

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FINDIKLARA UYGULANAN FİZİKSEL VE ISIL
SÜREÇLERİN AFLATOKSİNLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Yük. Kimyager Hayrettin ÖZER

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi : 14.10.2009
Tez Danışmanı : Prof. Dr. İnci Arısan ATAÇ (YTÜ)
Juri Üyeleri : Prof. Dr. Ayşe OGAN (MÜ)
: Prof. Dr. Ayşen YARAT (MÜ)
: Prof. Dr. Zühal Turgut (YTÜ)
: Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL (YTÜ)

İSTANBUL, 2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	i
SİMGE LİSTESİ	iii
KISALTMA LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL	4
2.1 Küfler	4
2.2 Mikotoksinler	8
2.2.1 Aflatoksinler.....	11
2.2.2 Aflatoksiinlerin oluşumu.....	14
2.2.2.1 Su aktivitesi ve güvenli depolama neminin aflatoksin oluşumu açısından önemi	15
2.3 Mikotoksinlerin İnsanlara Geçiş Yolu	17
2.3.1 Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri	18
2.3.2 Aflatoksinlerin insanlarda belirlenen etkileri	23
2.4 Türk Fındığı ve Aflatoksin.....	25
2.5 Aflatoksin Açısından Avrupa Birliği ve Türkiye	33
2.6 Türkiye’de ve Diğer Ülkelerde Fındıklarda Aflatoksin Limitleri	34
3 MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1 Materyal	38
3.1.1 Fındık işleme çalışmalarında kullanılan malzemeler	38
3.1.2 Örneklerde yapılan analizlerde kullanılan malzemeler	38
3.1.2.1 Kimyasallar ve Hazırlanışları	38
3.1.2.2 Alet Ekipman Tanımları	39
3.2 Yöntem.....	41
3.2.1 Pilot ölçekli uygulama (Aşama 1)	41
3.2.2 İşletme ölçekli uygulama	44
3.2.2.1 Fındık işleme tesislerinde uygulanan fiziksel işlemlerin (kıırma, boylama) aflatoksine etkisi (Aşama 2).....	44
3.2.2.2 Fındık işleme tesislerinde uygulanan ısı işlemlerin (beyazlatma, kavurma) aflatoksine etkisi (Aşama 3).....	57

3.2.3	Fındık örneklerinde aflatoksin analizi	57
3.2.3.1	Aflatoksin standardının hazırlanması	57
3.2.3.2	Kalibrasyon grafiği	54
3.2.3.3	Fındıklardan aflatoksinlerin ekstraksiyonu	56
3.2.3.4	İmmünoaffinite safhası ve enjeksiyon	56
3.2.3.5	Hesaplamalar	56
3.2.4	HPLC MS/MS kullanılarak kavurma işleminin fındıklardaki aflatoksine etkisinin araştırılması	57
3.2.4.1	Fındığın aflatoksijenik küf ile aşılması	57
3.2.4.2	Fındık örneklerinin kavrulması	57
3.2.4.3	Fındık örneklerinden aflatoksin ve muhtemel degradasyon ürünlerinin ekstraksiyonu	58
3.2.4.4	Örneklerin HPLC MS/MS'e enjeksiyonu	58
4	BULGULAR	59
4.1	Pilot Ölçekli Uygulamalar Sonrası Elde Edilen Bulgular (Aşama 1)	59
4.2	Fındık işleme tesislerinde uygulanan fiziksel işlemler (kırma, boylama, ayıklama) sonrası elde edilen bulgular (Aşama 2)	72
4.3	Fındık İşleme Tesislerinde Uygulanan Isıl İşlemler (Beyazlatma, Kavurma) Sonrası Elde Edilen Bulgular (Aşama 3)	78
4.3.1	Beyazlatma	78
4.3.2	Kavurma	85
4.4	HPLC MS/MS kullanılarak kavurma işleminin fındıklardaki aflatoksine etkisinin araştırılması çalışmasından elde edilen bulgular	93
5	SONUÇ VE TARTIŞMALAR	96
	KAYNAKLAR	101
	ÖZGEÇMİŞ	106

SİMGE LİSTESİ

<i>A</i>	Absorbans
<i>aw</i>	Su aktivitesi
<i>C</i>	Konsantrasyon
<i>cm</i>	Santimetre
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
<i>dk</i>	Dakika
ϵ	Molar absorptivite
<i>F</i>	Spektrofotometre faktörü
<i>g</i>	Gram
<i>kg</i>	Kilogram
<i>L</i>	Litre
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
<i>m</i>	Metre
<i>M</i>	Molekül ağırlığı
<i>m/z</i>	Kütle / yük oranı
<i>mg</i>	Miligram
<i>ml</i>	Mililitre
<i>mm</i>	Milimetre
<i>mmol</i>	Milimol
<i>ng</i>	Nanogram
<i>nm</i>	Nanometre
<i>ppb</i>	Milyarda bir (part per billion)
<i>S</i>	Residual standart sapma
$>$	Büyüktür
$<$	Küçüktür
$\sim$	Yaklaşık
$\%$	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

A. flavus	Aspergillus flavus
A. glaucus	Aspergillus glaucus
A. niger	Aspergillus niger
A. nomius	Aspergillus nomius
AB	Avrupa Birliği
AF	Aflatoksin
AOAC	Amerika Analitik Kimyacılar Organizasyonu (American Organization of Analytical Chemists)
CAC	Kodeks Alimentarius Komisyonu
CCCF	Gıda Maddelerinde Bulaşanlar Kodeks Komitesi
DTÖ	Dünya Ticaret Örgütü
DG SANCO	Sağlık ve Tüketici Koruma Genel Müdürlüğü
E-sorting	Elektronik sınıflandırma, lazerle sınıflandırma
EC	Avrupa Komisyonu
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Ofisi
EIS	Elektron Sprey İyonizasyon
FAO	Birleşmiş Gıda ve Tarım Örgütü
GE	Gıda Enstitüsü
Gua	Guanil
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
ICMSF	Gıdalarda Mikrobiyolojik Kriterler Uluslar arası Komisyonu
ISO	Uluslararası Standardizasyon Teşkilatı
IEC	Uluslararası Elektroteknik Komisyonu (Uluslararası elektrik, elektronik ve ilgili teknolojiler konusunda Standard Hazırlama Komisyonu)
LOD	Minimum tespit oimiti
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
MS	Kütle spektrometresi
MR	Misyon raporu
No	Numara
Ort	Ortalama
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi

RH	Bağıl nem
SBS	Sağlık ve Bitki Sağlığı
SSYB	Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı
TDI	Kabul edilebilir doz
TGK	Türk Gıda Kodeksi
Top	Toplam, Toplam Aflatoksin
TÜBİTAK	Türkiye Bilim ve Teknoloji Araştırma Kurumu
USD	Amerikan doları
UV	Ultra viyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Aspergillus flavus, petride	6
Şekil 2.2 Aspergillus flavus.....	6
Şekil 2.3 Aspergillus flavus, üç boyutlu görünümü	7
Şekil 2.4 Aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	13
Şekil 2.5 Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara geçiş yolları	18
Şekil 2.6 Aflatoksin B ₁ 'in vücuttaki metabolizması	21
Şekil 2.7 AFB ₁ -N ⁷ -Guanil kompleksi (Özkaya ve ark., 2003)	21
Şekil 3.1 Aşama 1 çalışma planı.....	43
Şekil 3.2 Aşama 2 çalışma planı.....	46
Şekil 3.3 Aşama 3 çalışma planı.....	47
Şekil 3.4 Aflatoksin B ₁ kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 3.5 Aflatoksin B ₂ kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 3.6 Aflatoksin G ₁ kalibrasyon grafiği.....	53
Şekil 3.7 Aflatoksin G ₂ kalibrasyon grafiği.....	53
Şekil 3.8 Aflatoksin standartları kromatogramı (B ₁ :0.422ppb, G ₁ :0.414ppb, B ₂ :0.092ppb, G ₂ :0.078ppb).....	54
Şekil 3.9 Aflatoksin standartları kromatogramı (B ₁ :1.265ppb, G ₁ :1.241ppb, B ₂ :0.275ppb, G ₂ :0.233ppb).....	54
Şekil 3.10 Aflatoksin standartları kromatogramı (B ₁ :2.108ppb, G ₁ :2.068ppb, B ₂ :0.458ppb, G ₂ :0.388ppb).....	55
Şekil 3.11 Aflatoksin standartları kromatogramı (B ₁ :2.951ppb, G ₁ :2.895ppb, B ₂ :0.641ppb, G ₂ :0.543ppb).....	55
Şekil 3.12 Aflatoksin standartları kromatogramı (B ₁ :3.794ppb, G ₁ :3.722ppb, B ₂ :0.824ppb, G ₂ :0.698ppb).....	56
Şekil 4.1 Aşılama akış şeması (~5-10ng/g düzeyinde).....	61
Şekil 4.2 Aşılama akış şeması (~20-30ng/g düzeyinde).....	61
Şekil 4.3 Doğal aflatoksinli fındık çalışması akış şeması (~84ng/g düzeyinde).....	62
Şekil 4.4 Aşılanmış fındıkların (~5-10ng/g) başlangıç örneğine ait kromatogram.....	63
Şekil 4.5 Aşılanmış fındıkların (~5-10ng/g) kavurma sonrası örneğine ait kromatogram	63
Şekil 4.6 Aşılanmış fındıkların (~5-10ng/g) zar atma sonrası örneğine ait kromatogram	64
Şekil 4.7 Aşılanmış fındıkların (~5-10ng/g) zar atma sonrası zarına ait kromatogram	64
Şekil 4.8 Aşılanmış fındıkların (~5-10ng/g) çürük örneğine ait kromatogram.....	65
Şekil 4.9 Aşılanmış fındıkların (~5-10ng/g) sağlam örneğine ait kromatogram.....	65

Şekil 4.10 Aşılınmış fındıkların (~20-30ng/g) başlangıç örneğine ait kromatogram	66
Şekil 4.11 Aşılınmış fındıkların (~20-30ng/g) kavurma sonrası örneğine ait kromatogram ..	66
Şekil 4.12 Aşılınmış fındıkların (~20-30ng/g) zar atma sonrası örneğine ait kromatogram...	67
Şekil 4.13 Aşılınmış fındıkların (~20-30ng/g) zar atma sonrası zarına ait kromatogram.....	67
Şekil 4.14 Aşılınmış fındıkların (~20-30ng/g) çürük örneğine ait kromatogram.....	68
Şekil 4.15 Aşılınmış fındıkların (~20-30ng/g) sağlam örneğine ait kromatogram.....	68
Şekil 4.16 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) başlangıç örneğine ait kromatogram	69
Şekil 4.17 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) kavurma sonrası örneğine ait kromatogram	69
Şekil 4.18 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) zar atma sonrası örneğine ait kromatogram	70
Şekil 4.19 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) zar atma sonrası zarına ait kromatogram	70
Şekil 4.20 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) çürük örneğine ait kromatogram.....	71
Şekil 4.21 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) sağlam örneğine ait kromatogram.....	71
Şekil 4.22 Kırma hattı örnekleme aşamaları ve aflatoksin analiz sonuçları	73
Şekil 4.23 Kırma işlemi, başlangıç örneğine ait kromatogram	74
Şekil 4.24 Kırma işlemi, kabuklu sağlam örneğe ait kromatogram	74
Şekil 4.25 Kırma işlemi, kabuklu çıtlak-kırık örneğe ait kromatogram	75
Şekil 4.26 Kırma işlemi, iç/gagal örneğe ait kromatogram	75
Şekil 4.27 Kırma işlemi, çürük örneğe ait kromatogram.....	76
Şekil 4.28 Kırma işlemi, boylanmış sağlam örneğe ait kromatogram.....	76
Şekil 4.29 Kırma işlemi, buruşuk örneğe ait kromatogram	77
Şekil 4.30 Beyazlatma Akış Şeması	80
Şekil 4.31 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, başlangıç örneğine ait kromatogram.....	81
Şekil 4.32 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, kavurma sonrası örneğe ait kromatogram.....	81
Şekil 4.33 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, beyazlatma sonrası örneğe ait kromatogram.....	82
Şekil 4.34 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, zar örneğine ait kromatogram.....	82
Şekil 4.35 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, e-sorting red örneğine ait kromatogram.....	83
Şekil 4.36 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, e-sorting kabul örneğine ait kromatogram.....	83

Şekil 4.37 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, elle ayıklama red örneğine ait kromatogram.....	84
Şekil 4.38 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, son örneğe ait kromatogram.....	84
Şekil 4.39 Az düzeyde kavurma (140-145°C) akış şemaları.....	87
Şekil 4.40 Orta düzeyde kavurma (150-155°C) akış şemaları	88
Şekil 4.41 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, başlangıç örneğine ait kromatogram..	89
Şekil 4.42 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, kavurma sonrası örneğe ait kromatogram.....	89
Şekil 4.43 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, zar atma sonrası örneğe ait kromatogram.....	90
Şekil 4.44 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, zar örneğine ait kromatogram	90
Şekil 4.45 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, e-sorting red örneğine ait kromatogram.....	91
Şekil 4.46 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, e-sorting kabul örneğine ait kromatogram.....	91
Şekil 4.47 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, elle ayıklama red örneğine ait kromatogram.....	92
Şekil 4.48 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, son örneğe ait kromatogram.....	92
Şekil 4.49 100ppb Aflatoksin B ₁ standardı kütle spektrumu (50-500 m/z)Ş.....	93
Şekil 4.50 Aflatoksin B ₁ içermeyen fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z).....	94
Şekil 4.51 Aflatoksin B ₁ içermeyen kavrulmuş fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z)	94
Şekil 4.52 Aflatoksin B ₁ içeren fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z)	95
Şekil 4.53 Aflatoksin B ₁ içeren kavrulmuş fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z)	95
Şekil 5.1a Fındık örneklerinde ısıtıl işlem ve elle ayıklama sonrası aflatoksin dağılımı.....	98
Şekil 5.1b Fındık örneklerinde ısıtıl işlem ve elle ayıklama sonrası aflatoksin dağılımı	98
Şekil 5.2 Aflatoksin B ₁ 'in kavurma işlemi sonrasındaki muhtemel bozulma ürünleri	100

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Küflerin mikotoksin üretebilme potansiyelleri ile ilgili yapılan çalışmalar	5
Çizelge 2.2 Mikotoksinlerin üründe gelişip mikotoksin oluşturmalarını etkileyen faktörler	9
Çizelge 2.3 Dünyada yaygın olarak rastlanılan mikotoksin üreticisi küfler ve oluşturduğu mikotoksinler.....	10
Çizelge 2.4 2001–2009 Türkiye fındık üretim, tüketim ve ihracatı	25
Çizelge 2.5 Aylık bazda Türkiye'nin son 3 sezonda yaptığı fındık ihracatının miktar ve tutarları.....	26
Çizelge 2.6 01.01.2008–31.12.2008 tarihleri arasında Türkiye'nin fındık ihracatı yaptığı ilk 10 ülke (Kg/USD)	27
Çizelge 2.7 Çeşitli gıdalar için Türkiye'deki aflatoksin limitleri.....	37
Çizelge 3.1 Firmalardan yapılan örnekleme çalışmaları.....	45
Çizelge 3.2 Aflatoksinlerin molekül ağırlığı (M) ve molar absorptivite (E)	49
Çizelge 3.3 Çalışma standartlarının hazırlanması	50
Çizelge 3.4 Kalibrasyon grafiğinde kullanılan standartların konsantrasyonları	51
Çizelge 3.5 Kalibrasyon grafiğinde kullanılan standartların konsantrasyonları ve alanları	51
Çizelge 4.1 Aşılınmış fındıkların (~5-10ng/g düzeyinde) kavurma öncesi ve sonrasında aflatoksin düzeyleri	60
Çizelge 4.2 Aşılınmış fındıkların (~20-30ng/g düzeyinde) kavurma öncesi ve sonrasında aflatoksin düzeyleri	60
Çizelge 4.3 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g düzeyinde) kavurma öncesi ve sonrasında aflatoksin düzeyleri	60
Çizelge 4.4 Fındık kırma işlemi sonrası aflatoksin analiz sonuçları	72
Çizelge 4.5. Beyazlatma işlemi (120-125°C, 30-40 dk) sonrası fındık örneklerinde aflatoksin düzeyleri.....	79
Çizelge 4.6 Az (140-145°C, 30-40 dk) ve Orta Düzeyde (150-155°C, 30-40 dk) kavurma işlemi sonrası fındık örneklerinde aflatoksin düzeyleri	86

ÖNSÖZ

Bu tez ülkemizin önemli ihraç ürünlerinden fındığın ihracatında karşılaşılan en önemli sorun olan aflatoksin kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla fındıkların işlenmesi sırasındaki bazı basamakların fındıklardaki aflatoksinler üzerine etkisi hakkında hazırlanmıştır. Çalışma sonunda ülkemizdeki fındık işleme kuruluşlarının yanında başta Avrupa olmak üzere tüm dünyadaki fındık işleme işletmelerinde uygulanabilecek sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmaları boyunca gerek fındık işleme firmalarının yardımıyla sanayi ölçekli denemeler, gerekse TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü'nde yer alan makinalardan faydalanılarak pilot ölçekli denemeler gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde başta danışmanım Prof. Dr. İnci Arısan ATAÇ olmak üzere, TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Müdürü Doç. Dr. Güner ÖZAY'a, çok önemli destekleriyle tüm deneylerin ve uygulamaların gerçekleştirilmesini sağlayan TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü çalışanlarından Dr. Ferda SEYHAN, Ceyda Pembeci KODOLBAŞ, Nihat ÖZCAN, Elmas ÖKTEM, Ömer Ethem ÖZSOY, Basri ÇIRAK, Özcan KUBAT, Serdar YÜCEL ve Doç. Dr. Cesarettin ALAŞALVAR'a, tüm doktora çalışmam boyunca benden desteğini esirgemeyen ve tüm çalışmalarında bana yardımcı olan eşim Banu ÖZER'e teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanmasında Fındık Tanıtım Grubu tarafından desteklenen 5074118 nolu "Fındık İlave İşleme Süreçlerinin (Further Processing) Aflatoksin Üzerine Etkisi" projesinin sonuçlarından faydalanılmıştır.

ÖZET

Fındıklardaki aflatoksin kontaminasyonu birçok üretici ülke için ciddi bir problemdir. Küf oluşumunun ve aflatoksin üretiminin fındık üretim ve işleme aşamasında önlenmesi anahtar çözümdür. Olgunlaşma döneminde küf bulaşıklığını azaltmak için yapılan bahçede yapılan “İyi Tarım Uygulamaları” ve hasat ve hasat sonrası dönemde kontaminasyonu önlemek için yapılan “Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktası” uygulamaları aflatoksin bulaşma riskini azaltmaktadır.

Bu çalışmada fındıklara uygulanan ilave işlemlerin (kavurma, zar atma ve ayırma) fındıktaki aflatoksin kontaminasyonunu azaltıcı etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aflatoksinlerin fındıklarda düşük konsantrasyonlarda bulunması ve dağılımının heterojen olması sebebiyle, doğal kontamine fındıkların yanında yapay olarak belirli düzeylerde (10µg/kg ve 20µg/kg) aflatoksin içerecek şekilde toksijenik küf (*Aspergillus flavus*) inokule edilmiş fındıklar da kullanıldı. İşlemenin aflatoksinlere etkisini belirlemek için aflatoksinlerle doğal kontamine olmuş fındıklar fındık işleme firmalarında genel uygulamalarla (kavurma, zar atma, mekanik ayırma ve elle ayırma) işlendi, yapay olarak kontamine edilmiş fındıklar TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Pilot Tesisleri’nde kavurma (120-125°C’de 30 dakika), zar atma ve elle ayırma işlemlerine tabi tutuldu.

İşlemenin aflatoksin kontaminasyonuna etkisini belirlemek için her işleme basamağından önce ve sonra numune alındı ve numuneler aflatoksin içeriğini belirlemek üzere HPLC (Flüoresans dedektör) ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre kavurma elle ayırma mekanik ayırma ve zar atma gibi işlemlerin fındıklardaki aflatoksin kontaminasyonunu azalttığı ve her işlem basamağından sonra Aflatoksinlerin zarda ve reddedilen fındıklarda (zarar görmüş, ayrılmış) yoğunlaştığı görülmüştür. İşlemeden sonra fındıkların aflatoksin kontaminasyonundaki ortalama azalma %98 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, fındık, kavurma, işleme

EFFECT OF PHYSICAL AND THERMAL PROCESSES ON AFLATOXINS IN HAZELNUT

ABSTRACT

Aflatoxin contamination of hazelnuts is a serious problem for many producing countries. Prevention of mould growth and aflatoxin production throughout the hazelnut production and processing chain is the key solution. The application of “Good Agricultural Practices” in orchards to reduce mould infection during the growing stage and “Hazard Analysis and Critical Control Point” approach to prevent contamination during harvest and postharvest stages results in minimization of aflatoxin risk.

In this study, it was aimed to determine the effect of further processing (roasting, blanching and sorting) on reduction of aflatoxin contamination in hazelnuts. Artificially toxigenic mould (*Aspergillus flavus*) inoculated hazelnuts at certain aflatoxin levels (10µg/kg and 20µg/kg) and naturally aflatoxin contaminated hazelnut lots were used because of constraints due to the fact that aflatoxin contamination tends to be low and distribution of contaminated kernels is extremely heterogeneous. Artificially infected lots were roasted (30 minutes at 120-125 °C), blanched and hand sorted in the pilot plant, while naturally aflatoxin contaminated hazelnut lots were processed using the industrial processing facilities according to the general applications prior to marketing (roasting, blanching, mechanical and hand sorting) to evaluate aflatoxin reductions achieved through processing.

Samples were taken and analyzed by HPLC with fluorescence detection for aflatoxins before and after each processing stages to demonstrate the effect of each process on the reduction of aflatoxin contamination. As a result, further processing such as roasting, hand and/or mechanical sorting and blanching consistently reduces aflatoxin contamination in hazelnuts. After each processing step, aflatoxins were concentrated in the hazelnuts contained in the skin and reject streams (pick-outs, damaged kernels). The average reduction of aflatoxin contamination in hazelnut after processing was 98%.

Keywords: Aflatoxin, hazelnut, roasting, processing

1. GİRİŞ

Avrupa Birliği (AB) gümrükleri hızlı gıda uyarı sisteminden 2001 yılında, 10 üye devlet tarafından Türkiye'den ithal edilen incirler için 16 ve fındıklar için 4 kez aflatoksin limitini aştığını gösteren uyarı yapılmıştır. 2002 yılında ise 11 üye devletten incir için 23 ve fındık için 62 uyarı mesajı alınmıştır. Yaşanan bu tür sorunlar nedeniyle Türkiye'de aflatoksin limitlerine uyum ile ilgili çeşitli yasal düzenlemeler getirilmesine karar verilmiştir.

AB Komisyonu 2002 yılında aldığı bir kararda; Türkiye orijinli kurutulmuş incir, fıstık ve daha az miktarda da fındıklarda aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin kontaminasyonu bulunduğu, bu ürünlerde Türkiye'den ayrılmadan önce aflatoksin miktarlarının tespit edilmesi gerektiği ifade edilmişti (DG SANCO / 1256/2000 MR Final). 1 Mart 2002'den itibaren AB ülkelerine ihraç edilecek her parti fındıktan numune alınarak analize tabi tutulmakta ve AB limitlerine uygun olması durumunda Sağlık Sertifikası düzenlenerek ihraç edilmektedir. AB dışındaki diğer dünya ülkeleri de aynı sistemle ithalat yapmaya başlamışlardır (Akpınar ve ark. 2008).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) bünyesinde 1963 yılında kurulan Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC) bünyesinde (Gıda Maddelerinde Bulaşanlar Kodeks Komitesi - CCCF); ülkemiz üretim ve ihracatı açısından önemli bir yere sahip olan fındık, antepfıstığı ve kuru incir ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir. Bu ürünlerin özellikle AB'ye ihracatındaki sorunların başında AB'nin düşük aflatoksin limitleri gelmektedir. 2004 yılından beri CAC'da sürdürülen bu çalışmalar sırasında fındık ve antepfıstık için aflatoksin limitlerinin işlenmemiş ve işlenmiş olmak üzere ayrı ayrı belirlenmesi gerektiği vurgulanmıştır. Böylece fındıklara uygulanan fiziksel ve ısıtma süreçlerinin aflatoksinler üzerine etkisinin önemi gündeme gelmiştir.

Bugüne kadar fındık dışındaki aflatoksin riski içeren çeşitli sert kabuklu meyvelerdeki (badem, fıstık) ilave işleme süreçlerinin üründeki aflatoksin kontaminasyonuna etkisi ile ilgili çalışmalar yürütülmüş olmasına karşın fındık için bu konuda kapsamlı bir bilimsel çalışma yapılmamıştır.

Sıcaklık, bağıl nem gibi bir çok çevresel faktörün aflatoksin oluşumuna etki ettiği bilinmektedir (Ozay ve ark., 2008, Northolt ve ark., 1976; Chiou ve ark., 1984; Denizel ve ark., 1976a,b). Sert kabuklu meyvelerde kabuk küflere ve diğer mikroorganizmalara karşı iyi bir bariyer olmakla birlikte (Bayman ve ark., 2002; Campbell ve ark., 2003); kabuğun böcek veya diğer faktörlere bağlı olarak zarar görmesi, toprak ile temas, depo koşulları, kurutma

sırasında sıcaklık ve bağıl nem gibi faktörlere bağlı olarak aflatoksin oluşumu ve bulaşma düzeyi artabilmektedir. Aflatoksin riskini azaltmanın en etkili yolu gıdaların toksijenik küflerle bulaşmasının ve toksin üretiminin engellenmesidir. (Magan ve Olsen, 2004; Barung ve ark., 2006). Bulaşmanın olduğu gıda maddesinin bileşimi (Sakai ve ark., 1984), depolama süresi, böceklerden kaynaklanan hasarlar, kabuğun zarar görmesi küf gelişimini ve toksin oluşumunu etkileyen diğer faktörleridir. (Schatzki ve Ong, 2001; Campbell ve ark., 2003). Bu faktörlerin etkileşimi küf gelişimi ve toksin oluşumu üzerine farklı sonuçlar doğurabilmektedir. Bu nedenle toksin oluşumundan sonra bulaşık tanelerin diğer tanelerden ayırt edilebilmesi ve uzaklaştırılması farklı aşamalara bağlı olacaktır. İlave işlemlerin sert kabuklu meyvelerde aflatoksin riskini azaltıcı etkisi üzerine fıstıklarda (Schatzki ve Pan, 1996, 1997) ve bademlerde (Almond Board Report Summary, 2002) kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

Amerika'da fıstık işleme İyi Üretim Uygulamaları (GMP) kurallarına göre yapılmakta ve mekanik hasat yapılarak fıstıkların toprakla teması kesilmektedir. Amerika'da işlenen fıstıklarda aflatoksin oluşumunun tamamen bahçede olduğu ve işleme sırasında artmadığı gözlenmiştir (Schatzki ve Pan, 1996). Yine Schatzki ve Pan (1997) tarafından yapılan çalışmaya göre küçük fıstıklarda aflatoksin dağılımı incelendiğinde, aflatoksin oranı 8ng/g olarak tespit edilmiş ve ayıklanmamış fıstıklardan 5-7 kat daha fazla toksin içerdiği saptanmıştır. Tüm bu çalışmalar hasat sırasında aflatoksin riski taşıyabilecek ürünlerin ayıklanmasının yüksek önemini ortaya koymaktadır. Hasat ve hasat sonrası işlemlerin aflatoksin oluşmasında ve dağılımındaki etkileri Schatzki ve arkadaşları tarafından 1995 yılından itibaren çalışılmış ve bir dizi makale olarak yayınlanmıştır. (Schatzki ve Pan, 1996; Schatzki ve Pan, 1997; Schatzki ve Ong 2001). 1981-1991 döneminde yapılan çalışmalarda, hasat ve işleme koşullarının iyileştirilmesi ile fıstıklarının aflatoksin seviyesi 10ng/g'dan 1.5ng/g'a düşürülmüştür. Ayrıca hasat sırasında kaliteli ürün için fıstıkların ayıklama işleminden geçirilmesi bulaşma riskini 2-4 kat azaltmıştır (Schatzki, 1995a ve b). Yapılan çalışmalarda aflatoksinli tanelerin %90'ının %4.6 düşük kaliteli ürünlerden kaynaklandığı ve bu tür ürünlerin ayrılmasının aflatoksin oranını 10 kat azalttığı sonucuna varılmıştır.

Badem Komisyonu (Almond Board) tarafından bademlerle ilgili olarak yürütülen çalışmada ise aflatoksin düzeyinden bağımsız olarak beyazlatma, elle veya mekanik olarak ayıklama gibi ilave işlemlerin uygulanması ile bademlerde aflatoksin miktarının %97 azaltılabileceği ve aflatoksinli ürünlerin daha çok çürük ve hasarlı ürünlerde ve beyazlatma sonrası badem zarında yoğunlaştığı tespit edilmiştir (Almond Board Report Summary, 2002).

Fiziksel işlem veya ayıklama işlemi sonrasında aflatoksin düzeyindeki azalma ile ilgili çalışmalar yerfıstıkları, ceviz, badem ve fıstıklarla ilgili olarak yapılmış olmasına rağmen fındıklarda şu ana kadar bilimsel bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmada aflatoksin ile doğal kontamine ve yapay olarak kontamine edilmiş fındıklarla çalışılmıştır. Ayrıca hem endüstriyel ölçekli işleme tesisleri kullanılmış hem de pilot ölçekli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile işletmelerde fındığa uygulanan boylama, elle ayıklama, beyazlatma ve kavurma işlemleri gibi fiziksel ve ısı işlemlerin mevcut aflatoksini azaltıcı etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL

2.1 Küfler

Küfler çok hücreli ve miselli morfolojiye sahiptirler. 30-110 µm çapındaki tübüller hücrelerden oluşurlar ve çeşitli renklerdeki yapısı ile karakterizedir (Şekil 2.1, 2.2, 2.3). Küfler havada bulunan birçok ince spordan gelişirler. Bu mikroorganizmalar genellikle bakteriler ve mayalardan daha büyük pH değişiminde bulunabilmekte ve daha büyük sıcaklık varyanslarına sahiptirler. Bundan dolayı en çok sevdikleri pH 7 civarında olup, 2-8 aralığını da tolere edebilir. Küfler normal oda sıcaklığından soğuğa nazaran daha fazla hoşlanırlar ve 90 civarındaki minimum su aktivitesine izin verirler, az miktardaki ozmofilik küfler 60 kadar düşük su aktivitesinde bile gelişebilirler. 90 veya üzeri su aktivitesinde bakteri veya maya daha efektif olarak gelişirler ve küflerden daha fazla gelişebilmek için var olan besinleri kullanırlar. Su aktivitesi 90 civarına geldiğinde küfler rahatlıkla gelişirler. Düşük nem içeriğine sahip olan gıdalardan unlu mamuller, peynirler ve kuru yemişler küf gelişimi ile çok fazla bozulurlar (Marriott, 1995).

Tarımsal ürünlerin üretimden hasat, depolama ve tüketimine kadarki evrelerde küfler tarafından meydana getirilen zararlanmalar önem taşımaktadır. Tarımsal ürünlerin ve gıdaların küflerle kontamine olmaları sonucunda sağlık problemlerinin yanısıra kalite ve ekonomik kayıplar da meydana gelmektedir. Yapılan tahminlere göre dünya genelinde üretilen gıda ve diğer tarımsal ürünlerin %5-10'u küfler tarafından insan ve hayvanların tüketemeyecekleri düzeyde bozulmaya uğratılmaktadır. Bunun neden olduğu ekonomik kayıplar sadece Avustralya için 10 milyon USD ve dünya geneli için tahmini 16 milyar USD olarak bildirilmektedir (Pitt ve Hocking, 1985).

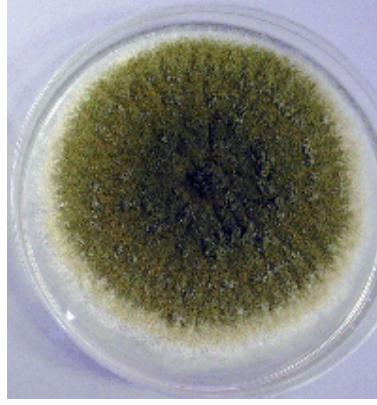
Küflerin tarımsal ürün ve gıdalarda meydana getirdikleri zararlanmalar, konidial gelişmeleri veya sebep oldukları oksidasyon sonucu oluşturdukları renk değişimi, dane ve ürün hasarları, çeşitli enzimatik ve oksidatif reaksiyonlara sebep olması sonucu ortaya çıkan zararlardır. Fakat bütün bunların yanısıra sağlık açısından en önemli zararı uygun ortamlarda üretmiş oldukları ikincil metabolitlerinden “mikotoksin” adı verilen toksinlerdir (Moreu, 1979).

Küflerin toksik karakterleri öncelikle genetik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Genellikle küflerin ürettikleri toksinler özgün toksinlerdir yani her küf her toksini üretmez. Ancak yine de kesin sınırlamaya gitmek doğru olmayabilir. Çünkü bir küfün bazı zamanlarda birden fazla toksini sentezlemesi söz konusudur (Wyllie and Morehouse, 1977; Ciegler and Kadis, 1971).

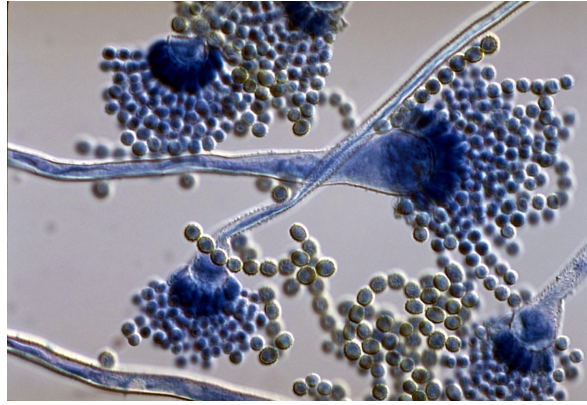
Küflerin mikotoksin üretebilme potansiyelleri ile ilgili çeşitli gıdalarda yapılan çalışmalarda (Çizelge 2.1) toksin üretebilen küf oranının gıdanın özelliğine bağlı olarak çeşitli ürünlerde %5,7-55 arasında olduğu yapılan araştırmalar tarafından belirtilmektedir (Munimbazi, C., ve ark. 1996, Vazquez Belda, B., ve ark. 1996, Doster, M.A., ve ark. 1994, Freitas Costa, ve ark. 2002, Jayaraman, P; ve ark. 1990, Kamphuis, H.J, ve ark. 1992).

Çizelge 2.1 Küflerin mikotoksin üretebilme potansiyelleri ile ilgili yapılan çalışmalar

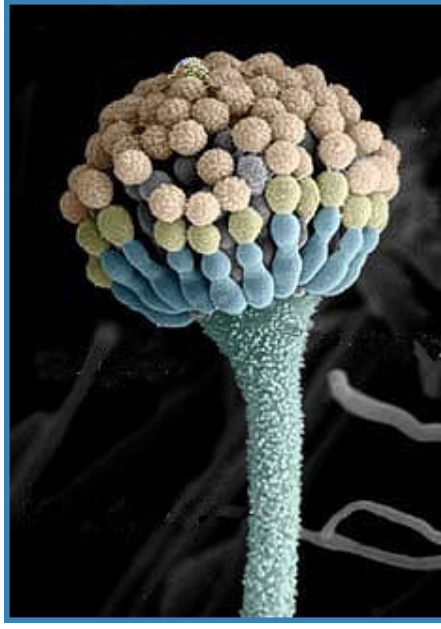
Gıda Maddesi	İsolasyon Adedi	Rastlama Yüzdesi	Kaynak
Burundi'den çeşitli gıdalar	95 izolasyon	%38,9-A. <i>Flavus</i> %100-A. <i>Paraciticus</i>	Munimbazi, C., ve ark. 1996
Arzua'da peynir yapım birimleri	120 Aspergillus türü	%19	Vazquez Belda, B., ve ark. 1996
California fıstıkları	11 Aspergillus sp.	%65	Doster, M.A., ve ark. 1994
Brezilya kahvesi		% 24.6 mikotoksin %13.1 aflatoksin	Freitas Costa, ve ark. 2002
Pirinç kepeği	34 örnek	%55,2 toksijenik	Jayaraman, P; ve ark. 1990
Mısır	35 örnek	%5,7	Kamphuis, H.J, ve ark. 1992



Şekil 2.1 Aspergillus flavus, petride (http://www.moldbacteria.com/Aspergillus_flavus.gif)



Şekil 2.2 Aspergillus flavus
(http://www.pfdb.net/photo/mirhendi_h/box020909/standard/a_flavus_s.jpg)



Şekil 2.3 *Aspergillus flavus*, üç boyutlu görünümü
(<http://www.iaqm.com/images/pics/Aspergillus1.jpg>)

2.2 Mikotoksinler

Mikotoksinler küf hifleri ve sporları içerisinde oluşturulan ve üzerinde bulunduğu ürün ve gıda maddesine salgılanabilen, küçük molekül yapısına sahip bileşiklerdir. Mikotoksinler ikincil, yani “sekonder metabolitler” olup, küfün vejetatif gelişiminin sonunda oluşturulurlar.

Küfler, gıdaların protein, yağ ve karbonhidratlarını enzimatik faaliyetlerle parçalayarak gıdanın dokusunu değiştirmekte, yağ içeriğinin azalmasına, serbest yağ asiti miktarının artmasına, proteinlerin parçalanmasına, amino asit bileşiminde değişime, renk değişimine, kötü koku oluşmasına, tat değişimlerine ve ağırlık kaybına yol açmaktadır.

Mantarlar, hasar görmüş dokular üzerinde daha kolay geliştiğinden bitkiyi buralardan kolayca etkilemektedir. Mantarlar bu şekilde bitki dokularını fiziksel olarak yaralamak suretiyle gıdalara zarar verdikleri gibi, salgıladıkları mikotoksinlerle de bu gıdalarla beslenen insan ve hayvanlara zarar verebilirler.

Ürün üzerinde küf üremesi mutlaka toksin üreteceği anlamına gelmemektedir. Çünkü küflerin tümü mikotoksin üretmemektedir ve mikotoksinler, gıda ve yem maddesine daha önceden bulaşmış küfler tarafından ancak uygun fiziksel ve çevresel koşullar bulunduğunda üretilmektedir. Bununla birlikte ürün üzerinde küfe rastlanılmaması o üründe daha önceden mikotoksin oluşmadığı anlamına da gelmemelidir Çünkü oluşan mikotoksin, ürün üzerinde küf öldükten veya uzaklaştırıldıktan sonra bile uzun süre kalabilmektedir. Mikotoksin oluşumunu tek başına veya birlikte etkileyen faktörlerden en önemlileri, küfün cinsi yani toksin üreten bir küf olup olmadığı, küfün ürüne bulaşma miktarı, ürünün olgunluk durumu, ürünün bileşimi, ürünün nem içeriği, ortam sıcaklığı ve depolama koşullarıdır. Mikotoksinlerin üründe gelişip mikotoksin oluşturmalarını etkileyen faktörler Çizelge 2.2’de şeklinde gösterilmiştir. Günümüzde 300 civarında mikotoksinin varlığı tespit edilmiş olup, 350 kadar küf türünün bu mikotoksinleri oluşturduğu bilinmektedir.

Çizelge 2.2 Mikotoksinlerin üründe gelişip mikotoksin oluşturmalarını etkileyen faktörler

Fiziksel Faktörler	Kimyasal Faktörler	Biyolojik Faktörler
Kurutma hızı	CO ₂ ,	Mikroorganizma yükü
Bağıl nem	O ₂	Mikrobiyal flora
Sıcaklık	Mineral içeriği	Böcek zararı
Mekanik zarar	Kimyasal işlemler	Hastalık zararı
Paçal yapılması	Substratın özelliği	Bitki çeşidi
Kızışma		Bitki stresi

Bir gıda da, bazen daha hammadde iken tarlada veya bahçede, hammaddeyi satın alarak belirli süre depolayan araçlarda, gıdaların işlenmesi sırasında, perakende satış noktalarında ve/veya evlerde depolama sırasında doğal olarak veya yanlış uygulamaların bir sonucu olarak küfler gelişip çoğalabilmekte ve mikotoksin üretebilmektedir.

Belirli bir küf türü birden fazla farklı mikotoksin oluşturabilmekte ve bir çeşit mikotoksin farklı küfler tarafından üretilmektedir. Mikotoksin üreticisi olduğu bilinen ve dünyada en yaygın rastlanılan küf türleri *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri içinde yer almaktadır. Sözü edilen küflere sıklıkla yağlı tohumlar, mısır, baklagiller, bazı baharatlar, arpa ve en çok da fındık, fıstık gibi kabuklu meyvelerde rastlanmaktadır. Dünyada yaygın olarak rastlanılan mikotoksin üreticisi küfler ve oluşturduğu mikotoksinler Çizelge 2.3’de verilmiştir. (Akpınar, Teknik rapor)

Çizelge 2.3 Dünyada yaygın olarak rastlanılan mikotoksin üreticisi küfler ve oluşturduğu mikotoksinler

KÜFLER	OLUŞTURDUĞU MİKOTOKSİNLER
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksin, aflatrem, siklopiazonik asit
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoksin
<i>Aspergillus clavatus</i>	Patulin, sitokalsin E, tryoquivaline
<i>Aspergillus niger</i>	Malformin, okzalik asit
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Okratoksin, penisilik aist
<i>Fusarium culmorum</i>	Trikotesen, zearelenon
<i>P. verrucosum</i> var. <i>Cyclopium</i>	Penitrem A, siklopiazonik asit, penisilik aist, okratoksin
<i>P. verrucosum</i> var. <i>Verrucosum</i>	Okratoksin, sitrinin, viridicatum, xanhomegnin
<i>Penicillium citrinum</i>	Sitrinin

Türkiye’de yakın zamanda yapılan bir çalışmada da, çoğunlukla Çizelge 2.3’deki küf cinslerine ait türlerin bulunduğu, 819 küf türünün %16’sının mikotoksin üretme özelliğinde olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise, Karadeniz bölgesine ait 61 adet fındık örneğinin 44 adetinde (% 72.13) *Aspergillus spp.*, 33 adedinde (% 54.09) *Penicillium spp.* ve 6 adedinde (% 9.83) de *Fusarium spp.* tesbit edilmiştir (Taydaş, Teknik Rapor).

2.2.1 Aflatoksinler

Aflatoksinler dünyada en çok bilinen ve en çok araştırılan mikotoksinlerdir. Aflatoksinler dünyanın her yerinde çiftlik hayvanları, evcil hayvanlar ve insanlarda aflatoksikosis gibi çeşitli hastalıklarla ilgilidir. Aflatoksinlerin oluşmaları bazı çevresel faktörlere bağlıdır; bu nedenle kontaminasyonun miktarı coğrafi yerleşime, tarımsal ve bilimsel tarımsal çalışmalara ve hasat, depolama ve/veya işleme esnasında küflerin saldırısına karşı ürünlerin hassasiyetine göre değişir.

Aflatoksinlere hassas laboratuvar hayvanlarına karşı potansiyel kansorejen olmasından ve insanlara karşı akut toksikolojik etkilerinden dolayı diğer mikotoksinlere nazaran daha fazla ilgi duyulmaktadır. Kesin bir güvenlik elde edilmesinin imkansız olduğu anlaşıldıktan sonra, birçok ülke aflatoksin riskini sınırlamak amacıyla gıda ve yem olarak kullanılacak ürünlerde katı düzenlemelere başvurmuştur.

1960 yılında İngiltere'de kanatlı hayvan çiftliklerinde 100.000'den fazla hindinin ölmesi ile yeni bir hastalık adlandırılmıştır; "Hindi X hastalığı". Daha sonradan bu durumun sadece hindilerle sınırlı olmadığı da anlaşılmıştır. Yavru ördekler ve genç sülünler de bu olaydan etkilenmiş ve ağır ölümler gözlenmiştir. Yapılan yoğun araştırmalar göstermiştir ki bu ölümler Brezilya'dan ithal edilen ve yeme katılan yer fıstığı küspesi ile ilişkilidir. Daha sonra yapılan çalışmalarda aflatoksinlerin birçok gıda maddesinde oluştuğu belirlenmiştir (Taydaş, Teknik Rapor).

1960'da toksinin yapısı itibariyle, fungal kaynaklı olabileceği ortaya atılmıştır. Toksin oluşturan küf *Aspergillus flavus* (1961) olarak tespit edilmiş ve toksine kaynağından dolayı Aflatoksin (*A. flavus* + toksin) ismi verilmiştir. Bu buluş ile insanlarda ve diğer memelilerde hastalıklara ve hatta ölüme bile neden olan ve gıda veya yemlerde kontaminant olarak bulunan bu potansiyel zararlı maddelerin farkına varılmıştır.

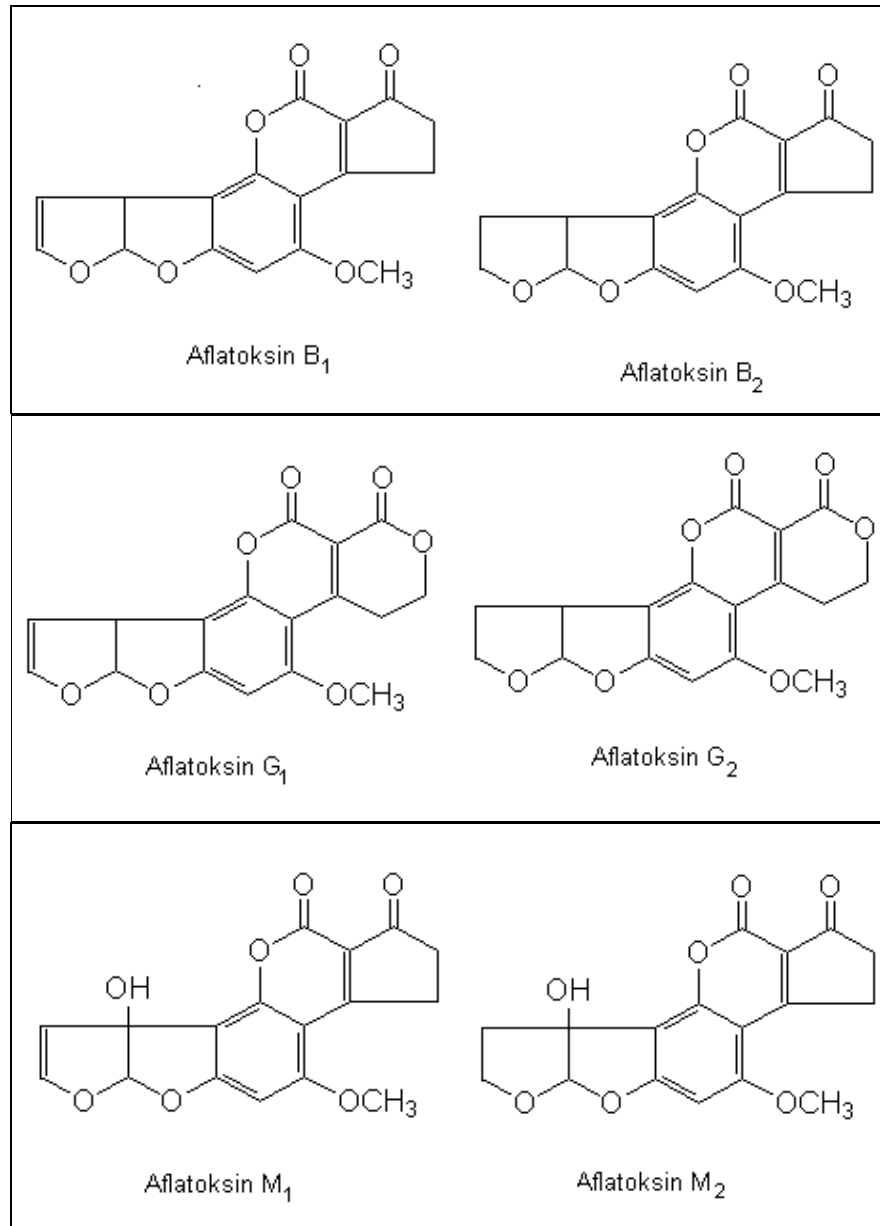
Ülkemiz açısından aflatoksin sorunu 1960'lı yıllarda gündeme gelmiştir. Aflatoksin sorunu 1967 yılında Kanada'ya gönderilen 10 ton iç fındığın, 1971 yılında da ABD'ye ihraç edilen 45 parti antepfıstığının 31 partisinin aflatoksin içerdiği gerekçesiyle geri çevrilmesi sonucu ortaya çıkmıştır (Heperkan, 2005).

Çalışmalar göstermiştir ki, aflatoksin öncelikle ve çoğunlukla *A. Flavus* 'un bazı suşları tarafından üretilmektedir, ayrıca *A. Parasiticus* 'un tüm suşları üretmektedir. Başlıca dört adet aflatoksin vardır: B₁, B₂, G₁, G₂. B₁ ve B₂ aflatoksinleri UV ışığı altında mavi flüoresan vermelerinden, G₁ ve G₂ aflatoksinleri ise yine UV ışığı altında sarı-yeşil

flüoresan vermelerinden dolayı, farklı yapılara sahiptir. Buna ek olarak, iki metabolik ürün olan aflatoksin M_1 ve M_2 de gıda ve yemlerin direk kontamine olduklarının göstergesidir. Bu aflatoksinler ilk kez aflatoksinli yemlerle beslenen hayvanların sütlerinden izole edilmişlerdir ve bundan dolayı M olarak gösterilmişlerdir.

Bu toksinler birbirlerine çok benzer yapılara sahiptirler ve yüksek derecede oksijenlenmiş biçimde benzersiz bir gruptur, doğal olarak heterosiklik bileşiklerden meydana gelirler. Toksik A.flavus kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden aflatoksin B_1 ve daha az olarak da aflatoksin G_1 sorumludur. Bu durum, her iki toksinin terminal furan halkasının 8, 9 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Groopman ve ark., 1988). Aflatoksin B_2 , B_1 'in, aflatoksin G_2 de G_1 'in dihidro türevleridir (Betina, 1989) ve “in vivo” koşullarda metabolik olarak B_1 ve G_1 'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler (Groopman ve ark., 1988). Aflatoksin M_1 ve M_2 , aflatoksin B_1 ve B_2 'nin hidroksi türevleridir, aflatoksin M_2 aynı zamanda, dihidro-aflatoksin M_1 'dir (Şekil 2.4). Aflatoksin B_1 ve G_1 'in hemiasetal türevleri olan aflatoksin B_{2a} ve G_{2a} da, A.flavus'un doğal metabolitleri olarak izole edilmişlerdir. Bu türevler, aflatoksin B_1 ve G_1 'in asit ortamda hidroksillenmesi ile de elde edilmektedir ve bu özellikten aflatoksin B_1 ve G_1 'in doğrulanmasında yararlanılmaktadır (Betina, 1989).

Aflatoksinler, metanol, kloroform ve diğer birçok organik çözücünde çözünebilmektedir. Ancak sudaki çözünürlükleri azdır (10-30 $\mu\text{g/mL}$). Toksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B_1 ve B_2 için 425 nm de; aflatoksin G_1 ve G_2 için ise 450 nm de floresan emisyonu oluştururlar. Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde çok stabildir, ancak çok düşük veya yüksek pH'larda (3'den az ve 10'dan büyük), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler (Groopman ve ark., 1988).



Şekil 2.4 Aflatoksinlerin kimyasal yapıları

2.2.2 Aflatoksinlerin oluşumu

Aflatoksin sıklıkla hasattan önce tarlada ekinlerde oluşur. Eğer ekinin kurutulması aksatılırsa ve depolama esnasında küf gelişimi için su miktarının kritik değerleri aşılsa hasat sonrası kontaminasyonu gözlenir. Böcek ve kemirgen istilas da bazı depolanmış ürünlerde küf gelişimini kolaylaştırır.

Aflatoksinler genellikle sütte, peynirde, mısırdaki, fıstıkta, pamuk tohumunda, fındıkta, bademde, incirde, baharatlarda ve diğer gıda ve yem çeşitlerinde gözlenir. Süt, yumurta ve et ürünlerinin de bazen aflatoksin bakımından kontamine olmaları hayvanların aflatoksin içeren yemlerle beslenmesi sonucu gözlenir.

Küf gelişimi ve aflatoksin kontaminasyonu, küflerin çevreyle etkileşimin sonucudur. Bu faktörlerin uygun kombinasyonu ile istila ve substratın kolonizasyonu ve üretilecek olan aflatoksinin tipi ve miktarı tespit edilebilir. Bununla beraber, toksin oluşumunu tam olarak neyin başlattığı iyi bilinmemesine rağmen, küf gelişimi için uygun bir substrat gereklidir. Küf istilas ve toksin üretimi için su, yüksek sıcaklık ve bitkinin böcekler tarafından zarar görmesi başlıca belirleyici faktörlerdir. Benzer olarak küf gelişimini ve toksin oluşumunu, özel ekin büyüme aşamaları, zayıf gübreleme, yüksek ekin yoğunluğu ve yabancı otlar da etkilemektedir.

Aflatoksin oluşumu ayrıca diğer küf ve mikropların gelişimi ile de etkilenmektedir. örneğin yer fıstığı ve mısırın hasat öncesi aflatoksin kontaminasyonu yüksek sıcaklık, uzun süreli kuraklık ve yüksek böcek aktivitesi ile alakalı iken, mısır ve yer fıstığının hasat sonrası aflatoksin kontaminasyonu ılık sıcaklık ve yüksek nem ile alakalıdır.

2.2.2.1 Su aktivitesi ve güvenli depolama neminin aflatoksin oluşumu açısından önemi

Bilindiği gibi, gıda maddelerinin kalite kayıplarının önlenmesinde ve muhafazasında, su ve su ile ilgili parametrelerin önemli etkisi bulunmaktadır. Bu parametreler, gıda maddelerinin işleme ve muhafaza süresince kalitelerinin korunmasında; su miktarı, bağıl nem dengesi, su aktivitesi, kuru madde ve ozmotik basınçtır. Herhangi bir gıdanın belli bir sıcaklıkta, değişik bağıl nem koşullarında tutulması ile bir denge oluşmaktadır. Bu denge sonucu gıda maddesinin nem içeriği ile, ortam bağıl nemi arasında bir ilişki meydana gelmektedir, bu ilişki "sorpsiyon eş-sıcaklık eğrisi" olarak ifade edilmektedir. Fazla nem içeren gıda maddelerinin ağırlık kaybıyla elde edilen eğriye "desorpsiyon", ortamdan nem alarak, ağırlık artışı sonucu oluşturulan eğriye de "adsorpsiyon" eş-sıcaklık eğrisi denmektedir. Her gıdanın deneysel yolla saptanan kendine özgü sorpsiyon eş-sıcaklık eğrisi vardır (Labuza, 1984).

Su aktivitesi ile sorpsiyon eş-sıcaklık eğrisi iç içe kavramlardır. Bir gıda maddesinin su aktivitesi değeri, ortam denge bağıl neminin 100'e oranı şeklinde ifade edilmektedir. Buna göre, herhangi bir gıda maddesinin nem içeriği bilindiği takdirde, kendi sorpsiyon eş-sıcaklık eğrisinden su aktivite değeri bulunabilmektedir. Bundan ürünün kurutulması ve depolama koşullarının belirlenmesinde büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Nitekim gıda maddelerinin kurutulması çalışmalarında desorpsiyon eş-sıcaklık eğrilerinden, kurutulmuş gıdaların muhafaza koşullarının saptanmasında da adsorpsiyon eş-sıcaklık eğrilerinden yararlanılmaktadır.

Gıda maddelerindeki kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişimleri sınırlayan en önemli faktör su aktivitesidir. Su aktivitesi düştükçe, gıda maddesinin kalite kaybı da azalarak, muhafaza süresi uzamaktadır (Labuza, 1982).

Sert kabuklu meyvelerin, dolayısıyla fındığın depolanmasındaki en önemli husus, öncelikle düşük bağıl nem (% 50-60) daha sonra düşük sıcaklık (5-10°C) koşullarının sağlanmasıdır. Bağıl nemin %60- 70 arasında olduğu koşullarda, enzimler aktif olmaktadır. % 70'in üzerinde olduğu zaman da küfler gelişmeye başlamakta ve kalite kaybına neden olmaktadır (Hadorn ve ark. 1977, 1978).

Gıdalarda sorpsiyon izotermi nem içeriği ve su aktivitesi arasındaki matematiksel ilişkiyi vermektedir. Su aktivitesi özellikle kuru gıdaların kalitesini etkileyen önemli bir faktördür. Kimyasal reaksiyonlar ve mikrobiyal aktivite su aktivitesine bağlı olarak, 0,2-0,4 aralığına denk gelen ve tek sıra su molekülü olarak adlandırılan düşük su aktivitesi değerlerinde en düşük hızda gerçekleşmektedir. Bu değer üzerinde su aktivitesinde her 0,1'lik artış

reaksiyon hızını %50-100 oranında artırmaktadır. Bu etki neme karşı geçirgen bir ambalaj malzemesi sonucu kaynaklanabildiği gibi nem geçirgenliği düşük bir ambalajda sıcaklık artışı ile ürünün su aktivitesinde artış ile de gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle gıda maddesinin sorpsiyon eş-sıcaklık eğrisinin ve yüksek sıcaklıklardaki davranışının belirlenmiş olması gerekmektedir (Labuza, 1984).

Fındık %57-62 yağ oranı ile yağlı bir üründür. Fındıklar 3°C, %60 bağıl nemde kalitelerini koruyarak iki yıl depolanabilmektedirler. Bununla birlikte kavrulmuş fındıkların kaliteleri 12-15 gün sonra bozulmaya başlamaktadır (Woodroof, 1975). Mikrobiyal aktivite sonucu bozulma kadar, kötü tat ve kokuların açığa çıkmasına neden olan acılaşıma da yağlı ürünlerin kalitesinin korunmasında önemli problemlerden biridir. Su aktivitesi yağın oksidasyonunu etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Labuza, 1971). Fındıkların sorpsiyon izotermeleri konusunda sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Kalitenin korunması için işleme ve depolama sırasında en uygun koşulların belirlenmesi ve uygulanması gerekmektedir. Fıstıkların sorpsiyon eş-sıcaklık eğrisi yüksek su aktivitesinde 20°C'de aflatoxin oluşumunun kontrolü açısından çalışılmış ve 0.87'nin üzerinde *Aspergillus flavus*'un geliştiği ve 0.88'de aflatoxin oluştuğu gözlenmiştir. 0.86'nın altında daha çok rekabetçi kseroofilik mantarların üremesi ile aflatoxin oluşumu engellenmiştir (Denizel, 1976b).

Tek-seviye (monolayer) su içeriği kurutulmuş gıdaların fiziksel ve kimyasal stabilitesi açısından son derece önemlidir. Bu seviyede yağ oksidasyonu, enzimatik reaksiyonlar, kararma reaksiyonları, aroma maddelerinin ve yapısal özelliklerinin korunması gibi mekanizmalar en düşük hızda gerçekleşmektedir. Tek-seviye su içeriği değeri BET ve GAB denklemleri ile sorpsiyon eş-sıcaklık eğrileri kullanılarak hesaplanabilmektedir (Labuza, 1984).

Fındıklar kurutulduktan sonra işleme alınacakları zamana kadar kabuklu olarak depolanmaktadır. Kabukların ve iç kısmın kimyasal bileşimleri farklıdır. Kabuk kısım daha çok nem tutan selülozik maddelerden oluşmakta, iç kısım ise çeşide ve yetiştirme bölgesine göre farklılıklar gösteren %55-65 oranında yağ içermektedir. Bu nedenle kabuklu ve işlenmiş fındıkların su aktivite değeri farklı nem içeriklerine tekabül etmektedir. Tüm bu özellikler dikkate alındığında tek bir güvenli depolama nem içeriğinden söz etmek doğru olmayacaktır. Ancak, naturel fındıkların %70 Bağıl Nemin altında depolanması küfler ve toksin üretiminin engellenmesi için yeterlidir. Kavrulmuş fındıklarda ise su aktivitesi 0.30-0.20 civarlarında olduğundan ürünlerin açık olarak %70 Bağıl Nemde depolanması ürünün tekrar nem almasına ve gevreklik gibi duyuşsal özelliklerin bozulması, acılaşıma reaksiyonlarının hızlanmasına

neden olacağından nem geçirmeyen ambalaj malzemesi ile paketlenerek depolanması önerilmektedir (TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü, 2005).

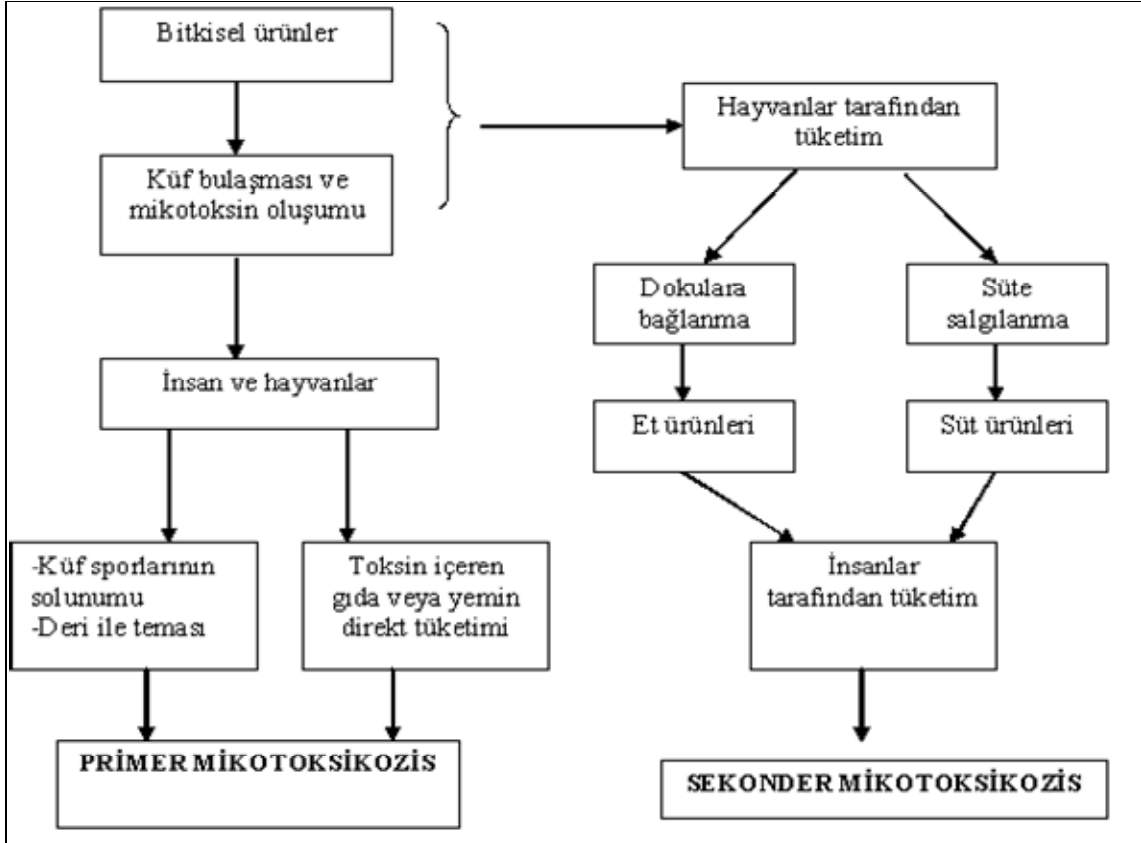
2.3 Mikotoksinlerin İnsanlara Geçiş Yolu

Mikotoksinlerin insanlara geçiş yolu Şekil 2.5’de gösterildiği gibi, doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde olmaktadır:

Birinci yoldan, insanlar ve hayvanlar doğrudan mikotoksin ile bulaşmış gıda ve yem maddelerini tüketerek mikotoksinleri bünyelerine alırlar ve bunun sonucunda oluşan mikotoksikozise “primer mikotoksikozis” adı verilmektedir.

İkinci yoldan ise, mikotoksin bulaşmış yem ile beslenen hayvanların et, süt ve yumurta gibi ürünlerine bu toksinler geçmekte ve hayvansal ürünlerin tüketilmesi sonucu da mikotoksin dolaylı olarak insanlara geçebilmektedir. Bu şekilde oluşan mikotoksikozise ise “sekonder mikotoksikozis” adı verilmektedir. Aflatoksinle bulaşmış yemler çiftlik hayvanlarına yedirildiğinde aflatoksin B₁ hayvanın bünyesinde metabolizma sonucu aflatoksin M₁ formuna dönüşmekte süt ve süt ürünlerine geçebilmektedir. Sütün peynire işlenmesi halinde ise, sütte bulunan M₁ miktarı (ortamdan su uzaklaştırıldığı için) genellikle peynirde 3-5 kat daha artmaktadır. Aflatoksin türevi olan M₁, B₁’e yakın toksisitededir. Özellikle, duyarlı bir grubu oluşturan çocukların daha çok süt tükettiği göz önüne alındığında sağlık açısından taşıdığı olumsuzluk daha iyi anlaşılmaktadır. Benzer olarak çiftlik hayvanlarının yumurtalarında ve etlerinde de aflatoksine rastlanabilmektedir.

Ayrıca küf sporlarının ve parçacıklarının, özellikle ürünün işlenmesi sırasında, aerosol veya toz halinde havaya yayılması sonucunda mikotoksinlerin doğrudan solunum ile ciğerlere ve deri ile temas ile de vücuda alınması söz konusu olmaktadır (Taydaş, Teknik Rapor).



Şekil 2.5 Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara geçiş yolları (Taydaş, Teknik Rapor).

2.3.1 Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri

Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ortaya çıktıktan sonra, bu konuda yapılan çalışmalar bir hız kazanmıştır. Mikotoksinlerin spesifik toksisitelerinin insanlarda doğrudan test edilememesi nedeniyle, toksisite çalışmaları laboratuvar hayvanları üzerinde elde edilen sonuçlara dayanmaktadır. Ancak mikotoksikozis nedeniyle ölüm ve hastalık vakalarına rastlanılan bölgelerde insanlardan alınan kan, idrar ve süt örneklerinde, insan kadavralarında ve bu insanların tükettiği gıdalardan elde edilen mikotoksin bulguları bu konuda veri kaynağı olmaktadır.

Mikotoksinler hayvanlarda alınan toksinin dozuna bağlı olarak, verim düşüklüğünden başlayıp ölüme kadar giden mikotoksikozis olaylarına yol açmakta ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Mikotoksinlerin neden olduğu hastalık sendromlarının teşhisi çok güç olmaktadır. Bu semptomlar yetersiz ve dengesiz beslenme veya patojen mikroorganizmaların neden olduğu diğer hastalıklarla kolayca karıştırılabilmektedir. Bu

nedenle mikotoksinlerin neden olduğu hastalıklar çoğu zaman nedeni bilinmeyen hastalıklar olarak değerlendirilmektedir.

Mikotoksinlerin hayvanlardaki etkileri genel olarak üç teshis edilebilir formda sınıflandırılmaktadır.

- 1- **Akut primer mikotoksikozis** (ani ölüm ve hastalanma), Akut aflatoksikozisin bir çok hayvan türünde klinik belirtileri; iştahsızlık, kilo kaybı, sinirsel anormallik, sarılık, çırpınma ve ölümdür.
- 2- **Kronik primer mikotoksikozis** (et, süt, yumurta veriminde azalma, kilo ve güç kaybı)
- 3- **Sekonder mikotoksin hastalıkları** (immün sistemin zayıflaması ve diğerk hastalıkların kolayca oluşması, aşının etkisiz kalması vb.)

Aflatoksinlerin biyolojik etkileri:

Aflatoksinler bilinen en etkili kanserojenik maddeler arasında yer almaktadır. Aflatoksinler arasında en toksik olanı B₁'dir ve ortamda çoğunlukla yüksek konsantrasyonda oluşturulur. Aflatoksin türevi olan M₁ ise B₁'e yakın toksisitededir. Birçok epidemiyolojik çalışma aflatoksin B₁ ile artan karaciğer vakaları arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Aflatoksinler çok düşük dozlarda, yani ppb (µg/kg) seviyelerinde vücuda alındığında kanserojenik, mutajenik, teratojenik ve kuvvetli hepatotoksik etkiler gösteren mikotoksinlerdir. En çok etkili olduğu organ ise karaciğerdir.

Kanserojenite: Aflatoksinler (B₁, B₂, G₁ ve G₂) karaciğer, kolon ve böbrekte kanser oluştururlar (Kanser oluşumu ratlarda yaş ve cinsiyete göre değişebilmektedir. Dişiler erkeklerden daha dirençli, gençler yaşlılardan daha dirençsizdirler).

Mutajenite: Aflatoksin B₁ en mutajen mikotoksindir. Kromosomal yanılmaya ve DNA kırılmasına neden olur.

Teratojenite: Aflatoksin B₁ teratojen özelliğe sahiptir ve protein sentezini inhibe eder. Canlılarda ölü veya sakat doğumlara neden olur.

Nefrotoksisite: Aflatoksin B₁ akut olarak böbreklerde hasar, tümör oluşumu, nefropati ve böbrekte ani kanama yapar.

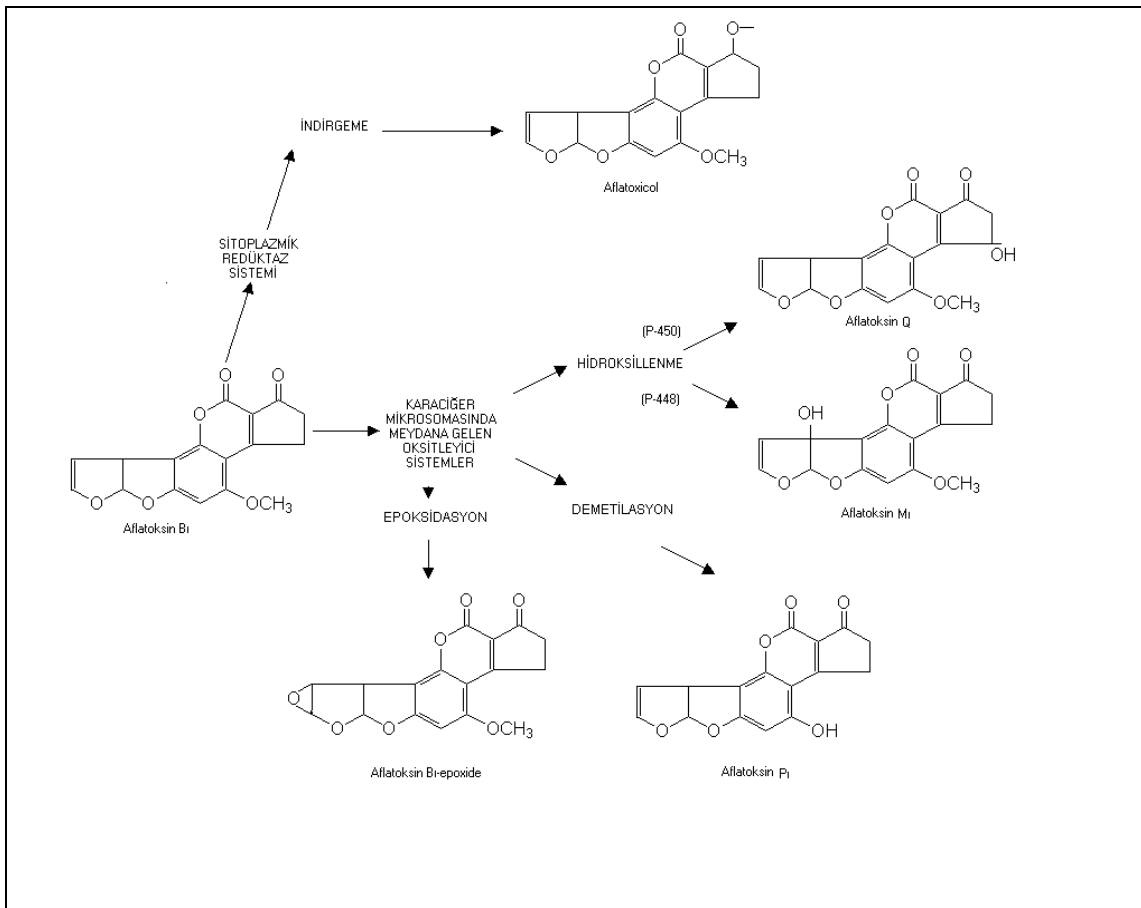
Hepatotoksinler: Aflatoksin B₁ karaciğerin hepatik dokularına zarar vererek, akut hastalığa

(sarılık, siroz vb.) ve ölüme neden olur. Hepatik lezyonları ve kanamayı artırır. Ayrıca serum enzimlerini artırır, serum proteinlerini azaltır ve kan pıhtılaşma mekanizmasını bozar. (Taydaş, Teknik Rapor)

Çiftlik hayvanlarında aflatoksikozis salgınları dünyanın birçok bölgesinde kaydedilmiştir. Bu vakalarda ve maymunları da içeren hayvanlar üzerindeki deneysel çalışmalarda genellikle karaciğer etkilenmektedir. Akut karaciğer doku bozukluğu karaciğer hücrelerindeki nekroz ve biliyer proliferasyon ve fibrosisi de içerebilecek kronik göstergelerle karakterize edilir. Bir yemde bulunan 300 µg/kg gibi az aflatoksin miktarı domuzlarda 3-4 ay içerisinde kronik aflatoksikozise neden olabilmektedir.

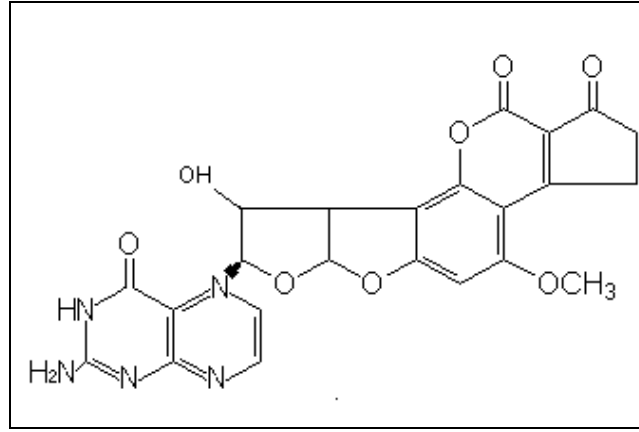
Aflatoksin B₁'in karsinojenite ve mutajenitesi vücuttaki metabolizması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aflatoksinler, hayvanlarda öncelikle mikrozomal ve stoplazmik oksijenaz enzim sistemleri tarafından metabolize edilmektedir. Bu enzim sistemleri, esas olarak karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan, sitokromla ilişkili enzimlerle, O₂'ye ve NADPH'a bağımlı enzimlerin kompleks bir organizasyonudur. Bu enzimler, çeşitli hidroksillenmiş türevlerin ve yüksek reaktif özelliğe sahip epoksid metabolitin oluşmasıyla sonuçlanan aflatoksin B₁'in oksidatif metabolizmasını katalize etmektedir. Bu sistemlerle aflatoksin B₁'in metabolizma yolları ve aflatoksin B₁'in çeşitli metabolitlere biyotransformasyonu Şekil 2.6'da görülmektedir.

Aflatoksin M₁ daha önce de değinildiği gibi, aflatoksin B₁'in hidroksillenmiş türevlerinden biridir ve karsinojenik gücünün aflatoksin B₁'den 10 kat daha düşük olduğu belirtilmektedir. Mikrozomal hidroksilasyon ve demetilasyon reaksiyonları sonucunda oluşan aflatoksin Q₁ ve P₁ metabolitleri de aflatoksin B₁'den çok daha az aktif olan maddelerdir. Bu nedenle bu reaksiyonlar, detoksifikasyon prosesi olarak kabul edilmektedir. Metabolizmada aflatoksin B₁'in detoksifikasyonu; hidroksillenmiş metabolitlerin sülfat ve glukuronik asitle birleşerek, suda çözünebilir sülfat veya glukuronid esterlerine dönüşmesi, ardından da idrar ve safra ile atılması ile tamamlanmaktadır. Bu biyotransformasyon olaylarında esas önemli olan proses, yine bu enzim sistemleriyle meydana gelen, aflatoksin B₁'in epoksidasyonu prosesidir. Burada, bifuran halkasındaki çift bağın epoksidasyonu sonucu çok reaktif bir form oluşmaktadır. (Özkaya ve ark., 2003).



Şekil 2.6 Aflatoksin B₁'in vücuttaki metabolizması (Özkaya ve ark., 2003)

Bu elektrofilik epoksid DNA, RNA ve protein gibi hücresel makromoleküllerdeki çeşitli nükleofilik merkezlere kovalent olarak bağlanabilir. Aflatoksin B₁'in epoksi formunun bu aktifleşme reaksiyonunun sonucunda DNA ile birleşerek AFB₁-N⁷-Gua kompleksini oluşturduğu bilinmektedir. Bu kompleks organizma veya hücreler için biyolojik bir tehlike oluşturmakta ve karsinojenik ve genotoksik etkilerin sorumlusu olarak değerlendirilmektedir. Şekil 2.7'de AFB₁-N⁷-Gua kompleksinin yapısı görülmektedir. Kenya'nın aflatoksin B₁ alımı ile karaciğer kanseri arasında pozitif ilişki bulunan bir bölgesinde hastalardan toplanan idrarlarda AFB₁-N⁷-Gua kompleksi belirlenmiştir (Özkaya ve ark., 2003).



Şekil 2.7 AFB₁-N⁷-Guanil kompleksi (Özkaya ve ark., 2003)

Bu epidemiyolojik, genetik ve deneysel bulgular sonucunda, Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC; International Agency for Research on Cancer) tarafından 1993 yılında yapılan sınıflamada, aflatoksin B₁ “yeterli kanıt elde edilmiş insan karsinojenleri (sınıf 1)”, aflatoksin M₁ de "muhtemel insan karsinojenleri (2B sınıfı)" içersinde yer almıştır (Smith, 1997). Avrupa Birliği'nin “Gıda Maddelerinde Bazı Kontaminantların Maksimum Düzeylerini Belirleyen Komisyon Direktifi”nde; özellikle aflatoksin B₁ olmak üzere, aflatoksinlerin genotoksik karsinojen maddeler olduğu, bu nedenle herhangi bir NOEL (No Observable Effect; gözlenebilir etki oluşturmeyen düzey) ve ADI (Acceptable Daily Intake; kabul edilebilir günlük alım miktarı) değerinin belirlenemediğine değinilmektedir (Commission Regulation (EC) No.1525/98).

2.3.2 Aflatoksinlerin insanlarda belirlenen etkileri

Mikotoksinlerin insanlarda oluşturduğu toksik etkiler, hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışma sonuçlarıyla yaklaşık olarak paralellik göstermektedir.

Aflatoksine maruz kalma ile insanlardaki akut hepatoksisite arasındaki ilişki hakkında az bilgi bulunmaktadır fakat, akut karaciğer hasarı vakaları, akut aflatoksikozis ile alakalı olması muhtemel olduğu gözlenmiştir. Kuzey-batı Hindistan'da iki yakın komşu bölgede meydana gelen bir akut hepatit salgınında birkaç yüz insan etkilenmiştir, ve bu olay görünüşe göre ağır kontamine olmuş mısır tüketimi sonucunda oluşmuştur. Buradaki bazı mısır örneklerindeki aflatoksin miktarı mg/kg düzeylerindedir ve en yüksek miktar 15mg/kg olarak kaydedilmiştir.

Karaciğer kanseri Afrika'nın ve güney-doğu Asya'nın bazı bölgelerinde daha yaygındır, eğer bölgesel epidemiyolojik bilgiler ile deneysel hayvan verileri birlikte göz önüne alınırsa, yüksek aflatoksine maruz kalma başta karaciğer kanseri riskini artırdığı gözlenmiştir. Kenya, Mozambik, Svaziland, ve Tayland'dan toplanan verilerde günlük diyetle aflatoksin alımı (bir günde 3.5 ile 222.4 ng/kg vücut ağırlığı) ile karaciğer kanseri vakaları (yılda 100,000 kişiden 1.2 ile 13.0 vaka) arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

Dünya'nın çeşitli bölgelerinde aflatoksinle kontamine gıdalarla beslenen insanlarda, karaciğer kanseri, siroz ve özellikle çocuklarda "Reye's Sendromu" vakalarına zaman zaman rastlanıldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Ayrıca hepatit B virüsü taşıyan ve alkol kullanan insanlarda aflatoksinin olumsuz etkilerinin çok daha fazla arttığı da belirlenmiştir.

Şu ana kadar yapılan araştırmalara göre, insanda karaciğer kanseri için risk faktörlerinin hepatit B virüsü, hepatit C virüsü, aflatoksin B₁ ve şüpheli olarak da alkol olduğu belirtilmektedir.

Uzun yıllardan beri hepatit B virüsünün mü, yoksa aflatoksin B₁'in mi karaciğer kanser etmeni olduğu araştırılmış, fakat yapılan son araştırmalarla, her ikisini de P53 gen mutasyonuna neden olarak primer karaciğer kanserine neden olduğu ve diğer oluşabilecek olumsuz etkilerin de bu olayı desteklediği belirtilmektedir.

Araştırma sonuçlarına göre; Çin'in güneyinde ve Afrika'nın Sahara bölgesinin güneyinde, yüksek düzeyde aflatoksin içeren gıdalarla beslenen, hepatit B ve C virüsü taşımayan, karaciğer kanserine yakalanmış insanların karaciğerlerinden alınan örneklerde yapılan incelemeye göre, aflatoksin B₁'in P53 kanser baskılayıcı genin 249'uncu kodonundaki (AGG → AGT) Guanin yerine Timin geçmesine neden olarak karaciğerde primer kanser

oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir. “Hot Spot Mutasyon” denilen bu olaya yüksek aflatoksin alanlarında yaşayan ve karaciğer kanserine yakalanmış hastaların toplamının %50’sinde rastlanmıştır. Halbuki, aynı mutasyona düşük aflatoksin alanlarında 25 tümörde 1’den daha az oranda rastlanmıştır.

Ülkemizde ise, 1983-84 Kasım ayları arasında, SSYB Kanselerle Savaş Daire Başkanlığına ihbar edilen toplam 183 karaciğer kanser olgusunun %77.2’sinin aflatoksin formasyonu için elverişli iklim koşullarına sahip olduğu varsayılabilecek; Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde yoğunlaşması dikkat çekmektedir. Türkiye’de karaciğer kanseri coğrafi dağılımıyla, gıdaların aflatoksin dağılımı arasında bir ilişki kurabilmek için, öncelikle karaciğer kanser olgularının yoğunlaştığı bölgeler bakımından, önemli olan gıdalarda yaygın aflatoksin tarama çalışmalarının yapılması gerekmektedir (Taydaş, Teknik Rapor)

Türkiye fındık, antepfıstık ve çeşitli riskli gıdalar (Tahıllar, baharatlar vb.) nedeniyle aflatoksin riski altındadır. Bunu şöyle bir örnekle açıklamak mümkündür; günde 25 g fındık ve/veya fıstık yiyen 60 kg ağırlıktaki bir insan, yediği gıdanın ortalama 12 µg/kg düzeyinde AFB₁ içermesi durumunda **300** ng aflatoksin ile yüklenir. Avrupa Topluluğu tarafından günlük aflatoksin için kabul edilebilir doz insanlarda (TDI) 0,014 ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Buna göre, 60 kg ağırlığındaki bir insan için 1 günde alınabilir doz **0.84** ng olmaktadır. Görüldüğü gibi günde yaklaşık 25 g aflatoksin açısından riskli gıda tüken yaklaşık 60 kg ağırlığındaki bir insanın alabileceği doz (300 ng) tolere edilemeyecek düzeyde olacaktır

Dünya sağlık örgütü (World Health Organization, International Agency for Research on Cancer) aflatoksinleri “Grup 1 Karsinojenik” olarak tanımlamıştır (WHO IARC, 1993). Kanıtlarda bulunan etkilerde, birkaç hayvan çeşidinde aflatoksinin özellikle karsinojenik etkisi ve dünyanın bazı bölgelerinde aflatoksine maruz kalma düzeyleri ile insanlarda karaciğer kanseri vakası görülme sıklığı arasındaki ilişkiler göz önüne alındığında mümkün olduğunca aflatoksine maruz kalmamak gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

2.4 Türk Fındığı ve Aflatoksin

Dünya fındık tüketiminin %91'lik kısmı Avrupa ülkeleri tarafından gerçekleştirilmekte ve bunun %80'i çikolata ve şekerleme sanayinde ham madde olarak kullanılmaktadır. %10'u çerez olarak tüketilmektedir. (Fındık Bülteni, 2009)

Dünya fındık üretiminin %70'ini ve ticaretinin %75'ini Türkiye gerçekleştirmektedir (Çeliksa ve ark., 2008). Bu özelliği ile Türkiye en önemli ülke konumundadır. Yıllara göre Türkiye fındık üretim, tüketim ve ihracatı (2001 – 2009) Çizelge 2.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4 2001–2009 Türkiye fındık üretim, tüketim ve ihracatı (Fındık Bülteni, 2009)

DÖNEM	ÜRETİM MİKTARI (Kabuklu/Ton)	TÜKETİM MİKTARI (İç/Ton)	İHRACAT MİKTARI (İç/Ton)	İHRACAT BEDELİ (USD)
2000–01	470.000	183.657	204.253	682.451.341
2001–02	625.000	183.000	255.893	636.027.664
2002–03	600.000	190.000	255.918	593.690.721
2003–04	480.000	128.000	223.363	878.754.034
2004–05	350.000	47.813	194.594	1.554.156.298
2005–06	530.000	60.000	239.366	1.952.767.268
2006–07	661.000	80.000	248.664	1.262.427.049
2007–08	530.000	80.000	207.287	1.589.547.748
2008-09	769.000	150.000	145.540	714.922.245

Aylık bazda Türkiye'nin son 3 sezonda yaptığı fındık ihracatının miktar ve tutarlarının karşılaştırılması Çizelge 2.5'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.5 Aylık bazda Türkiye'nin son 3 sezonda yaptığı fındık ihracatının miktar ve tutarları (Fındık Bülteni, 2009)

Aylar	2006–07 Sezonu		2007–08 Sezonu		2008–09 Sezonu	
	Miktar (Ton)	Değer (USD)	Miktar (Ton)	Değer (USD)	Miktar (Ton)	Değer (USD)
Eylül	34.459	161.463.954	29.446	209.154.056	47.649	262.130.590
Ekim	33.641	149.349.199	32.788	250.859.024	37.266	183.589.567
Kasım	33.492	151.746.535	27.964	222.753.591	27.760	123.852.967
Aralık	21.891	105.503.380	17.430	138.192.522	16.081	71.089.074
Ocak	18.002	91.546.341	16.695	133.432.095	16.784	74.260.047
TOPLAM	141.485	659.609.409	124.323	954.391.288	145.540	714.922.245

Fındık Türkiye ekonomisinde önemli bir yere sahiptir ve bitkisel ürünler içinde en yüksek döviz getiren üründür. Türkiye 80 ülkeye iç fındık ihraç etmekte ve yılda yaklaşık 700 milyon dolar gelir elde etmektedir. 01.01.2008–31.12.2008 tarihleri arasında Türkiye'nin en fazla fındık ihracatı yaptığı ilk 10 ülke Çizelge 2.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6 01.01.2008–31.12.2008 tarihleri arasında Türkiye’nin fındık ihracatı yaptığı ilk 10 ülke (Kg/USD) (Fındık Bülteni, 2009)

Ülke	Miktar (Kg)	Değer (USD)
ALMANYA	58.424.967	378.694.819
İTALYA	53.056.911	288.681.651
FRANSA	15.648.705	96.979.028
BELÇİKA	12.074.544	71.686.882
İSVİÇRE	8.962.948	57.672.376
RUSYA FEDERASYONU	8.155.513	54.176.174
AVUSTURYA	7.769.425	47.663.288
HOLLANDA	7.037.898	43.800.979
UKRAYNA	5.579.717	37.372.391
İNGİLTERE	4.712.863	34.098.900

Fındık ekonomiye olan katkıları dışında, beslenme yönünden, içerdiği yağ, protein, vitamin ve mineral maddeler bakımından oldukça önemli bir gıda maddesidir (Pala ve ark., 1996, Özdemir ve ark., 1998)

Karadeniz bölgesinin, nemli ve yağışlı özelliklerinden dolayı uygun olmayan koşullarda hasat; gereği gibi yapılmayan kurutma, depolama ve işleme sonucunda fındıkta küf gelişmesi artış göstermektedir. Küflerin ürettikleri mikotoksinlerden birisi olan aflatoksinler, önemli kalite ve ekonomik kayıplara neden olmakta ve insan sağlığını riske etmektedir (6). Aflatoksinler, özellikle B1, kanser oluşturucu ve mutajenik (kalıtsal bilgilerin değişimi) etkilidir. Epidemiyolojik çalışmalarda, aflatoksin içeren gıdalarla beslenen bölge insanlarında primer karaciğer kanseri ve sirozuna daha yüksek oranda rastlanmıştır. Ayrıca, teratojenik (anne karnındayken bozukluklara neden olma) ve immunosupresif (bağışıklık sistemini zayıflatıcı) etkilere de sahip olduğu denek hayvanlar üzerinde kanıtlanmıştır (Tayfur, 2002).

Fındıkta küf bulaşması yaygın olup, bazı türlerin gelişmeleri insan ve hayvan sağlığı için önemli bir risk oluşturmaktadır. Fındık özürleri arasında raf ömrünü kısaltan etkenlerin en önemlisinin küflenme olduğu belirtilmektedir. Küf gelişimi bahçede başlamakta, hasat ve

yetersiz ve/veya uygun olmayan kurutma koşulları nedeniyle gelişebilmekte, depolama ve taşıma sırasında da oluşabilmektedir. Kabuklu fındıkta hasat, kurutma ve depolama süresince *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Rhizopus* cinsine ait türler bulunmuştur. Kabuklu fındıkta aflatoksin üreten *A. flavus* ve *A. parasiticus* cinsi küflerin gelişmesi ağaçta başlamakta, hasat işlemleri boyunca artmaktadır. Harman ve depolamada kabuğu çatlamış fındık taneleri dışında, ağaçtaki ve yerdeki kabuklu fındık tanelerinde *A. flavus* görülmemiştir. Ancak küf sayısı fındık dalında 105 koloni/g iken, yerde bir miktar daha arttığı görülmüştür. Bu miktar, harman, çevre ve iklim koşullarına göre de değişebilmektedir. Yağış, sert kabuklu meyvelerde hasattan sonra oluşan küf sayısı ve mikroflorayı etkileyen en önemli unsurdur. Yağışın fazla olması durumunda, bakteri ve küflerin toplam sayısı 108 koloni/g 'a kadar yükselmektedir. Natürel ve kavrulmuş iç fındıkta *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* küfleri bulunmuştur (Abdel ve Saber, 1993, Eke ve Göktan, 1987).

Küfler, gıdaların protein, yağ, ve karbonhidratlarını enzimatik faaliyetlerle parçalayarak gıdanın dokusunu değiştirmekte, yağ içeriğinin azalmasına, serbest yağ asidi miktarının artmasına, proteinlerin parçalanmasına, amino asit bileşiminde değişime, renk değişimine, kötü koku oluşmasına, tat değişimlerine ve ağırlık kaybına yol açmaktadırlar. Küfler sağlam gıdanın içine de girebildiklerinden bakterilerden daha fazla zarar vermekte ve toksijenik tipleri mikotoksin üretebilmektedir. (ICMSF, 1996).

Mikotoksinler (aflatoksin, okratoksin, patulin vd.) sadece fındıkta değil, sağlık, tarım ve ekonomiyi etkileyebilecek dünya çapında önemli bir sorundur. Türkiye tarımdaki büyük potansiyeline koşut olarak büyük miktarlarda tahıl, fındık, antepfıstığı, kuru meyve (kuru incir, kuru kayısı, kuru üzüm) üretmektedir. Üretim, hasat, kurutma, taşıma, depolama ve işleme sırasındaki yetersiz ve yanlış uygulamalar fındıklarda aflatoksin oluşumu riskini arttırmaktadır. Fındık ihracatında da karşılaştığımız sorunların başında aflatoksin oluşumu gelmektedir.

Aflatoksin, *Aspergillus flavus*, *A. paraticus* ve *A. nomius* küflerinin fındıklara bulaşması ile uygun koşullar bulduğunda bu küflerin biyosentezi ile toksin üretimi sonucu oluşurlar. Çok az sayıdaki tanede oluşmaları söz konusu olsa bile insan sağlığı açısından çok düşük miktarda olmaları dahi risk yaratabildiğinden hasat ve işleme sırasında bulaşma olan tanelerin ayrılması ve işleme sırasında küf gelişiminin önlenmesi son derece önemlidir. Çünkü küf gelişimi durdurulabilmekte, küfler bir şekilde yok edilebilmekte iken aflatoksinlerin oluştuktan sonra yok edilmesi veya ortamdan uzaklaştırılması çok zordur. Fındıklarda aflatoksin oluşumu ile ilgili literatürde bilgisi sınırlıdır.

Aflatoksin hasat öncesi sert kabuklu meyvelerde ağaç üzerindeyken oluşabildiği gibi hasat ve hasat sonrası aşamalarda da oluşabilmektedir (Ozay, 1986, Mahoney, N. ve Molyneux, R.J. 1998). Hasattan itibaren kurutma işleminin gecikmesi, uygun olmayan koşullarda bekletme, depolama gibi aşamalar küf gelişmesi ve aflatoksin oluşumunu hızlandırmaktadır. Fıstıklarda (*Pistachio vera*) hasat ve hasat sonrası işlemlerin aflatoksin oluşmasında ve dağılımındaki etkileri ve pazarlama ve tüketicilerin aflatoksinli ürünler tüketme riski Schatzki ve arkadaşları tarafından 1995 yılından itibaren çalışılmış ve bir dizi makale olarak yayınlanmıştır. (Schatzki, T.F.1995; Schatzki, T.F., 1995b; Schatzki ve Pan, 1996; Schatzki ve Pan, J.,1997; Schatzki, 1998; Schatzki. ve Koe, 1999) Yapılan çalışmalara göre aflatoksin örnekleme metodu önem taşımaktadır. 10 kg'lık örnekleme metodu ile satıcıların riski %58 iken 250 kg'lık örneklemede risk %11'e düşmektedir. Hasat ve işleme koşullarının iyileştirilmesi ile A.B.D. fıstıklarının 1981-1991 döneminde aflatoksin seviyesi 10ng/g'dan 1.5ng/g'a düşürülmüştür. Ayrıca, hasat sırasında kaliteli ürün için fıstıkların ayıklama işleminden geçirilmesi aflatoksin bulunma riskini 2-4 kat azaltmıştır (Schatzki, 1995). Yapılan çalışmalarda aflatoksinli tanelerin %90'ının, fıstıkların %4.6'sını oluşturan düşük kaliteli ürünlerden kaynaklandığı ve bu tür ürünlerin ayrılmasının aflatoksin oranını 10 kat azalttığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, Amerika'daki üretim koşullarında işlenen fıstıklarda aflatoksin oluşumunun tamamen bahçede olduğu ve işleme sırasında artmadığı gözlenmiştir (Schatzki ve Pan, 1996). Yine Schatzki ve Pan tarafından 1997 yılında yayınlanan çalışmaya göre küçük daneli fıstıklarda aflatoksin dağılımı incelendiğinde, aflatoksin oranı 8 ng/g olarak tespit edilmiş ve ayıklanmamış fıstıklardan 5-7 kat daha fazla toksin içerdiği saptanmıştır. Tüm bu çalışmalar hasat sırasında aflatoksin riski taşıyabilecek ürünlerin ayıklanmasının yüksek önemini ortaya koymaktadır. Ancak unutulmamalıdır ki, Amerika'da fıstık işleme GMP (İyi Üretim Uygulamaları) kurallarına göre yapılmakta ve mekanik hasat yapılarak fıstıkların toprakla teması kesilmekte ve hasattan sonra fıstıklar kurutma tesislerine 24 saat içinde ulaştırılarak kurutma makineleri ile hızla kurutulmaktadır. Yukarıda verilen rakamlar bu noktalar göze alınarak değerlendirilmeli ve hasat sırasında aflatoksin önleme konusunda gerekli tedbirler biran önce alınmalıdır.

İşleme koşullarının iyileştirilmesi ve ve iyi bir fiziksel ayırım ile aflatoksinli sert kabuklu yemişlerde aflatoksin miktarının %90 oranında azaltılabileceği belirtilmektedir (Almond Board Report Summary, 2002, Douglas, 2002, Galvez ve ark., 2003). Harmanda dış kabuğu çatlamış, zedelenmiş fındıklarda da aflatoksin bulunmuştur (Sanchis ve ark., 1988).

Aflatoksin oluşumu, ortam bağıl nemi (%RH) ile dolayısıyla ürünün su aktivitesiyle (a_w)

ilişkilidir (Prado ve ark., 1991). Güneşte kurutma sırasında, su aktivitesinin yüksek olduğu (0,98-0,80) ilk 6-10 günde aflatoksin oluşabilmektedir. Naturel fındıklar ve kavrulmuş kıyılmış fındıklar aflatoksin açısından riskli iken, kavrulmuş fındıklar daha dayanıklıdır. Su aktivitesinin 0.78-0.81 olduğu durumlarda (genellikle kek ürünleri) fındık aflatoksin ve ergosterol üretilmesi için iyi bir besi yeri oluşturmaktadır. Fındıkta aflatoksin bulunması ve aflatoksinin kanserojen olması, fındığın riskli ürünler arasında yer almasına neden olmaktadır. Tüketici sağlığının korunması amacıyla dünya piyasaları 2000 yılına kadar, aflatoksin açısından riskli ürünlerde aflatoksin limitinin sıfıra indirilmesini hedeflemekte idi. Bu hedef doğrultusunda birçok ülkede aflatoksin B₁ limiti 4'ten 2 ppb'a; aflatoksinerin (B₁, B₂, G₁, ve G₂) toplam limiti de 10 ppb'tan 4 ppb'e indirilmiştir (Commission Regulation EC No 194/97). Avrupa Birliği (AB) Gıda ve Hayvan Sağlığı Ajansı, Türkiye'nin Almanya ve Fransa'ya ihraç ettiği Antep ve Siirt fıstığı, fındık ve kuru incirlerin, kanserojen bir madde olan aflatoksin B₁ ve diğer aflatoksin türlerini, AB'nin sağlık standartlarının öngördüğünden 4-7 kat fazla içerdiğini açıklamıştır. Bunun üzerine Türkiye'ye gelen uzmanlar heyeti bir rapor yazarak, 11 incelemeden 5'inde çok yüksek miktarda aflatoksin B₁ bulunduğu, 6 incelemede de oranın AB yönetmeliğinin üst sınırında olduğunu belirtmiştir (Verstraete, 2003). Raporda, bu ürünlerin tüketildiği anda kısa vadede, başta karaciğer olmak üzere çeşitli kanserlere neden olabileceği vurgulanmış ve AB, bu ürünlerin ithalatının izlemeye alınmasına karar vermiştir.

4 Şubat 2002'de AB Resmi Gazetesi'nde yayımlanan karara göre Gıda Sağlığı ve Tarım İşleri Genel Müdürlüğü'nün laboratuvar analizi ile sertifikası olmadan söz konusu ürünlerin AB sınırlarından içeri girmemesine karar verilmiştir (DG SANCO / 1256/2000-MR final).

Dünyanın en büyük fındık üreticisi olmamız nedeni ile fındık yetiştiriciliği ve işleyiciliği konuları üzerinde önemle durulması gerekmektedir. Fındık hasadı, öncesi ve sonrasında çeşitli problemlerle karşılaşmaktadır. Yanlış veya erken hasat, fındığın uygun olmayan koşullarda, yetersiz düzeyde kurutulması veya nemli hava koşullarında kurutulması başta aflatoksin sorunu olmak üzere bir çok kalite sorunları ile karşılaşmamıza neden olmakta ve büyük ekonomik kayıplar yaşanmaktadır. Bu nedenle öncelikle fındıklarda aflatoksin oluşumuna etki eden faktörlerin belirlenmesi ve önleyici tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Hasat ve hasat sonrası uygulamalarla aflatoksin oluşması kontrol edilemediği takdirde, daha sonraki aşamalar olan depolama ve işleme sırasında aflatoksin kontrolü zorunlu hale gelmektedir. Aflatoksinin kontrolü aflatoksinli partilerin ayrılmasını, aflatoksinli ürün miktarının azaltılmasını ve doğru depolama ve işleme yöntemleriyle yeni aflatoksin oluşmasının önlenmesini içermektedir. Aflatoksini azaltma (dekontaminasyon /

detoksifikasyon) yöntemleri:

i) aflatoksinli ürünlerin ayrılması,

ii) toksinin üründen uzaklaştırılması

iii) toksinin fiziksel (ısıtma işlem uygulamaları vd.), kimyasal, biyokimyasal uygulamalarla etkisizleştirilmesidir.

Aflatoksinli ürünler sağlam ürünlerden fiziksel özellikleri itibarı ile de farklılıklar gösterebilmektedir. Bu fiziksel farklılaşma özelliklerinden faydalanılarak ayırma işleminin üzerinde önemle durmak gerekmektedir. Ancak aflatoksinin detoksifikasyonu (toksik etkisinin yok edilmesi) sırasında gıda yada yemde yeni toksik/mutagenik maddeler oluşabilmektedir (ICMSF, 1996). Bu nedenle, detoksifikasyona tabi tutulmuş ürünlerin insan veya hayvanların tarafından tüketilmesi Dünya Sağlık Örgütü tarafından uygun bulunmamaktadır. Dolayısı ile, ekonomik kayıpları en aza indirmek ve fındığın geleceğini kurtarmak için bu konuda öncelikle aflatoksin oluşumunu engelleyici önlemler almak bir zorunluluktur.

Türkiye açısından aflatoksin sorunu 1967 yılında Kanada'ya gönderilen 10 ton iç fındığın, 1971'de ABD'ye ihraç edilen Antep fıstığının aflatoksin içerdiği gerekçesiyle geri çevrilmesi sonucunda gündeme gelmiştir (Akpınar, Teknik Rapor)

1998-2002'de AB tarafından reddedilen sert kabuklu meyvelerden doğan kaybın 4.5 milyon dolar olduğu, limitlerin yükseltilmesi durumunda reddedilen ürün miktarının %44 daha az olacağı belirtilmektedir (Heperkan, 2005).

Türk fındığında fungal flora ve aflatoksin tespiti ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar vardır. 1990-1994 yılları arasında toplam 1373 gıda örneğinde (fındık ve ürünleri, yer fıstığı ve ürünleri, antep fıstığı, susam ve tahin, incir, kırmızı biber, mısır ve ürünleri) yapılan analizler sonucunda fındık örneklerinin hiçbirinin yasal limitin üzerinde aflatoksin içermediği ve kontaminasyon sıklığının %0.3 olduğu tespit edilmiştir. 1987-2003 yılları arasında Karadeniz ve Akçakoca bölgesinden toplam 1303 fındık örneğinde aflatoksin aranmış ve limitin üstündeki değer %3.8 saptanmıştır. Bu değerlendirmede limit değer olarak aflatoksin toplam için 4 ppb, B₁ için ise 2 ppb alınmıştır. Bu örnekler üzerindeki çalışmaların bazılarında hiç aflatoksine rastlanmazken, bazılarında 135 ppb gibi oldukça yüksek değerler belirlenmiştir (Özçakmak ve ark., 2007).

Giresun merkez ve ilçelerine ait 30 farklı tombul fındık örneklerinde aflatoksin varlığı ve küf florası araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan fındıklarda aflatoksin kontaminasyonuna rastlanmamasına karşın, örneklerde ortalama %85,93 olmak üzere %54-100 oranında fungal enfeksiyon görülmüştür. Tüm örneklerde depo fungusu olarak bilinen *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küf izole edilirken, 9 örnekte *Aspergillus flavus* grubu küf bulunmuştur. Bunların yanında ayrıca *Mucorales* ve *Rhizopus* cinsi enfeksiyon oranı da yüksek bulunmuştur. Depolanmış fındıklarda küf oranının yüksek olması depolama şartlarının uygun olmadığını göstermektedir (Demir ve ark., 2002).

Bursa'da satışa sunulan 25 adet kakaolu fındık kreması örneğinde aflatoksin B1 ve M1 miktarları sırasıyla 1076.5 ve 194.4 ng/g olarak tespit edilmiştir (Aluç ve ark., 2003). İstanbul'da fındık ezmeleri üzerine yapılan bir çalışmada 182 örneğin 5'inde Türk Gıda Kodeksinde (TGK) belirtilen limitlerin üzerinde Aflatoksin B₁'e 10'unda ise yine TGK'nde belirtilen limitlerin üzerinde toplam aflatoksine rastlanmıştır. (Vural ve ark., 2007).

2000-2003 yılları arasında Fındık Tanıtım Grubu desteği ile TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü tarafından yapılan bir çalışmada dalından yeni koparılmış fındıktaki aflatoksinin ihracatı etkileyebilecek düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca 2004 yılı ürünlerinde diğer yıllara kıyasla 10-20 kat daha fazla toksijenik küf oranına (%46) rastlanmıştır ancak bahçelerden örnekleme çalışmalarında aflatoksine rastlanmamıştır. Bununla beraber, çiftçi harman yerlerinden alınan örneklerde 4 ng/g toplam aflatoksin düzeyinin üzerinde (4-24 ng/g : toplam örneklerin %6'sı) kontaminasyona rastlanmıştır. Aynı çalışmada hasat sonrası yapılan işlemlerin son derece önemli ve kritik olduğu ve gerekli tedbirler için hızla hareket edilmesi gerektiği belirtilmiştir (TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü, 2005).

T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı fındık, incir ve mamulleri için 2001 ve 2002 yıllarına ait denetim, özel istek, ihracat, referans ve aflatoksin izleme projesi analiz sonuçlarını (11460 adet örnek) istatistiksel değerlendirmeye almıştır. Örneklerin %90'ındaki toplam aflatoksin ve B1 miktarlarının çok düşük olduğu bildirilmiştir. 2002 yılında AB'ye ihraç edilen fındık, incir, antep fıstığı ve ürünlerine ait 15441 adet partisinin sadece %0.9'u çeşitli nedenlerle geri dönmüş, geri dönen ürünlerde gümrükte yapılan kontroller sonucunda uygun çıkan %0.05'inin yurda girişine izin verilmiştir. AB ülkeleri gümrüklerinde aflatoksin gerekçesiyle fındıkların geri çevrilmesi büyük ekonomik kayıplara yol açmakta, üretici ve sanayiciyi zor durumda bırakmakta, ihracatı engellemekte, Türkiye'nin dış ticaretteki itibarını zedelenmekte, fındık fiyatlarında düşümlere ve pazarlama sorunlarına yol açmaktadır. (Özçakmak ve ark, 2007).

2.5 Aflatoksin Açısından Avrupa Birliği ve Türkiye

Türkiye'nin AB aflatoksin limitlerine uyumunu sağlamak amacı ile AB Gıda ve Veteriner Ofisi'nden iki denetçi ve bir ulusal uzman olmak üzere bir kurul oluşturulmuştur. Bu kurul, gıda kontrolü yapılırken gıda maddelerinde aflatoksin kontaminasyon kontrolünün yapılıp yapılmadığını araştırmaktadır. Özellikle de AB'ne ihracatı yapılan Türkiye orijinli gıda ürünlerinde 2002/80/EC komisyon kararını ve aflatoksin limitlerine ihracatçıların uyumunu değerlendirmektedir. Bu kurul tarafından yetkili makamlara uyarı yapılarak fındık, kuru incir ve diğer gıdalarda aflatoksin kontaminasyon kontrolü için yasal düzenlemelerin yapılması sağlanmıştır.

AB Komisyonu 2002 yılında aldığı kararda; Türkiye orijinli kurutulmuş incir, fıstık ve daha az miktarda da fındıklarda aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin kontaminasyonu bulunduğu, bu ürünlerde Türkiye'den ayrılmadan önce aflatoksin miktarlarının tespit edilmesi gerektiği ifade edilmiştir. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, 2002/80/EC komisyon kararına göre, AB'ne ihracatı yapılan gıda ürünleri için ihracat sertifikası istemektedir. Bu sertifikada belirtilen analizler, özel laboratuvarların yanısıra Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü'ne bağlı laboratuvarlarda yapılmaktadır.

Türkiye'de 98/53/EC yönergesi doğrultusunda ihracat yapılan ürünlerden örnek alınarak analiz yapılmaktadır. Aflatoksin izleme projesi kapsamında 2002 yılında fındıkta 593, incirde 1695 örnek alınarak denetim yapılmıştır. Fındık ve mamullerinde %0.6, incir ve mamullerinde %4.3 oranında olumsuz sonuç çıkmış ve yasal işlem uygulanmıştır. Proje kapsamında, 2001-02 yıllarında fındık ve kuru incirden alınan tüm örneklerin %90'ında B₁ ve toplam aflatoksin miktarı, AB limitlerinin çok altında çıkmıştır.

AB gümrükleri hızlı gıda uyarı sisteminden 2001 yılında, 10 üye devlet tarafından Türkiye'den ithal edilen incirler için 16 ve fındıklar için 4 kez aflatoksin limitini aştığını gösteren uyarı yapılmıştır. 2002 yılında ise 11 üye devletten incir için 23 ve fındık için 62 uyarı mesajı alınmıştır. Yaşanan bu tür sorunlar nedeniyle Türkiye'de aflatoksin limitlerine uyum ile ilgili yasal düzenlemelerin hazırlanmasına karar verilmiştir (Ordukaya, 2008).

2.6 Türkiye’de ve Diğer Ülkelerde Fındıklarda Aflatoksin Limitleri

Dünya Ticaret Örgütü Sağlık ve Bitki Sağlığı (SBS) Anlaşması, uluslararası organizasyonlarda geliştirilen önerilere ve standartlara uyum konusunda üye ülkeleri tevsik etmektedir. Anlaşma, ithalat yapan ülkelere uluslararası standartlar ile daha sıkı önlemler oluşturulmasına izin vermektedir. SBS Anlaşması gereği AB, aflatoksin zehirlemesinin önemini vurguladıktan sonra 31 Ocak 1997’de AB Gıda Bilimi Komitesi tarafından gıdalarda maksimum aflatoksinin limitini azaltan bir yönerge hazırlanmıştır (Commission Regulation (EC) No: 194/97). AB Komisyonu, 8 Ocak 1998’de belirli gıda maddelerinde maksimum aflatoksin limitlerinin yeniden düzenlenmesi için Dünya Ticaret Örgütü’ne (DTÖ) bir öneri sunmuştur. DTÖ’ ne üye ülkeler, AB Komisyonu’nun aflatoksin düzenlemeleri ile ilgili önerisinin FAO/WHO Kodeks Komite toplantısından önce yapılmasının uygun olmadığını, toplantının beklenilmesini ve eşzamanlı olarak çalışılması gerektiğini açıklamıştır. AB, yapılan bu eleştirilere rağmen bu konuda kararlı olduğunu belirterek 20 Mart 1998 tarihine kadar içlerinde Türkiye’nin de olduğu DTÖ’ne üye ülkelere önerilen önlemlere yönelik yazılı olarak görüşlerini belirtmelerini istemiştir. İlgili ülkelere, önerilen standartların gelişmekte olan ülkelere AB’ne yapılan yerfıstığı ihracatını sınırladığı, önlemlerin SBS Anlaşması’na uymadığı ve açıklanamayan ticari bir engel oluşturduğu gibi görüşler bildirilmiştir. (Committee on Sanitary..., 1998). Haziran 1998’de AB önerilerinin uygunluğu bilimsel olarak onaylanmış fakat diğer üyelerden alınan yazılı yorumların incelenmesi sonucunda değişikliğe gidilmesi gerektiği kararına varılmıştır. Örneğin, aflatoksin için yapılan örneklemede ve islenmemiş yerfıstığı için maksimum aflatoksin limitlerinde esneklik sağlanmıştır. AB ülkeleri, 1998 yılına kadar gıda maddelerindeki aflatoksin için farklı standartlar uygulamıştır. Portekiz, aflatoksin standardını yerfıstığı için 25 ppb, diğer gıdalar için 20 ppb belirlerken Avusturya, gıdaların hepsi için aflatoksin B₁’i 1 ppb olarak saptamıştır. Bazı ülkeler ise, özel ürün gruplarında daha katı düzenlemelere gitmiştir. Örneğin, Fransa sadece yerfıstığında aflatoksin B₁ için 1 ppb olarak belirlemiş diğer gıdalarda ise çok esnek olmuştur. AB, Haziran 1998’de gıdalarda maksimum aflatoksin kalıntı limitini azaltan komisyon düzenlemesini (Commission Regulation (EC) No: 1525/98), örnekleme analiz metodları ve örnekleme yönteminin ayrıntısını belirten komisyon yönergesini (Commission Directive 98/53/EC) benimsemiştir. Komisyon yönergesi, daha çok islenme durumuna bağlı olarak yerfıstığında toplam aflatoksin limitini 15 ppb (8 ppb B₁), içerisine fındığın da dahil olduğu diğer sert kabuklu meyvelerde ve kurutulmuş meyvelerde ise 10 ppb (5 ppb B₁) olarak belirlemiştir. Ayrıca doğrudan insan tüketimine yönelik islenmiş tahıllarda, kurutulmuş ve sert kabuklu meyvelerde (Fındık dahil) toplam aflatoksin limiti 4 ppb (2 ppb

B₁) olarak belirlenmiştir (Commission Regulation (EC) No: 466/2001, Commission Regulation (EC) No: 472/2002). Gıda Kodeks'inde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde, gıdaların tamamında toplam aflatoksin limiti 20 ppb olarak belirlenmiş olup, AB toplam aflatoksin standardına göre çok daha yüksektir (Ordukaya, 2008). AB tarafından 19 Aralık 2006 tarihinde çeşitli gıdalarda birçok mikotoksin için maksimum limitler Kodeks Alimentarius Komitesinde çeşitli mikotoksinler için alınan kararları da içerecek şekilde tekrar yayınlanmıştır. Halen yürürlükte olan bu AB yönergesinde de fındıkta aflatoksin limiti işlenmemiş ürünlerde 10 ppb (5 ppb B₁), işlenmiş ve insan tüketimine doğrudan sunulacak ürünlerde 4 ppb (2 ppb B₁) olarak belirlenmiştir (Commission regulation (EC) No: 1881/2006).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) bünyesinde 1963 yılında kurulan Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC) bünyesinde (Gıda Maddelerinde Bulaşanlar Kodeks Komitesi - CCCF); ülkemiz üretim ve ihracatı açısından önemli bir yere sahip olan fındık, antepfıstığı ve kuru incir ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir. 2004 yılından beri sürdürülen çalışmalar, 30 Haziran - 4 Temmuz 2008 tarihleri arasında Cenevre/İsviçre'de yapılan CAC toplantısında tamamlanarak oybirliğiyle uluslararası standart haline getirilmiştir. Bugüne kadar AB'de aflatoksin limitleri; yukarıda da bahsedildiği gibi, doğrudan tüketime sunulan, işlenmiş ürünler için toplam (B₁ +B₂+G₁ +G₂) 4 ppb (B₁ için 2 ppb), doğrudan tüketime sunulmayacak herhangi bir işleme tabi tutulacak ürünler için ise toplam 10 ppb (B₁ 5 ppb) olarak uygulanmakta iken CAC'da yürütülen çalışmalar neticesinde bu limitler işlenmiş ürünlerde 10 ppb, işlenmemiş ürünlerde 15 ppb olarak belirlenmiştir. Bu ürünlerdeki aflatoksin limitinin, Dünya Ticaret Örgütü'ne (DTÖ) üye bütün ülkelerde en düşük bu seviyede olması gerektiğinden AB'nde de aynı şekilde ilgili mevzuatını değiştireceği düşünülmektedir. (Kodeks Alimentarius Komisyonu....., 2008)

Fındık, antepfıstığı ve badem ile ilgili 2004-2008 yılları arasında CAC tarafından yapılan çalışmalar sırasında AB, Avrupa Gıda Güvenliği Ofisi'nden (EFSA-European Food Safety Authorization) toplam aflatoksin limitinde olabilecek bir artışın tüketici sağlığını nasıl etkileyeceğinin araştırılmasını istemiştir. EFSA bu amaçla 4ppb, 8 ppb ve 10ppb toplam aflatoksin limitlerini insan sağlığına etkisi açısından değerlendirmiştir. EFSA bu konudaki araştırmasını tamamlayıp 2007 yılında yayınlamış ve fındık, antepfıstığı ve bademdeki toplam aflatoksin limitinin 4 ppb'den 8 veya 10 ppb'ye arttırılmasının aflatoksine maruz kalma ve kanser riski açısından önemsenmeyecek bir etki yapacağını belirtmiştir (EFSA, 2007).

CAC tarafından alınan kararlar ve AB'nin aflatoksin limitinin arttırılması yönündeki çalışmaları ülkemizin en önemli ihraç ürünlerinden olan fındığın önündeki aflatoksin sorununun çözümü açısından büyük önem taşımaktadır. Türkiye yapılan bu çalışmalar boyunca üzerine düşeni yapmış ve bu konuda yönlendirici etkiye sahip olmuştur. Ülkemizde de AB yasalarına uyum kapsamında aflatoksin limitleri açısından AB ile eşzamanlı olarak çeşitli tebliğler yayınlanmıştır. Son olarak 17.05.2008 tarihinde CAC ve AB kararları da göz önünde bulundurularak güncellenen şu an yürürlükte olan “Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ” (Tebliğ No: 1881/2006) Türk Gıda Kodeksi'nde (TGK) yayınlanmış ve bu tebliğde fındıkta aflatoksin limiti sadece toplam aflatoksin için olmak üzere 10 ppb olarak belirlenmiştir. Bu tebliğde fındık ve diğer gıda ürünleri için yer alan aflatoksin limitleri Çizelge 2.7'de verilmiştir (TGK Tebliğ no: 2008/26).

Çizelge 2.7 Çeşitli gıdalar için Türkiye’deki aflatoksin limitleri (TGK Tebliğ no:2008/26)

<u>Gıda Maddesi</u>	<u>Maksimum limit (µg/kg)</u>		
	B₁	B₁+B₂+G₁+G₂	M₁
AFLATOKSİN			
Fındık , antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	-	10,0	-
Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	-
Tahıllar (karabuğday (<i>Fagopyrum</i> sp.) dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,0	4,0	-
Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	-
Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050
Baharatların aşağıdaki türleri için; - Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiber ve acı kırmızıbiberin bütün ve toz hali dahil) - Karabiber (<i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) - Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) - Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) - Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	5,0	10,0	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	-	0,025
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5,0	10,0	0,5

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmamızda fındıkların işlenmesi ve ürünlerin analizleri olmak üzere 2 aşama vardır;

3.1.1 Fındık işleme çalışmalarında kullanılan malzemeler

Kontamine olmayan fındık: Aflatoksijenik küf aşılınmak üzere 240kg aflatoksinle kontamine olmamış fındık.

Doğal kontamine fındık: İşleme aşamalarında kullanmak üzere aflatoksin içeren 100kg fındık

İşletmelerden alınan fındık: Fındık işleme etsislerinin çeşitli aşamalarında alınan 80kg fındık

Pilot ölçekli fındık işleme makineleri: Boylama, kırma, kavurma, zar atma aşamalarını içeren düşük miktarda fındığın işlenmesi için kullanılabilen fındık işleme makineleri

3.1.2 Örneklerde yapılan analizlerde kullanılan malzemeler

3.1.2.1 Kimyasallar ve Hazırlanışları

Fosfat tamponlu tuz (PBS) : 0.2 g potasyum klörür, 0.2 g potasyum dihidrojen fosfat, 1.16 g disodyum hidrojen ortofosfat (veya 2.92 g hidrojen fosfat.12H₂O) ve 8 g sodium klörür 0.9 L distile suda çözülür. Tamamen çözüldükten sonra 0.1mol/L HCl veya 0.1 mol/L NaOH kullanarak pH 7.4'e ayarlanır. Distile su ile litreye tamamlanır.

Hazır olarak temin edilebilen PBS tabletleri de kullanılabilir. (1 tablet 100 ml su içerisinde çözündürülür. 25°C'nin altında saklanır)

Sodyum klörür

Benzen

Sülfürik asit

Potasyum dikromat

Asetonitril, HPLC için uygun kalitede

Metanol, teknik kalite

Metanol, HPLC için uygun kalitede

Saf su, HPLC için uygun kalitede

Benzen/Asetonitril çözeltisi: Benzen / Asetonitril [98+2 (v+v)]

Ekstraksiyon çözeltisi: Metanol / Su [8+2 (v+v)]

HPLC mobil fazı: Su / Asetonitril / Metanol [6+2+3 (v+v+v)] karışımı hazırlanır.

Çözeltinin 1 litresine 120 mg potasyum bromür ve 350 µl nitrik asit ilave edilir. Kullanmadan önce süzülür.

Formik asit

HPLC MS/MS mobil fazı: %1 formik asit içeren Su / Metanol [1+1 (v+v)] çözeltisi

Potasyum bromür

Nitrik asit , 4 mol/L

İmmunoafinite kolon: Rhone Diagnostis Technologies Aflaprep

4-8°C’de muhafaza edilir. Kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenir.

Aflatoksin B1, B2, G1, G2 standartları : Kristalize

3.1.2.2 Alet Ekipman Tanımları

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Cihazı (HPLC): SHIMADZU - HPLC 10Avp (**HPLC**

Şartları: Ex. :365nm, Em. :435nm, Sıcaklık : Oda sıcaklığı , Pompa akış hızı: 1 ml/dk, Basınç : Basınç değeri ortam sıcaklığına göre 155-175 bar arasında değişir)

Dedektör: RF-10AXL Flüoresans dedektör

HPLC kolonu: ACE C18, 250x4.6mm i.d., 5µm

Kobra cell türevlendirme cihazı: Rhone Diagnostics Technologies

HPLC MS/MS, Triple quadropole

Analitik terazi: 0.1 mg hassasiyetle ölçüm yapabilen

Laboratuvar terazisi: 0.1 g hassasiyetle ölçüm yapabilen

Su aktivitesi cihazı: Novatron, Novasina EEJA-3

Homojenizatör: Robot Coupe R60

Rotary evaporatör

Yüksek devirli blender: 1 L blender kabı ile birlikte

Manyetik karıştırıcı

Whatman No. 4 filtre kağıdı

Çeşitli hacimlerde balon joje

Mobil faz süzme aparatı

Otomatik pipet : 0-100 µl ve 100-1000 µl arası ayarlanabilen

3.2 Yöntem

Bu çalışma kapsamında, fındık işletmelerinde aflatoksin riskini en aza indirilmesini sağlamak amacı ile fındık işletme tesisindeki üretim koşulları dikkate alınarak;

- I. PİLOT ÖLÇEKLİ UYGULAMA: Fındık ürünlerinde aflatoksin oluşumunun sağlanması için mikrobiyolojik ön denemelerin gerçekleştirilmesi ve işleme aşamalarında aflatoksin düzeyinin belirlenmesi,
- II. İŞLETME ÖLÇEKLİ UYGULAMA: Fındık işleme tesislerinde fiziksel ve ısı süreçlerinin aflatoksin düzeyi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan çalışmalarda alınan fındık örneklerinde Bölüm 3.1’de isimleri ve özellikleri verilen malzemeler kullanılarak aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.2)

3.2.1 Pilot ölçekli uygulama (Aşama 1)

Fındık ürünlerinde aflatoksin oluşumunun sağlanması için mikrobiyolojik ön denemelerin gerçekleştirilmesi ve işleme aşamalarında aflatoksin düzeyinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda toplam 340 kg fındık örneği kullanılmıştır. 40 kg fındık aşılama öncesi ön denemeler için kullanılmış olup, aşılama çalışması 200 kg lık fındık örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Aşılama aşaması için temin edilen örnekler homojen olması amacı ile karıştırılmış ve 10 kg lık üç farklı örnekleme yapılarak aflatoksin analizleri ve su aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Su aktivitesi analizi için fındıklar iyice öğütülmüştür ve sonuçlar su aktivitesi cihazı (Novatron, Novasina EEJA-3) vasıtasıyla elde edilmiştir. Örnekler 10 kg partilere ayrılarak aşılma çalışmalarına başlanmıştır.

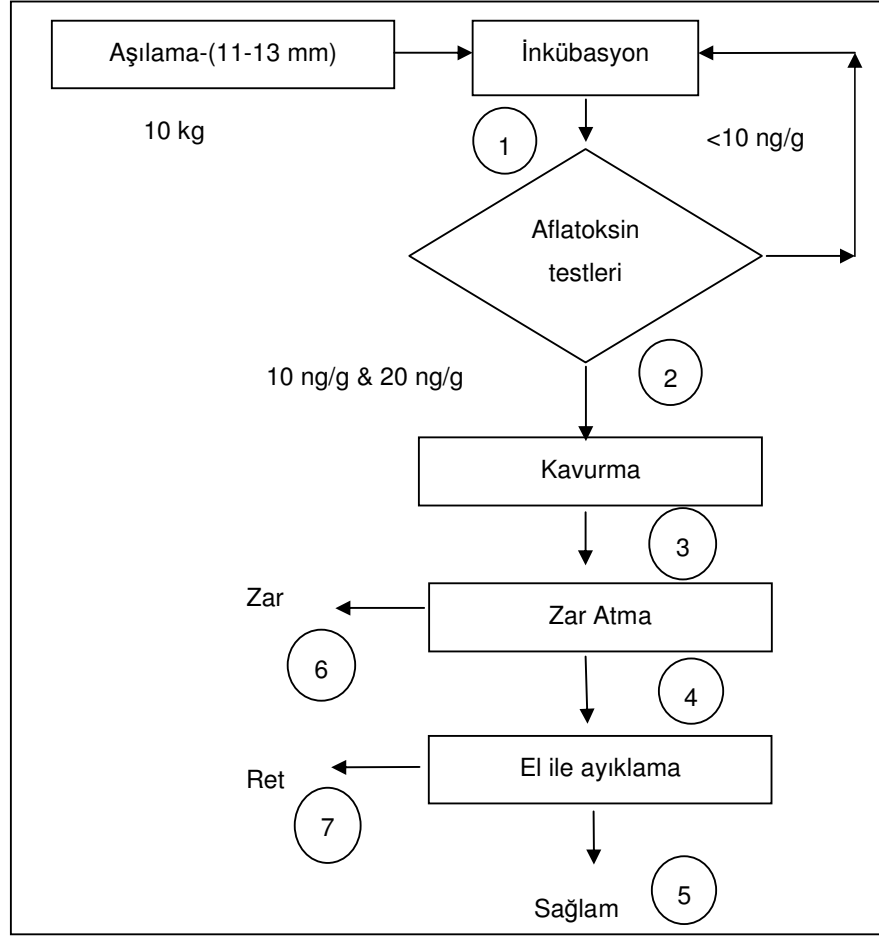
Pilot ölçekli bu uygulamada birincisi aflatoksijenik küf aşılınmış fındıklarda, ikincisi doğal olarak kontamine olmuş fındıklarda olmak üzere iki farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Birinci uygulama aşamalarında TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Küf Koleksiyonundan seçilen aflatoksin üretebilme potansiyeli yüksek *A.flavus* küfü uygun besiyeri ortamında çoğaltılarak 500 g fındığa 0.06 ml/g oranında aşılınmıştır. Çalışma 10ng/g ve 20ng/g olacak şekilde iki farklı aflatoksin düzeyinde gerçekleştirilmek üzere planlanmıştır. Her bir düzeyde 10 paralel çalışma yürütülmüştür. Aşılama öncesinde fındıkların su aktivitesinin 0.85 düzeyine getirilebilmesi için fındıklar nemlendirilmiş ve %85 Bağıl Neme sahip ortamda denge bağıl nemine ulaşmaya kadar bekletilmiştir. %85 denge bağıl nemine ulaşan fındıklar toksijenik *A.flavus* küfü ile aşılınarak farklı aflatoksin düzeyine ulaşmaya kadar sabit sıcaklık (25°C) ve bağıl nem (%85) koşullarında bekletilmiştir (Bu çalışma TÜBİTAK MAM

Gıda Enstitüsü Mikoloji Laboratuvarı tarafından yapılmıştır). Yüksek aflatoksin düzeyine ulaşan 500 g lık toksinli fındıklar istenilen aflatoksin seviyesinde olacak oranda 10 kg lık fındıklarla karıştırılarak kavurma denemeleri gerçekleştirilmiştir. Karıştırma işleminden sonra başlangıç aflatoksin miktarını tespit etmek amacı ile ilk analiz yapılmıştır.

İkinci denemede kullanılacak doğal olarak aflatoksin içeriği yüksek fındık partisi kabuklu fındıkların arasında tanelenmiş olarak bulunan iç fındıkların seçilmesi ile oluşturulmuş ve bu parti aşılama çalışmasında olduğu gibi ısıtma işlemi ve ayıklama işlemine tabi tutulmuştur.

Pilot ölçekli uygulamada aşılama fındıklar kullanılarak yapılan çalışmanın basamakları ve aflatoksin analizi için örnek alınan aşamalar aşağıda 3 madde halinde ve Şekil 3.1’de özetlenmiştir:

- a. Toksin üreten küflerin seçilerek geliştirilmesi (TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Mikoloji Laboratuvarı tarafından yapılmıştır)
- b. Fındık ürünlerinde yaklaşık 10ng/g ve 20ng/g seviyelerinde aflatoksin oluşacak şekilde toksin üreten küflerin fındık örneklerine aşılama (TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Mikoloji Laboratuvarı tarafından yapılmıştır).
- c. Fındıkların pilot işletmede işlenerek kavurma, zar atma ve el ile ayıklama işlemlerinin yapılması ve her aşamada aflatoksin analizlerinin yapılması



Şekil 3.1 Aşama 1 çalışma planı

3.2.2 İşletme ölçekli uygulama

3.2.2.1 Fındık işleme tesislerinde uygulanan fiziksel işlemlerin (kıрма, boylama) aflatoksine etkisi (Aşama 2)

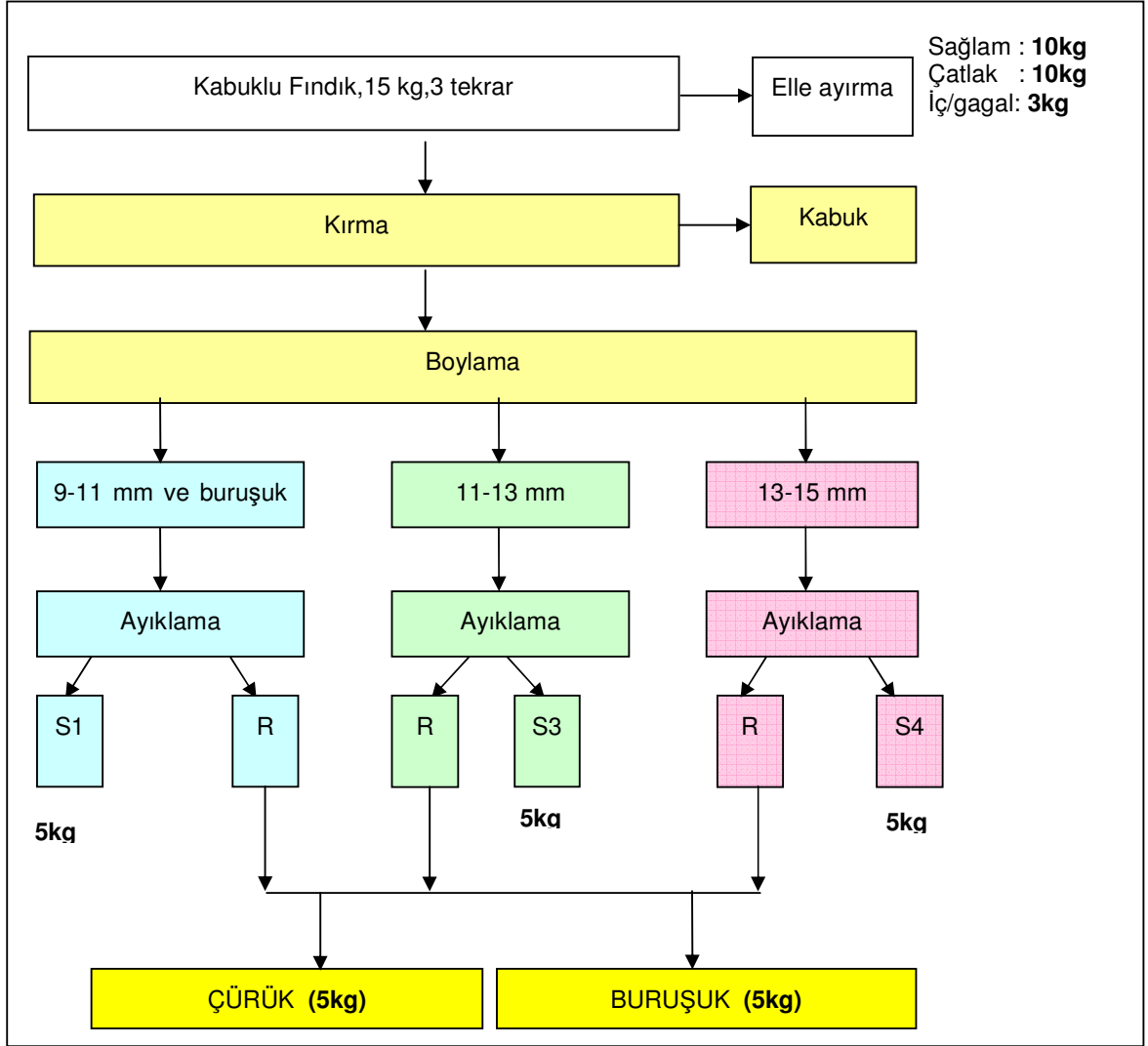
Fındık işleme tesislerinde uygulanan fiziksel süreçlerin aflatoksin düzeyi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları için yürütülen çalışmada 10 tonluk fındık partilerinde Şekil 3.2'deki çalışma planına göre örnekleme yapılmış ve alınan örneklerde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiştir. Alınan örnek miktarları ve hangi aşamalarda örnekleme yapıldığı Şekil 3.2'de verilmiştir. 10 tonluk fındıklar kullanılarak çalışma yapılmış ve kıрма işlemi için kullanılan fındıklarda aflatoksin analizi 15 kg'lık örneklerde 3 paralel çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kabuklu fındıklarda aflatoksin dağılımının belirlenmesi amacıyla sağlam, kabuksuz fındık ve çatlak fındıklarda aflatoksin analizleri yapılmış, daha sonra boyutlandırma işleminin etkisi için buruşuk, 9-11mm, 11-13mm, 13-15mm ve >15 mm olmak üzere 5 farklı fındık boyutlarındaki fındıklarda aflatoksin analizleri gerçekleştirilmesi planmış, ancak yapılan çalışmada örnek olarak seçilen fındıkların özelliklerine (Levant kalite) bağlı olarak 5 farklı boylama yapılması mümkün olamamış, 9 mm'nin altındaki fındıklar ile 9-11mm fındıklar için ayrı ayrı olarak ve 15mm üstü fındıklar ile örnekleme yapılamamıştır (Şekil 3.2). Son olarak elle ayıklama işleminin etkisi için çürük, buruşuk ve sağlam fındıklar el ile seçilmiş ve aflatoksin analiz gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2 Fındık işleme tesislerinde uygulanan ısı işlemlerin (beyazlatma, kavurma) aflatoksine etkisi (Aşama 3)

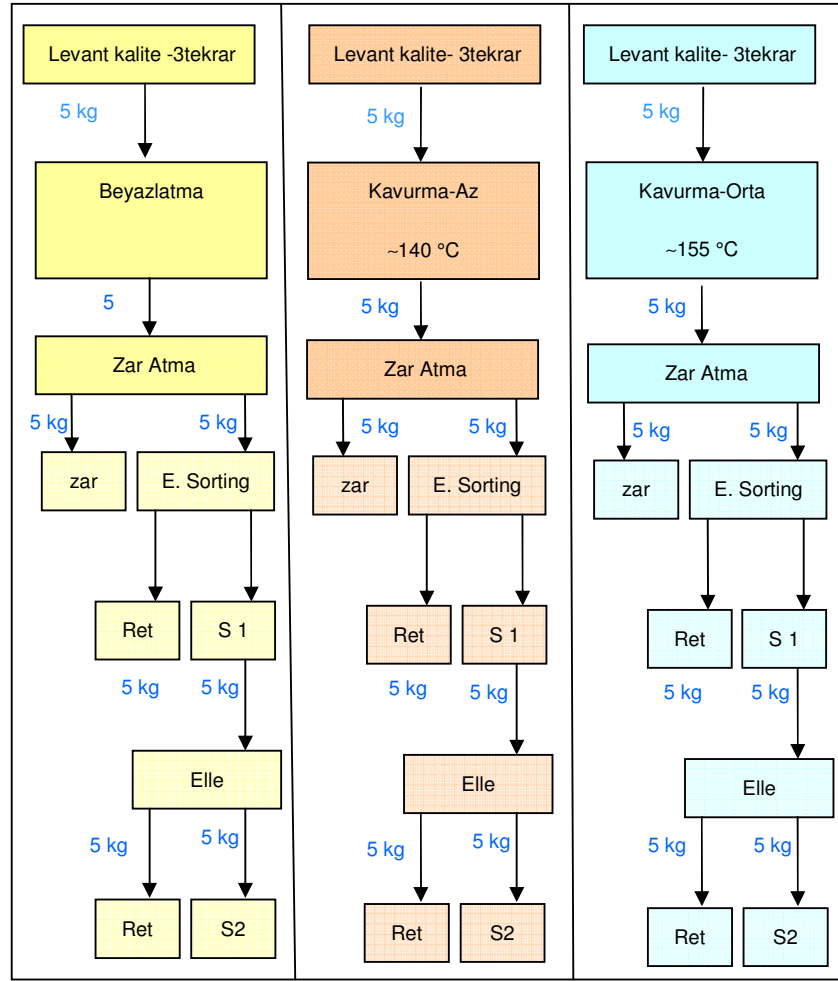
Fındık işleme tesislerinde uygulanan ısı işlemlerin aflatoksin düzeyi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları için yürütülen çalışmada Çizelge 3.1'de verilen 3 farklı fındık işleme tesisinden Şekil 3.3'deki çalışma planına göre örnekleme yapılmış ve alınan örneklerde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiştir. Alınan örnek miktarları ve hangi aşamalarda örnekleme yapıldığı Şekil 3.3'de verilmiştir. Beyazlatma işleminin aflatoksine etkisinin belirlenmesi amacıyla beyazlatma öncesi fındıklarda, beyazlatılan fındıklarda, zarda ve beyazlatma sonrası ayıklama aşamalarında alınan örneklerde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiştir. Kavurma işleminin etkisinin belirlenmesi amacıyla da 2 farklı sıcaklıktaki kavurma prosesinde kavurma öncesi fındıklarda, kavurma sonrası fındıklarda, zarda ve kavurma sonrası ayıklama aşamalarında alınan örneklerde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).

Çizelge 3.1 Firmalardan yapılan örnekleme çalışmaları

İşlem Adı	Firma1	Firma2	Firma3
Beyazlatma çalışmaları (125°C)	X	X	X
Az Düzeyde Kavurma (140-145°C)	X	X	X
Orta Düzeyde Kavurma (150-155°C)	X	X X	



Şekil 3.2 Aşama 2 çalışma planı



Şekil 3.3 Aşama 3 çalışma planı

3.2.3 Fındık örneklerinde aflatoksin analizi

Kristalize aflatoksin standartları kullanıldı. Shimadzu RF-10AXL floresans dedektörlü Shimadzu Class Vp 5.0 HPLC cihazında ters faz kolon (ACE C18, 250x4.6mm i.d., 5µm - Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland) kullanılarak analizler yapıldı. Analizde kullanılan malzemeler ve özellikleri Bölüm 3.1’de verilmiştir.

Numuneler homojenizatör (Robot Coupe R60) yardımıyla 1:1 oranında su ile homojen edildi. Homojen edilmiş numunelerden 100g laboratuvar numunesi alınarak metanol-su çözeltisi ile hızlı karıştırıcıda (Waring blender) ekstraksiyon işlemi yapıldı. Immunoaffinite kolonlardan geçirilerek saflaştırılan aflatoksinler kolon sonrası türevlendirme işlemiyle (Kobra-cell) HPLC cihazında analiz edildi. Kullanılan yöntem (AOAC 999.07, 2005) TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü laboratuvarlarında valide edilmiş ve Alman Akreditasyon Kuruluşu DAR tarafından ISO/IEC 17025:2005 standardına göre akredite edilmiş bir yöntemdir.

3.2.3.1 Aflatoksin standardının hazırlanması:

Spektrofotometre kalibrasyonu:

9 mmol/L sülfürik asit çözeltisi hazırlanır (1ml konsantre sülfürik asit 2L’ye saf su ile tamamlanır.). Hazırlanan çözelti ile 0.25 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi hazırlanır (78mg potasyum dikromat 1L, 9 mmol/L sülfürik asit ile çözülür.).

25ml 0.25 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi 9 mmol/L sülfürik asitle 50ml’ye tamamlanarak 0.125 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi hazırlanır.

25ml 0.125 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi 9 mmol/L sülfürik asitle 50ml’ye tamamlanarak 0.0625 mmol/L potasyum dikromat çözeltisi hazırlanır.

Kör olarak kullanılan 9 mmol/L sülfürik asit çözeltisine karşın, değişik konsantrasyonlarda hazırlanan üç potasyum dikromat çözeltisinin 350nm civarındaki maksimum absorpsiyonu (A) ölçülür.

Her konsantrasyonun molar absorptivitesi, ϵ , hesaplanır;

$$\epsilon = A / (L \times C), \text{ (C= konsantrasyon, mol/L, L= 1cm)} \quad (3.1)$$

Hesaplanan üç ϵ değerinin ortalaması alınır, ve düzeltme faktörü F bulunur;

$$F = 3160 / \epsilon_{\text{ort}} \quad (3.2)$$

0.95<F<1.05 şartı sağlanıyorsa bu spektrofotometre standart kalibrasyonu için kullanılabilir.

Stok standart hazırlanması ve kalibrasyonu

Kristal halde bulunan aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ standartları, Benzen/Asetonitril [98+2 (v+v)] çözeltisi içinde çözündürülerek 10µg/ml konsantrasyonda çözeltiler elde edilir.

Kör olarak kullanılan Benzen/Asetonitril çözeltisine karşın hazırlanan standartların 350nm'deki absorbansları (A) okunur. Her aflatoksinin konsantrasyonu C (µg/L), 3.3 nolu eşitlik ve Çizelge 3.2'deki veriler kullanılarak hesaplanır.

$$C = 1000 \times F \times A \times M_i / \epsilon_i \quad (3.3)$$

A: Absorbans değeri

M: Her bir aflatoksinin molekül ağırlığı, (g/mol)

ϵ : Her bir aflatoksinin Benzen/Asetonitril içindeki molar absorbtivitesi, (m²/mol)

F: Spektrofotometre faktörü

Çizelge 3.2 Aflatoksinlerin molekül ağırlığı (M) ve molar absorptiveleri (E)

Aflatoksin	M (g/mol)	ϵ (m ² /mol)
B ₁	312	19800
B ₂	314	20900
G ₁	328	17100
G ₂	330	18200

Hazırlanan standartlardan Benzen/Asetonitril içerisinde 1000ng/ml aflatoksin B₁ ve G₁, 200ng/ml aflatoksin B₂ ve G₂ standartları hazırlanır.

Karışık stok standart hazırlamak için 10ml'lik balon jöjeye seyreltik standartlardan 1'er ml alınır. Çözelti azot gazı altında uçurulur. 4ml metanol eklenir. Aflatoksinlerin çözünmesi beklenir. Daha sonra 10ml'ye su ile tamamlanır. İyice karıştırılır. (Karışık stok standardın son konsantrasyonu B₁ ve G₁ için 100ng/ml; B₂ ve G₂ için 20ng/ml olur.)

Stok standartlar koyu renkli numune şişelerine konur ve parafilm ile iyice kapatılır. 4°C'nin altında muhafaza edilir. Tekrar kullanılacağı zaman önce oda sıcaklığına gelmesi beklenir daha sonra parafilm çıkarılır

Çalışma standardı hazırlanması:

Hazırlanan karışık stok standarttan Çizelge 3.3'deki miktarlar alınır ve 10 ml'lik balon jöjelere konur. Metanol/su (40/60) ile çizgisine tamamlanır.

Çizelge 3.3 Çalışma standartlarının hazırlanması

Çalışma standardı	Ara standarttan alınan miktar (µl)	Son konsantrasyonlar (ng/ml)			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	40	0.400	0.080	0.400	0.080
2	120	1.200	0.240	1.200	0.240
3	200	2.000	0.400	2.000	0.400
4	280	2.800	0.560	2.800	0.560
5	360	3.600	0.720	3.600	0.720

3.2.3.2 Kalibrasyon grafiği

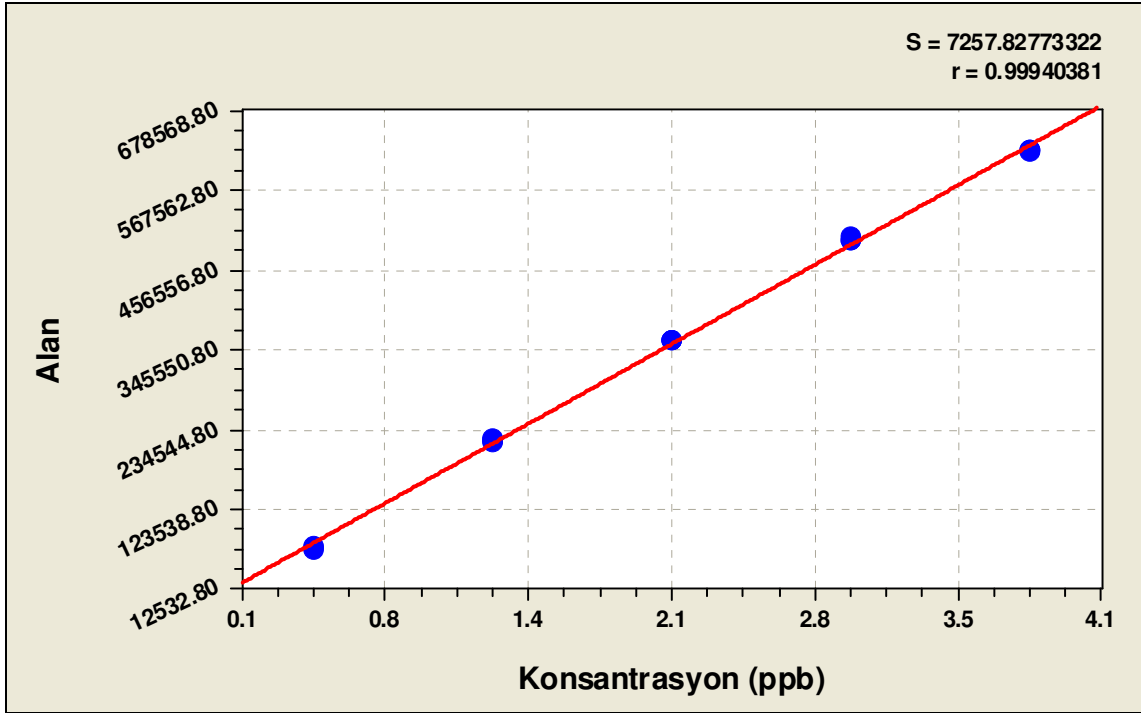
Her bir aflatoksin için en az beş ayrı noktadan oluşan ve her düzeyde 3 paralelli olmak üzere toplam 15 standart enjeksiyonu ile kalibrasyon grafikleri çizilir. Kalibrasyon grafiği için 3.2.3.1'de hazırlanan çalışma standartları kullanılır. Hazırlanan her standarttan HPLC'ye 100µl enjekte edildikten sonra elde edilen sonuçlardan faydalanılarak konsantrasyona karşı alan grafikleri çizilir. Bu çalışmada kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan aflatoksin standartlarının spektrofotometrede hesaplanan konsantrasyonları Çizelge 3.4'de ve kromatogramlarından elde edilen alanları Çizelge 3.5'de verilmiştir. Bu standartlar kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafikleri (Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7) ve her standardın HPLC'den elde edilen kromatogramı aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12).

Çizelge 3.4 Kalibrasyon grafiğinde kullanılan standartların konsantrasyonları

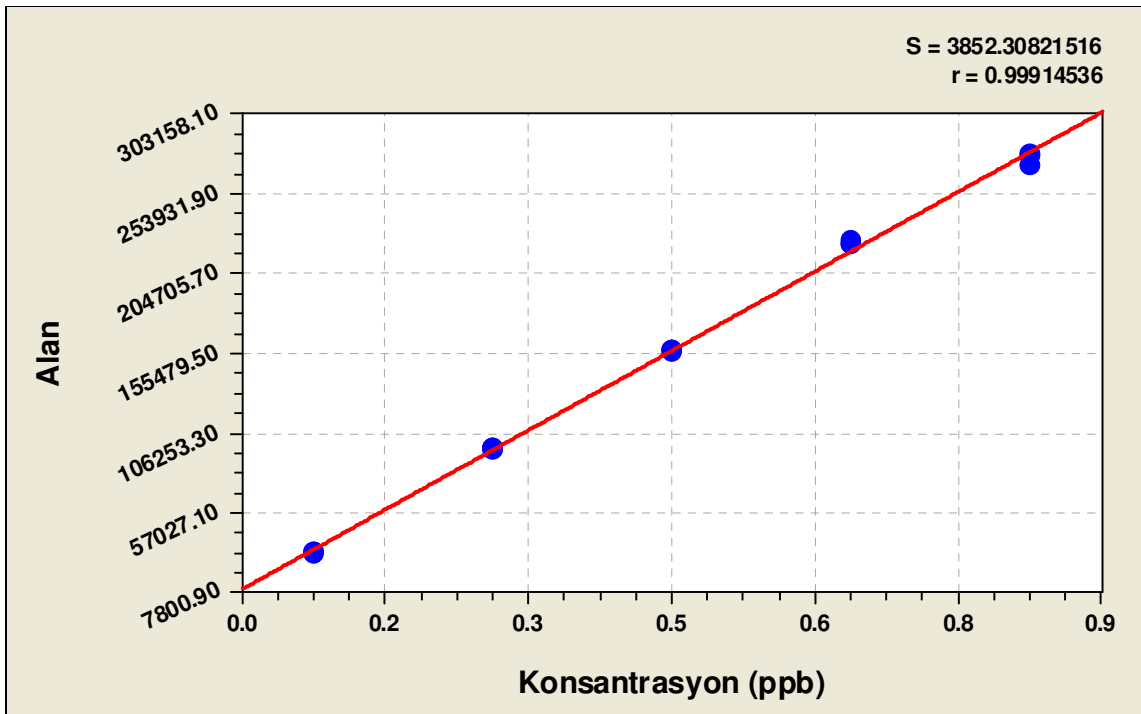
	Son konsantrasyonlar (ng/ml)			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	0.422	0.092	0.414	0.078
2	1.265	0.275	1.241	0.233
3	2.108	0.458	2.068	0.388
4	2.951	0.641	2.895	0.543
5	3.794	0.824	3.722	0.698

Çizelge 3.5 Kalibrasyon grafiğinde kullanılan standartların konsantrasyonları ve alanları

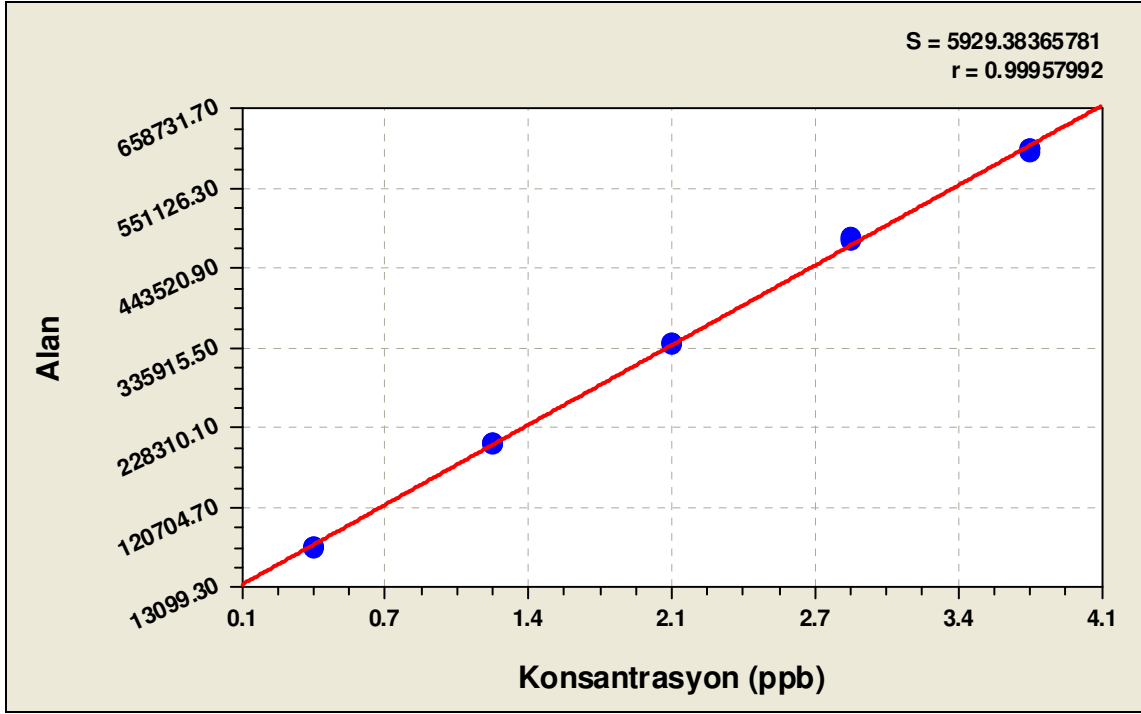
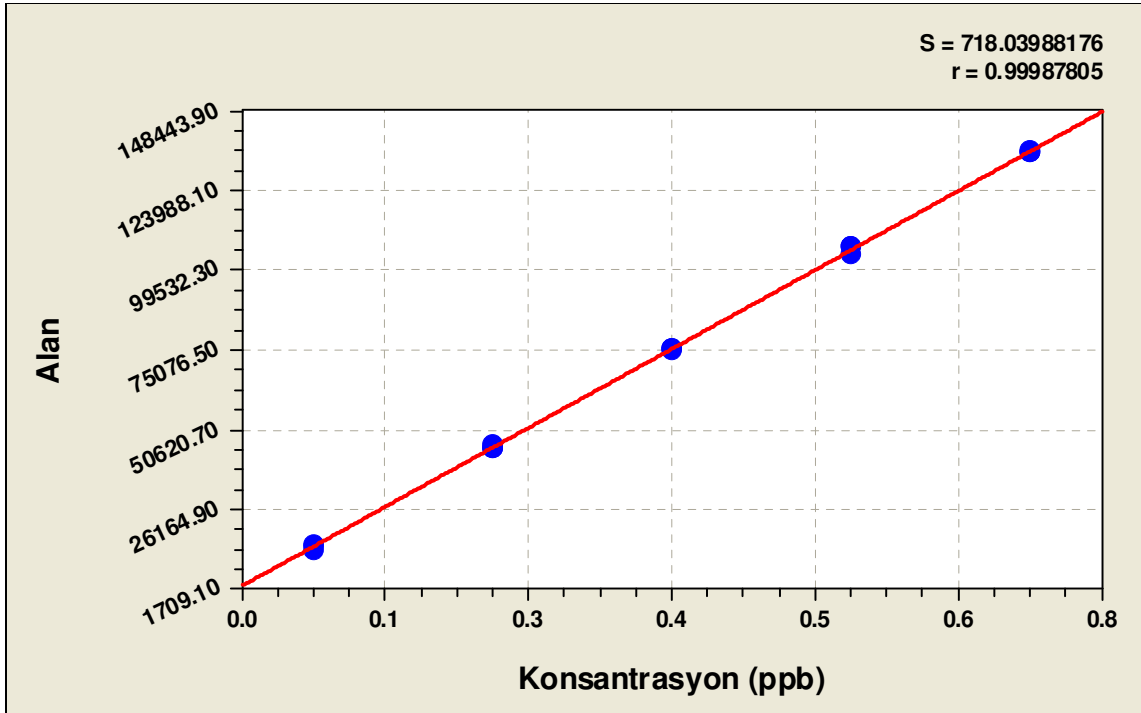
B ₁ (ppb)	Alan	B ₂ (ppb)	Alan	G ₁ (ppb)	Alan	G ₂ (ppb)	Alan
0.422	72708	0.092	32414	0.414	66902	0.078	14827
0.422	70974	0.092	33685	0.414	68276	0.078	15669
0.422	68036	0.092	33052	0.414	67727	0.078	13937
1.265	223207	0.275	97893	1.241	209403	0.233	46449
1.265	220255	0.275	97123	1.241	209586	0.233	45240
1.265	216708	0.275	95670	1.241	206752	0.233	45157
2.108	359252	0.458	157593	2.068	343489	0.388	75596
2.108	358665	0.458	157293	2.068	341723	0.388	74980
2.108	357952	0.458	157032	2.068	342557	0.388	75647
2.951	503450	0.641	226032	2.895	485934	0.543	106854
2.951	496809	0.641	223201	2.895	483962	0.543	106652
2.951	498463	0.641	223261	2.895	481374	0.543	104698
3.794	623068	0.824	278545	3.722	604929	0.698	135947
3.794	622815	0.824	271209	3.722	599857	0.698	135533
3.794	621034	0.824	277964	3.722	604623	0.698	136216

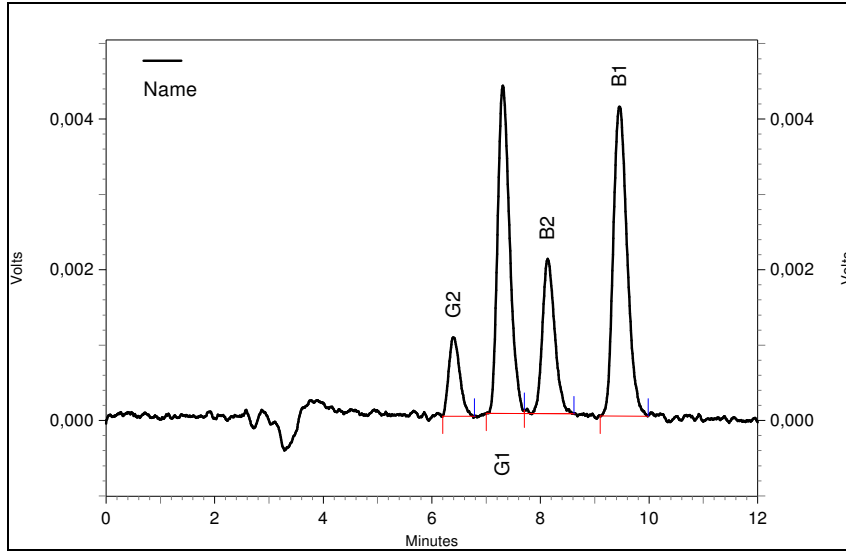


Şekil 3.4 Aflatoxin B₁ kalibrasyon grafiği

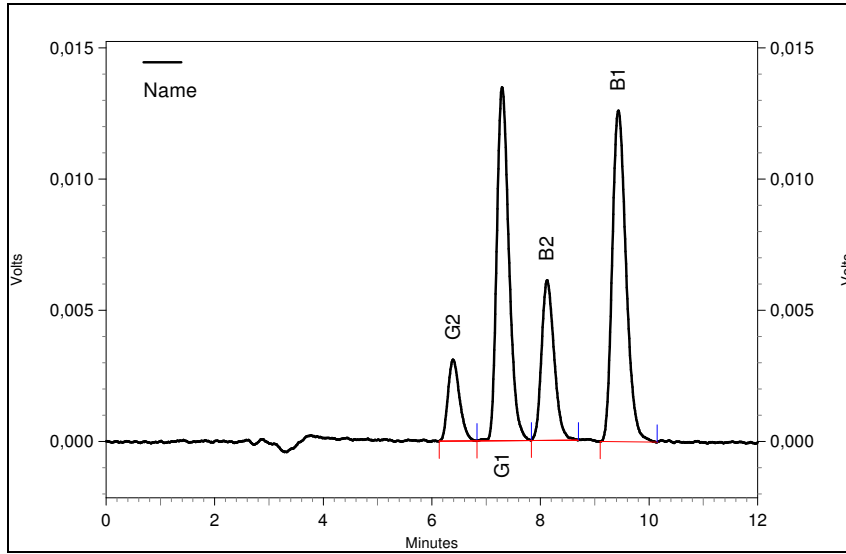


Şekil 3.5 Aflatoxin B₂ kalibrasyon grafiği

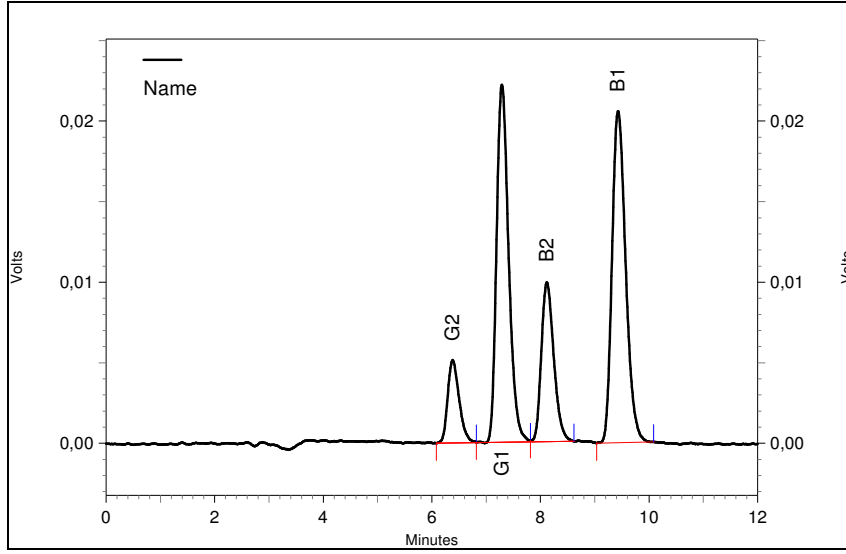
Şekil 3.6 Aflatoxin G₁ kalibrasyon grafiğiŞekil 3.7 Aflatoxin G₂ kalibrasyon grafiği



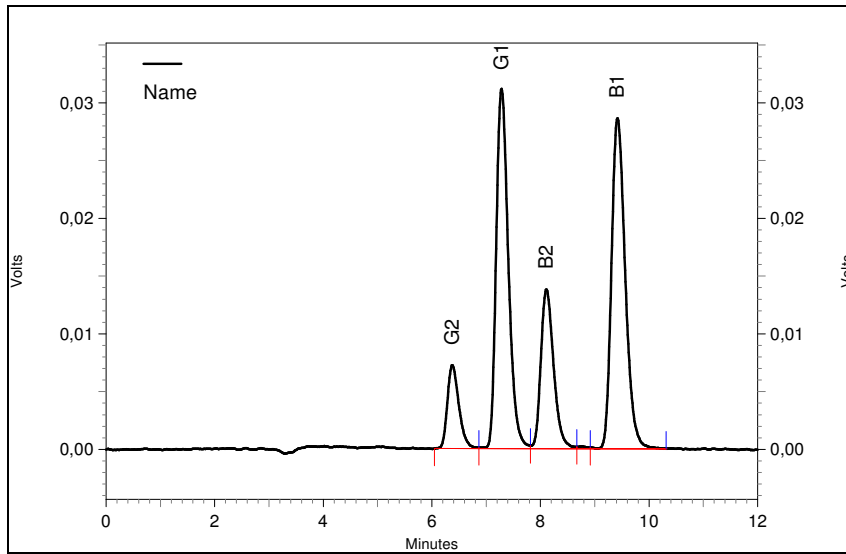
Şekil 3.8 Aflatoksin standartları kromatogramı (B₁:0.422ppb, G₁:0.414ppb, B₂:0.092ppb, G₂:0.078ppb)



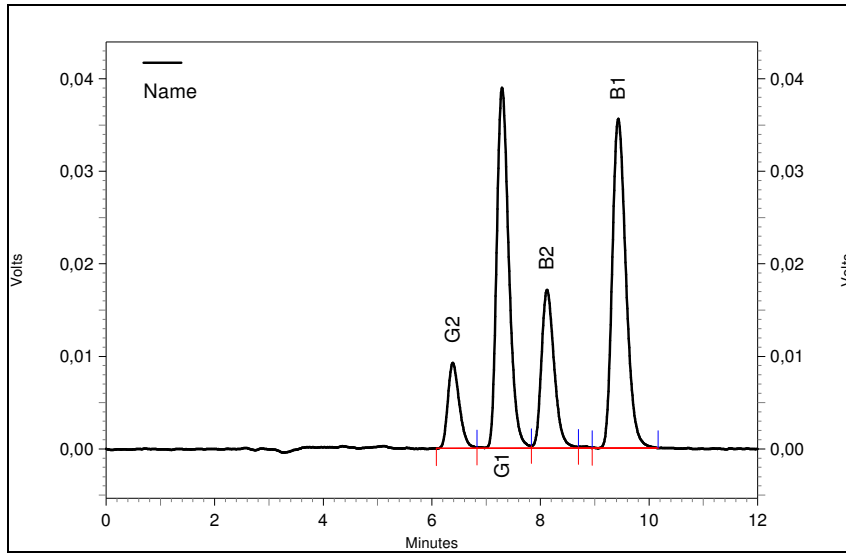
Şekil 3.9 Aflatoksin standartları kromatogramı (B₁:1.265ppb, G₁:1.241ppb, B₂:0.275ppb, G₂:0.233ppb)



Şekil 3.10 Aflatoksin standartları kromatogramı (B₁:2.108ppb, G₁:2.068ppb, B₂:0.458ppb, G₂:0.388ppb)



Şekil 3.11 Aflatoksin standartları kromatogramı (B₁:2.951ppb, G₁:2.895ppb, B₂:0.641ppb, G₂:0.543ppb)



Şekil 3.12 Aflatoksin standartları kromatogramı (B₁:3.794ppb, G₁:3.722ppb, B₂:0.824ppb, G₂:0.698ppb)

3.2.3.3 Fındıklardan aflatoksinlerin ekstraksiyonu

Numuneler homojenizatör (Robot Coupe R60) yardımıyla 1:1 oranında su ile homojen edilir. 1L'lik blender kabına 100 gram homojenize edilmiş numune 0.1 g hassasiyetle tartılır. 4 gram sodyum klörür, 50 ml su ve 150 ml metanol eklenir, 3 dakika yüksek devirde karıştırılır. Whatman No.4 Filtre kağıdından süzülür. Süzülen kısımdan 5 ml alınır 5 ml PBS çözeltisi ile iyice karıştırılır. Bölüm 3.2.3.4 uygulanır.

3.2.3.4 İmmünoafinite safhası ve enjeksiyon

İmmünoafinite kolonun başındaki mavi kısım çıkarılır, ucu kesilir ve tekrar takılır. Kolon bu kısımdan el pompasına sabitlenir. Ekstraksiyonu tamamlanmış numune el pompasındaki cam enjektöre konur. Kolondan saniyede yaklaşık 1 damla akacak şekilde geçirilir. Daha sonra 2 kez 10 ml saf su geçirilerek yıkama yapılır (akış hızı 5 ml/ dakikayı geçmemelidir) Kolondan birkaç saniye hava geçirilip su tamamen çıkarılır. 1 ml metanol alınır ve kolondan yavaşça geçirilir. Bu sırada bir iki kez piston geri çekilerek (backflushing) dolgu maddesinin metanol ile iyice teması sağlanır. Tüm metanol 5 ml'lik koyu renkli şişeye toplanır. 1 ml su ile işlem tekrarlanır ve su aynı şişeye alınır. Toplam hacim 2 ml olur. HPLC'ye 100µl enjeksiyon yapılır. Her numune için en az 2 enjeksiyon yapılır.

3.2.3.5 Hesaplamalar

Analizin seyreltme faktörü 2’dir. Bu yüzden sonuç 2 ile çarpılır.

Örnek: Analiz sonunda Aflatoksin B₁ 2 ng/ml bulunsun.

$(50\text{gram}/250\text{ml}) \times 5\text{ml}/2\text{ml} = 0.5\text{g/ml}$ ’dir.

Örneğin 0.5g/ml’inde 2ng/ml bulunursa 1gramında 4ng olur. Sonuç: 4 ng/g Aflatoksin B₁

3.2.4 HPLC MS/MS kullanılarak kavurma işleminin fındıklardaki aflatoksine etkisinin araştırılması

Aflatoksinlerin degradasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar olmasına karşın fındıklardaki kavurma işleminin aflatoksini nasıl etkilediği konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple ön çalışma niteliğinde kalitatif bilgi edinmek üzere bu çalışma tasarlanmıştır. HPLC MS/MS kullanılarak aflatoksinlerin kavurma işlemi sonrasında fındıktaki degradasyonunun incelenmesi 4 aşamada gerçekleştirilmiştir:

3.2.4.1 Fındığın aflaoksijenik küf ile aşılınması

Fındıklarda kavurma işleminin aflatoksin üzerine etkisinin araştırılması için bir deneme yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle aflatoksin içermeyen fındık örneği TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Mikoloji Laboratuvarında aflatoksijenik küf ile aşılınarak yaklaşık 30 ppb düzeyinde aflatoksin içerecek kadar inkübe edilmiştir. Aşılama işlemi Bölüm 3.2.1’de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Çalışma 3 paralelli olacak şekilde planlanmıştır.

3.2.4.2 Fındık örneklerinin kavrulması

Aşılınmış ve aşılınmamış örnekler homojenizasyonun sağlanması amacıyla blender kullanılarak öğütülmüş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra petri kaplarına 3 paralelli olacak şekilde öğütülmüş örneklerden 0.1g hassasiyetle 25g tartılmıştır. Aşılınmış ve aşılınmamış örnekler ~155 °C’de 30 dakika süreyle TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Fındık İşleme tesislerinde kavrulmuşlardır.

3.2.4.3 Fındık örneklerinden aflatoksin ve muhtemel degradasyon ürünlerinin ekstraksiyonu

Petrilerdeki 25g örnekler 1L'lik blender kabına aktarılır. Üzerine 4 gram sodyum klörür, 50 ml su ve 75 ml metanol eklenir, 3 dakika yüksek devirde karıştırılır. Whatman No.4 Filtre kağıdından süzülür. Süzülen kısımdan 20ml alınarak azot altında kuruluğa kadar uçurulur ve kalıntı 1 ml metanolde çözülür. Kalitatif bir çalışma yapıldığından kavurma sonrasındaki nem kaybı dikkate alınmamıştır.

3.2.4.4 Örneklerin HPLC MS/MS'e enjeksiyonu

Bu çalışma TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Kalıntı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Kütle spektrometresine örneklerden 10µl enjeksiyon edilmiştir. Mobil faz olarak %1 formik asit içeren methanol:su (50:50) karışımı kullanılmıştır. Elektron Sprey İyonizasyon (ESI) tekniği ile iyonizasyon gerçekleştirilmiş ve "Triple quadropole" dedektör kullanılmıştır. Örneklerin 50-500 m/z (Kütle/yük) aralığında kütle spektrumları alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Pilot Ölçekli Uygulamalar Sonrası Elde Edilen Bulgular (Aşama 1)

Pilot ölçekli bu uygulamada birincisi aflatoksijenik küf aşılınmış fındıklarda, ikincisi doğal olarak kontamine olmuş fındıklarda olmak üzere iki farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Aşılınmış fındıklarla yapılan çalışmada da iki farklı aflatoksin konsantrasyonunda çalışılmıştır. Aşılınmış fındıklarla yapılan her iki uygulama sonucunda (Şekil 4.1, 4.2) işleme öncesi ve sonrasında ulaşılan aflatoksin düzeyleri Çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

Birinci aşılama çalışmasında 10 denemenin 8’inde $8.20 \pm 1.00 \text{ ng/g}$ toplam aflatoksin düzeyine ulaşılmıştır. İki denemede aflatoksin düzeyleri yaklaşık 2 ng/g olarak tespit edilmiş ve değerlendirmeye alınmamıştır. Bu çalışmada, zar atma amacı ile $120\text{-}125^\circ\text{C}$ ’de, 30 dk yapılan ısıt işlemleri sonrasında aflatoksin düzeyinde **%46** azalma kaydedilmiştir. Aflatoksin miktarının özellikle zarda ($11.00 \pm 5.24 \text{ ng/g}$) yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Elle ayıklanan çürük fındıklarda $1.27 \pm 0.84 \text{ ng/g}$, sağlam fındıklarda ise $0.17 \pm 0.07 \text{ ng/g}$ aflatoksin tespit edilmiştir. Tüm denemelerde fındık zarının atılması ve çürüklerin elle ayrılması ile aflatoksin düzeyinde 97.98 ± 0.84 azalma kaydedilmiştir. İkinci aşılama çalışmasında aşılınan fındıklar 3 gün sonrasında istenilen aflatoksin düzeyine ulaşmış ve fındıklarda çürümeler başladığı gözlenmiştir. 10 denemede ortalama $27.66 \pm 8.80 \text{ ng/g}$ toplam aflatoksin düzeyi belirlenmiştir. İkinci aşılama çalışmasında, zar atma amacı ile $120\text{-}125^\circ\text{C}$ ’de, 30 dk yapılan ısıt işlemleri sonrasında aflatoksin düzeyinde **%51** azalma kaydedilmiştir. Aflatoksin miktarının zarda ve çürük fındıklarda yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Elle ayıklanan çürük fındıklarda $21.05 \pm 11.61 \text{ ng/g}$, sağlam fındıklarda ise $0.42 \pm 0.08 \text{ ng/g}$ aflatoksin tespit edilmiştir. Tüm denemelerde fındık zarının atılması ve çürüklerin elle ayrılması ile aflatoksin düzeyinde 98.35 ± 0.33 azalma kaydedilmiştir.

Doğal olarak aflatoksin içeriği yüksek fındık partisi kabuklu fındıkların arasında tanelenmiş olarak bulunan iç fındıkların seçilmesi ile oluşturulmuş ve bu parti aşılama çalışmasında olduğu gibi ısıt işlem ve ayıklama işlemine tabi tutulmuştur ve aşılama çalışmasında elde edilen bulguları destekleyici sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.3).

Doğal olarak bulaşık fındık partisinde de çürük fındıkların ve fındık zarının uzaklaştırılması ile son üründe aflatoksin konsantrasyonunun önemli ölçüde (99.88) azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Bu çalışmada yapılan analizlere ait HPLC kromatogramları Şekil 4.4 - 4.21’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Aşılannmış findıkların (~5-10ng/g düzeyinde) kavurma öncesi ve sonrasında aflatoksin düzeyleri

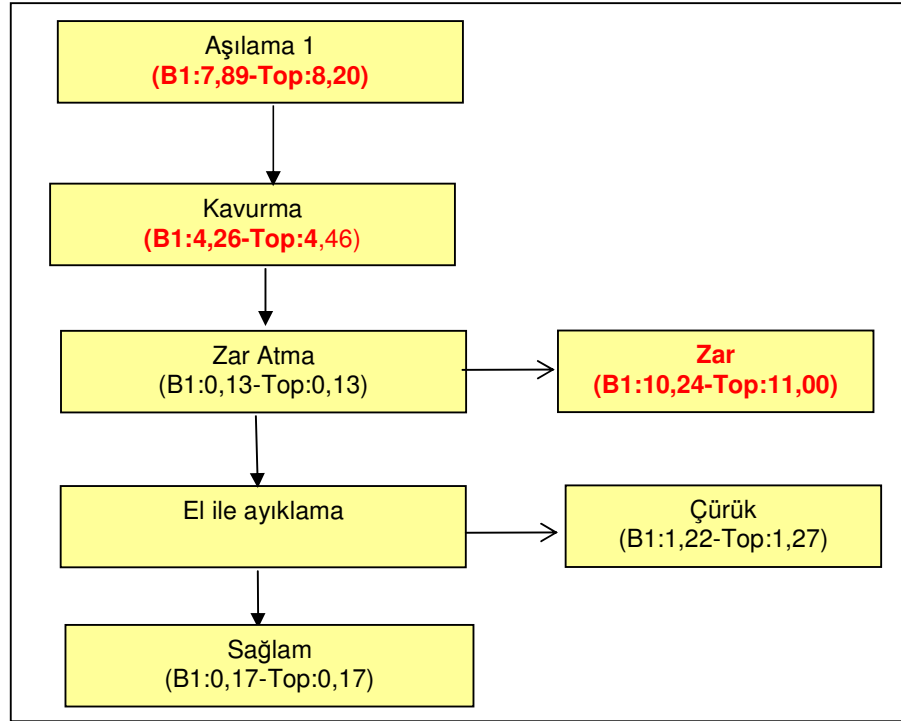
1. Düzey (~5-10ng/g)	Aflatoksin B₁, ng/g	Toplam Aflatoksin, ng/g
Başlangıç	7.89±1.00	8.20±1.02
Isıl İşlem Sonrası (120-125°C)	4.26±1.32	4.46±1.39
Beyazlatma Sonrası	0.13±0.02	0.13±0.02
Zar	10.24±5.23	11.00±5.24
Çürük	1.22±0.81	1.27±0.84
Sağlam	0.17±0.07	0.17±0.07
Ortalama % Azalma	97.90±0.87	97.98±0.84

Çizelge 4.2 Aşılannmış findıkların (~20-30ng/g düzeyinde) kavurma öncesi ve sonrasında aflatoksin düzeyleri

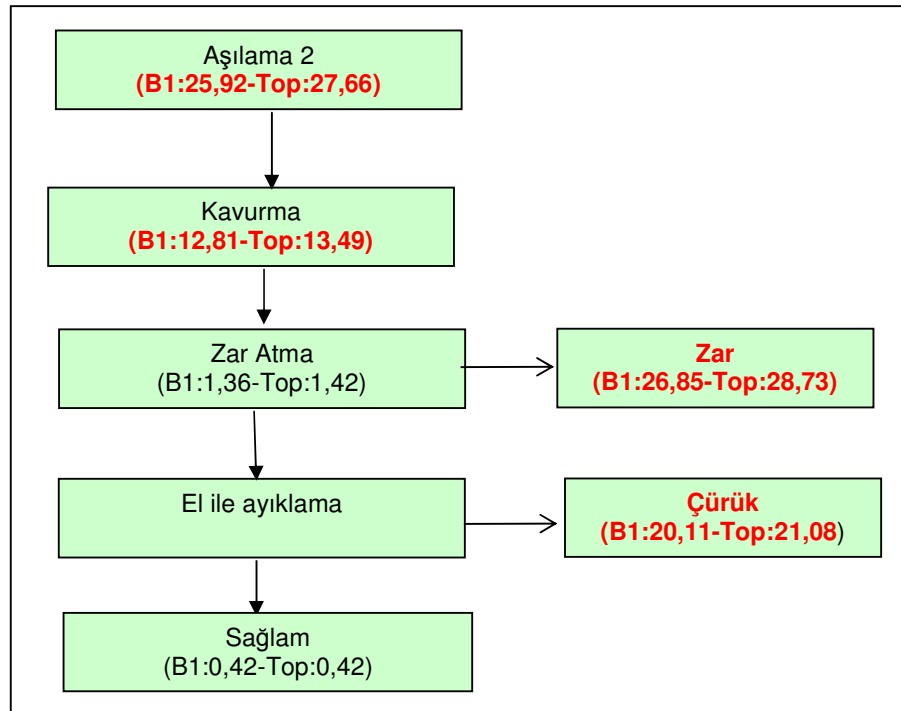
2. Düzey (~20-30ng/g)	Aflatoksin B₁, ng/g	Toplam Aflatoksin, ng/g
Başlangıç	25.92±8.66	27.66±8.80
Isıl İşlem Sonrası (120-125°C)	12.81±1.80	13.49±1.88
Beyazlatma Sonrası	1.36±0.46	1.42±0.49
Zar	26.85±4.16	28.73±4.28
Çürük	20.11±1.09	21.08±11.61
Sağlam	0.42±0.08	0.42±0.08
Ortalama % Azalma	98.31±0.40	98.35±0.33

Çizelge 4.3 Doğal aflatoksinli findıkların (~84ng/g düzeyinde) kavurma öncesi ve sonrasında aflatoksin düzeyleri

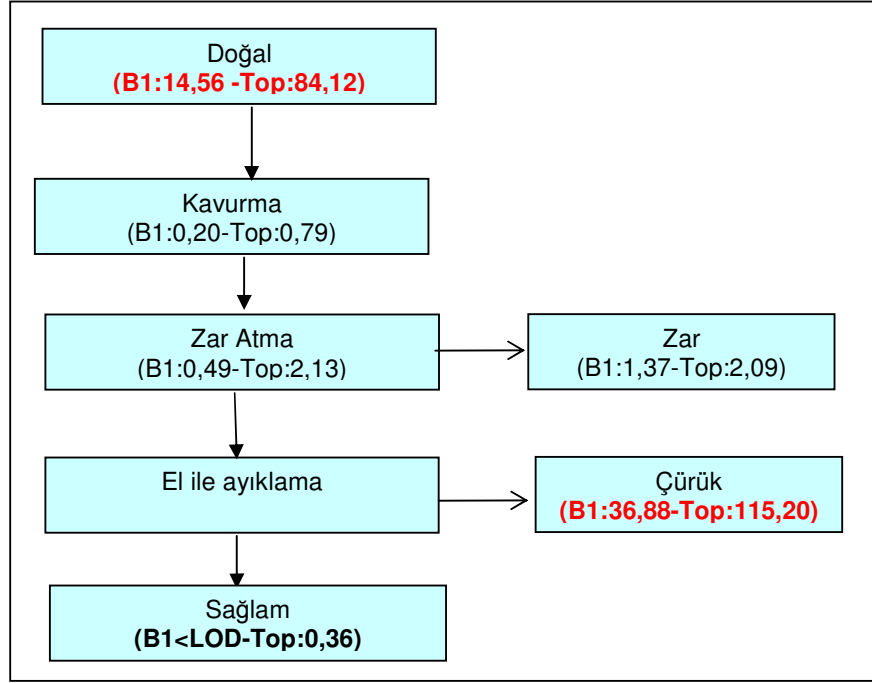
Doğal Aflatoksinli parti (~84ng/g)	Aflatoksin B₁, ng/g	Toplam Aflatoksin, ng/g
Başlangıç	14.56±0.07	84.12±0.10
Isıl İşlem Sonrası	0.20±0.12	0.79±0.34
Beyazlatma Sonrası	0.49±0.57	2.13±0.88
Zar	1.37±0.41	2.09±0.63
Çürük	36.88±11.30	115.20±35.19
Sağlam	<LOD	<LOD
Ortalama % Azalma	97.73	99.88



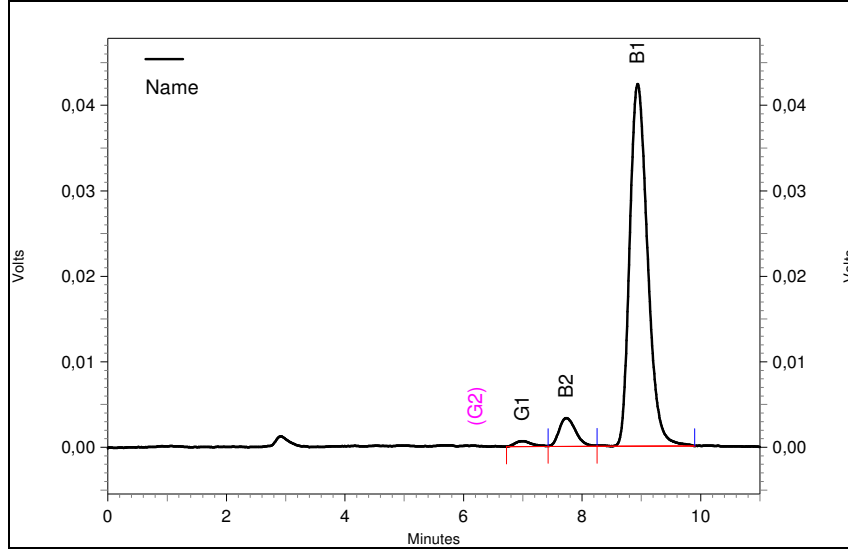
Şekil 4.1. Aşılama akış şeması (~5-10ng/g düzeyinde)



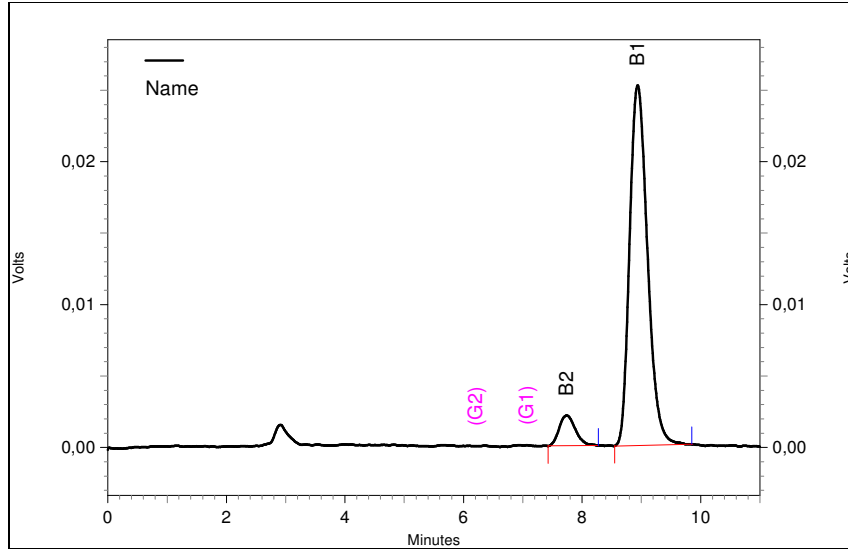
Şekil 4.2. Aşılama akış şeması (~20-30ng/g düzeyinde)



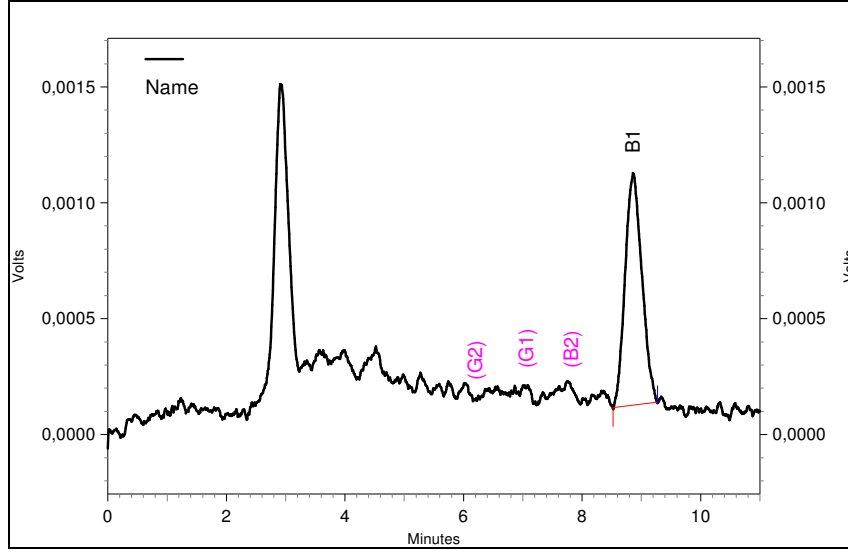
Şekil 4.3. Doğal aflatoksinli fındık çalışması akış şeması (~84ng/g düzeyinde)



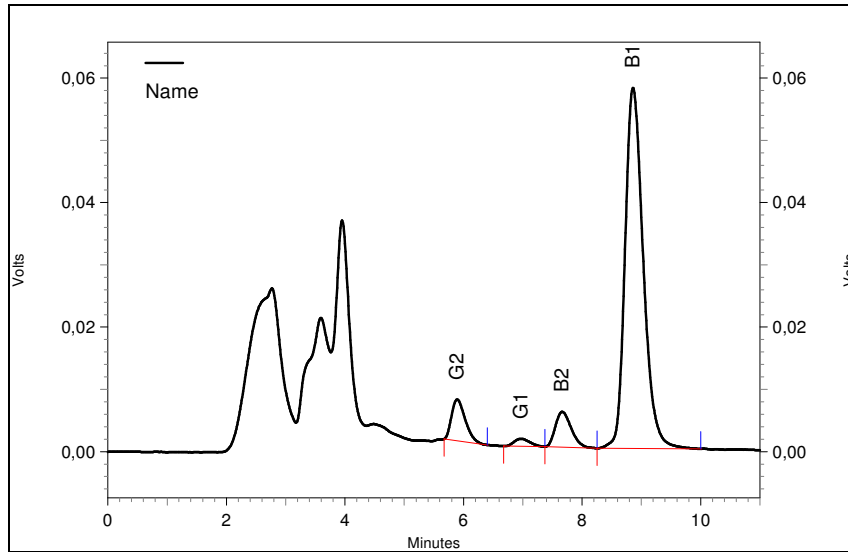
Şekil 4.4 Aşılانmış fındıkların (~5-10ng/g) başlangıç örneğine ait kromatogram



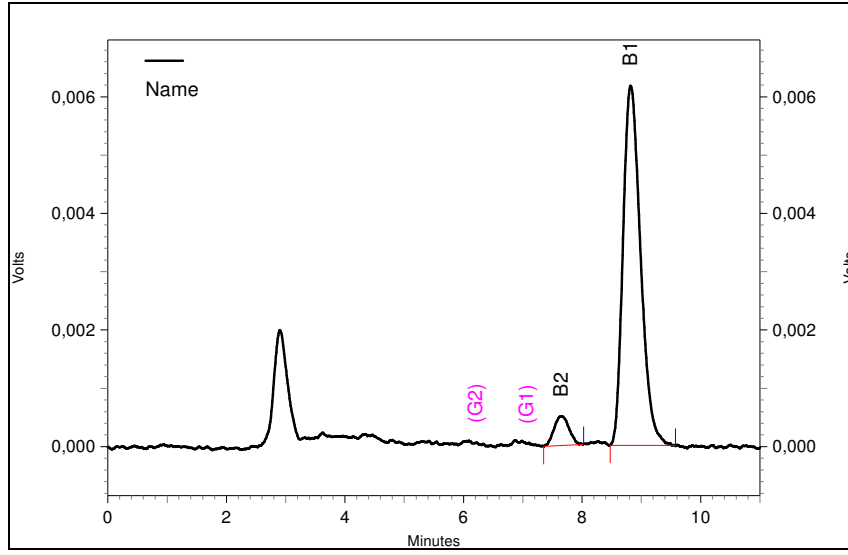
Şekil 4.5 Aşılانmış fındıkların (~5-10ng/g) kavurma sonrası örneğine ait kromatogram



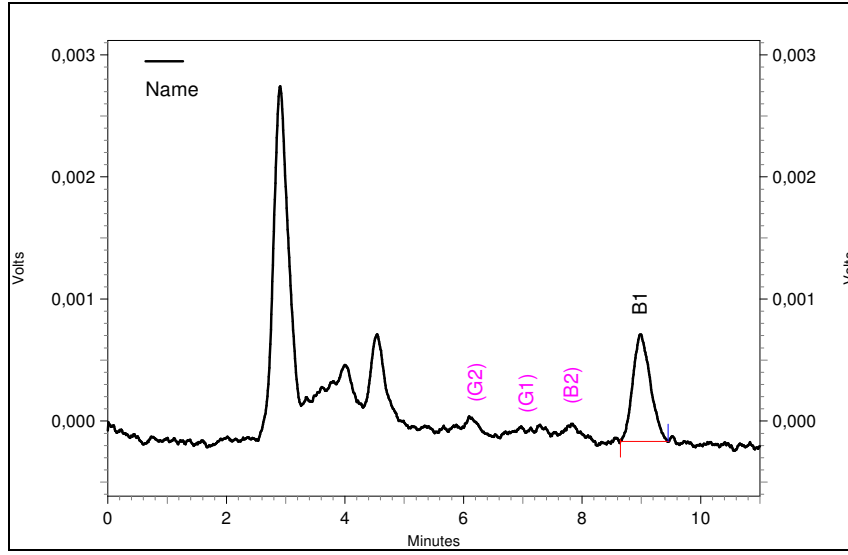
Şekil 4.6 Aşılannmış fıındıkların (~5-10ng/g) zar atma sonrası örneğine ait kromatogram



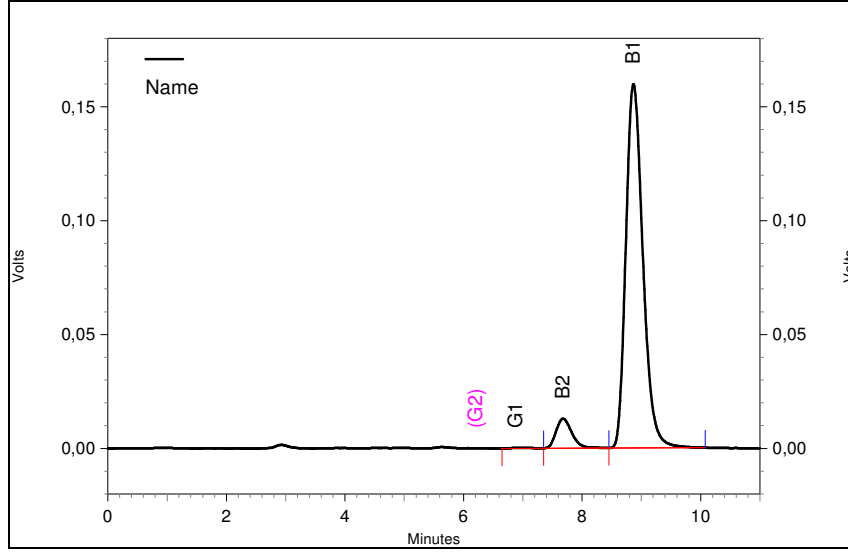
Şekil 4.7 Aşılannmış fıındıkların (~5-10ng/g) zar atma sonrası zararına ait kromatogram



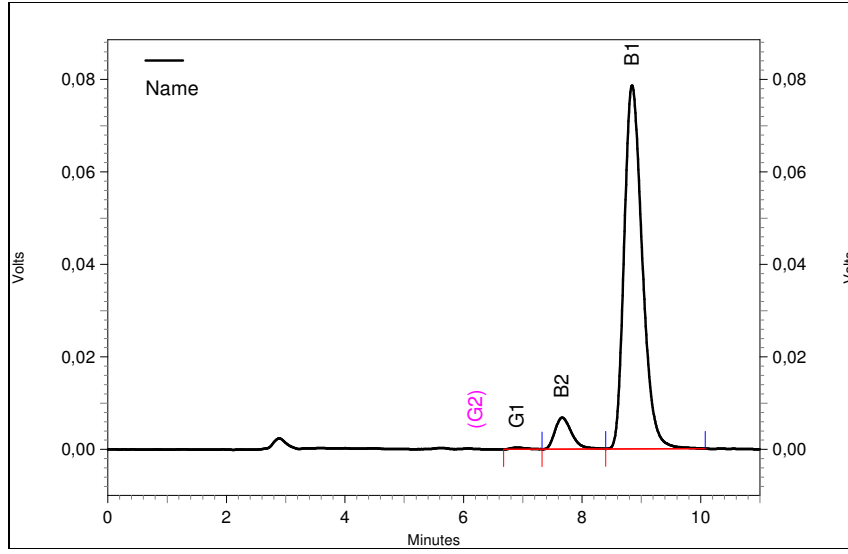
Şekil 4.8 Aşılانmış fındıkların (~5-10ng/g) çürük örneğine ait kromatogram



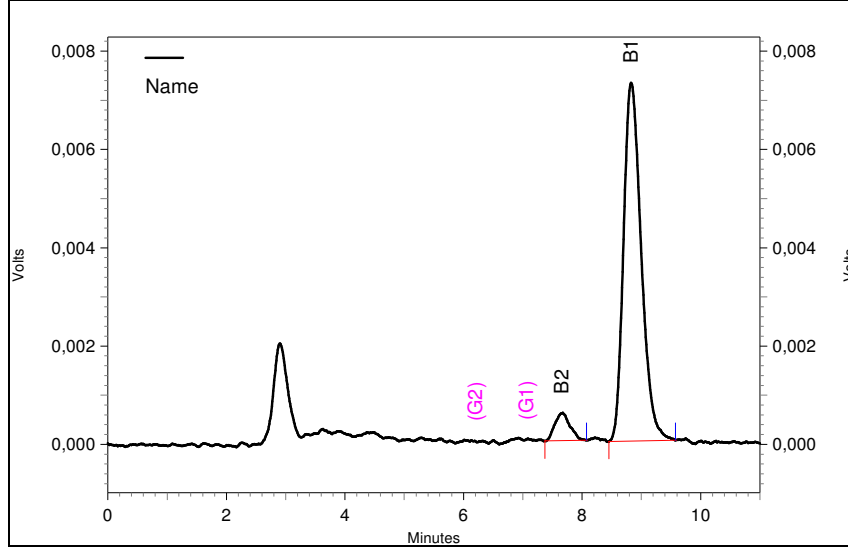
Şekil 4.9 Aşılانmış fındıkların (~5-10ng/g) sağlam örneğine ait kromatogram



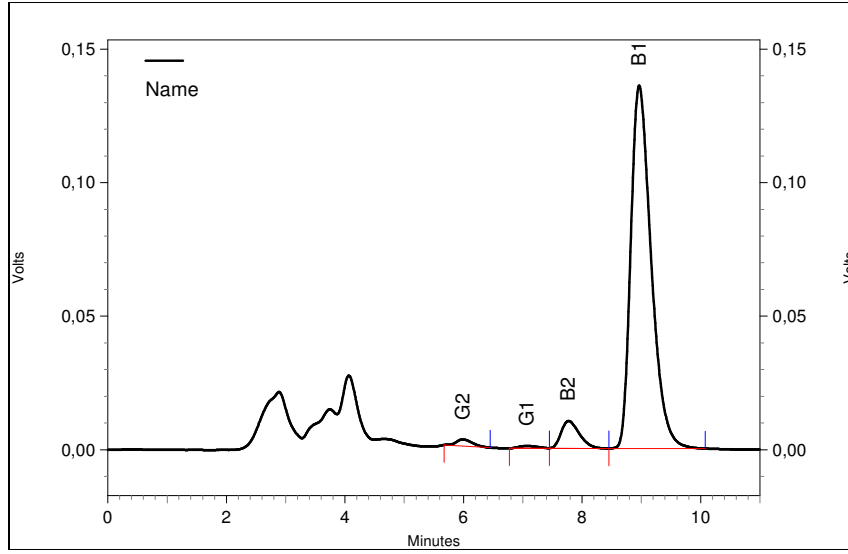
Şekil 4.10 Aşılانmış fındıkların (~20-30ng/g) başlangıç örneğine ait kromatogram



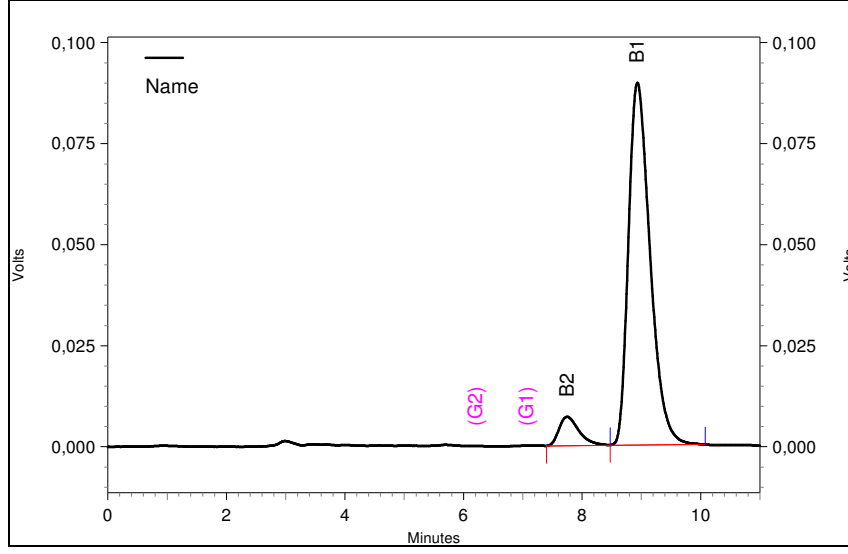
Şekil 4.11 Aşılانmış fındıkların (~20-30ng/g) kavurma sonrası örneğine ait kromatogram



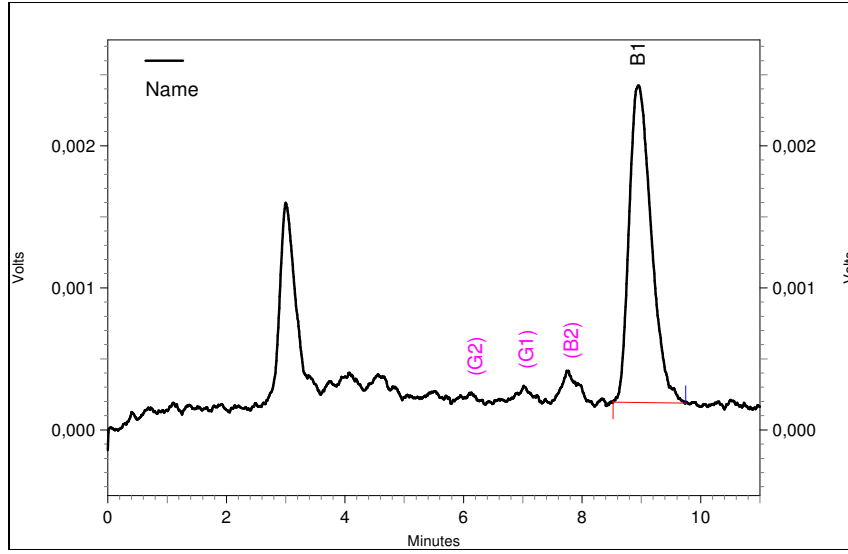
Şekil 4.12 Aşılانmış fıındıkların (~20-30ng/g) zar atma sonrası örneğine ait kromatogram



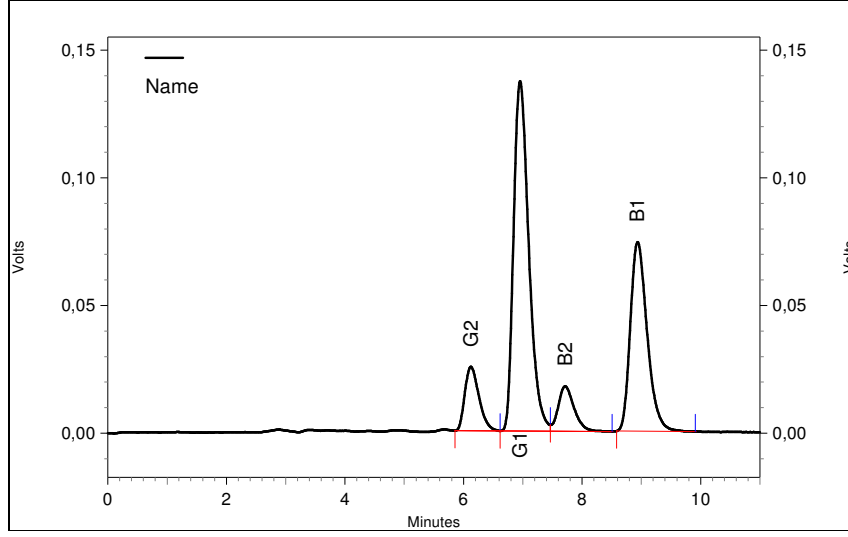
Şekil 4.13 Aşılانmış fıındıkların (~20-30ng/g) zar atma sonrası zarına ait kromatogram



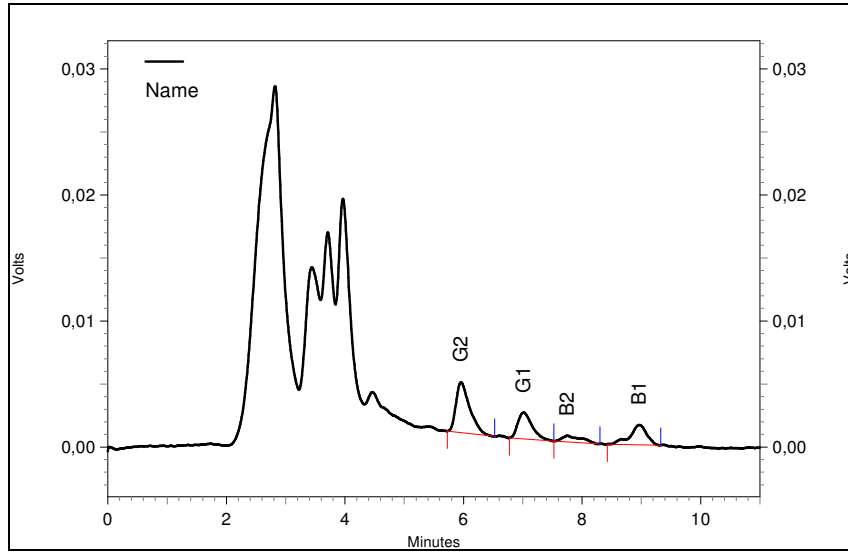
Şekil 4.14 Aşılannmış fındıkların (~20-30ng/g) çürük örneğine ait kromatogram



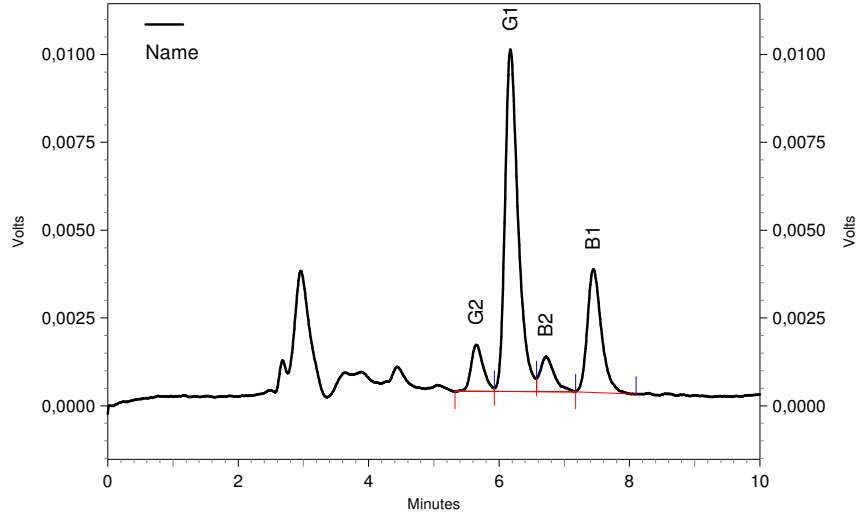
Şekil 4.15 Aşılannmış fındıkların (~20-30ng/g) sağlam örneğine ait kromatogram



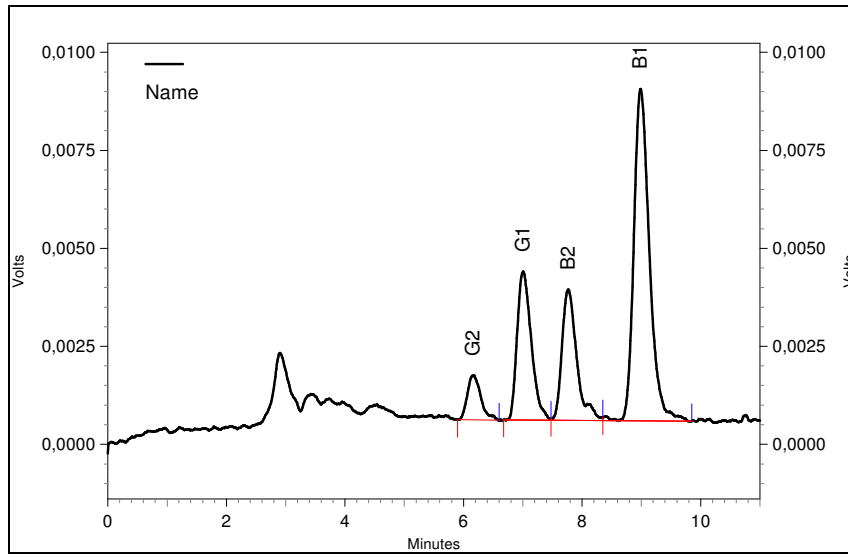
Şekil 4.16 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) başlangıç örneğine ait kromatogram



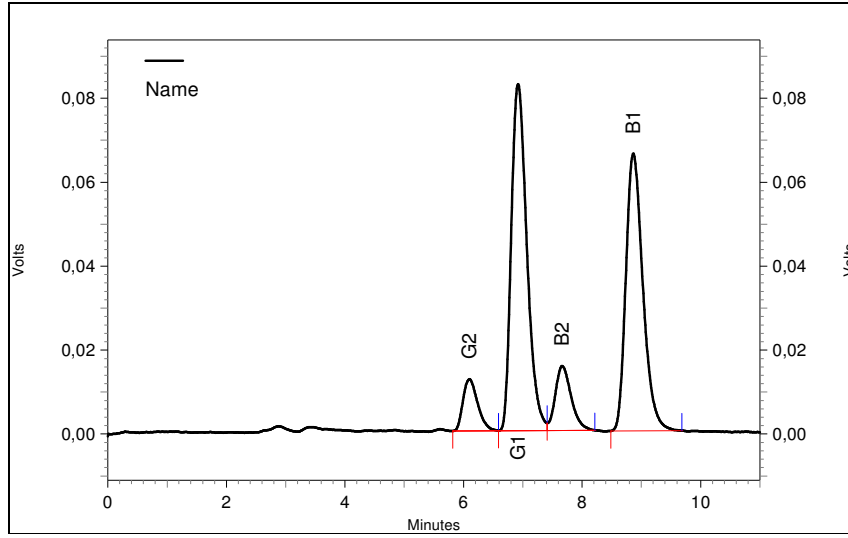
Şekil 4.17 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) kavurma sonrası örneğine ait kromatogram



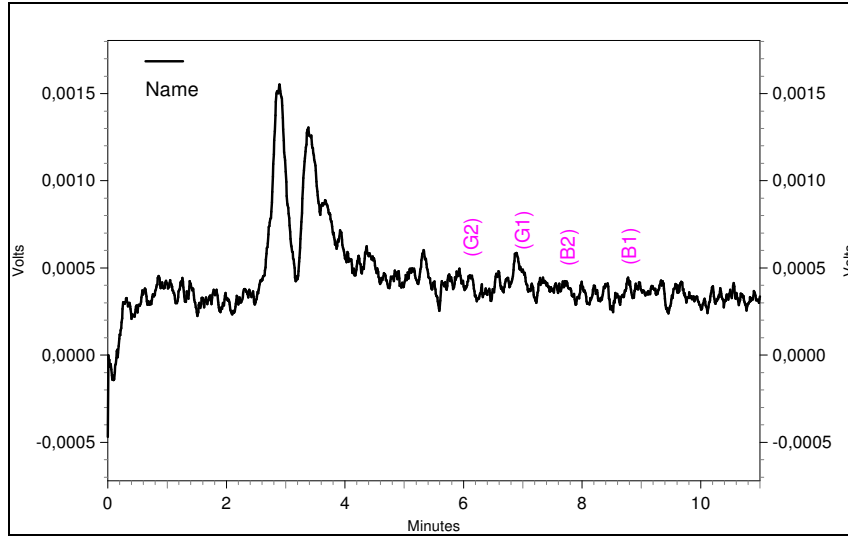
Şekil 4.18 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) zar atma sonrası örneğine ait kromatogram



Şekil 4.19 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) zar atma sonrası zarına ait kromatogram



Şekil 4.20 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) çürük örneğine ait kromatogram



Şekil 4.21 Doğal aflatoksinli fındıkların (~84ng/g) sağlam örneğine ait kromatogram

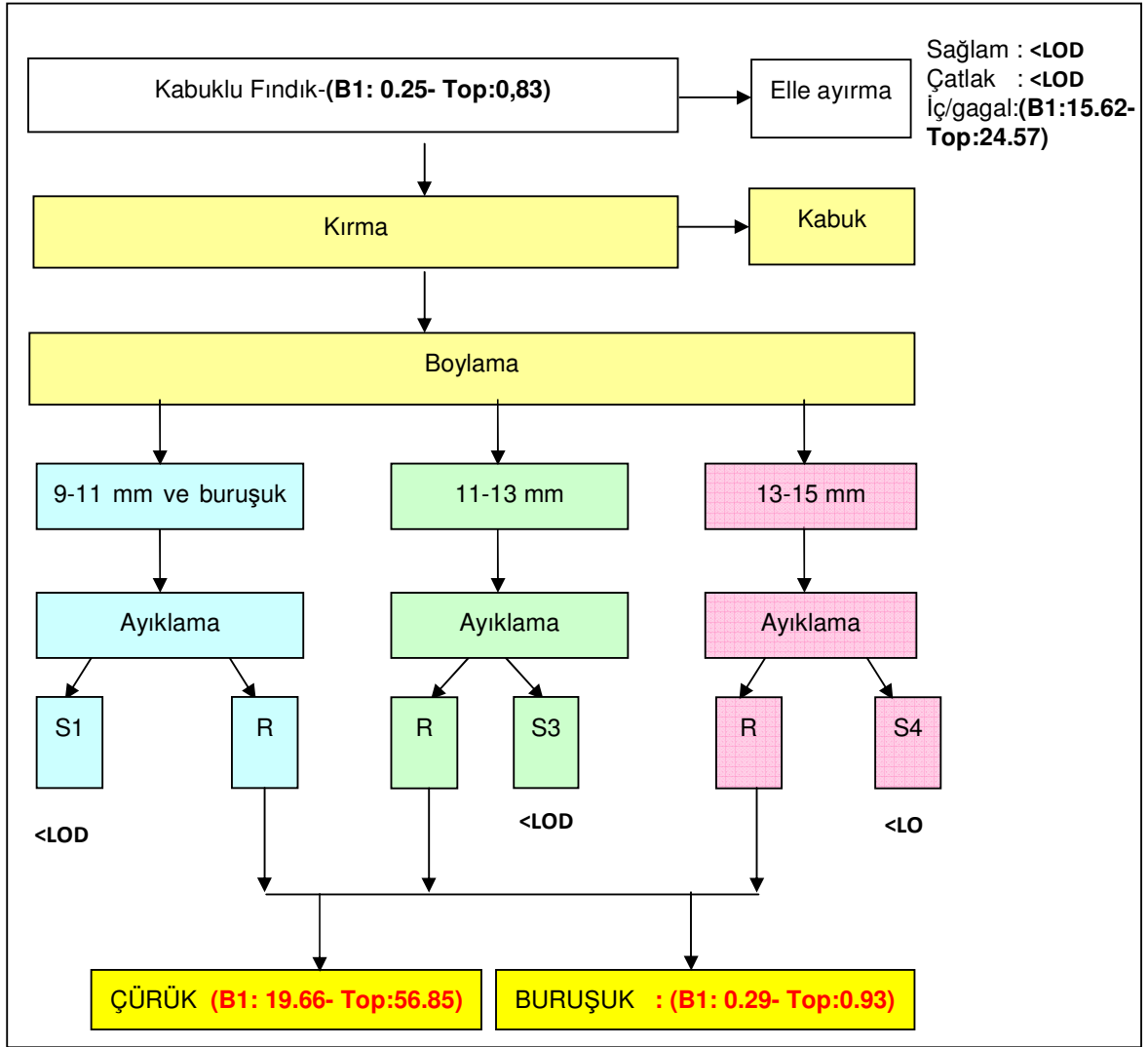
4.2 Fındık işleme tesislerinde uygulanan fiziksel işlemler (kıрма, boylama, ayıklama) sonrası elde edilen bulgular (Aşama 2)

10 tonluk fındık partisinden boylama, kıрма ve ayıklama aşamalarından sonra alınan fındık örneklerinde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiş (Şekil 4.22) ve sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmiştir. Yapılan çalışmada örnek olarak seçilen fındıkların özelliklerine bağlı olarak 5 farklı boylama yapılması mümkün olamamış, 9 mm’nin altındaki fındıklar ile 9-11mm fındıklar ayrı ayrı ve 15mm üstü fındıklar ile örnekleme yapılamamıştır. Kıрма işlemi için kullanılan fındıklarda aflatoksin analizi 15 kg’lık örneklerde 9 paralel çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Başlangıç örneğinde 0.83ng/g aflatoksin tespit edilmiş olup kıрма, boylama ve seçme işlemlerinden sonra da örneklemler yapılmıştır. Kabuklu fındıklar arasından sağlam kabuklular, kabuğu çıtlamış olanlar ve ayrıca kabuğundan ayrılmış iç fındıklar (gagal) seçilerek aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiş ve kabuklu fındıklar arasından seçilen iç fındıklarda toplam aflatoksin miktarı 24.57ng/g olarak tespit edilmiştir. Fındıklar üç farklı boya ayrılarak, çürük, buruşuk ve sağlam fındıklar el ile seçilmiş ve aflatoksin analiz gerçekleştirilmiştir. Buruşuk ve çürük fındıklarda sırası ile toplam aflatoksin miktarı 0.93 ve 56.85ng/g olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma sonrasında kabuklu fındıklar arasında tanelenmiş olarak bulunan iç fındıklarda ve çürük fındıklarda aflatoksin riskinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmanın aflatoksin riski yüksek kabuklu fındıklarla tekrar edilmesi sonuçların desteklenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

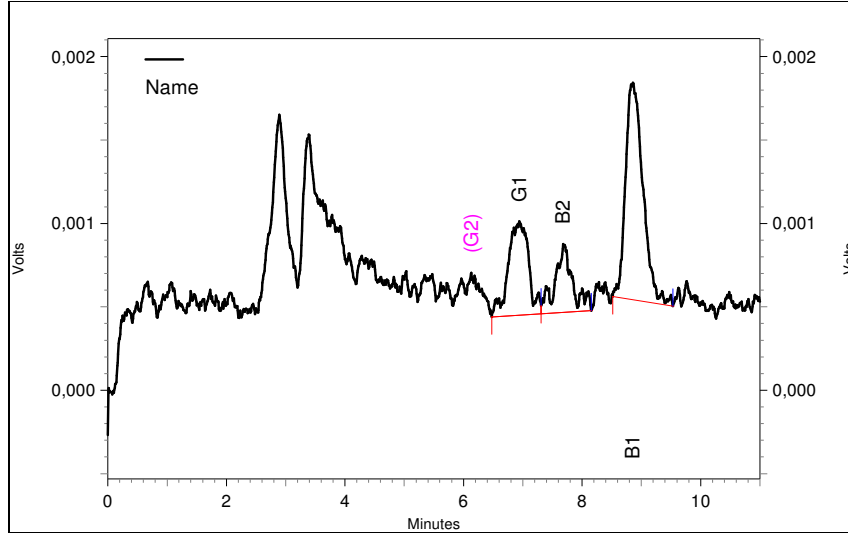
Bu çalışmada yapılan analizlere ait HPLC kromatogramları Şekil 4.23 - 4.29’da verilmiştir.

Çizelge 4.4 Fındık kıрма işlemi sonrası aflatoksin analiz sonuçları

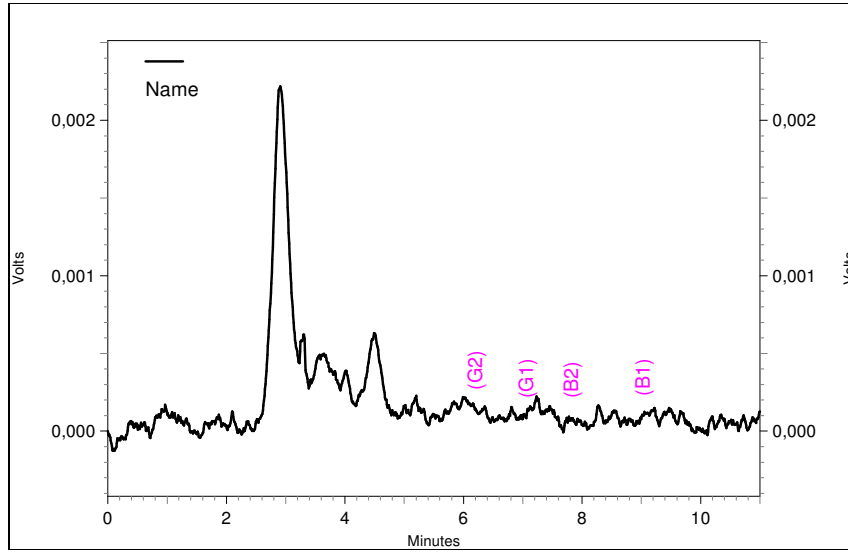
Fındık Çeşidi	Aflatoksin B1 (ng/g)	Toplam Aflatoksin (ng/g)
Harman-kabuklu	0.25	0.83
Kabuklu (sağlam)	<LOD	< LOD
Kabuklu (çıtlak-kırık)	<LOD	< LOD
İç/Gagal-kırık fındık	15.62	24.57
Çürük	19.66	56.85
9-11 mm buruşuk karışık	<LOD	< LOD
11-13 normal	<LOD	< LOD
13-15mm iç	<LOD	< LOD
Buruşuk iç	0.29	0.93



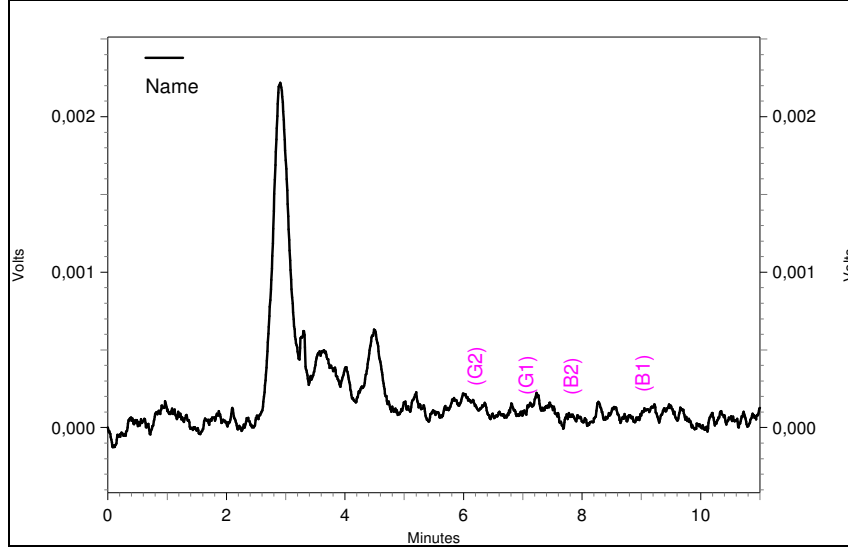
Şekil 4.22 Kırma hattı örnekleme aşamaları ve aflatoksin analiz sonuçları



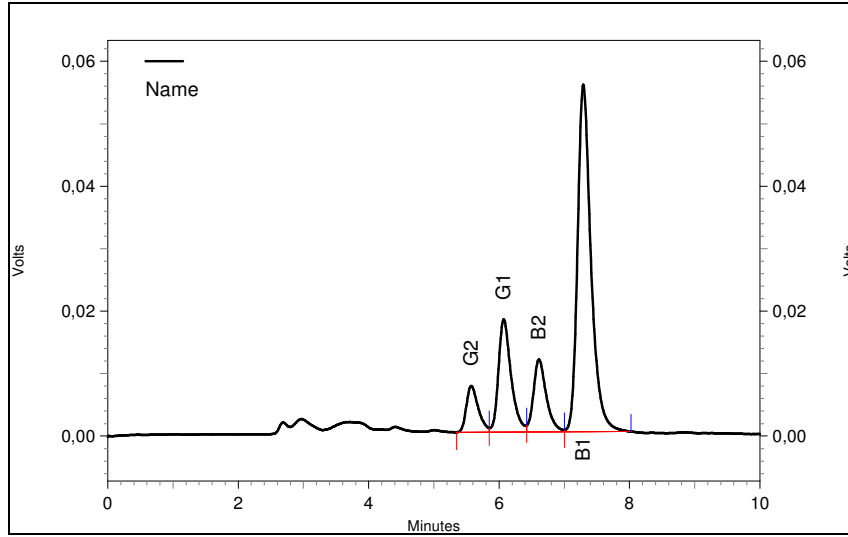
Şekil 4.23 Kırma işlemi, başlangıç örneğine ait kromatogram



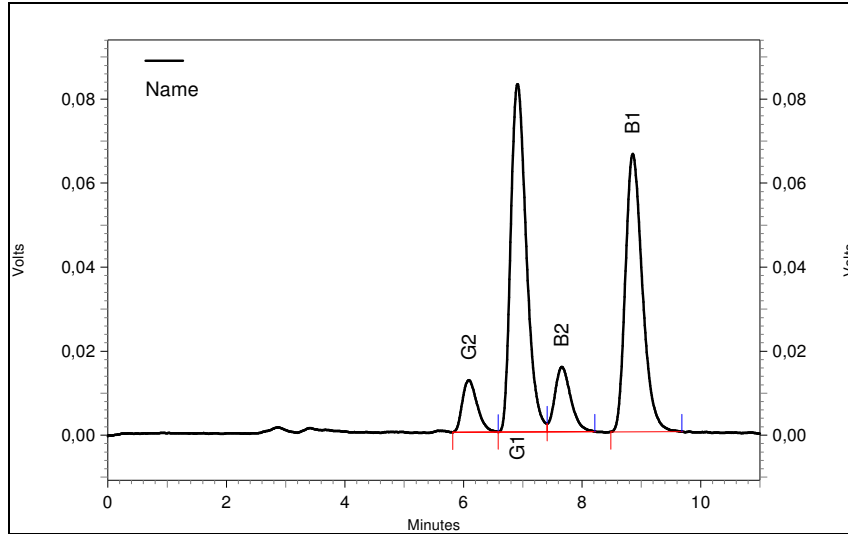
Şekil 4.24 Kırma işlemi, kabuklu sağlam örneğe ait kromatogram



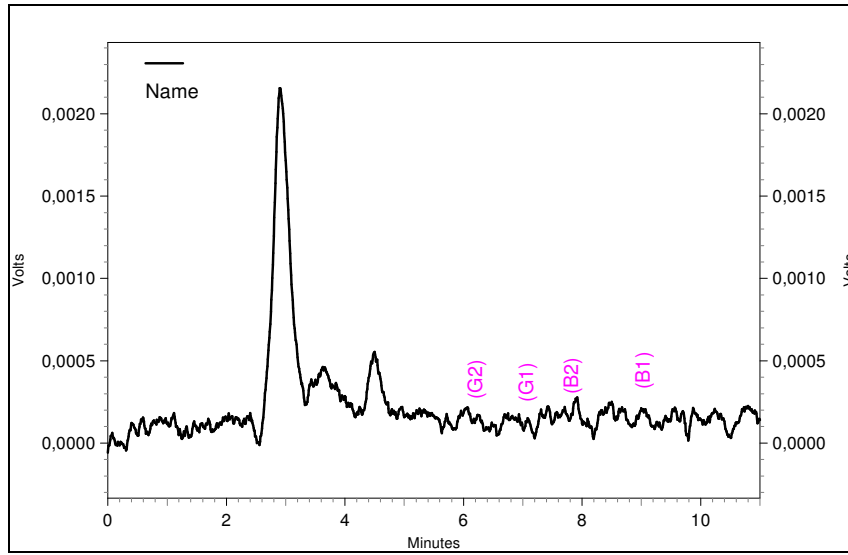
Şekil 4.25 Kırma işlemi, kabuklu çıtlak-kırık örneğe ait kromatogram



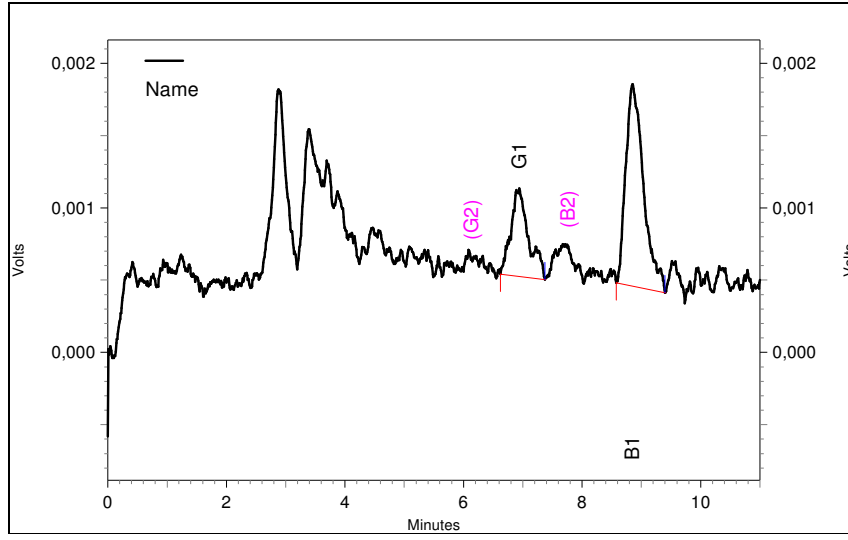
Şekil 4.26 Kırma işlemi, iç/gagal örneğe ait kromatogram



Şekil 4.27 Kırma işlemi, çürük örneğe ait kromatogram



Şekil 4.28 Kırma işlemi, boylanmış sağlam örneğe ait kromatogram



Şekil 4.29 Kırma işlemi, buruşuk örneğe ait kromatogram

4.3 Fındık İşleme Tesislerinde Uygulanan Isıl İşlemler (Beyazlatma, Kavurma) Sonrası Elde Edilen Bulgular (Aşama 3)

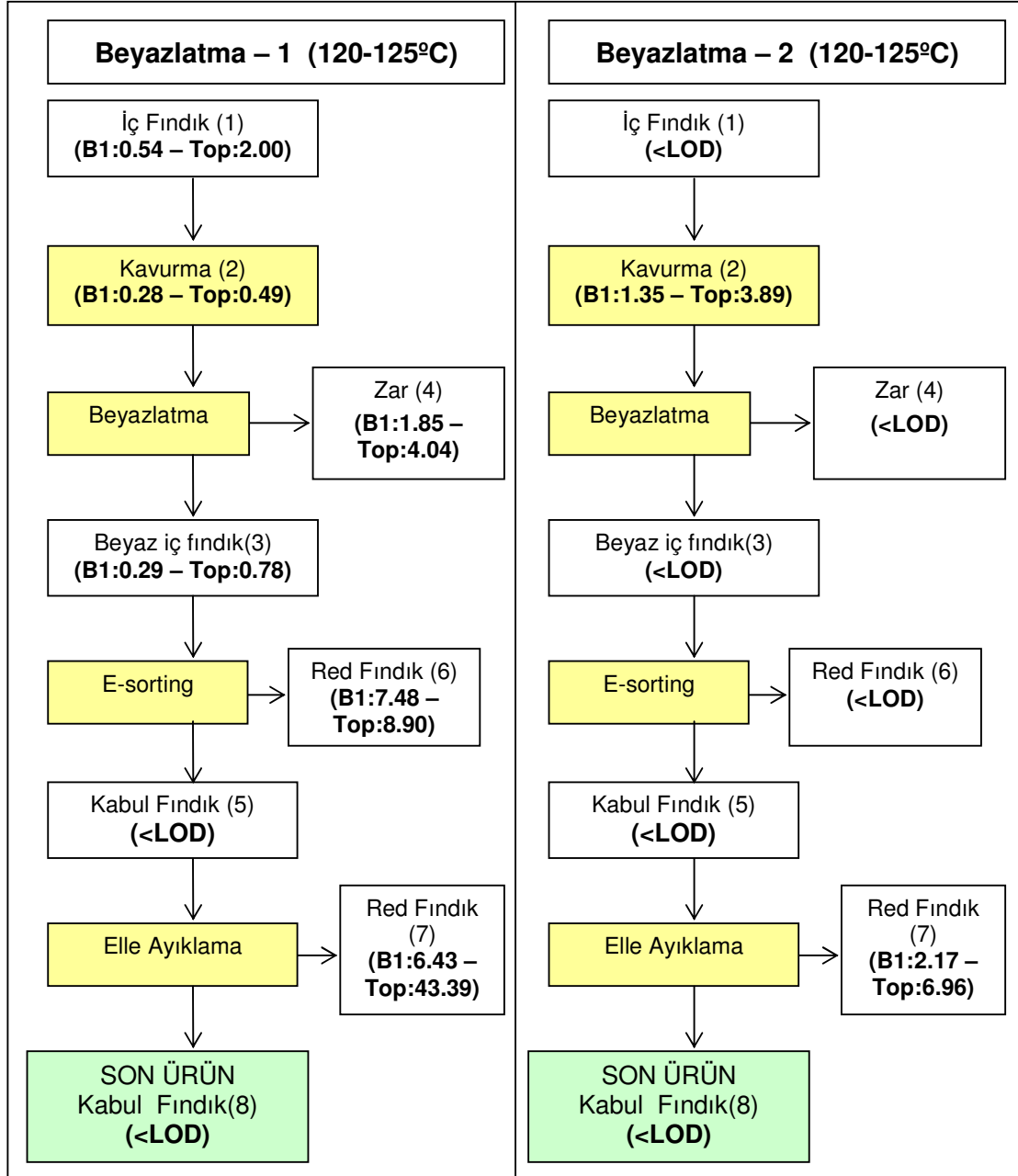
4.3.1 Beyazlatma

Beyazlatma amacı ile yapılan işlemler sırası ile ısıtma işlemi, elektronik ayırıcı (e-sorting) ve elle ayıklama olarak özetlenebilir. Yapılan çalışmalar Şekil 4.30'da verilmiştir. Beyazlatma çalışmaları 3 uygulama ile 120-125°C de iki farklı firmada gerçekleştirilmiş ve işlemler üç kez tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda 3. uygulamada aflatoksin tespit edilememiştir. Diğer iki uygulama sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda beyazlatma hattında aflatoksin limitlerinin altında fındık örnekleri ile çalışılmış ve ayıklanan çürük fındık örneklerinde ve zarda limitlerin üzerinde aflatoksin tespit edilmiştir. Bu işlemler sonrası 1. denemede başlangıç aflatoksin miktarı 2ng/g olan örnekler 120-125°C'de ısıtma işlemi sonrasında 0.49ng/g aflatoksin düzeyine ulaşmıştır. Fındık örneklerinin zarlarında 4.04ng/g, e-sorting ile ayıklanan çürük fındıklarda 8.90ng/g, elle ayıklama sonrasında ise çürük fındıklarda 43.39 ng/g aflatoksin tespit edilmiştir. Beyazlatma işlemi sonrasında son ürünün aflatoksin miktarının tespit edilebilir sınırların (LOD: Tespit edilebilir limit: $B_1 < 0.04 \text{ ng/g}$, $\text{Top} < 0.10 \text{ ng/g}$) altında olduğu belirlenmiştir. Farklı bir firmada yapılan 2. uygulamada ise başlangıç örneklerinde toplam 3.89ng/g aflatoksin tespit edilmiş olmasına karşın fındık örneklerinin zarlarında ve e-sorting ile ayıklanan çürük fındıklarda aflatoksin miktarı tespit edilebilir sınırların altında bulunmuştur, ancak elle ayıklama sonrasında çürük fındıklarda 6.96ng/g toplam aflatoksin tespit edilmiştir. Uygulamalar sonrası elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de ve Şekil 4.30'da verilmiştir.

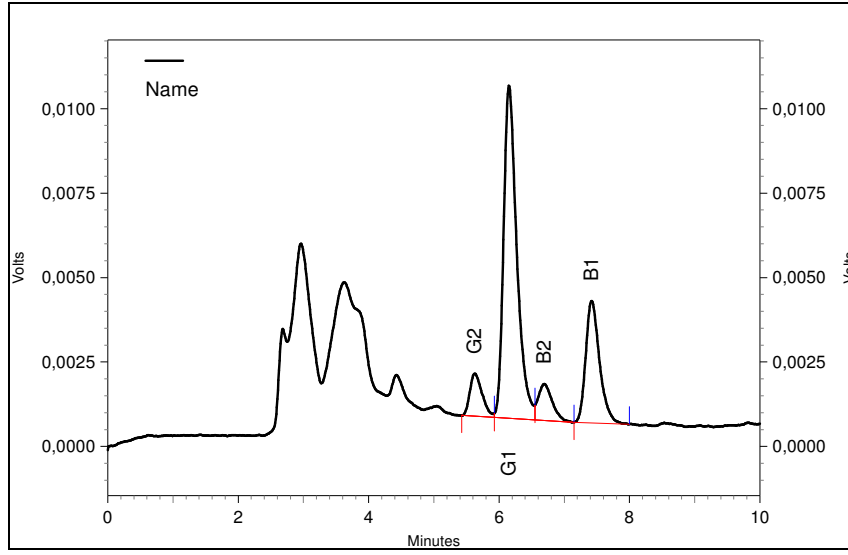
Bu çalışmada yapılan analizlere ait HPLC kromatogramları Şekil 4.31 - 4.38'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Beyazlatma işlemi (120-125°C, 30-40 dk) sonrası fındık örneklerinde aflatoksin düzeyleri

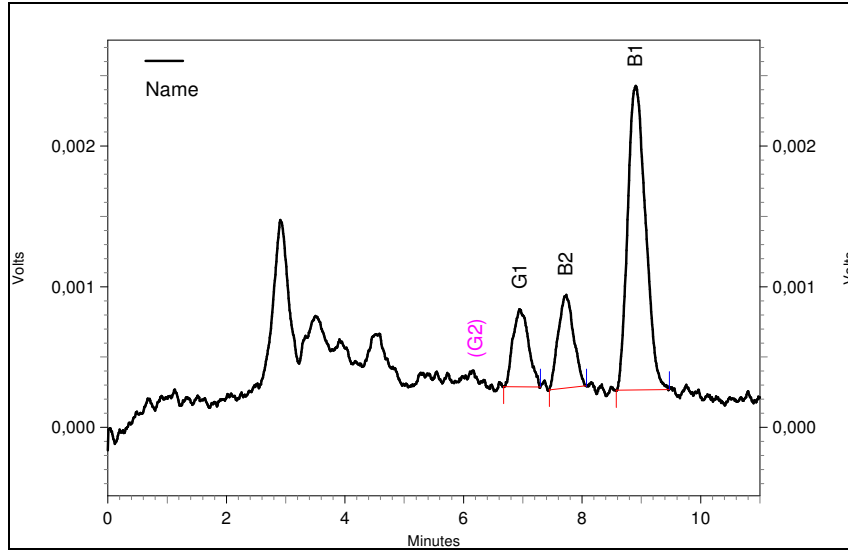
Aflatoksin (ng/g)	Uygulama 1-Firma 1		Uygulama 2- Firma 2		Uygulama 3 - Firma 2	
	B1	Toplam	B1	Toplam	B1	Toplam
Başlangıç	0.54	2.00	1.35	3.89	<LOD	<LOD
Kavurma Sonrası	0.28	0.49	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Beyazlatma Sonrası	0.29	0.78	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Zar	1.85	4.04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
E-Sorting- Ret	7.48	8.90	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
E-Sorting sonrası	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Elle Ayıklama -Ret	6.43	43.39	2.17	6.96	<LOD	<LOD
Son Ürün	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD



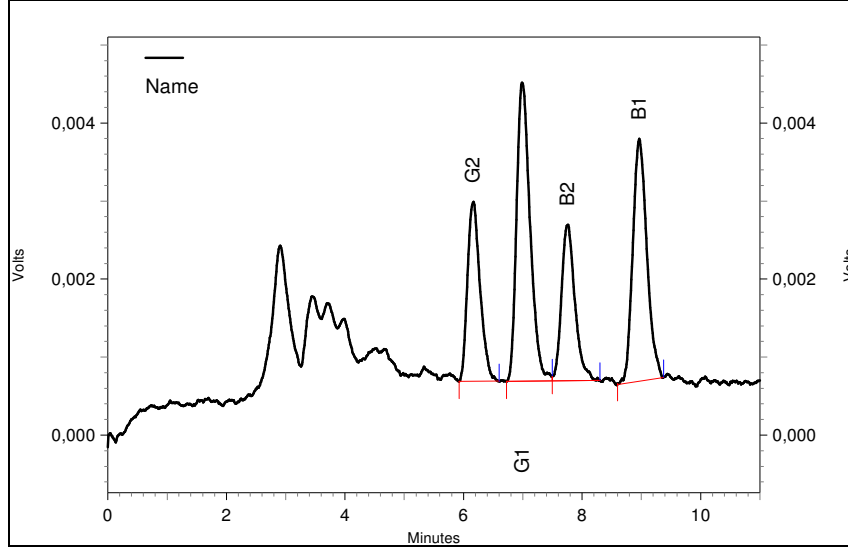
Şekil 4.30 Beyazlatma Akış Şeması



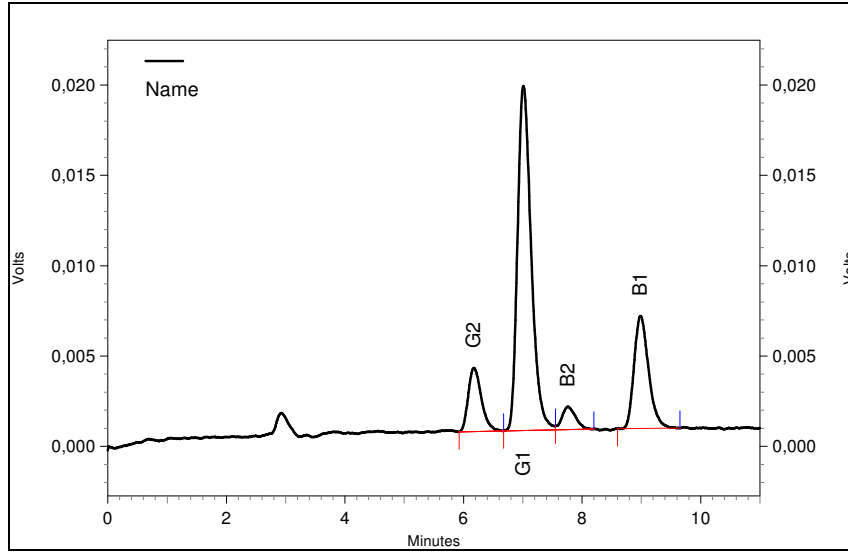
Şekil 4.31 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, başlangıç örneğine ait kromatogram



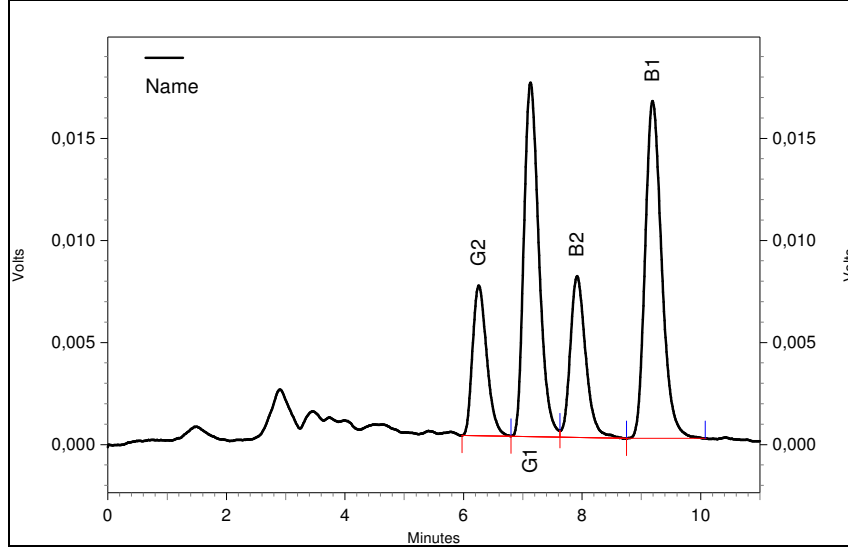
Şekil 4.32 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, kavurma sonrası örneğe ait kromatogram



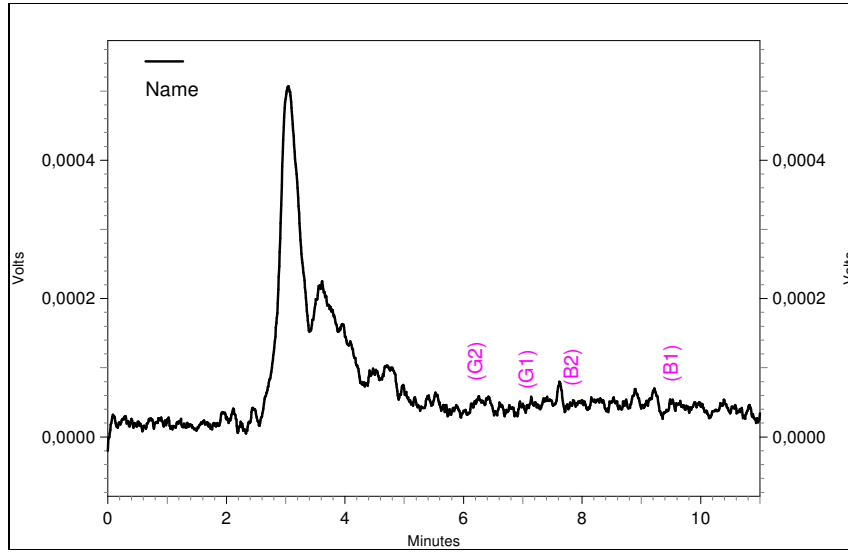
Şekil 4.33 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, beyazlatma sonrası örneğe ait kromatogram



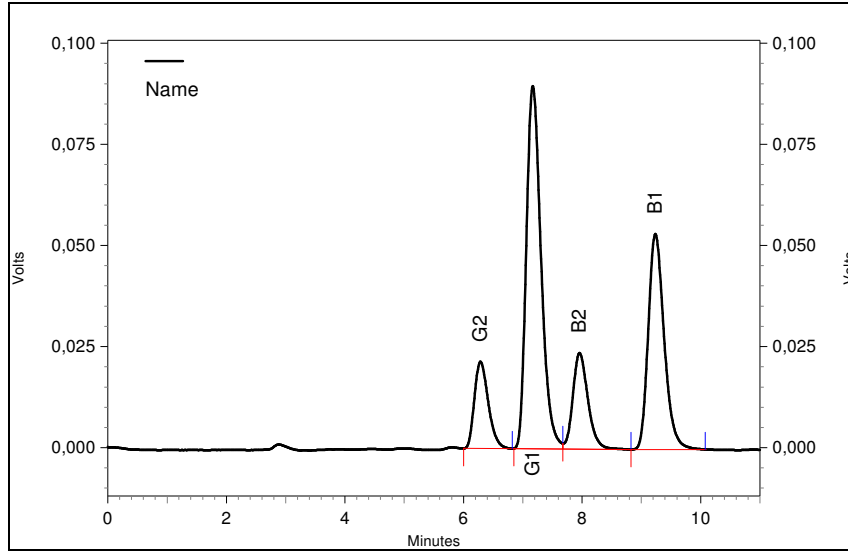
Şekil 4.34 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, zar örneğine ait kromatogram



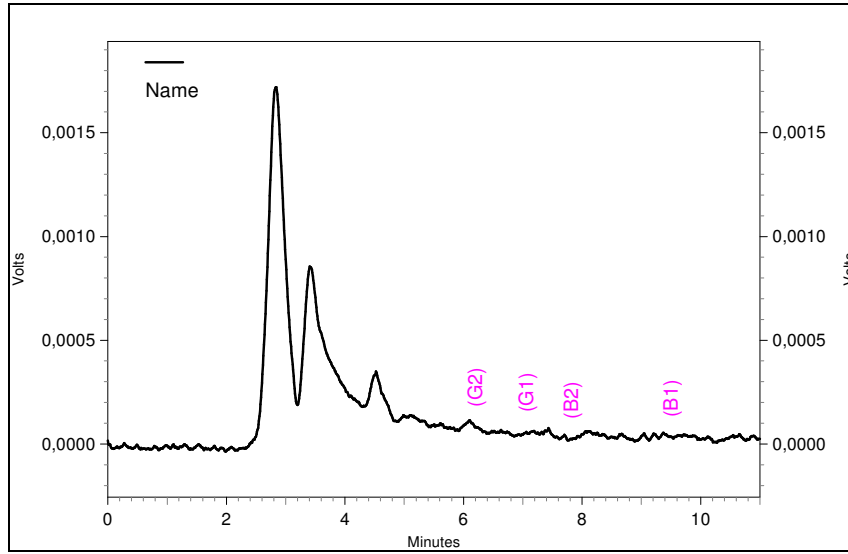
Şekil 4.35 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, e-sorting red örneğine ait kromatogram



Şekil 4.36 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, e-sorting kabul örneğine ait kromatogram



Şekil 4.37 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, elle ayıklama red örneğine ait kromatogram



Şekil 4.38 Beyazlatma işlemi (120-125°C), uygulama 1, son örneğe ait kromatogram

4.3.2 Kavurma

Kavurma amacı ile yapılan işlemler sırası ile ısıtma işlemi, elektronik ayırıcı (e-sorting) ile ayıklama ve elle ayıklama olarak özetlenebilir. Kavurma çalışmaları az ve orta düzeyde olmak üzere sırası ile 140-145°C ve 150-155°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Her bir sıcaklık koşulu için 3 uygulama farklı firmalarda, en az 10 tonluk fındık partisi ile gerçekleştirilmiş ve örneklemeler üç kez tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda az düzeyde kavurma çalışmasında iki uygulamada aflatoxin tespit edilememiştir. Bu nedenle, 3 uygulamanın dışında ayrıca kabuklu fındıkların arasındaki tanelenmiş iç fındıkların seçilmesi ile oluşturulan 300 kg fındık partisi kullanılmış ve işlemler TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Fındık Pilot Tesisinde gerçekleştirilmiştir. Ancak, Pilot Tesiste e-sorter olmadığından 4. uygulama için bu aşama yapılamamıştır. Bu uygulamalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda kavurma hattında aflatoxinli fındık örnekleri ile çalışılmış olmasına rağmen zarı ayrılan ve ayıklanan sağlam fındık örneklerinde aflatoxin tespit edilememiştir. Yapılan çalışmalar Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'da verilmiştir. Az düzeyde kavurma çalışması 1. denemesinde (Şekil 4.39), başlangıç aflatoxin miktarı 42.40ng/g olan örnekler 140-145°C'de ısıtma işlemi sonrasında 5.29ng/g aflatoxin düzeyine ulaşmıştır. Fındık örneklerinin zarlarında 25.81 ng/g, e-sorting ile ayıklanan çürük fındıklarda 19.10ng/g, elle ayıklama sonrasında ise çürük fındıklarda 2.96ng/g aflatoxin tespit edilmiştir. Kavurma işlemi sonrasında son ürünün aflatoxin miktarının tespit edilebilir sınırların altında olduğu belirlenmiştir. TÜBİTAK MAM GE Pilot Tesisinde yapılan diğer uygulamada (Şekil 4.39) ise başlangıç örneklerinde 21.74ng/g, ısıtma işlemi sonrasında ise fındıklarda 0.19 ng/g toplam aflatoxin tespit edilmiştir. Fındık örneklerinin zarlarında aflatoxin miktarı 2.09 ng/g ve elle ayıklama sonrasında çürük fındıklarda ise 16.00 ng/g olarak belirlenmiştir.

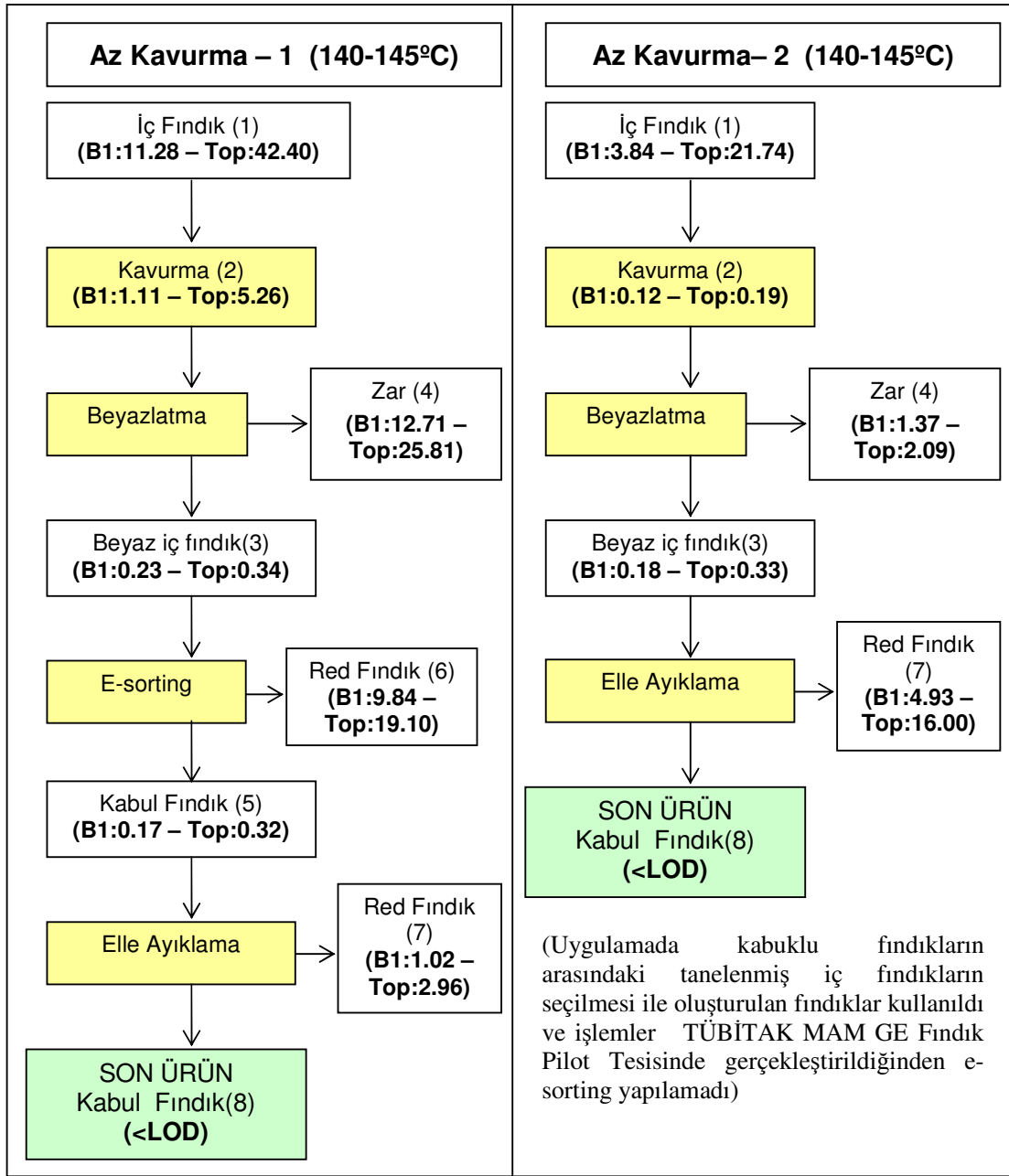
Orta düzeyde yapılan kavurma çalışmaları Şekil 4.40'da verilmiştir. Orta düzeyde kavurma çalışması 1. denemesinde (Şekil 4.40), başlangıç aflatoxin miktarı tespit edilebilir limitlerin ($B_1 < 0.04$ – Top: < 0.10) altında olmasına rağmen elle ayıklama sonrasında çürük fındıklarda 15.17ng/g toplam aflatoxin tespit edilmiştir. Kavurma işlemi sonrasında son ürünün aflatoxin miktarının tespit edilebilir sınırların altında olduğu belirlenmiştir. Orta düzeyde yapılan 2. uygulamada, 1. uygulamaya benzer olarak başlangıç örneğinde ve son ürünlerde aflatoxin miktarı tespit edilebilir limitlerin ($B_1 < 0.04$ – Top: < 0.10) altındadır. Ara aşamalarındaki örneklemelerde düşük miktarda aflatoksine (0.12-0.45ng/g toplam aflatoxin) rastlanmıştır. Orta düzeyde yapılan 3. uygulamada ise tüm örneklemelerde aflatoxin düzeyi tespit edilebilir limitin altındadır.

Az ve orta düzeyde kavurma uygulamalar sonrası elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da özetlenmiştir. Az ve Orta düzeyde yapılan kavurma çalışmalarında 3. uygulamalarda aflatoksin miktarı tespit edilebilir limitlerin altında olduğundan Çizelge 4.6'da bu uygulamalar belirtilmemiştir.

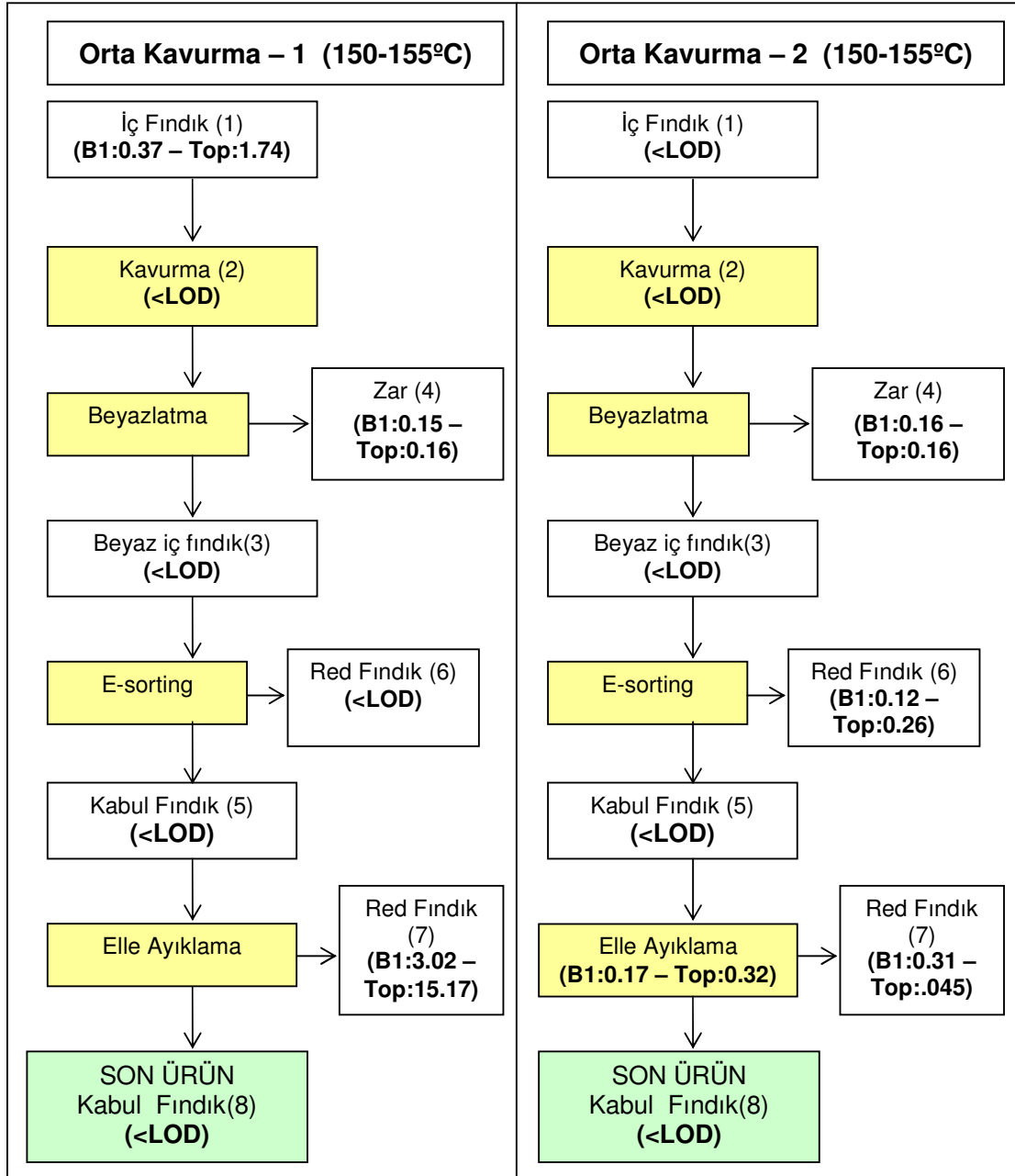
Bu çalışmada 140-145°C'de yapılan 1 nolu demeye ait analizlerin HPLC kromatogramları Şekil 4.41 - 4.48'de verilmiştir.

Çizelge 4.6 Az (140-145°C, 30-40 dk) ve Orta Düzeyde (150-155°C, 30-40 dk) kavurma işlemi sonrası fındık örneklerinde aflatoksin düzeyleri

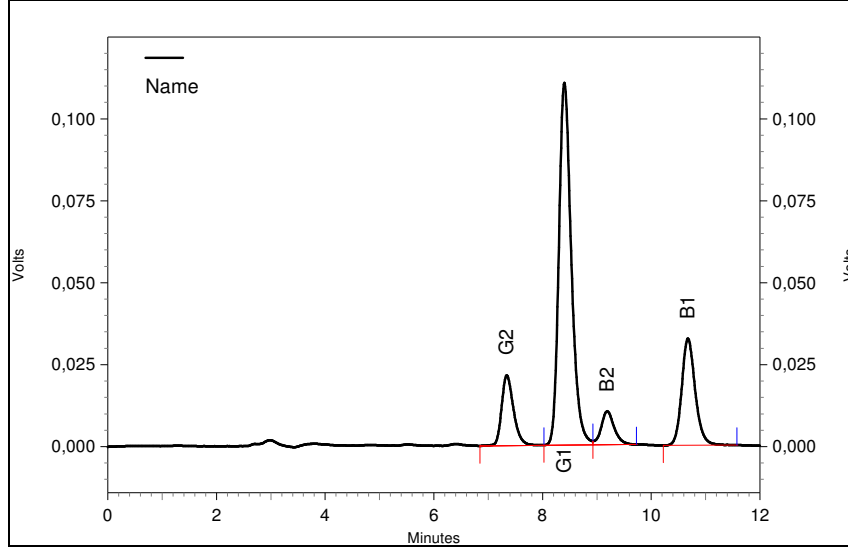
Aflatoksin(ng/g)	Kavurma 1 (140-145°C)		Kavurma 2 (140-145°C)		Orta Kavurma 1 (150-155°C)		Orta Kavurma 2 (150-155°C)	
	B1	Toplam	B1	Toplam	B1	Toplam	B1	Toplam
Başlangıç	11.28	42.40	3.84	21.74	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kavurma Sonrası	1.11	5.26	0.12	0.19	0.37	1.74	<LOD	<LOD
Zar Atma Sonrası	0.23	0.34	0.18	0.33	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Zar	12.71	25.81	1.37	2.09	0.15	0.16	0.15	0.16
E-Sorting Ret	9.84	19.10	-	-	<LOD	<LOD	0.12	0.26
E-Sorting sonrası	0.17	0.32	-	-	<LOD	<LOD	0.17	0.32
Elle Ayıklama - Ret	1.02	2.96	4.93	16.00	3.02	15.17	0.31	0.45
Son Ürün	<LOD	<LOD	0.04	0.126	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD



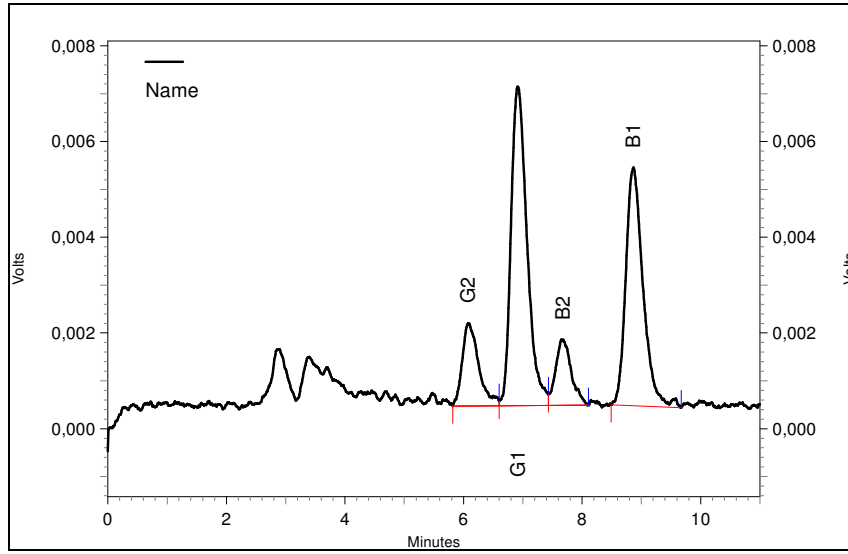
Şekil 4.39 Az düzeyde kavurma (140-145°C) akış şemaları



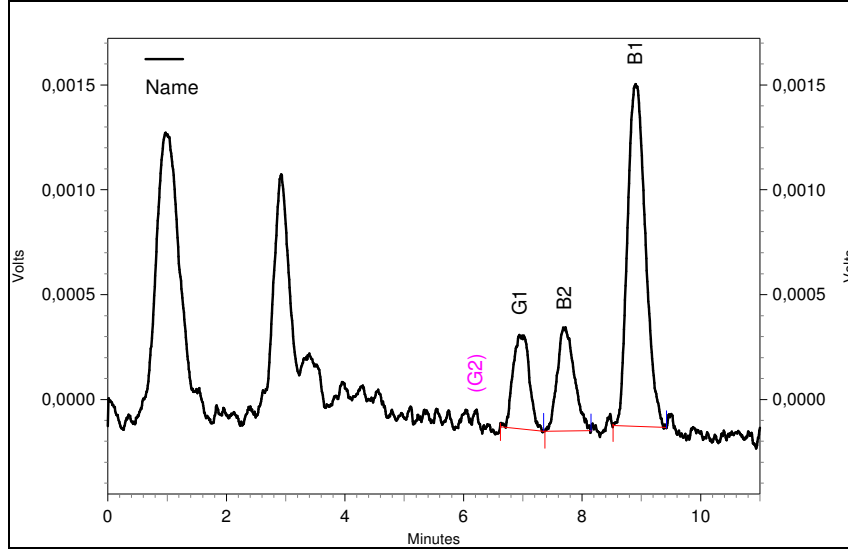
Şekil 4.40 Orta düzeyde kavurma (150-155°C) akış şemaları



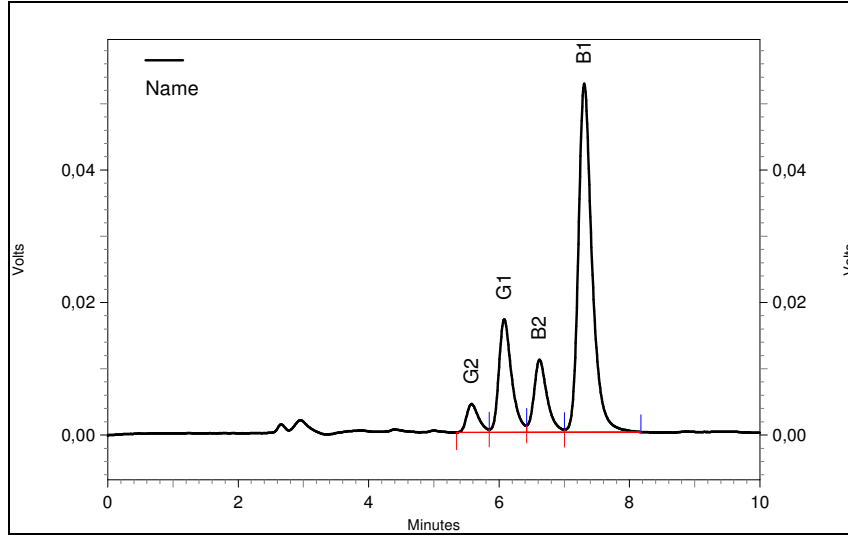
Şekil 4.41 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, başlangıç örneğine ait kromatogram



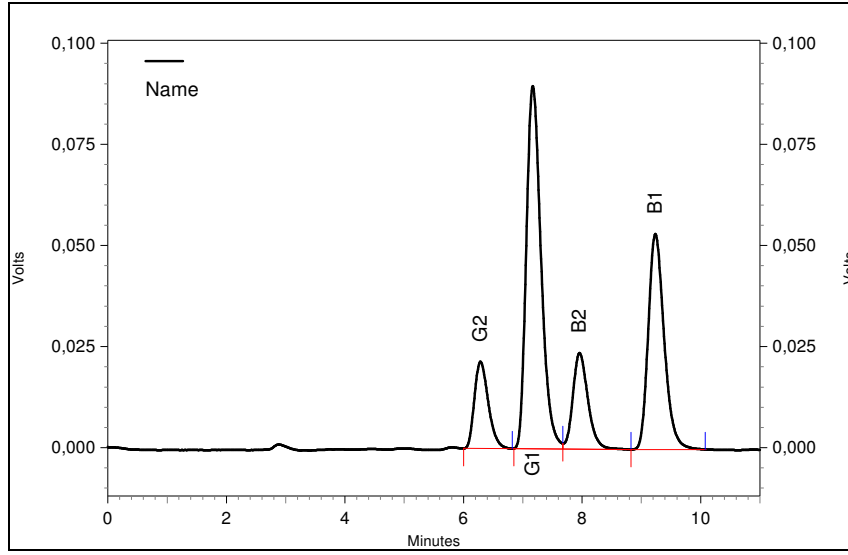
Şekil 4.42 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, kavurma sonrası örneğe ait kromatogram



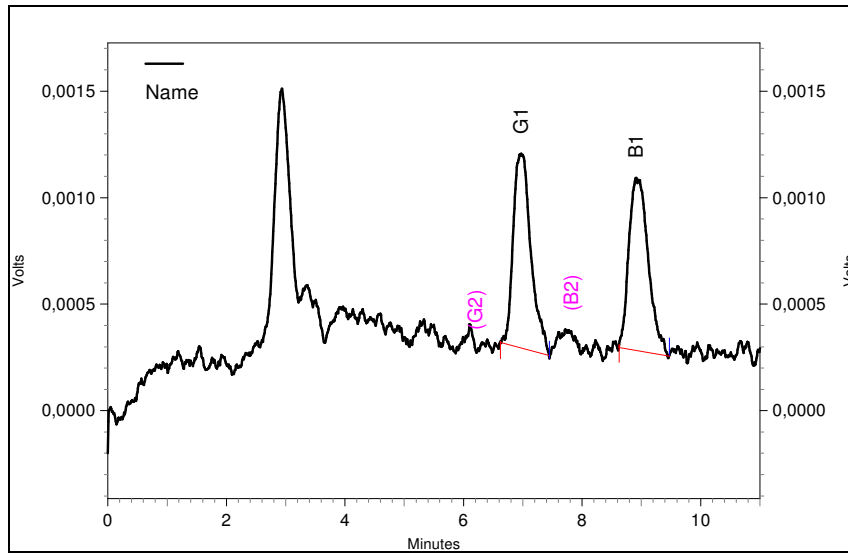
Şekil 4.43 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, zar atma sonrası örneğe ait kromatogram



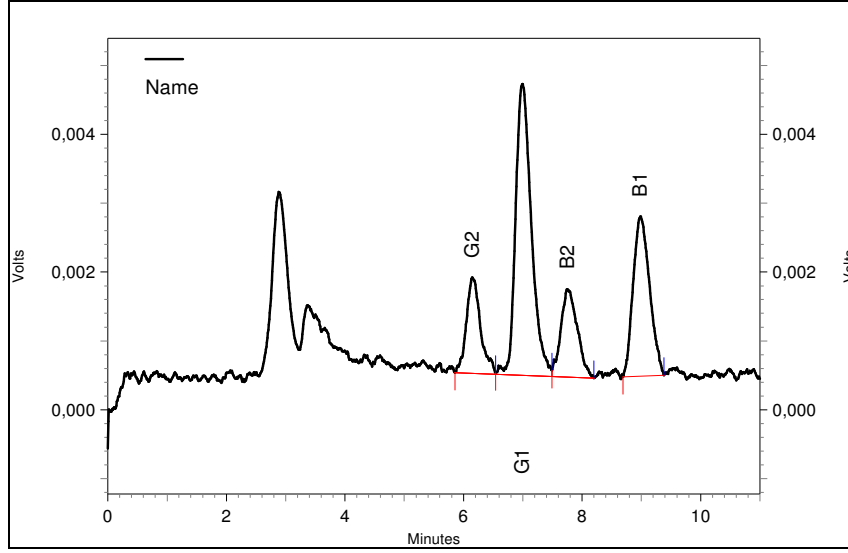
Şekil 4.44 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, zar örneğine ait kromatogram



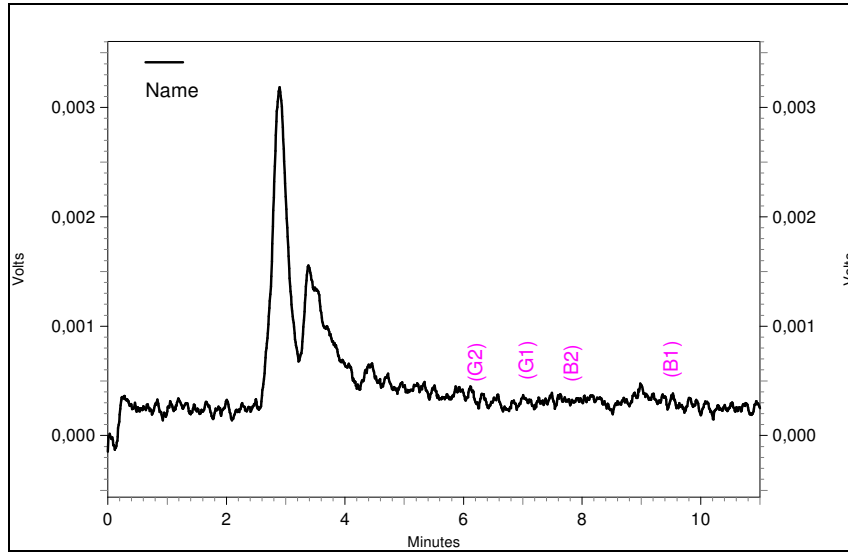
Şekil 4.45 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, e-sorting red örneğine ait kromatogram



Şekil 4.46 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, e-sorting kabul örneğine ait kromatogram



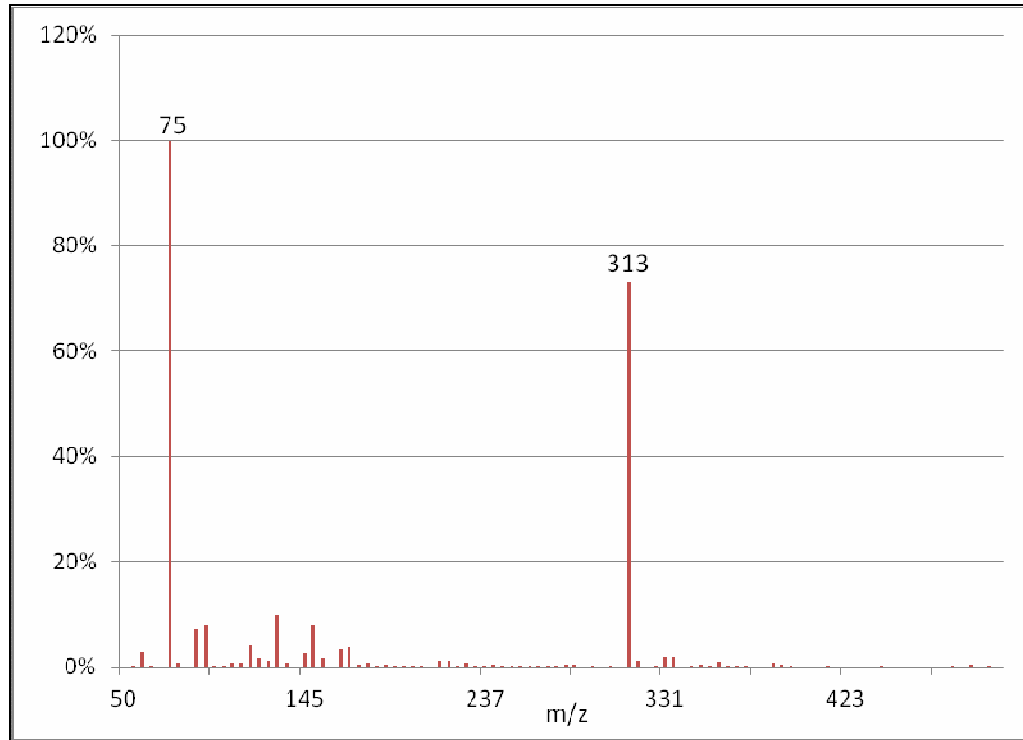
Şekil 4.47 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, elle ayıklama red örneğine ait kromatogram



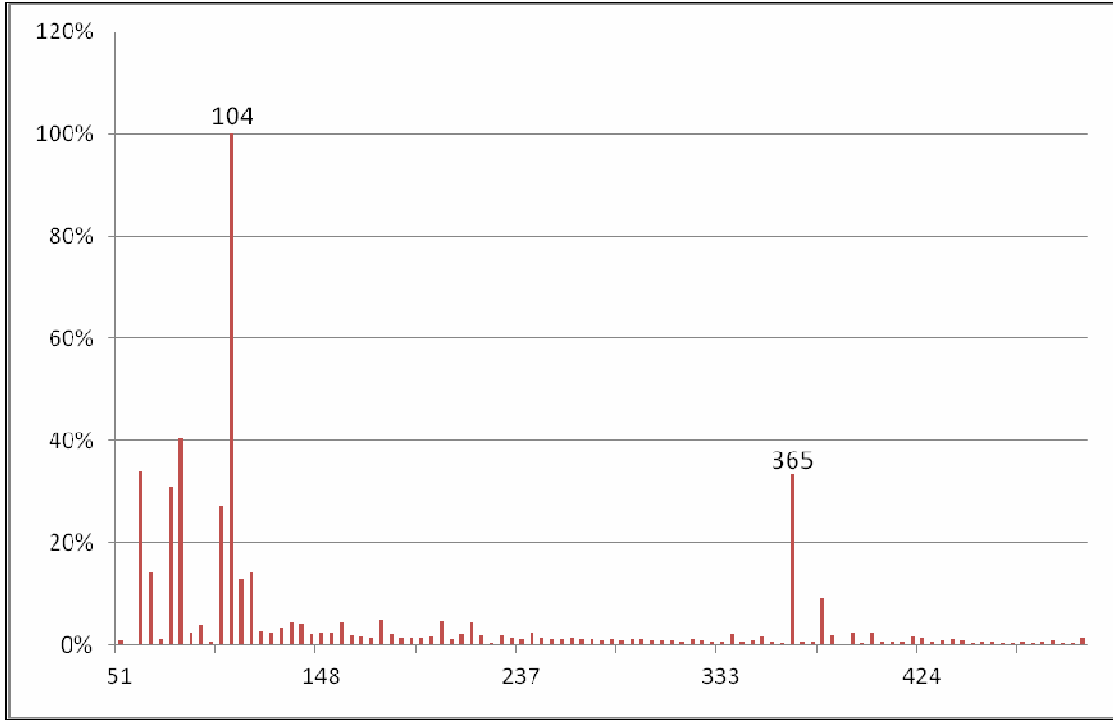
Şekil 4.48 Kavurma işlemi (140-145°C), uygulama 1, son örneğe ait kromatogram

4.4 HPLC MS/MS kullanılarak kavurma işleminin fındıklardaki aflatoksin etkisinin araştırılması çalışmasından elde edilen bulgular

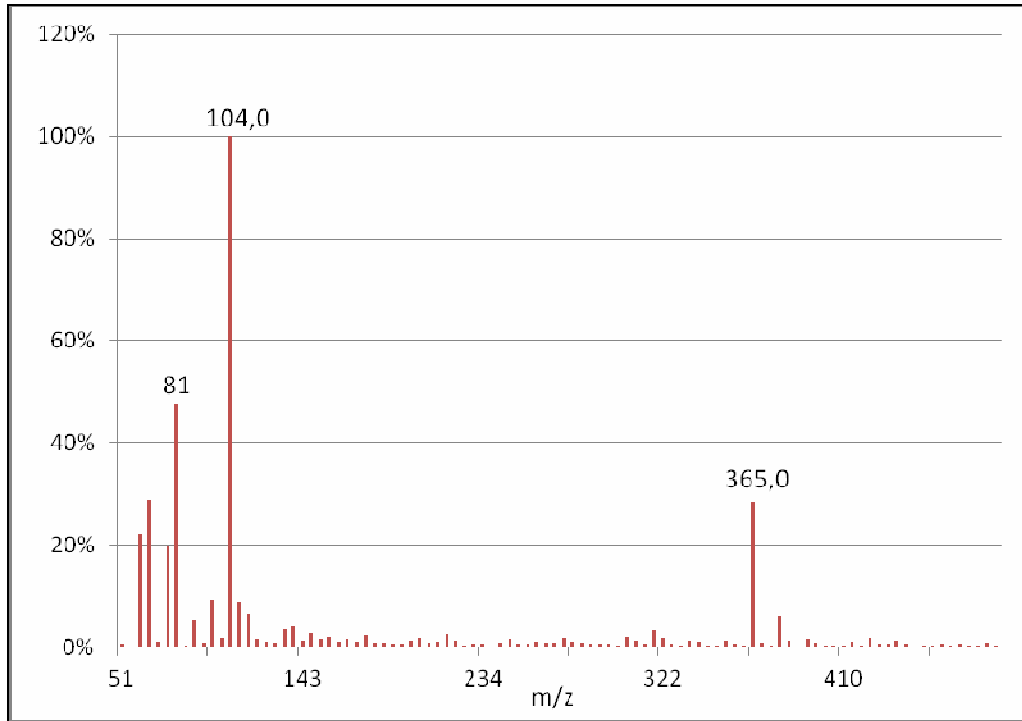
Kavurma işleminin aflatoksin üzerindeki etkisinin HPLC MS/MS ile belirlenmesi çalışmasında temel düzeyde de olsa oldukça ilginç bulgular elde edilmiştir. Öncelikle saf aflatoksin B₁ standardı ile yapılan çalışmanın spektrumunda (Şekil 4.49) m/z 313 iyonu net olarak görülmüştür ki bu da bize aflatoksin B₁'i tespit edebildiğimizi göstermektedir. Nitekim aflatoksin içermeyen kavrulmuş ve kavrulmamış örneğin spektrumlarında (Şekil 4.50, Şekil 4.51) m/z 313 iyonuna rastlanmamıştır. Aynı şekilde aflatoksin B₁ içeren fındık örneğine ait spektrumda (Şekil 4.52) m/z 313 iyonu net olarak görülmektedir. Aflatoksin B₁ içeren kavrulmuş fındık örneğine ait spektrumda (Şekil 4.53) diğer spektrumlara göre değişik iyonlar gözlemlenmiştir.



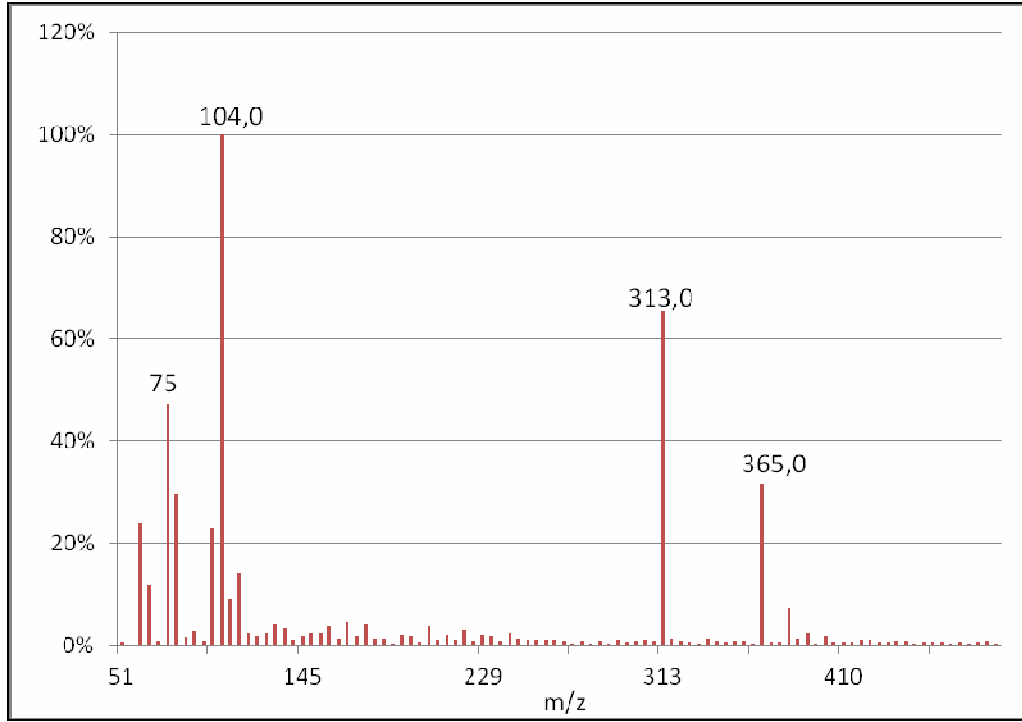
Şekil 4.49 100ppb Aflatoksin B₁ standardı kütle spektrumu (50-500 m/z)



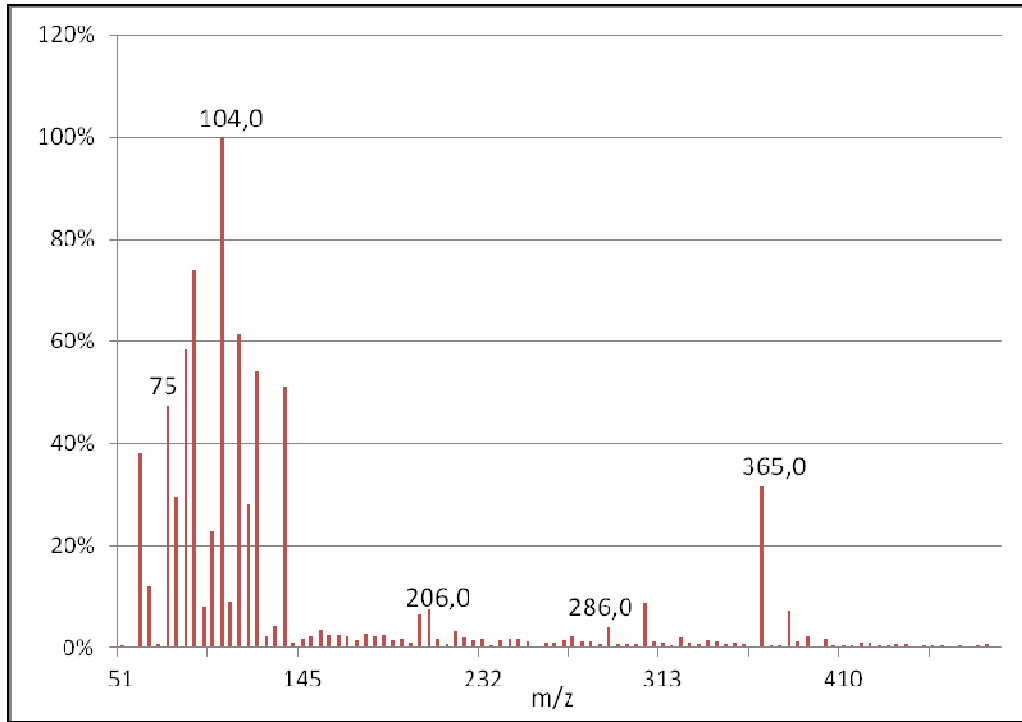
Şekil 4.50 Aflatoksin B₁ içermeyen fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z)



Şekil 4.51 Aflatoksin B₁ içermeyen kavrulmuş fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z)



Şekil 4.52 Aflatoksin B₁ içeren fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z)



Şekil 4.53 Aflatoksin B₁ içeren kavrulmuş fındık örneği kütle spektrumu (50-500 m/z)

5. SONUÇ VE TARTIŞMALAR

Fındıklar sert kabuğu tarafından çevresel bulaşmaya karşı korunması nedeni ile aflatoksin açısından fıstık gibi diğer sert kabuklu meyvelere kıyasla aflatoksin açısından daha az risk taşımaktadır. Ancak bazı yıllarda fındıklarda böceklerin açtığı delikler, kabukta çatlamlar veya iklimsel değişikliklere bağlı olarak oluşan stres nedeni ile aflatoksin riski artış gösterebilmektedir. Güneş altında kurutma sırasında yine o dönemdeki hava koşullarına bağlı olarak uzayan kurutma süresi ile bu risk daha fazla artış gösterebilmektedir. Bu çalışma ile bu tür yıllarda dikkat edilmesi gereken ilave işleme aşamalarının aflatoksin riskini azaltıcı etkisi bakımından önemleri ortaya konmuştur.

İhraç edilen fındıkların %80'inden fazlası çikolata sanayinde kullanılmakta ve hammadde olarak natürel formda ihraç edilen fındıklar daha sonra kullanılacağı ürün grubuna göre ilave işlemlerden geçebilmektedir. Fındığa zar atma ve kavurarak aroma, yapı kazandırmak amacı ile ısıl işlemler, elektronik ayırma/seçme cihazları veya el ile ayıklama ve boyut küçültme işlemleri uygulanan ilave işlemlerdir. Isıl işlemler amacına bağlı olarak 120-170°C sıcaklık arasında değişebilmekte, kullanılan fındığın çeşidine ve tazeliğine bağlı olarak istenen aroma ve rengin oluşumu için farklı kavurma süreleri uygulanabilmektedir. Elektronik ayırma (e-sorting) işleminin ise yüzeydeki renk farkına bağlı olarak ayarları değişebilmektedir. Örneğin çalışmamızda 2-3 mm kabuklu fındıkların partinin %10'unu geçmeyecek şekilde ayar kullanılmış olmakla birlikte bu ayarlar müşteri isterlerine bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu çalışmada en yaygın olarak kullanılan sıcaklık, süre ve diğer ayarlar dikkate alınmıştır. Elle ayıklama işleminde ise eğitimli işçiler tarafından çürük, vurgun, ikiz, buruşuk, kırık, vb. fındıklar yürüyen bant üzerinden ayrı ayrı seçilmektedir. Çalışmamızda çürük fındıklar dikkate alınarak elle ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Beyazlatma amacı ile 120-125°C'de TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Pilot Tesislerinde ısıl işleme tabi tutulan aflatoksijenik küf ile aşılınmış ve doğal kontamine olmuş fındık örneklerinde zar atma ve elle ayıklama sonrası alınan örneklerde aflatoksin düzeyi arttıkça fındık zarına kıyasla çürük fındıklarda daha fazla aflatoksinin yoğunlaştığı Şekil 5.1b'de açıkça görülmektedir.

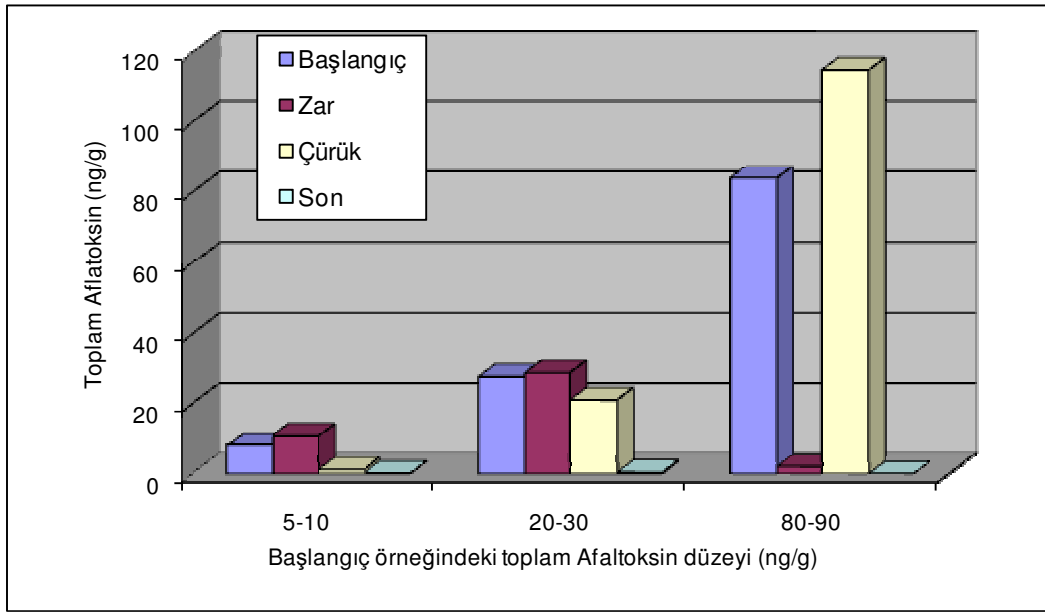
Yapılan her iki aşılama çalışması sonrasında zar ve çürük fındıklardaki aflatoksin düzeyleri kıyaslandığında, düşük aflatoksin içeriğine (~10 ng/g) sahip 1. Aşılama uygulamasında küflerin ve dolayısı ile toksinlerin yüzeyde yoğunlaştığı ve zar atma işlemi ile aflatoksin miktarının önemli ölçüde azaltılabileceği, ancak yüksek aflatoksin içeriğine sahip (~25ng/g)

2. uygulamada fındıkların çürümeğe başladığı ve sadece zar atma ile değil aynı zamanda çürük fındıkların da ayıklanması ile aflatoksin içeriğinin önemli ölçüde azaltılabileceği sonucuna varılmıştır. Doğal olarak aflatoksin içeren (~84ng/g) fındık örneklerinde yapılan çalışma da bu sonucu desteklemiştir. (Şekil 5.1a ve 5.1b).

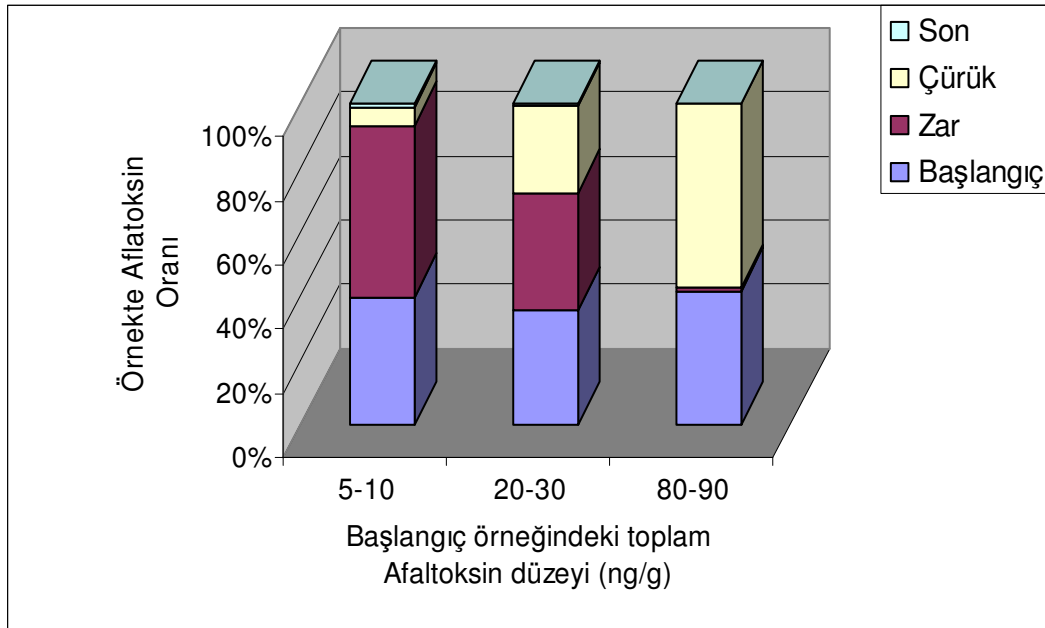
Sonuç olarak, çürümenin artması ile küf gelişimine bağlı olarak çürük fındıklarda aflatoksin miktarının arttığı, bu nedenle yüksek toksinli fındıklarda yüzeysel temizlemenin aflatoksin içeriğini azaltmada yeterli olamayacağı, çürüklerin ayıklanması aşamasının aflatoksini azaltıcı yönde çok önemli etkisi olduğu ortaya çıkmıştır.

Ayrıca, kabuklu fındıklar içerisinde kabuğundan ayrılmış olarak bulunan tanelenmiş iç fındıkların aflatoksin bulaşması bakımından sağlam fındıklar için önemli risk teşkil ettiği de ortaya konulmuştur (Çizelge 4.3).

Bu çalışma ile, düşük veya yüksek aflatoksin içeriğine bağlı olmadan, tüm fındık partilerinde ısıtıl işlem sonrası çürük fındıkların ve zarların uzaklaştırılması ile aflatoksin miktarında en az %98 azaltılabileceği tespit edilmiştir. Bu aşamada yapılan çalışmalarla gerek ısıtıl işlem, gerekse zar atma ve ayıklama işlemlerinin aflatoksin miktarını tutarlı olarak azaltıcı etkisi ortaya konmuştur.



Şekil 5.1a Fındık örneklerinde ısıt işlem ve elle ayıklama sonrası aflatoksin dağılımı

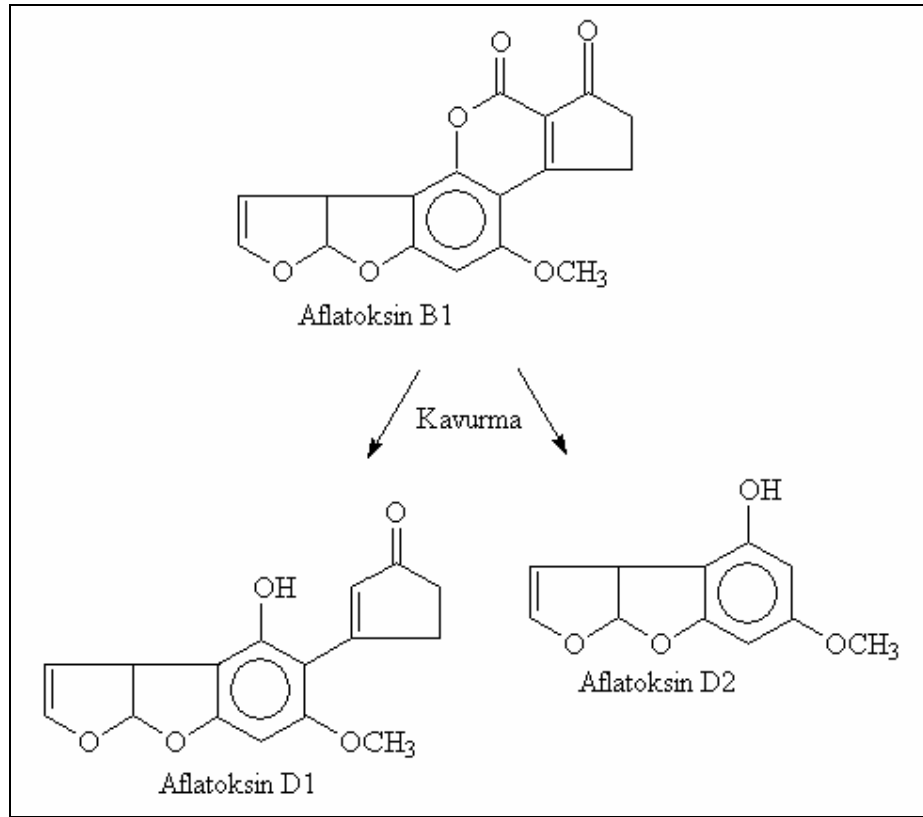


Şekil 5.1b Fındık örneklerinde ısıt işlem ve elle ayıklama sonrası aflatoksin dağılımı

Endüstriyel fındık işleme tesislerinde yapılan uygulamalarda beyazlatma işlemi sonrasında son ürünün aflatoksin miktarının tespit edilebilir sınırların altında olduğu belirlenmiştir. Bu da beyazlatma ve ayıklama işlemlerinin daha sağlıklı fındık üretilmesine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Aynı şekilde kavurma işlemi sonrasında da tüm uygulamalarda, son ürünün aflatoksin miktarının tespit edilebilir sınırların altında olduğu belirlenmiştir. Bu da beyazlatma işleminde olduğu gibi kavurma ve ayıklama işlemlerinin daha sağlıklı fındık üretilmesine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur.

Isıl işlem sonrasında alınan fındık örneklerinde aflatoksin miktarındaki azalma Pilot Tesis ortamında %46-51, endüstriyel fındık işleme tesislerinde ise %67-79 düzeyinde gerçekleşmiştir.

HPLC MS/MS ile yapılan çalışmada Aflatoksin B₁ içeren kavrulmuş örneğin spektrumunda (Şekil 4.53) aflatoksin B₁'e ait m/z 313 iyonu tamamen yok olmuş ve diğer spektumlara göre farklı iyonlar gözlemlenmiştir. Bu durum bize kavurma sonrası kesin olarak aflatoksin B₁'in azaldığını göstermiştir. Aflatoksin B₁ içeren fındıkta kavurma sonrası oluşan iyonların aflatoksin B₁ içermeyen kavrulmuş fındık örneğine ait spektrumda (Şekil 4.51) yer almaması kavurma sonrası oluşan bu iyonların aflatoksin B₁'in degradasyonu sonucu oluşabileceği ihtimalini güçlendirmektedir. Önceden farklı ürünlerde amonyak ve sitrik asit ile yapılan degradasyon çalışmalarında Aflatoksin D₁ (m/z 286) ve Aflatoksin D₂ (m/z 206) moleküllerinin oluştuğu yayınlanmıştır (<http://www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E2A.htm>, (Mendez-Albores ve ark., 2008). Şimdiye kadar yapılmış bu çalışmalar bizim çalışmamızda gördüğümüz m/z 286 ve m/z 206 iyonlarının Aflatoksin B₁ molekülünün degradasyonu sonucu oluşan Aflatoksin D₁ ve D₂ moleküllerine ait olabileceğini göstermektedir (Şekil 5.2). Aflatoksin B₁'in bozulma sıcaklığı 268-269°C iken kavurma sıcaklığı olan yaklaşık 155°C gibi düşük bir sıcaklıkta degradasyona uğraması düşündürücüdür. Bu durum aflatoksinlerin bulunduğu ürünün bileşiminin etkisi ile (matriks etkisi) düşük sıcaklıklarda da degradasyona uğrayabileceğini göstermektedir. Ancak bu çalışma bir ön bilgi düzeyindedir ve bu konuda kapsamlı bir araştırmanın yapılması gerekmektedir.



Şekil 5.2 Aflatoksin B₁'in kavurma işlemi sonrasındaki muhtemel bozulma ürünleri

Aflatoksin elle veya mekanik ayıklama işlemi sonrası reddedilen fındıklarda yoğunlaşmıştır.

Çalışmalar sırasında uygulanan her bir ilave işlem aşaması (ısıl işlem: beyazlatma-kavurma, zar atma, elle veya mekanik/e-sorting) aflatoksin miktarını tutarlı olarak azaltmıştır.

Türkiye’de fındık işleme sektörü Avrupa’daki işleme sektörünün kullandığı ekipmanları ve teknolojileri kullanmaktadır. Dolayısı ile bu çalışmalar ile tespit edilmiş olan ilave işlemlerin aflatoksini azaltıcı etkisi Avrupa’daki ilave işlemler için de geçerli olacaktır.

Sonuç olarak işletmelerde fındığa uygulanan kırma, boylama, elle ayıklama, beyazlatma ve kavurma işlemleri gibi fiziksel ve ısıl işlemlerin mevcut aflatoksini azaltıcı etkileri tamamen ortaya koyularak çalışmanın amacına ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdel Hafez, A.I.I., Saber, S.M., (1993), "Mycoflora and mycotoxin of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and walnut (*Juglans regia* L.) seeds in Egypt", *Zentralbl Mikrobiol.* 148(2): 137-147.
- Akpınar, Ş., Günay, Ş.E., (2008), Fındık İhracatı Ve Aflatoksin Analiz Sonuçları Raporu, Kontrol Şube Müdürlüğü, T.C. Ordu Valiliği, İl Tarım Müdürlüğü.
- Akpınar, Ş., Teknik Rapor, Gıdalar, Yemler ve Mikotoksinler, KKGM, Gıda Kontrol Hizmetleri Dairesi Başkanlığı (<http://www.ordutarim.gov.tr/subeleler/kontrol/aflatoksin/toksinler.htm>)
- Almond Board Report Summary, (2002), Aflatoxin in Almonds: Effect of further Processing Summary Report
- Aluç, M., Aluç, S., (2003), "Akçakoca Ordu ve Giresun İlçelerinde Yetiştirilen Fındıklarda Aflatoksin Düzeylerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Çalışma", I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı, İstanbul, sayfa: 60-67.
- AOAC Official Method 999.07, (2005), "Aflatoxin B1 and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste, and Paprika Powder, Immunoaffinity Column Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization"
- Barung, D., Bhatnagar, D., van Egmond, H.P., van der Kamp, J.W., van Osenburggen, W.A. ve Visconti A., (2006), *The Mycotoxin Fact Book: Food and Feed Chain*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic., p 182.
- Bayman, P., Baker, J.L. ve Mahoney, N.E., (2002), "Aspergillus on tree nuts: Incidence and associations", *Mycopathologia*, 155:161–169.
- Betina V., (1989), *Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects*, Elsevier, , Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, 437p, ISBN 0-444-98885-8.
- Campbell, B.C., Molyneux, R.J. ve Schatzki, T.F., (2003), "Current research on reducing pre- and post-harvest aflatoxin contamination of US almond, pistachio, and walnut", *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 22:225–266.
- Ciegler, A.S. and Kadis, S.J., (1971), *Fungal Toxins (In microbial toxins)*, Vol.VI, Acedemic Press, London, pp:563.
- Chiou, R.Y.Y., Koehler, P.E. ve Beuchat, L.R., (1984), "Hygroscopic characteristics of peanut components and their influence on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*", *Journal of Food Protection*, 47:791–794.
- Commission Directive 98/53/EC. (1998), The sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs.
- Commission Regulation (EC) No 194/97., (1997)," Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs", *Official Journal of the European Communities*.
- Commission Regulation (EC) No.1525/98, (1998), "Amending Regulation (EC No.194/97), Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs", *Official Journal of the European Communities*.

Commission Regulation (EC) No: 466/2001., (2001), "Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs", Official Journal of the European Communities.

Commission regulation (EC) No 472/2002., (2002), "Amending Regulation (EC No. 466/2001), Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs", Official Journal of the European Communities.

Commission Regulation (EC) No: 1881/2006., (2006), "Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs", Official Journal of the European Communities.

Commitee on Sanitary and Phytosanitary Measures G/SPS/GEN/50, G/SPS/GEN/55 and G/SPS/GEN/57, (1998), World Trade Organization, Geneva

Çeliksaşı, M., Dağlıoğlu, F., (2008), "Kuru Meyvelerde Aflatoksin Riski", Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 237-240.

Demir, C., Şimşek, O., Hamzaçebi, H., (2002), "Fındıkta Küf Florası ve Aflatoksin Oluşumunun Araştırılması", Gıda, 27 (4), 291-295.

Denizel, T., Jarvis, B. ve Rolfe, E.J., (1976a), "A field survey of pistachio (*Pistacia vera*) nut production and storage in Turkey with particular reference to aflatoxin contamination", Journal of the Science of Food and Agriculture, 27:1021-1026.

Denizel, T., Rolfe, E.J. ve Jarvis, B., (1976b), "Moisture-equilibrium relative humidity relationships in pistachio nuts with particular regard to control of aflatoxin formation", Journal of the Science of Food and Agriculture, 27:1027-1034.

DG SANCO / 1256/2000-MR final., (2003), Report of a Mission Carried out in Turkey from 4th to 8th September 2000 in order to Access the facilities and measures in place for the determination of aflatoxin levels in hazelnut.

Doster, M.A. ve Michailides, T.J., (1994), "Aspergillus molds and aflatoxins in pistachio nuts in California", Phytopathology, 84, 583-590.

Douglas L.P., (2002), "Effect of Processing on Aflotoxin", Mycotoxin and Food Safety, 173-179.

EFSA opinion, (2007), "Opinion Of The Scientific Panel On Contaminants In The Food Chain On A Request From The Commission Related To The Potential Increase Of Consumer Health Risk By A Possible Increase Of The Existing Maximum Levels For Aflatoxins In Almonds, Hazelnuts And Pistachios And Derived Products", Question N° EFSA-Q-2006-174, The EFSA Journal 446, 1 – 3.

Eke, D. ve Göktan, D., (1987), "Kabuklu fındıklarda *Aspergillus flavus* gelişmesi ve aflatoksin oluşumu", Gıda Sanayi, 4, 36-43

Freitas Costa, L.L., Scussel, V.M., (2002), "Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil", Brazilian Journal of Microbiology, 33(2): 138-144.

Fındık Bülteni 2009/01, (2009), Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü

Galvez, F.C.F, Francisco, M.L.D.L, Villarino, B.J., Lustre A.O. ve Resurreccion, A.V.A., (2003), "Manual Sorting To Eliminate Aflatoxin from Peanuts", Journal of Food Protection, 66,1879-1884

Groopman, J.D. ve Kensler, T.W., (1988), "Aflatoxin Exposure in Human Populations:

Measurements and Relationship to Cancer”, CRC Critical Review in Toxicology, 19(2), 113-145.

Hadorn, H., Keme, T., Kleinert, J. ve Zürcher, K., (1977), “The behaviour of hazelnuts under different storage conditions”, Rev. Choc., Confec., Bakery, 2, 25-36.

Hadorn, H., Keme, T., Kleinert, J., Messerli, M., ve Zürcher, K., (1978), “Storage trials and quality tests on hazelnuts”, Lagerungsversuche und Qualitaetsprüfungen an Haselnüssen, Gordian, 78 (10), 300, 302-304, 306, 308, 310, 78 (11), 342-346, 348.

Heperkan, D., (2005), “Mikotoksinlerin Önemi ve Türkiye’deki Mikotoksin Çalışmaları”, II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, sayfa: 6-7

ICMSF (International Commission of Microbiological Specifications for Foods), (1996), Microorganisms in Food 5, Blackie Academic and Professional, Champman and Hall, New York.

Jayaraman, P. ve Kalyanasundaram, I., (1990), “ Natural occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in rice bran”, Mycopathologia, 110(2): 81-85.

Kamphuis, H.J., Horst M.I., Samson, M.A., Ramboust, F.M., Notermans, S., (1992), “Mycological condition of maize products”, Int. J. of Food Microbiology, 16, 237-245.

Kodeks Alimentarius Komisyonu Toplantısı Bilgi Notu, (2008), T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı Ege İhracatçı Birlikleri, 31inci Kodeks Alimentarius Komisyonu Toplantısı Bilgi Notu

Labuza, T.P., (1971), “Kinetics of lipid oxidation in foods”, CRC Critical Reviews in Food Technology, 355-405.

Labuza, T.P., (1982), Shelf Life Dating of Foods. Food and Nutrition Press.Westport, Connecticut, 500p, ISBN 0-917678-14-1

Labuza, T.P., (1984), Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurement and use. American Association of Cereal Chemist. Minneapolis, MN.,150p, ISBN 0-913250-34-1.

Magan N., Olsen M., (2004), “Mycotoxins in Food: Detection and Control. Abington, UK: 2004”, Woodhead Publishing, p 17.

Mahoney N. ve Molyneux R. J., (1998), “Contamination of Tree Nuts by Aflatoxigenic Fungi: Aflatoxin Content of Closed-Shell Pistachios”, J.Agric Food Chem., vol:46,1906-1909

Mendez-Albores, A., Nicolas-Vazquez, I., Miranda-Ruvalcaba R., ve Moreno-Martinez, E., (2008), ”Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Study on the Degradation of B-Aflatoxins in Maize with Aqueous Citric Acid”, American Journal of Agricultural and Biological Sciences 3 (2): 482-489.

Moreu, C., (1979), Moulds, Toxins and Food, 2nd Ed., John Wiley&Sons., London, pp:477

Munimbazi, C. ve Bullerman, L.B., (1996), “Molds and mycotoxins in foods from Burundi”, Journal of Food Protection, 59(8): 869-875.

Northolt, M.D., Verhulsdonk, C.A.H., Soentoro, P.S.S. ve Paulsch W.E., (1976), “Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by Aspergillus parasiticus”, Journal of Milk and Food Technology, 39:170–174.

Ordukaya, A., (2008), “Sağlık Ve Bitki Sağlığı Önlemlerinin Uygulanmasına İlişkin Dünya

Ticaret Örgütü Anlaşması Açısından Türkiye ve Avrupa Birliği'nin Karşılaştırılması", AB Uzmanlık Tezi, T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Dış İlişkiler ve Avrupa Topluluğu Koordinasyon Dairesi Başkanlığı)

Ozay, G., (1986), "Türk Antepfıstıklarında (*Pistachia vera*) aflatoksinler", E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi, B. Gıda Müh., 4(2), 41-49.

Ozay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S. ve Yılmaz, A., (2008), "Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: A 3-year study. Food Additives & Contaminants. Part A", Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, Volume 25 Issue 2, 209-218.

Özçakmak, S., Dervişoğlu, M., (2007), "Fındıkta Aflatoksin Oluşumuna Etkili Faktörler, Avrupa Birliğinin Limit Değerlerle İlgili Düzenlemeleri ve Türk Fındığı İhracatına Etkileri", Gıda, 32 (1): 33-40).

Özdemir, F., Topuz, A., Doğan, Ü., Karkacier, U., (1998), "Fındık Çeşitlerinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri", Gıda, 23 (1): 37-41

Özkaya, Ş., Temiz, A., (2003), "Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları", Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030101.pdf , Cilt: 01 Sayı: 01 Sayfa: 1-21).

Pala, M., Açıktur, F., Löker, M., Yıldız, M., Ömeroğlu, S., (1996), "Fındık Çeşitlerinin Bileşimi ve Beslenme Fizyolojisi Açısından Değerlendirilmesi", Tr. Journal of Agriculture and Forestry, 20, 43-48.

Pitt, J.I. ve Hocking, A.D., (1985), *Fungi and Food Spoilage*, Academic Press, Sydney, pp:413

Prado, G., Vieira, M.B.C.M., Nicacio M.A.S., Gloria, M.B.A., (1991), "Effect of relative humidity on microbial contamination and aflatoxin production in peanut kernels", *Ciencia e Tecnologia de-Alimentos*, 11(2): 264-273.

Sakai, T., Sugihara, K. ve Kozuka, H., (1984), "Growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* in plant materials", *Journal of Hygienic Chemistry*, 30:62-68.

Sanchis, V., Quilez, M.L., Viladrich, R., Vinas, I. ve Canela, R., (1988), "Hazelnuts as Possible Substrate for Aflatoxin Production", *Journal of Food Protection*, 51, 289-292

Schatzki, T.F., (1995a), "Distribution of aflatoxin in pistachios. 1. Lot distribution", *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1561-1565.

Schatzki, T.F., (1995b), "Distribution of aflatoxin in pistachios. 2. Distribution in freshly harvested pistachios", *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1566-1569.

Schatzki, T.F. ve Pan J.L., (1996), "Distribution of aflatoxin in pistachios. 3. Distribution in pistachio process streams", *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1076-1084.

Schatzki, T.F., (1997), "Pan J. Distribution of aflatoxin in pistachios. 4. Distribution in small pistachios", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45:205-207.

Schatzki, T.F., (1998), "Distribution of Aflatoxin in Pistachios. 5. Sampling and testing U.S. pistachio for Aflatoxin", *J.Agric Food Chem.*, 46, 2-4

Schatzki, T.F., and De Koe, W.J., (1999), "Distribution of Aflatoxin in Pistachios. 6. Buyer's and seller's risk", *J. Agric. Food Chem.*, 47,3771-3775

Schatzki, T.F., (2001), “Ong MS. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4513–4519.

Smith J.E., (1997), *Aflatoxins : Handbook of Plant and Fungal Toxicant*, J.P. Felix D’mello (Ed.). CRC Press. pp. 269-285.

Taydaş, E.E., Teknik Rapor, Aflatoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri, KKGM, Gıda Kontrol Hizmetleri Dairesi Başkanlığı (http://www.ordutarim.gov.tr/subeleler/kontrol/aflatoksin/insan_sag_etkisi.htm)

Tayfur, M., (2002), Mikotoksinler ve Karsinojenik Etkileri, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara. www.un.org.tr/who/nutrition/mikotoksinler

TGK (Türk Gıda Kodeksi) Tebliğ no:2008/26, (2008), Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ

TÜBİTAK MAM (Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi) Gıda Enstitüsü, (2005), Fındıklarda Aflatoksin Oluşumuna Etki Eden Faktörlerin ve Önleyici Tedbirlerin Belirlenmesi Projesi Sonuç Raporu, Proje no:5024143

Vazquez Belda, B., Fente Sampayo, C.A., Quinto Fernandez, E., Franco Abuin, C. Rodriguez Otero, J.L., Cepeda Saez, A., (1996), “Incidence of toxigenic molds in farm-level cheesemaking units from Arzua (La Coruna, Spain)”, *Food Science and Technology International*, 1(2/3): 91-95.

Verstraete, F., (2003), European Community Legislation concerning Aflatoxin with reference to hazelnuts, EC Health and Consumer Protection Directorate

Vural, A., Aydın, A., Çakmak, Ö. ve Erkan, M.E., (2007), “Determination of Aflatoxin Levels in Consumed Hazelnut Cream in Istanbul, Turkey”, *Asian Journal of Chemistry*, 19, 3079-3084.

WHO IARC (World Health Organization, International Agency For Research On Cancer), (1993) “Lists of IARC Evaluations According to IARC Monographs”, Iarc, Lyon

Woodroof, J.G., (1975), *Tree Nuts, Production, Processing, Products.*, 2nd ed. Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.

Wyllie, T.D. ve Morehouse, L.G., (1977), *Mycotoxic Fungi, Mycotoxicoses.*, An Encyclopedic Handbook, Vol.1, Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins, Marcel Dekker Inc., New York.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	27.09.1976	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1990-1994	Maçka Anadolu Teknik Lisesi, Bilgisayar Bölümü
Lisans	1994-1999	Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2000-2003	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı
Doktora	2003-Devam	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

Çalıştığı kurum(lar)

1999-2000	Bioser Medikal Ltd. Şti.
2000-Devam ediyor	TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü, Uzman Araştırmacı