

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEKİRDAĞ İLİNDE SATIŞA SUNULAN KURU İNCİRLERDE AFLATOKSİN

VARLIĞI

FATİH YIKILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK

2007

TEKİRDAĞ

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEKİRDAĞ İLİNDE SATIŞA SUNULAN KURU İNCİRLERDE AFLATOKSİN
VARLIĞI

FATİH YIKILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 18/06/2007 tarihinde aşağıdaki juri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK
(Danışman)

Yrd. Doç.Dr. Tuncay GÜMÜŞ

Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT

Tekirdağ, 2007

**TEKİRDAĞ İLİNDE SATIŞA SUNULAN KURU
İNCİRLERDE AFLATOKSİN VARLIĞI**

FATİH YIKILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK
TEKİRDAĞ, 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
Özet	ii
Summary	iii
Çizelgeler Listesi	iv
Şekiller Listesi	v
Kısaltmalar	vi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	6
2.1. Gıdalarda Bulunan Küfler ve Mikotoksinler	6
2.2. Mikotoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri	12
2.3. Mikotoksinlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler	15
2.4. Aflatoksinlerin Yapısı ve Özellikleri	17
2.5. Aflatoksinlerin Oluşumunu Etkileyen Faktörler ve İncirde Aflatoksin	20
2.6. Aflatoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri	23
2.7. Kuru İncirde Aflatoksin Varlığı ve Yapılan Çalışmalar	30
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Kuru İncir	33
3.2. Metod	33
3.2.1. Aflatoksin Miktarının Belirlenmesi	33
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
6. KAYNAKLAR	
ÖZGEÇMİŞ	
TEŞEKKÜR	

TEKİRDAĞ İLİNDE SATIŞA SUNULAN KURU İNCİRLERDE AFLATOKSİN VARLIĞI

FATİH YIKILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

DANIŞMAN: Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK

ÖZET

Bu araştırmada Tekirdağ ilinde satışa sunulan toplamda 45 kuru incir örneğindeki aflatoksin miktarları HPLC yöntemi ile incelenmiştir. Örneklerin sadece 4'ünde tespit edilebilir düzeyde aflatoksin belirlenmiş olup, diğer örneklerde tespit edilebilir düzeyde aflatoksin bulunmamıştır. İncelenen örneklerden dördünde, toplam 7,38 ppb, 2,90 ppb, 1,49 ppb ve 0,50 ppb düzeylerinde aflatoksin bulunduğu belirlenmiştir. Tespit edilen bu değerler, ilgili Tebliğ'de incir için belirlenmiş olan Maksimum Aflatoksin Seviyesini aşmamaktadır.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin, Kuru İncir, Mikotoksin

RESEARCH OF AFLATOXIN IN DRIED FIGS SOLD IN TEKİRDAĞ

FATİH YIKILMAZ

M. Sc. Thesis

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Main Branch of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK

SUMMARY

In this research, the aflatoxin content of 45 dried fig samples which were sold Tekirdağ Region were determined by HPLC method. Aflatoxins were determined only in the 4 of the samples. It was concluded that the other fig samples did not contain aflatoxins in the detectable levels. In these samples total aflatoxins were determined to be in the levels of 7,38 ppb, 2,90 ppb, 1,49 ppb and 0,50 ppb. The detected aflatoxin levels in the samples do not exceed the legal limits.

Key words: Aflatoxin, Dried wigs, Mycotoxin.

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
	<u>No.</u>
Çizelge 1.1.100 g Kuru İncirin Besin Değeri	3
Çizelge 2.1. Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler	9
Çizelge 2.2. Gıdalarda bulunan önemli mikotoksinler ve üreticileri	10
Çizelge 2.3. Aflatoksin Tipleri	18
Çizelge 2.4. Aflatoksin derivatlarının toksisiteleri	23
Çizelge 2.5. Gıda maddelerindeki Maksimum Aflatoksin Seviyeleri	29
Çizelge 4.1. Aflatoksin ile Kontamine örnek sayıları	35
Çizelge 4.2. İncir örneklerinde tespit edilen aflatoksin miktarları	38
Çizelge 4.3. Aflatoksin geri kazanım değerleri	40

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 2.1. Aflatoksinlerin Yapısı	19
Şekil 4.1. İncirlerde Aflatoksin İçeren Örnek Yüzdeleri	36
Şekil 4.2. Farklı Marketlerden Temin Edilen Örneklerde Aflatoksin İçeren Örnek Yüzdeleri	37

KISALTMALAR

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMIT	Enzyme Multiplied Immunotechnique
EIA	Enzyme Immunoassay
FPIA	Flouresans Polarization Immunoassay
GC	Gas Chromatography
HPLC	High- Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometer
µg	Mikrogram
ppb	Part per billion (µg/kg)
ppm	Part per million (µg/g)
TLC	Thin Layer Chromatography

1.GİRİŞ

Günlük yaşantımızda sık görölen ve hemen her çeşit gıda maddesinde üreyebilen küfler, son yıllarda üzerinde önemle durulan bir araştırma konusu olmuştur. Küfler, uygun koşullarda ham ve işlenmiş materyalde çoğalarak bir yandan ürünün kalite ve kantitesini değiştirip bozulmasına neden olmakta diğer yandan da insan sağlığı için az veya çok zararlı toksik maddeler oluşturmaktadırlar.

Mikotoksin, Yunanca mantar anlamına gelen “mycos” ve Latince zehir anlamına gelen “toxicum” kelimelerinin birleştirilmesinden türetilmiş ve belirli küf formlarının bazı gıda ürünlerinden özellikle tahılların üzerinde gelişme gösteren toksik kimyasal ürünlerine işaret eden bir terimdir (Quillien, 2002). Mikotoksikoz, yem ya da gıda maddesinin mikotoksinlerle kontamine olmasının neden olduğu bir hastalıktır (Nelson ve ark., 1993). Bütün küflerin toksik etkili olmadığını unutmamak gerekir. Aksine bazıları yararlı etkileriyle çeşitli gıdalarda (peynir, salamura et) ve antibiyotiklerin üretiminde kullanılmaktadır. Küfler, tahıllara doğal olarak bulaşırlar. Mikotoksinler, hem hayvanlarda hem de insanlarda önemli akut ve kronik etkilere neden olabilmektedirler (Herrman, 2002).

Aflatoksinler, bazı *Aspergillus* türleri tarafından üretilen mikotoksinler olup ve tahıllar, suyu uçurulmuş meyveler, kurutulmuş meyveler gibi işlenmemiş ürün çeşitlerinde görölmektedir (Quillien, 2002).

Aflatoksinler, birçok gıda maddesinde olduğu gibi incirlerde de oluşmakta, tüketim aşamasında insan sağlığını etkilerken, ihracat açısından sorun yaratmaktadır (Anon.,2007a). Ülkemizde kuru incir dış satımında 1987’den itibaren aflatoksin sorunu yaşanmaktadır (Anon.2007b).

İncir kültürü, Anadolu'da insanlık tarihi kadar eski devrelere dayanan kültür meyveleri içinde, en eski gelişme tarihine sahip meyvelerden biridir. İncirin anavatanı Türkiye olup, buradan Suriye, Filistin ve daha sonra da Ortadoğu üzerinden Çin ve Hindistan'a yayılmıştır. İncirin özel dölllenme ve kendine özgü kurutma şartları isteyen bir meyve olması yetiştirildiği bölgeleri sınırlı kılmaktadır (Anon., 2007a).

Ülkemiz, kurutulmuş incir üretiminde en önemli ülkelerden birisidir (Cemeroğlu, 2004). İncir, her ne kadar subtropik bir meyve olsa da geniş ekolojik uyum kabiliyeti nedeniyle yurdumuzun tüm sahil kuşağında ticari olarak yetiştirilmektedir (Anon., 2007a). Kuru ve taze incir üretim amacı ile Büyük ve Küçük Menderes havzalarında özellikle Aydın yöresinde belirgin bir yoğunlaşma görülmektedir. En önemli iki çeşit yöresel isimleriyle 'sarılop' ve 'göklop' tur. (Anon., 2007a; Cemeroğlu, 2004).

İnsan sağlığı açısından, yüksek kalori değeri, içerdiği mineral maddeler ve besin maddeleri ile özel bir yere sahip olan kuru incirin 100 gramında 217 kcal'lik enerji, 138 mg kalsiyum, 163 mg fosfor, 4,2 mg demir, 91,5 mg magnezyum, 0,073 mg B₁ ve 0,072 mg B₂ vitamini bulunmaktadır (Anon., 2007a).

Çizelge 1.1'de kuru incirin besin değerine ilişkin bilgiler verilmiştir.

Çizelge 1.1. 100 g Kuru İncirin Besin Değeri

Enerji (kcal)	217
P rotein (gr)	4
Şeker (gr)	55.3
Yağ (gr)	1.2
Diyet Lifi (gr)	6.7
Kalsiyum (mg)	138
Fosfor (mg)	163
Demir (mg)	4.2
Magnezyum (mg)	91.5
Vitamin B1 (mg)	0.073
Vitamin B2 (mg)	0.072

Kaynak:Anon., 2007a

Gıdaların kurutulularak dayandırılma yöntemi, insanın doğadan öğrendiği ve bu yüzden ilk çağlardan beri uygulanmakta olan en eski muhafaza yöntemidir. Gıdalar ya güneş ısısından yararlanarak ya da başka kaynaklardan elde edilen ısı yardımıyla kurutulmaktadır. Diğer meyvelerden farklı olarak incirler, ağaçta bırakılarak mümkün olduğunca bitki üzerinde kurumaya terk edilmektedir. Kuruyarak düşen incirlerin toplandığı ve hasırlar üzerine serilerek veya 3x1 m boyutlarında yerden 10-15 cm yükseklikte plastik tel örgülü kerevetler üzerine yayılarak güneşte veya gölgede bekletilerek kurumanın 8-10 günde tamamlandığı bildirilmektedir. Kurutulmuş incirler, sandıklar içinde depolanmakta ve incir işleme tesislerinde bazı işlemler uygulandıktan sonra, ambalajlanıp piyasaya sunulmaktadır. İncirlerin işlenmesi eleme, sınıflandırma, yıkama gibi başlıca işlemleri kapsar (Cemeroğlu, 2004).

Tarımsal ürünlerde mikotoksin oluşumu, uygun koşullarda ürüne bağlı olmak üzere, hasattan tüketime kadar hemen her aşamada meydana gelebilmektedir (Oruç, 2005). Aflatoksin oluşumu, incirler henüz ağaç üzerinde yaş oldukları dönemde iken başlamaktadır (Anon.,2007b). Meyveler tozlaşma sırasında incir ilek sinekleri (incir yaban arısı) aracılığıyla enfekte olurlar ve meyveler olgunlaşırken aflatoksin oluşumu başlar. Eğer hasattan sonra kontaminasyonun daha ileri boyutlara ulaşması engellenmek isteniyorsa meyveler 48 saat süre ile en az 60 °C de kurutulmalıdır (Anon., 2006). İncirde ayrıca okratoksin A ve fumonisinler de fazla miktarda bulunabilmektedir. Bu nedenlerle uygun şartlarda kurutulamayan incir, insan sağlığı açısından daha riskli olabilmektedir (Oruç, 2005).

İncirlerde aflatoksin oluşumunun engellenmesi için;

1. Zamanında ve tekniğine uygun şekilde budama yapılması,
2. Temiz ilek kullanılması,
3. Hasat döneminde yere düşen meyvelerin sık sık toplanması,
4. Kurutmanın tahta ızgaralar (kerevit) üzerinde yapılması,
5. Küf oluşumunun önlenmesi için tam kurutma sağlanması

6. İncirler sergiden alınırken hurda incirlerin ayrılması gerektiği bildirilmektedir (Anon., 2007a).

Kuru incirlerde aflatoksin oluşumunu engellemek için güneş enerjisinden yararlanarak geliştirilen solar kurutma sistemlerinin yaygınlaştırılması gerektiği bildirilmektedir. Bu yöntemle zamanla nemini kaybeden (%50-60) buruklaşmış incirler, toprağa dökülmeden önce, ağaçtan toplanarak, plastik telli kerevetlere dizilmekte ve sonra solar kurutma tüneline sokularak, meyvedeki nem oranının %20-22 seviyesine düşmesi sağlanmaktadır. Böylelikle hem zamandan kazanılmakta, hem de aflatoksin oluşmasının önüne geçilmektedir (Anon., 2007a).

Ayrıca, kuru incirlerin pazarlanıncaya kadar bekletildikleri depo ortamının temiz olması, kireç badanası yapılması, incir kurdu kelebeğinin girişini engelleyecek tül gibi materyalle çevrilmesi ve kuru incirlerin en kısa sürede pazarlanması ve depolamada hijyen koşullarının iyileştirilmesi gerektiği belirtilmektedir (Anon.,2007a).

Kuru incirlerde aflatoksin oluşumunu engellemek için çeşitli kurutma yöntemleri geliştirilmekte, iyi şartlarda kuru incir üretimi sağlamak için gerekli tedbirler alınmaya çalışılmaktadır.

Bu çalışmada, Tekirdağ ili genelinde ticari şekilde halkın tüketimine sunulan, değişik satış, toplu tüketim ve üretim yerlerinden tedarik edilen kuru incir numunelerinin Aflatoksin içeriğinin belirlenmesi ve yasal mevzuata uygunluğunun incelenmesi amaçlanmıştır. Gıdalardaki aflatoksinler ile ilişkili sağlık riskleri ve kuru incirlerin direk olarak tüketilmeleri nedeniyle, incirlerin kalitesinin belirlenmesi önemli bir konudur.

LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Gıdalarda Bulunan Küfler ve Mikotoksinler

Gıdalarda ve yemlerde bulunan hifli küfler (filamentli funguslar) dendiğinde taksonomide Mycobiota (funguslar alemi) içinde Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota bölümleri altında yer alan değişik cins ve türdeki funguslar akla gelmektedir. Tarımsal ürünler, hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında ortam koşullarına, tarım ürününün bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik küflerle kontamine olurlar (Anon., 2006).

Küflerle kontaminasyon iki açıdan önemlidir. Yakın zamana kadar tarımsal ürünlerdeki küflerin varlığı yalnızca bozulmalar, ürünün besin değerindeki kayıplar, danelerin çimlenme kabiliyetindeki düşüşler nedeniyle ve özet olarak ekonomik açıdan önemli görülmüştür. Üzerinde fungusların geliştiği tahılların ve yağlı tohum küspelerinin hayvan yemi olarak değerlendirilmesi sakıncalı bulunmamıştır. Küflerin verdiği ekonomik zararlar, tarım ürünlerindeki kayıplar dikkate alındığında gerçekten azımsanamayacak düzeydedir. Yıllık üretimler baz alındığında; yağlı tohumlarda % 12, pirinçte % 5, yer fıstıklarında % 4.2, mısırdaki % 3, soya fasulyesinde % 3 ürün kayıpları meydana gelmektedir (Anon., 2006).

Ancak gıda ve yemlerde gelişen fungusların gelişme sürecini tamamladıktan sonra miselleri içerisinde oluşturdukları ve birçok durumda üzerinde buldukları ürüne salgıladıkları toksik metabolitler, insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır (Anon., 2006).

Küfler tarafından üretilen sekonder toksik bileşiklere mikotoksin denmektedir (Oruç, 2005).

Fungusların çok çeşitli sekonder metabolitleri bulunmaktadır. Bu metabolitlerden antibiyotikler, sağlık üzerinde olumlu etkiye sahip, çok önemli bir madde grubudur ve tıp ile veterinerlikte terapi amacıyla kullanılmaktadır. Mikotoksinler ise küçük dozlarda alınsalar bile insan, hayvan ve bitkilere toksik etki yaparlar (Anon., 2006).

Mikotoksinler, gıda ve yemlerde bulunan kimyasal etkenler içerisinde insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en ciddi tehlikelerden biridir. Mikotoksin çeşidine göre yerel bir sorun olabilirken, dünyanın farklı coğrafyalarında yetiştirilen benzer ürünlerde ortaya çıkmasıyla daha çok genel bir sorun olabilmektedir (Oruç, 2005). Mikotoksinler, insan ve hayvanlarda patolojik veya istenmeyen fizyolojik değişikliklere neden olurlar. Mikotoksikozis ise mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yemlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan hastalıklardır (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Mikotoksinler, gıda güvenliğinin sağlanması açısından kontrol altına alınması gereken önemli sorunlardan biridir (Oruç, 2005). Mikotoksinler çeşitli bitkisel ve hayvansal orjinli gıdalarda yaygın olarak bulunmakta ve bitkisel ürünlerde hasat öncesinde olduğu gibi hasat sonrasında da oluşabilmektedir (Karagözlü ve Karapınar, 2000). İnsan sağlığı açısından önemli olan fındık, antep fıstığı, kuru incir, siyah zeytin, kırmızı toz ve pul biber gibi ihraç ürünlerinin yanında, başta mısır olmak üzere diğer tahıl ürünleri mikotoksinlerle kontamine olabilmektedir (Oruç, 2005). Süt ve süt ürünleri, et, yumurta gibi hayvansal ürünlerdeki mikotoksin varlığının ise çoğunlukla mikotoksin oluşmuş hayvan yemlerinin tüketilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Gıda ve yemler çok çeşitli küflerin saldırısına hedef olmaktadır. Bununla birlikte mikotoksin üreten küf sayısının bugün yaklaşık 350 ile sınırlı olduğu

bilinmektedir. Test edilen binlerce fungus türünden büyük çoğunluğu mikotoksin oluşturmamıştır (Anon., 2006). En önemli mikotoksin üreticileri, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* cinsleridir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Çizelge 2.1' de bu dört cinsin oluşturduğu başlıca mikotoksinler görülmektedir. Aflatoksin gurubundaki derivatlar 18 civarındadır. Okratoksinler de strüktür benzerliği bulunan 7 bileşiği kapsamaktadır. Ancak en önemlisi OTA (Okratoksin A)'dır. Trikotesenler 40 derivat içerirler, hatta bu gruba 150 bileşiğin dahil olduğu ileri sürülmektedir. *Alternaria* toksinleri de 30' un üzerinde farklı metabolit sergilemektedir (Anon., 2006).

Çizelge 2.1.Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler

Aspergillus toksinleri	Penicillium toksinleri	Fusarium toksinleri	Alternaria Toksinleri
Aflatoksinler	Sitrinin	Zearalenon(F-2toksin)	Alternariol
AFB ₁	Okratoksin A		Alternariol mono - metil-eter
AFB ₂	Sitreoviridin	Triokotesenler	
AFG ₁	Rubratoksin A	Deoksinivalenol	Altertoksin
AFG ₂	Rubratoksin B	Nivalenol	Tenuazonik asit
AFM ₁	Patulin	Diasetoksisirpenol	
AFM ₂	Penisilikasit	T-2 toksin	
AFB _{2a}	P-R (Pen. requeforti)-toksin	HT-2 toksin	
AFG _{2a}	Luteosikrin	Tremortin,	
AFB ₃	İzlanditoksin	Fumonisin B ₁	
Aspertoksin	Ksantosilin-X	Moniliformin	
Sitrinin	Siklopiazonikasit		
Sterigmatosistin	Sitromisetin		
Okratoksin A	Rugulosin		
Patulin	Ksantomegnin		
Penisilikasit	Rugulovasin A		
	Rugulovasin B		
	Verrukulotoksin		
	Emodin		

Kaynak: Anon.,2006

Bugüne kadar yaklaşık 400 mikotoksin tanımlanmış olmasına rağmen, bunlardan beş veya altı tanesi çok önemlidir. Önem derecesine göre sıralama ülke ve bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte aflatoksinler, okratoksin A (OTA), fumonisinler, trikotesenler ve zearalenonun birinci derecede önemli mikotoksinler olduğu konusunda araştırmacıların görüş birliğine vardıkları belirtilmektedir (Oruç, 2005).

Gıdalarda bulunan önemli mikotoksinler ve üreticileri Çizelge 2.2’de verilmiştir (Anon., 2006).

Çizelge 2.2. Gıdalarda bulunan önemli mikotoksinler ve üreticileri

Mikotoksinler	Önemli toksin üreticileri
Aflatoksin	<i>Asp. flavus, Asp. parasiticus, Asp. nomius</i>
Alternaria toksinleri: - Alternariol - Alvertoksin - Tenuazonikasit	<i>Alt. alternata, Alt. tenuissima</i>
Fusarium toksinleri: - Trikotese - Zearalenon - FusarinC - Fumonisin	<i>Fus. culmorum, Fus. equiseti, Fus. graminearum, Fus. moniliforme, Fus. poae, Fus. sambucinum, Fus. sporotrichioides, Fus. verticillioides</i>
Sitrinin	<i>Asp. terreus, Pen. expansum, Pen. citrinum, Pen. citreonigrum, Pen. verricosum</i>
Siklopiazonikasit	<i>Asp. flavus, Asp. tamaris, Pen. camambertii, Pen. griseofulvum, Pen. puberulum</i>
Okratoksin A	<i>Asp. ochraceus Gr., Asp. alutaceus, Asp. fresenii, Eur. herbariorum, Pen. verrucosum Chemotyp I ve II</i>
Patulin	<i>Asp. clavatus, Asp. terreus, Bys. fulva, Bys. nivea, Pae. variotii, Pen. griseofulvum, Pen. expansum, Pen. roquefortii Chemotyp II</i>
Penisilikasit	<i>Asp. alutaceus, Pen. auratiogriseum, Pen. roquefortii Chemotyp II, Pen. simplicissimum, Pen. raistrickii, Pen. viridicatum</i>
Sterigmatosistin	<i>Asp. versicolor, Emer. nidulans, Eurotium spp. (iz miktarda)</i>

(Anon., 2006)

Küçük molekül yapısına sahip mikotoksinlerin, bunları üretme yeteneğinde olan küfler tarafından her zaman, her koşulda üretilebileceklerini düşünmek yanlıştır. Mikotoksin sentezi için özel koşulların oluşması gerekir (Anon., 2006).

Bilinen ilk mikotoksikozis olması bakımından tarihsel bir önemi olan ergotizm (çavdar zehirlenmesi), *Claviceps purpurea* ile enfekte olmuş tahılların tüketilmesi sonucu görülen bir hastalıktır. Hastalık etmeni, *Claviceps purpurea*'nın metabolik ürünleri olan ergot alkaloidleridir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

1960 yılına kadar tarımsal ürünlerin küflenmesi, sadece ekonomik yönden problem yaratırken 1960 sonrası yüksek canlılarda meydana getirdiği hastalıklar nedeniyle ilgi odağı olmuştur. Oysa küflerin insan ve hayvanlarda hastalık yaptıklarına, hatta toplu ölümlere yol açtıklarına ilişkin veriler hayli eski tarihlere gitmektedir (Anon., 2006).

1960 yılında İngiltere' de 100 000 hindi palazının ani ölümü yol açan hastalığa, hayvan yemlerine katılan yer fıstığı unlarındaki küflerin neden olduğu saptanmış, yapılan araştırmalarda bu küfün *Aspergillus flavus* olduğu tanımlanmış ve bu ürettiği toksin de aflatoksin olarak adlandırılmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). Oral alımlarla canlılarda çok kuvvetli toksik etki gösteren, aynı zamanda kanserojen olan aflatoksinlerin keşfinden sonra mikotoksinler yoğun araştırılan bir konu olmuştur . 1960'dan beri üzerinde en çok çalışma yapılan mikotoksin grubunun aflatoksinler olduğu (Krogh, 1987), okratoksin (OT), patulin, sitrinin, sterigmatosistin, zearalenon ve siklopiazonik asit gibi ikinci grup mikotoksinlerle ilgili çalışmaların ise son yıllarda arttığı rapor edilmektedir (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

Bugün gelinen noktada insanları bu mikotoksinlerin etkilerinden korumak amacıyla mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek (tolere edilebilir) en yüksek miktarları yasal düzenlemelerle belirlenmekte, her ülkenin

limit (sınır) değerleri farklı olsa da uluslararası ticarete belli normlara yaklaşmak için çaba sarf edilmektedir (Anon., 2006).

2.2. Mikotoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri

İnsanlar ve hayvanlar mikotoksinleri direk olarak, kontamine olmuş gıda ve yem maddelerini tüketerek alırlar. Ayrıca kontamine yemle beslenen hayvanların, yumurta ve süt gibi ürünlerine de bu toksinlerin geçmesi nedeniyle, mikotoksinler insanlara dolaylı olarak da ulaşabilmektedir (Anonymous 2007c).

Küflerin insanların sağlığını tehdit ettiği yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Anonymous 2007c). Mikotoksinlerin insanlar ve hayvanlar üzerindeki etkileri farklılık göstermekle birlikte, özellikle insanlar söz konusu olduğunda bireysel olarak insanlar üzerinde araştırma yürütülmesinin zorluğu nedeniyle insanlar üzerindeki etkileri iyi bilinmemektedir (Quillien, 2002). Toksikite denemeleri en duyarlı hayvan olan ördek yavruları, fareler ve ratlar kullanılarak genellikle oral dozlarla bazen de subkutan yolla (deri altı enjeksiyonları ile) yapılır. Bir mikotoksinin toksisitesi belli bir hayvan türü için onun letal dozu (LD₅₀ değeri) ile belirtilir. Bu değer hayvanlarda kg başına, bazen de birey başına düşen doz (mg, µg, ng) olarak verilir. Hayvan denemelerinde akut ve kronik etkileri saptanan mikotoksinlerin insanlar için de tehlikeli olacağından kuşku duyulmamalıdır. En azından bu mikotoksinlerin gıdalarda ve yemlerde bulunması tolere edilmemelidir (Anon., 2006).

Mikotoksinlerle zehirlenme genellikle kronik nitelikte olurken, akut nitelikte de olabilmekte ve çok ciddi sonuçlarla karşılaşılabilir. Örneğin Kenya'da 2004 yılı nisan ve haziran ayları arasında, temel besin maddesi olarak kullanılan mısır ve mısır ürünlerini yiyen insanlarda ortaya çıkan aflatoksikozis olayında, 317 zehirlenme olmuş ve bunlardan 125'i ölümlü sonuçlanmıştır. Bu

olayda tespit edilen aflatoksin miktarının mısırdaki 48.000 ppb'ye ulaştığı bildirilmektedir (Oruç, 2005).

Mikotoksinin toksisitesi özellikle konu olan mikotoksinin molekül özelliğine, maruz kalma sıklığına ve absorbe edilen miktarına bağlıdır (Quillien, 2002).

Yüksek dozda mikotoksin alındığında, akut toksik etki meydana gelmekte ve gıda veya yemin tüketilmesinin ardından kısa sürede ölüm görülebilmektedir. Bazı mikotoksinler ölümden önce çok az belirgin semptomlar gösterirler. Bir kısmı ise deri nekrozları, lökopeni (kanda lökosit sayısının azalması) ve immunosupresif (bağışıklık sisteminin baskılanması) etkiler ile belirginleşirler ve ağır hastalıklara neden olurlar (Anon., 2006).

Daha az dozların uzun süre alınmaları sonucunda kronik hastalıklar görülür. Bunlar; özellikle karaciğer, böbrek gibi organlarda hastalıklar, dejenerasyonlar, bağışıklık sisteminde bozukluklar, kusurlu ve eksik organ oluşumları, deri nekrozları, üremede azalma ve kilo kaybı gibi bozukluklardır. Akut toksik etkiye bireyin duyarlılığı, genetik ve fizyolojik özellikleri ve çevresel faktörler etkendir (Anon., 2006).

Mikotoksinler içinde yüksek organizmalara en etkili olanlar; aflatoksinler, trikotesenler, fumonisinler ve okratoksin A'dır (Anon., 2006).

Mikotoksinlerin çeşitli biyolojik etkileri onların reaksiyonca aktif kimyasal yapılarından ileri gelir. Küçük molekülü bu bileşikler metabolizmada önemli işlevleri olan çok sayıdaki molekülün reseptörleri olarak davranırlar. DNA, RNA, fonksiyonel proteinler, enzim kofaktörleri, membrandaki kimyasal yapılar ile reaksiyona girerler, hormon aktivitelerine etkili olurlar, biyosentez yollarını ve enerji üretimini inhibe ederler. Örneğin difuran kumarin derivatı olan aflatoksin B₁ (AFB₁)'in kabul edilen etki mekanizması, toksin molekülünün DNA'ya bağlanarak RNA-polimeraz enziminin çalışmasını inhibe ettiği

şeklindedir. m-RNA sentezinin yapılamaması, protein sentezinin gerçekleşmesini engeller. Hepatotoksik ve kanserojen olan AFB₁'in karaciğer kanserine neden olması molekülün nükleik asitlere etkisinin sonucu olarak görülmektedir (Anon., 2006).

Sonuç olarak mikotoksinler insanlarda; karaciğer kanserine ve gen yapısında değişikliklere yol açar, vücudun hormonal dengesini bozar, vücudun koruyucu (bağışıklık) sistemini zayıflatır, kısırlığa ve sakat doğumlara neden olur, gıda emilimini azaltır ve kemikleri zayıflatır, vücut direncini düşürerek vücudu hastalıklara açık hale getirir (Anonymous 2007c).

Mikotoksinlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Mikotoksinlerin analizinde, ince tabaka kromatografisi (TLC), Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), Enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (ELISA) ve enzim aktivitesine bağlı immunoteknik (Enzyme Multiplied Immunoassay/EMIT) gibi yöntemler uzun zamandır kullanılmaktadır. Ancak bunların dışında Flouresans Polarization Immunoassay (FPIA) yöntemi ile de mikotoksinlerin ölçümünde olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir (Oruç, 2005).

Kromatografik teknikler arasında en yaygın kullanım alanı bulan HPLC tekniği, katı sabit bir faz (kolon) ile hareketli bir sıvı faz (mobil faz) arasında, bileşenlerin çeşitli yöntemlere göre ayrımının gerçekleştirildiği bir tekniktir. Kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi gibi klasik ayırma teknikleri ile kıyaslandığında, HPLC'nin bir çok avantajı bulunmaktadır (Cemeroğlu, 2007).

HPLC'de (LC) hareketli faz sıvı (asetonitril, metanol, etanol, tetrahidrofur, etil asetat, su gibi solventler) ve sabit faz çok küçük katı parçacıklardan (kolonun dolgu maddeleri olan silisyum dioksit, alüminyum oksit, gözenekli polimer ve iyon değiştirici reçineler gibi) oluşmaktadır. HPLC ile mikotoksin analizinde bilinmesi gereken en önemli faktörlerden biri, hangi mikotoksinin hangi dedektörle aranacağını bilmesidir. Örneğin aflatoksinler (AFM1 dahil), fumonisinler ve OTA analizlerinde flouresans dedektör; trikotesenlerin analizinde UV veya DAD dedektörü kullanılmalıdır. Ayrıca kütle dedektörü (MS/Mass Specrometer) ile de LC-MS veya LC-MS/MS sistemi şeklinde mikotoksin analizi yapılmaktadır. Aflatoksin, fumonisin, okratoksin analizinde temelde C-18 kolonları ve mikotoksinlerin ekstraksiyon aşamasında toksinlerin daha konsantre ve saf olarak elde edilebilmesi için genellikle İmmüno

Affinite Kolonları (IAK) kullanılmalıdır. HPLC mikotoksin analizlerinde en fazla kullanılan analiz yöntemlerinden biridir (Oruç, 2005). Analiz süresindeki muhtemel kayıplar, bir geri kazanım (recovery) testi yürütülerek belirlenebilir. % 90 ve üzerinde elde edilen geri kazanım değerleri, bileşenin tüm analiz sürecindeki kayıplarının minimum düzeyde olduğunun bir göstergesidir (Cemeroğlu, 2007).

HPLC ile yapılan bir çalışmada, geri alma değerlerinin aflatoksin B1 için %54.8-72.9, B2 için %80-92, G1 için %55.2-80.3, G2 için %69.3-88 iken toplam aflatoksinde %62.7-78.1 olarak ölçüldüğü bildirilmektedir (Şahin, 2003).

Mikotoksinlerin analizinde GC (Gas Chromotography)'ye MS (Mass Spectrometry) dedektörü bağlanarak mikotoksinler atomlarına kadar parçalanabilmekte ve böylece ölçümleri yapılabilmektedir. Ancak mikotoksinlerin analizi GC/MS ile yapılabilmekle birlikte diğer sistemler daha pratik olduğundan GC/MS pek tercih edilmemektedir (Oruç, 2005).

Günümüz yöntemlerden biri olan mikotoksin analizlerinde en sık kullanılan ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) tekniğinde genellikle katı yüzeylere bağlanmış az miktarda antikor (antibadi) ile örneklerde bulunan toksin ve toksin ile işaretlenmiş enzimlerin bağlanma mücadelesi temel alınmaktadır. Yapılan yıkama sonrası bağlanmamış enzimler ayrılmakta, kullanılan belirli substrat ile meydana gelen renkli maddenin miktarına dayanarak toksin miktarının hesaplanması sağlanmaktadır (Oruç, 2005).

Aflatoksinlerin Yapısı ve Özellikleri

Aflatoksinler, en toksik mikotoksinler arasında yer almakta olup en önemli üreticileri *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*' tur (Bennet ve Papa, 1988). Aflatoksijenik küfler, yer fıstığı, baharatlar ve incir gibi birçok gıda ürünüde bulunabilmektedir (Farber vd., 1997).

Aflatoksin üreten küfler olan *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius*, birçok tahıl ürünüde yetiştirilme, hasat ve depolanma aşamalarında ortamın ısı ve nemine bağlı olarak yerleşip üremeye ve toksik metabolitleri olan aflatoksinleri üretmeye devam ederler. Yemlerdeki aflatoksinin en önemli kaynakları mısır, yerfıstığı küspesi ve pamuk tohumu küspesi gibi yem hammaddeleridir (Oruç, 2005).

Aflatoksinlerin kimyasal yapılarının aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalarda bu maddelerin bifuran halkasına sahip heterosilik bileşikler oldukları belirlenmiştir (Heatchcote,1984). Aflatoksinlerin iki esas metabolitinin B1 ($C_{17}H_{12}O_6$) ve G1($C_{17}H_{12}O_7$) olduğu bildirilmekte (Şahin, 2003) ve kimyasal yapılarına göre iki ana grupta toplanabilecekleri belirtilmektedir. Birincil gruptaki bileşikler difurankumarin siklopentanon yapısında olup, bu grup içinde B1, B2, B2a, M1, M2, M2a ve Aflatoksikol bulunmaktadır. İkinci gruptaki bileşikler difuranokumarinlakton yapısında olup bu grup ise G1, G2, G2a, GM1, GM2, GM2a, B3 komponentlerini içermektedir. Bu komponentler içinde de B1, B2, G1, G2' ye gıdalarda daha sık rastlanmaktadır ve bunlar toksijenik suşlar tarafından doğrudan sentezlenmektedir (Heatchcote,1984). B1 ve B2'nin süt ve süt ürünlerindeki kısa formları olan M1 ve M2 ise (Heatchcote,1984), ruminantların aflatoksinle kontamine olmuş yemlerle beslenmesi sonucu üretilmekte (Quillien, 2002) ve hayvanların süt, idrar ve dışkılarında bulunmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Aflatoksinler, ultraviyole ışık altında verdikleri renge göre ayrılmışlar ve mavi ışık veren ilk tür B1 ve B2 olarak, yeşil ışık verenler ise G1 ve G2 olarak adlandırılmıştır. B2 ve G2, B1 ve G1'in dehidro türevleridir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Bugüne kadar 20'nin üzerinde aflatoksin varyetesinin kaydedildiği bildirilmekte (Quillien, 2002), ancak doğal olarak 4 ana türün B1, B2, G1, G2 olduğu rapor edilmektedir. *A. parasiticus*' un tüm suşlarının 4 aflatoksin formunu birden sentezlemesine rağmen, *A. flavus* türünün bazı suşlarının sadece B1 ve B2 formunu sentezlediği belirtilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

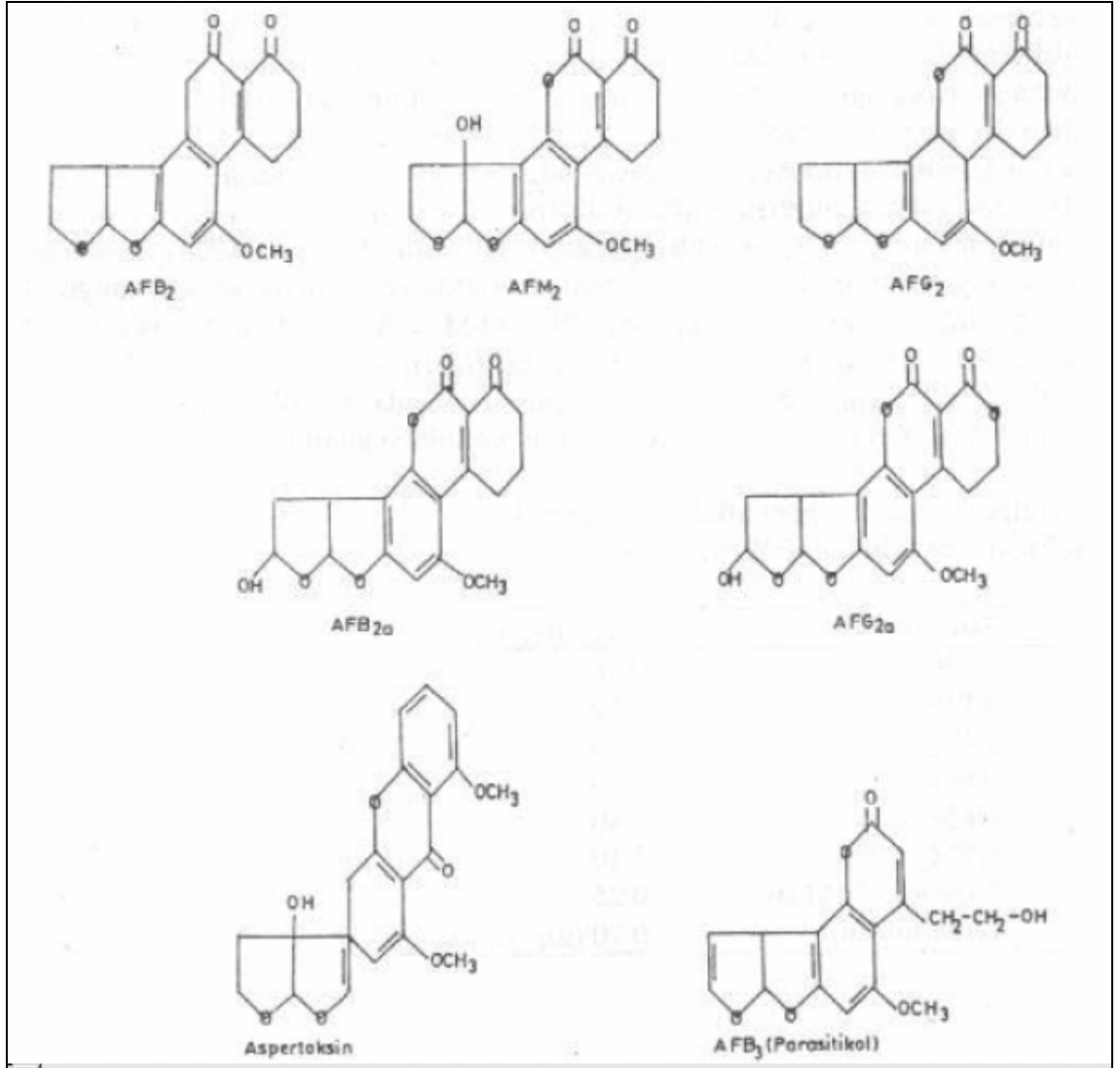
Aflatoksin tipleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Aflatoksin Tipleri

Aflatoksin B1, B2, G1, G2
Aflatoksin B2a, G2a
Aflatoksin M1, M2
Aflatoksin GM1, GM2
Aflatoksin M2a, Gm2a
Aflatoksin B3 (parasiticol)
Aflatoxicol
Aflatoksin P1
Aflatoksin Q1

Kaynak: Betina, 1984

Şekil 2.1'de aflatoksinlerin yapıları verilmiştir.



Şekil 2.1. Aflatoksinlerin Yapısı

2.5.Aflatoksinlerin Oluşumunu Etkileyen Faktörler ve İncirde Aflatoksin

Aflatoksin, filamentli funguslardan *Aspergillus* cinsine ait üç tür ve iki alt tür tarafından oluşturulur. Bunlar; *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* türleri ve *A. flavus* var. *columnaris*, *A. parasiticus* var. *globosus* alt türleridir. Bunların dışında *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Streptomyces* cinsleri belirtilmişse de çok sayıda fungal izolatin taranması sonucu yalnızca iki *Aspergillus* türünün toksin üretmeye muktedir olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda üçüncü bir tür olarak *A. nomius* bunlara eklenmiştir. Aflatoksin oluşturduğu saptanan ilk fungus *A. flavus*'dur (Anon., 2006).

A. flavus bütün dünyada daha yaygın olarak bulunur. *A. parasiticus* ise daha fazla tropik ve subtropik iklim zonlarında görülür. Her ikisine de topraklarda sıklıkla rastlanır. Havada, canlı veya ölü hayvanlar ve bitkiler üzerinde de bulunurlar (Anon., 2006).

Aflatoksin oluşturan küflerin ürediği her türlü gıdada aflatoksin bulunabilir. Aflatoksinlerin en sık izole edildiği gıdalar ise; yer fıstığı, mısır ve incirdir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Aflatoksinlerin toksik etkilerinin saptanması ile dünyadaki çeşitli bölgelerde yetişen gıdalarda aflatoksin oluşumu incelendiğinde, bu toksinlerin özellikle etkin olduğu gıda gruplarının yer fıstığı, badem, Antep fıstığı, pamuk tohumu, ayçiçeği gibi yağlı tohumlar; mısır, buğday, arpa, pirinç gibi hububat; üzüm, incir, kayısı gibi kurutulmuş meyveler; süt ve süt ürünleri; karabiber, kırmızı biber gibi baharatlar olduğu belirtilmiştir (Tosun, 1996).

Tüm meyveler içinde incirin aflatoksin oluşumuna en uygun substrat olduğu görülür. İncirde aflatoksin İncirin küf konidileri ile kontaminasyonu ağaç üzerindeki başlar. Meyveler tozlaşma sırasında incir ile sinekleri (incir yaban arısı) aracılığıyla enfekte olurlar ve meyveler olgunlaşırken aflatoksin kontaminasyonu da başlar. 1986-1987 yıllarında yine İsviçre ve Almanya'ya ihraç edilen kuru incirlerimizde aflatoksin bulunmuş ve parti geri çevrilmiştir. Bu ikinci uyarı üzerine Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na başlatılan proje kapsamında incirlerin gerçekten yüksek düzeyde aflatoksin ve OTA içerdikleri belirlenmiştir (Tunail 2000).

UV lambası altında parlak sarı-yeşil renkte floresan veren kuru incirlerin seleksiyonu oldukça olumlu sonuçlar verir. Bu parlak sarı-yeşil renkli floresana incirde *A. flavus* grubu küflerin oluşturduğu aflatoksinin dışındaki bir metabolit (kojikasit) neden olur. Floresan veren örneklerle aflatoksin varlığı arasında korelasyon yüksektir. Ancak unutulmaması gereken nokta floresans vermeyen incirlerin de aflatoksinle kontamine olabilecekleridir (Tunail 2000).

1993 yılında İsviçre'de analizi yapılan Türkiye kökenli kuru incir örneklerinin (n:25) %28 oranında AFB₁ ile 0,1-0,3 µg/kg düzeyinde kontamine oldukları saptanmıştır. Örneklerin birinde AFB₁ içeriği 2,2 µg/kg bulunmuştur. Almanya'da 1991-1993 yılları arasında araştırılan kuru incirlerde (n:343); ortalama 15,4 µg/kg konsantrasyonda aflatoksin içeren örneklerin oranı %10 olarak belirlenmiştir. Kuru incir mamullerinde ise rastlanma sıklığı daha da yüksek bulunmuştur. Örneklerin (n:36) %86'sının AFB₁ içerdiği belirlenmiştir. 1989-1992 yıllarını kapsayan 4 yıllık periyotta İsviçre ve Almanya'da test edilen kuru incirlerin (n:105) sınır değerleri aşan aflatoksin içerikli örnek oranı %18,4 olarak saptanmıştır (Tunail 2000).

Türkiye'de 1990-1994 yıllarında taranan kuru incir örneklerinin (n:92) %17,4'ü aflatoksinle kontamine bulunmuş, %9,8'inin sınır değerleri aşan miktarda aflatoksin, %1'ininde OTA içerdiği saptanmıştır (Tunail 2000).

Özay ve Alperden (1991), aflatoksinin ortaya çıkışının bahçe bitkilerine nazaran tahıl ve yağlık tohumlarda daha sık görüldüğü halde, incirin riskli meyveler arasında olduğunu bildirmiştir. İncirdeki aflatoksin miktarları diğer meyveler ile karşılaştırıldığında daha yüksek değerlerde olabilmektedir (Oruç, 2005).

Küflerin aflatoksin üretimleri; genetik potansiyel, çevre koşulları (A_s , sıcaklık, substrat, pH, redoks potansiyeli) gibi faktörlere bağlıdır (Anon., 2006). Aflatoksinin oluşması için, toksin üreten *Aspergillus flavus* veya *Aspergillus parasiticus*'un bulunması yanı sıra fungusun toksin üretebilmesi için gerekli tüm koşulların da sağlanması gerekir (Anon.,2007b).

Aflatoksinlere süt, et ürünleri, incir, kuru üzüm gibi değişik gıdaların yanında tahıllarda da rastlanmaktadır. Herhangi bir nedenle zedelenmiş tahıllarda aflatoksin oluşum riski sağlam taneye göre daha yüksektir (Charles ve Hurburgh 1995). Toksin oluşumunda en önemli faktörlerden birisi depolama olup, depolanan ürünün nem miktarı, sıcaklık, depolama süresi, deponun nisbi nemi ve depolanan ürünlerdeki zararlı yoğunluğu gibi faktörler küf gelişiminde etkilidir. Yapılan araştırmalar *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksin üretebilmesi için depo sıcaklığının 25-30 °C ve nisbi nemin %85'ten fazla olması gerektiğini ortaya koymuştur (Denizel 1979, Aytaç 1983). Diğer taraftan nem miktarının buğdayda %17-18, unlarda %16, mısırdada %16-25, pirinçte %20-22 civarında olması toksin oluşumunu hızlandırmaktadır (Ciegler ve vd. 1971).

İncirde aflatoksin oluşumunda, su aktivitesinin (a_w 0,80 olmalı), sıcaklığın (35 C°), nemin, taşıyıcı böceklerin ve ürün bileşiminin önemli olduğu bildirilmektedir (Anon.,2007b). Üründe su aktivitesi değerinin etkilerine ve sıcaklığa bağlı olarak, incirde aflatoksin üreten küflerden *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un sırasıyla 0,78 ve 0,82 a_w 'de gelişmeye ve 0,82-0,83 a_w 'de aflatoksin üretmeye eğilimli olduğu bildirilmektedir. Yeni olgunlaşmış meyve

0,91-0,97 aw, buruk meyve ise 0,80- 0,89 aw ile mikotoksin oluşumu için uygun bir substrattır. Sıcaklık, olgunlaşma, hasat ve kurutma dönemi boyunca üretim bölgelerinde ortalama sıcaklık 27-30°C'dir. Bu sıcaklık derecesi, küf ve mikotoksin oluşumu için gerekli olan optimum sıcaklık derecesine çok yakındır. Toksin oluşumu, küf gelişiminden çok, substratın kimyasal bileşimine de bağlıdır. İncirler yüksek karbonhidrat içerikleri nedeniyle aflatoksin oluşumu için iyi bir substrattır (Özay ve Alperden 1991).

İncirlerde aflatoksin oluşumunun henüz ağaç üzerinde, yaş oldukları dönemde iken başladığı belirtilmekte (Oruç, 2005; Anon.,2007b), ve kurutma sırasında önemli miktarda artış gösterdiği rapor edilmektedir (Oruç, 2005). Koşulara bağlı olmak üzere aflatoksin üretim süresi 24 saat ile 4-10 gün arası değişebilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Aflatoksin oluşturan fungusların bazı ürünlerde uzun dalga mor ötesi ışık altında (360 nm) parlak yeşilimsi-sarı ışımaya yapan bir başka sekonder metabolizma ürününü, kojik asidi de oluşturduğu saptanmıştır. Kojik asidin varlığından ve aflatoksinle ilişkisinden yararlanarak, işletmelerde ışımaya yapan incirler ayırmakta ve partiler temizlenmektedir. Aflatoksinle bulaşık kuru incirlerin işletmelerde çıplak gözle seçilip ayrılması mümkün değildir. Ayrıca, örnekte küf gelişimi gözle görülmesine rağmen Aflatoksin olmayabilir veya küf görülmemesine karşılık üründe Aflatoksin bulunabilmektedir. Işıma aflatoksinle bulaşık olanları ayırmada etkilidir ancak ışımaya şiddeti veya ışımaya alanının aflatoksin miktarı ile ilişkisi yoktur (Anon.,2007b).

UV lambası altında parlak sarı-yeşil renkte floresan veren kuru incirlerin seleksiyonu oldukça olumlu sonuçlar verir. Floresan veren örneklerle aflatoksin varlığı arasında korelasyon yüksektir. Floresan veren danelerin % 70' inin aflatoksin, aynı zamanda 6.9 g.kg⁻¹ düzeyinde kojik asit içerdiği belirlenmiştir (Anon., 2006).

Son yıllarda Türk incirlerinde aflatoksin nedeniyle önemli ekonomik kayıplar ortaya çıkmıştır. Türkiye'deki kuru incir işletmelerinde 1987'den beri işleme bandı üzerine yerleştirilen UV lambalarla parlak yeşilimsi sarı ışıma veren ve aflatoksin kontaminasyon riski olan meyveler seçilerek uzaklaştırılmaktadır (Özay ve Alperden 1991).

İncirin Ege Bölgesi ve ülkemiz tarımsal ürün ihracatında oldukça önemli bir payı olduğu (Şahin, 2003), ve bu üründe aflatoksin bulunmasının önemli bir konu olduğu açıktır.

2.6.Aflatoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Aflatoksinler, mikotoksinler içinde en toksijenik metabolitler olarak kabul edilmekte ve insan ve hayvan sağlığı açısından birçok risk taşımaktadır (IARC, 1993). Vücuda alınan aflatoksinin (özelikle AFB₁) neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden mikotoksikosis aflatoksikosis denir (Anon., 2006).

Aflatoksinlerin insanlarda ve hayvanlarda akut toksik etkisinin yanında, kuvvetli kanserojenik maddeler olduğu araştırmalarla belirlenmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan denemelerde özellikle aflatoksin B₁'in karaciğer kanserine yol açtığı saptanmıştır (Erdem, 1982; Kurtzman ve ark. 1987; Akkurt 1991; Taydaş 1993; IARC, 1993; Demir 1996).

At, sığır, domuz, koyun, keçi, köpek, maymun, rat, fare, hindi, tavuk, ördek, Gökkuşığı alabalığı gibi hayvanlar aflatoksine duyarlıdırlar. İçlerinde en duyarlı hayvan ördek yavruları olduğundan aflatoksin ve derivatlarının toksisitelerinin belirlenmesinde genellikle bu hayvanlardan yararlanılır (Anon.,

2006). Çizelge 2.4' te ördek yavruları üzerinde aflatoksinlerin belirlenen LD₅₀ dozları verilmiştir.

Çizelge 2.4. Aflatoksin derivatlarının toksisiteleri

Toksin	LD ₅₀ (mg. kg ⁻¹)
AFB ₁	0.36
AFB ₂	1.70
AFG ₁	0.80
AFG ₂	2.50
AFM ₁	0.80
AFM ₂	3.10
Parasitikol (AFB ₃)	0.25
Aspertoksin	0.70 (µg. yumurta)

Kaynak: Anon., 2006

En yüksek toksisite AFB₁ ve AFB₃ (parasitikol)'e aittir, AFG₂ ve AFM₂ ise en düşük toksisiteyi gösterir. Tarımsal ürünlerde, gıdalarda ve yemlerde en sıklıkla görülen aflatoksinlerin toksisite sıralaması; AFB₁> AFM₁ = AFG₁> AFB₂ > AFG₂ > AFM₂ şeklindedir. Başka hayvanlar üzerinde belirlenen LD₅₀ dozlarından bu sıranın fazlaca değişmediği, bazı hallerde toksik sıralamada AFM₁' in AFG₁' in, AFM₂'nin de AFG₂'nin önüne geçtiği veya eşitliği koruduğu görülür (Anon., 2006).

Hayvanlarda akut seyreden aflatoksikosiste vücudun direk etkilenen bölgesi karaciğerdir. Karaciğer paranzim hücrelerinin hasar görmesi yanında, karaciğer ve safra kanallarında proliferasyon (hücrelerin hızlı bir şekilde bölünmesi) başlar, kanamalar görülür, sinir sistemi etkilenerek fonksiyonlarını yerine getiremez. Kramplar, felçler, denge bozuklukları meydana gelebilir. Özellikle genç hayvanların yemden yararlanmaları azalır, gelişme durur ve hızlı bir kilo kaybının ardından toksik hastalık ölümle sonuçlanır (Anon., 2006). Aflatoksinlerin Tayland, Tayvan, Hindistan gibi ülkelerde, insanlarda akut zehirlenme yaptığını gösteren olaylar da literatüre geçmiş, Hindistan' ın 200

köyünde görülen ve 397 hastadan 106' sının ölümü ile sonuçlanan olaylarda, tüketilen gıdalarda *Asp. flavus*' un gelişmiş olduğu ve yüksek miktarda aflatoksin ürettiği belirlenmiştir (Anonymous 2007c).

AB Gıda Bilimsel Komitesi, aflatoksin B1'in düşük seviyelerde bile karaciğer kanserine ve mutasyona yol açtığını bildirmiştir. Asya ve Afrika'nın çeşitli bölgelerinde de karaciğer kanserine rastlama sıklığı ile, aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketim düzeyi arasında sıkı bir ilişki gözlenmiştir (Anonymous 2007c).

Gökkuşacağı alabalığında karaciğer kanserine neden olan günlük doz 0.5-2.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, ratlarda tümörün ortaya çıkmasına kadar günlük doz 10-15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ 'dir. İnsanlarda AFB₁' in akut toksik etkisinden ziyade kronik dozlarla ortaya çıkan karaciğer kanserlerinin önemli olduğu düşünülmektedir. Afrika' da Büyük Sahra' nın güneyinde kalan bölgeler ile Güneydoğu Asya' da hepatoselüler karsinomaların çok fazla olduğu, Mozambik' te karaciğer kanser olaylarının ABD'ye oranla 500 kez yüksek seyrettiği belirtilmiştir. Özellikle tropik zonda bulunan ülke ve topluluk halkları iklime ve beslenme biçimlerine bağlı olarak daha fazla aflatoksin içerikli gıdalar tükettikleri bildirilmektedir (Anon., 2006).

AFB₁' in kanserojen etkisinin yanı sıra mutajen, teratojen ve immunosupresif etkilere sahip olduğu hayvan denemeleriyle gösterilmiştir. Immunosupresif etkisi nedeniyle aflatoksin hayvanlarda çeşitli aşılara karşı iyi bir bağışıklık oluşmasını engellemekte, çeşitli enfeksiyonlara (salmonellosis, koksidiomikosis) karşı da direnci azaltmaktadır (Anon., 2006).

Aflatoksin B1, aflatoksinlerin en zehirlisi olup gıda maddelerinde çok sık bulunmaktadır. Yüksek dozda alındığında şiddetli toksik etkisine ek olarak, aflatoksinlerin düşük dozda sürekli alınması, insan sağlığı üzerinde kronik etkiye neden olmaktadır. Bu bilimsel bulgular, gıdalardaki aflatoksin düzeyleri için uluslararası standartların tartışılmasını hızlandırmıştır. Gelişmiş ülkelerde,

gıdaların standartlara uygunluğu ve sağlık riskleri oldukça fazla tartişılmaktadır. Gıda güvenliğini sağlamak amacıyla AB komisyonu tarafından aflatoksin düzenlemeleri ile yapılan müdahale ve ithalat yasaklarının kullanımı, artık savunulur duruma gelmiş olup nlem amacıyla uygulanmaktadır (Karaman ve Acar, 2006).

AB Komisyonu 4 şubat 2002 tarihinde aldığı bir kararda ‘‘Türkiye’den gelen veya Türkiye orijinli kurutulmuş incir ve fıstıklarda ve daha az miktarda da fındıklarda oldukça fazla miktarda aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin kontaminasyonu bulunduğunu, bu ürünlerde Türkiye’den ayrılmadan önce alınan numunelerdeki toplam aflatoksin ve aflatoksin B₁ miktarlarının tespit edilmesi gerektiğini belirtmektedirler (Anon., 2007d).

Danimarka’da Türkiye’den ithal edilen kuru incir ve ezmelерinde en fazla rastlanan çeşidin B₁ olduğu tespit edilmiştir. 1988 sezonunda Türk kuru incirindeki aflatoksin bulaşımı, büyük miktarlardaki temiz kuru incir grupların içerisinden çok az kuru meyvenin yüksek seviyede toksin içermesi nedeniyle ortaya çıkmıştır. rnek alınan partideki kontaminasyon derecesinin ortalama 3 kg’da 1 tane aflatoksinle bulaşık incir şeklinde olduğu bilinmektedir (Mathot, 1989).

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2002/80/EC komisyon kararına göre, AB’ne ihracatı yapılan gıda ürünleri için ihracat sertifikası istemektedir. 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, 2001-2002 yıllarında fındık ve kuru incirden alınan tüm örneklerin % 90’nında B₁ ve toplam aflatoksin miktarı, AB limitlerinin çok altındadır. 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 aşağıda belirtilen yasal düzenlemeler hazırlanmıştır;

- a) Tarım ve Köyişleri Bakanlığının yapısı, fonksiyonları ve yetkilerini tanımlayan 441 sayılı kararname,
- b) 560 sayılı kararname ile 28 Haziran 1995 yılında çıkartılmış ve gıda maddelerinin üretimi, tüketimi ve denetlenmesi hakkındaki 4128 sayılı yasa,
- c) Türk Gıda Kodeksi hakkındaki düzenleme,
- d) 4 Eylül 2000 tarihli Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından yeniden gözden geçirilen ve gıda kontrolü konusunda özel laboratuvarlara onay veren düzenleme,
- e) 9 Haziran 1998'de yayınlanan gıda maddelerinin üretimi, tüketimi ve denetimi hakkındaki 23367 sayılı düzenleme,
- f) İthalat yapan ülkenin geri gönderdiği ihracat malları hakkında yapılacak işlemler, gıda maddelerindeki belirli kontaminantların maksimum düzeylerinin saptanması, gıda maddelerindeki belirli kontaminantların düzey kontrolü için örnekleme metotları ve analiz metodu, ihracat işlemleri, ithalat kontrolü ve ülke içindeki gıda kontrolleri hakkında genelge,
- g) Aflatoksin belirleme metotları, diğer mikotoksin belirleme metotları, antepfıstığı, sert kabuklu meyveler, kuru incir, işlenmiş iç fındık, antepfıstığı ezmesi, fındık un ve püresi hakkında oluşturulan Türk Standartları,
- h) Ülke içerisindeki gıda kontrolünü düzenlemek amacıyla 2002/80/EC komisyon kararı dikkate alınarak AB'ne ihracatı yapılan bazı kuru meyveler için sertifikasyon konusunda bakanlık genelgesi,
- i) 25 Mart 2002 yılında yayınlanan gıda maddelerindeki belirli kontaminantların kontrolü için analiz ve örnekleme metotlarını içeren 2002/25 sayılı tebliğ,
- i) 23 Eylül 2002'de yayınlanana gıda maddelerinde kontaminant düzeyini saptayan 2002/63 sayılı düzenleme yapılmıştır (Karaman ve Acar, 2006).

AB, Haziran 1998'de gıdalarda maksimum aflatoksin kalıntı limitini azaltan komisyon düzenlemesi (1525/98), örnekleme analiz metotları ve örnekleme yönteminin ayrıntısını belirten komisyon yönergesini (98/53/EC) benimsenmiştir. Komisyon yönergesi, daha çok işlenme durumuna bağlı olarak yerfıstığında toplam aflatoksin limitini 15 ppb (8 ppb B1), diğer sert kabuklu meyvelerde ve kurutulmuş meyvelerde ise 10 ppb (5 ppb B1) olarak belirlemiştir. Ayrıca doğrudan insan tüketimine yönelik işlenmiş tahıllarda, kurutulmuş ve sert kabuklu meyvelerde toplam aflatoksin limiti 4 ppb (2 ppb B1) olarak belirlenmiştir. AB, süt için aflatoksin M1'i 0.05 µg/l düzeyinde belirlemiştir. JECFA'de (birleşik gıda katkı uzmanlık komitesi) aynı düzeyde önermiştir. Fakat daha sonra, 2001 yılı FAO/WHO Kodeks komisyon toplantısında yapılan tartışmalar sonucunda AB'nin itirazlarına rağmen daha yüksek olan 0.5 µg/l düzeyi onaylanmıştır. FAO/WHO 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 (Karaman ve Acar, 2006).

Aflatoksin kontrollerinde (findık ve antepfıstığı dahil) AB'nin uyguladığı tolerans limitleri AFB1 için 2 ppb (2µg/kg), toplam aflatoksin (B1+B2+G1+G2) için 4 ppb (4µg/kg) iken, bu limitler Türk Gıda Kodeksi'ne göre sırasıyla 5 ve 10 ppb'dir (Oruç, 2005).

Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ (2002/63)'de yer alan değerlere göre gıdalarda bulunabilecek maksimum aflatoksin seviyeleri, Çizelge 2.5' te verilmiştir (Anon., 2007d).

Çizelge 2.5. Gıda Maddelerindeki Maksimum Aflatoksin Seviyeleri

Gıda Maddesi	Maksimum Aflatoksin Seviyesi (ppb)		
	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
Fındık, yer fıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5	10	
Tahıllar (karabuğday-fagopyrum sp.dahil) ve tahıl ürünleri	2	4	
Süt			0.05
Süt tozu			0.5
Peynir			0.25
Bebek mamaları ve devam formülleri (süt bazlı)			0.05
Bebek mamaları ve bebek gıdaları	1	2	
Baharat	5	10	
Diğer gıda maddeleri *	5	10	

Kaynak: kkgm.gov.tr (Anonymous, 2007d)

2.7. Kuru İncirde Aflatoksin Varlığı ve Yapılan Çalışmalar

Türkiye’de gıda olarak tüketilen bitkisel ürünlerdeki mikotoksin kalıntılarıyla ilgili çalışmalar, Antep fıstığında ve kuru incirlerde aflatoksin ve aflatoksijenik küflerin saptanmasıyla hız kazanmış ve genelde aflatoksinler üzerinde yoğunlaşmıştır (Karagözlü ve Karapınar; 2000).

İncir, ülkemizde özellikle Ege Bölgesi’nde ticari anlamda üretilen kurutmalık bir meyvedir. Üretim miktarları ve bunun kuru meyve olarak ihraç edildiği miktarlar göz önüne alındığında, incirin Ege Bölgesi ve ülkemiz tarımsal ürün ihracatında oldukça önemli bir payı olduğu belirtilmektedir (Şahin, 2003).

Türkiye incirlerinin aflatoksinle kontamine olduğuna ilişkin ilk sinyal 1973 yılında Danimarka’ya ihraç edilen kuru incirlerimizden gelmiştir. 1976’da Ege Bölgesi’nde; ağaç üzerindeki olgun incirlerden başlayarak kuru incir ve mamulleri işleme tesislerinde değişik aflatoksin belirlenmemiştir. 1986-1987 yıllarında yine İsviçre ve Almanya’ya ihraç edilen kuru incirlerimizde aflatoksin bulunmuş ve parti geri çevrilmiştir. Bu ikinci uyarı üzerine Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’na başlatılan proje kapsamında incirlerin gerçekten yüksek düzeyde aflatoksin ve OTA içerdikleri belirlenmiştir (Anon., 2006).

1993 yılında İsviçre’de analizi yapılan Türkiye kökenli kuru incir örneklerinin (n=25) % 28 oranında AFB₁ ile 0.1-0.3 µg/kg düzeyinde kontamine oldukları saptanmıştır. Örneklerin birinde AFB₁ içeriği 2.2 µg/kg bulunmuştur. Almanya’da 1991-1993 yılları arasında araştırılan kuru incirlerde (n=343); ortalama 15.4 µg/kg konsantrasyonda aflatoksin içeren örneklerin oranı % 10 olarak belirlenmiştir. Kuru incir mamullerinde ise rastlanma sıklığı daha da yüksek bulunmuştur. Örneklerin (n=36) % 86’sinin AFB₁ içerdiği belirlenmiştir. 1989-1992 yıllarını kapsayan 4 yıllık periyotta İsviçre ve Almanya’da test edilen

kuru incirlerin (n=105) sınır değerleri aşan aflatoksin içerikli örnek oranı % 18.4 olarak saptanmıştır. Türkiye' de 1990-1994 yıllarında taranan kuru incir örneklerinin (n=92) % 17.4'  aflatoksinle kontamine bulunmuş, % 9.8' inin sınır değerleri aşan miktarda aflatoksin içerdiği saptanmıştır. Türkiye için önemli bir ihraç ürünü olan ve iç pazarda da sevilerek tktilen kuru incirde aflatoksin düzeyini aşağıya çekmek için daha fazla nlem almak gerekmektedir. Çünkü basit bir hesaplama bu ürünün de izin verilen günlük alımın çok üzerinde vücuda AFB₁ yükleyeceği açıktır (Anon., 2006).

Kurutulmuş meyve örneklerinde aflatoksin varlığı ile ilgili farklı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de çok sayıda çalışma yapılmıştır.

zay ve Alperden'in yapmış olduğu çalışmalarda şubat 1989'da çeşitli incir işletmelerinden alınan örneklerde saptanan en yüksek aflatoksin değerleri B₁ için 12,5 g/kg G₁ için 16,6 g/kg olmuştur. Saptanan aflatoksin G₁ miktarları B₁'den daha yüksektir. Örneklerde aflatoksin üreten küfün *A. flavus*'tan çok *A. parasiticus* olduğu belirlenmiştir. *A. flavus* oğunlukla aflatoksin B₁ ve B₂ retirken *A. parasiticus*'un daha çok aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ ürettiği bilinmektedir. şubat ayında işletmelerden alınan örneklerde aflatoksin değerlerinin düşük olması daha önceki çalışmalarda grldğu gibi BGYF seçme sisteminin üründen kontamine grupların uzaklaştırılmasında etkin görev aldığını göstermektedir (zay ve Alperden, 1991).

Stenier vd.,(1988), Türkiye'de satışa sunulan incirlerle ilgili yaptıkları çalışmaya göre, analiz edilen 11 partide tespit edilen en yüksek değerler, Aflatoksin B₁ için 0,7 g/kg, Aflatoksin G₁ için ise 0,8 g/kg'dır. Yapılmış olan bir başka çalışmada, 284 örneğin % 4'ünün Aflatoksin B₁, % 2'sinin Aflatoksin B₂ ve % 2'sinin de Aflatoksin G₂ ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Boyacıoğlu ve Gönül, 1990). Türkiye'de kuru incir örneklerindeki aflatoksin miktarlarının belirlenmesi ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise, analiz edilen 32 örneğin sadece bir tanesinde aflatoksin B₁ tespit edildiği ve bu örneğin 30 g/kg aflatoksin B₁ içerdiğinin belirlendiği rapor edilmiştir (zay vd., 1995).

Yapılan araştırmada UV lamba altında floresan veren ve vermeyen 25'er adet incir deney materyali olarak kullanılmış ve bu incirlerde aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada, floresan vermeyen incirlerin hiçbirinde aflatoksin bulunmadığı, floresan veren örneklerin ise toplam 14'ünde alfatoksin saptandığı bildirilmektedir (Karagözlü ve Karapınar; 2000).

Aydın, Nazilli, Germencik, Bozdoğan ve Tire'de 30 bahçeden ağaç olumu, yeme olumu, buruk dönem, sergi, ve üretici deposu olmak üzere 6 dönemde örnek alınarak bir başka çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, 1. sergi dönemi olan 24-26 Ağustos tarihinde sergi yerinden alınan örneklerin aflatoksinle bulaşma oranı % 57 olarak tespit edilir iken, bu oran 5-9 Eylül tarihlerinde aynı bahçelerden alınan örneklerde %18 olmuştur. Belli bir zaman farkıyla sergiye konulan incirlerde genelde aflatoksin kontaminasyonu oranlarında önemli bir farklılık olduğu sonucuna varıldığı belirtilmektedir (şahin, 2003).

Brezilya'da yapılan bir çalışmada, analiz edilen farklı kuru üzüm cinsleri ve kuru incir örnekleri içinde en yüksek düzeyde Aflatoksin G₂ ile kontamine olan ürünün kuru incir olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, 19 kuru incir örneğinin 10 adedinin (%53) 0,3 – 2,0 µg/kg aflatoksin ile kontamine olduğu, bir örneğin ise 1500 µg/kg Aflatoksin B₁ içerdiği rapor edilmektedir (Iamanaka vd., 2007).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kuru incir

Araştırma materyalini Tekirdağ ilinde satışa sunulan toplamda 45 kuru incir örneği oluşturmuştur. Örnekler, tesadüfi örnekleme yöntemine göre alınmıştır. Örneklerin 23 tanesi, Tekirdağ semt pazarından, 22 tanesi ise çeşitli marketlerden alınmıştır. Örnekler laboratuara getirilerek aflatoksin analizleri yapılmıştır.

3.1.2. Örneklerin Analize Hazırlanması

Marketlerden alınan örnekler özel 500 g'lık özel ambalajında, pazardan alınan örnekler ise 500 g'lık poşet torbalarda laboratuara getirilmiştir. Örnekler ayrı ayrı homojen hale getirmek için blendırda 3 dakika süreyle parçalanmış ve macun kıvamına getirilmiştir. Homojen halindeki örneklerin 1/4 ' ü alınmış ve tekrar karıştırılmış 1/4 azaltma metodu ile 100 g örnek ayrılmıştır. Bu örneklerin 50 g'ı analiz için kullanılmıştır (Bullerman, 1978).

3.1.3. Aflatoksin standartları

Aflatoksin standartları Sincer firmasından temin edilmiştir. Standartların 1 ml'sinde 250 ng B1, 235 ng B2, 245 ng G1 ve 250 ng G2 ihtiva etmektedir.

3.2. Metot

3.2.1. Aflatoksin Miktarının Belirlenmesi

Aflatoksin analizi AOAC 'nin 999.07 nolu metodu kullanılarak HPLC ile yapılmıştır.

A. Sistem Koşulları

(HPLC sistemi: Shimadzu Prominence)

Dedektör :	Floresans dedektör; ex.: 360 nm, em.: 440 nm
Kolon :	ODS-2 (4,6 mm x 250 mm x 5 µm)
Akış Hızı :	1 ml/dakika
Türevlendirme :	Kolon sonrası elektro kimyasal hücre ile üretilmiş brom ile
Mobil Faz :	su : asetonitril : metanol (6 + 2 + 3 v/v/v) 120 (mg/L mobil faz) KBr + 100 (µL/L mobil faz) %65 HNO ₃

B. Ekstraksiyon

50 gram incir numunesi tartılmış üzerine 5 gram NaCl ve 200 mL ekstraksiyon solventi (%80 metanol : %20 su) ve 100 mL hekzan ilave edilmiştir. Blenderin kapağı kapatılarak yüksek hızda 3 dakika karıştırılmıştır. Ekstrakt filtre kağıdından süzölmüş ve filtrattan 10 mL pipetle alınmış ve behere konulmuş ve üzerine 60 mL PBS ilave edilmiştir. İyice karıştırılmış ve numunenin tamamını 1-2 damla/saniye sabit hızla AflaTest P[®] kolonundan geçirilmiştir. Kolondan yaklaşık 2 damla/saniye sabit hızla 15 mL su geçirerek kolonu yıkanmıştır. Kolona 0,5 mL metanol aktarım yerçekimi ile vial akması beklenmiştir. 1 dakika bekledikten sonra 0,75 mL metanol ile aynı işlem tekrarlanmıştır. Viale 1,75 mL su ilave ederek toplam hacmi 3 mL' ye

tamamlanmış eluat 0,45 µm' lik şırınga ucu filtreden süzöldükten sonra HPLC'ye enjekte edilmiştir.

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 sodyum klörür 0,9 L distile suda çözülmüştür. Tamamen çözüldükten sonra 0,1mol/L HCl veya 0,1 mol/L NaOH kullanarak pH 7,4'e ayarlanmıştır. Distile su ile litreye tamamlanmıştır.

Sodyum klörür

Asetonitril, HPLC için uygun kalitede

Metanol, teknik kalite

Metanol, HPLC için uygun kalitede

Benzen

Saf su, HPLC için uygun kalitede

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

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

Çözeltilinin 1 litresine 120 mg potasyum bromür ve 350 µl nitrik asit ilave edilmiştir. Kullanmadan önce süzölmüştür.

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

Potasyum bromür

Nitrik asit , 4 mol/L

İmmunoafinite kolon: Aflaprep (Rhone Diagnostis Technologies) 4-8°C'de muhafaza edilmiştir. İmmunoaffiniti kolon kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

HPLC ile yapılan analizlerde geri kazanım değerleri B1 için % 95, B2 için % 93 G1 için % 90, G2 için % 86'dır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Tekirdağ ilinde tesadüfî örnekleme yöntemine göre alınan satışa sunulan 45 kuru incir örneğindeki aflatoksin miktarları belirlenmiştir.

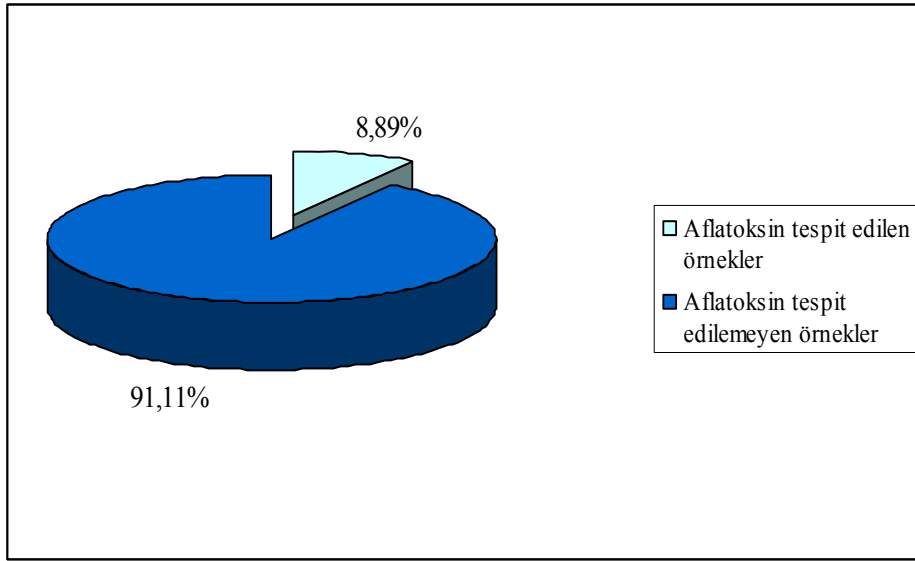
Çizelge 4.1’de aflatoksin analizi için piyasadan temin edilen örnek sayıları, örneklerin temin edildiği kaynaklar ve aflatoksin ile kontamine örnek sayıları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Aflatoksin İle Kontamine Örnek Sayıları

İncelenen Örnek Sayısı	Aflatoksinle Kontamine Örnek Sayısı	Örnek Kaynağı
23	0	Tekirdağ semt pazarı
22	4	Market

İncelenen toplam 45 örneğin 4’ünde (% 8,89) tespit edilebilir düzeyde aflatoksin belirlenmiş olup, diğer örneklerde tespit edilebilir düzeyde aflatoksin bulunmamıştır.

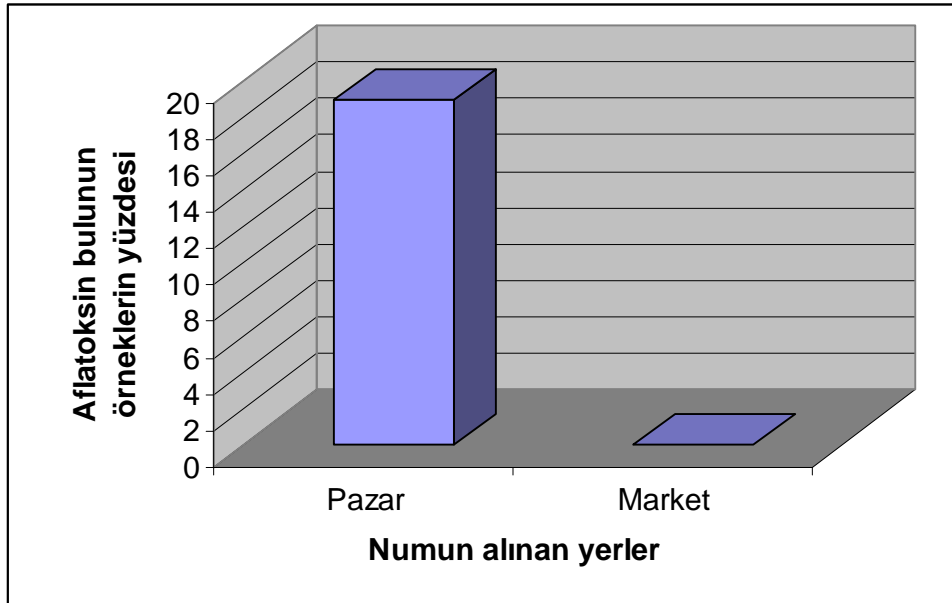
Aflatoksin içerdiği belirlenen örnek yüzdeleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. İncirlerde Aflatoksin İçeren Örnek Yüzdeleri

Aflatoksin belirlenen örneklerin tamamı marketlerden olması bu konuda yapılması gereken araştırmaların önemini artırmaktadır. Marketlerdeki örneklerin raf ömrünün kontrolü ve depolama şartlarının belirlenmesi bu konuda yapılacak araştırmalara ışık tutacaktır.

Marketlerden alınan 22 incir örneğinin 4'ünde (% 18,8) aflatoxin tespit edilmiş olup, aflatoxin içerdiği belirlenen örneklerin alındıkları yerlere göre dağılımı Şekil 4.2'de verilmiştir.



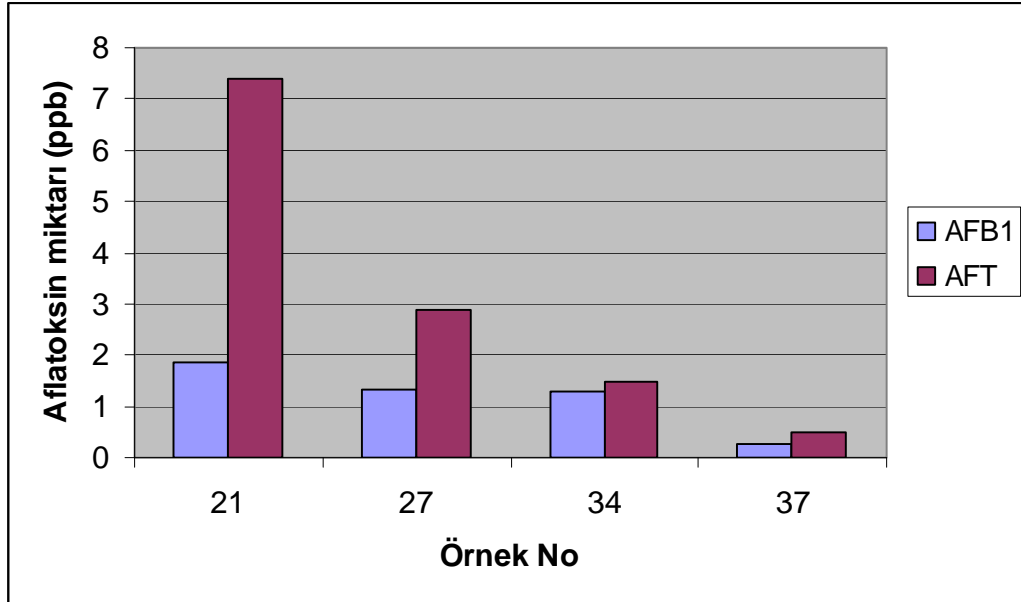
Şekil 4.2. Numune Alınan yerlere göre aflatoxin bulunma yüzdesi

Aflatoksin ile kontamine örneklerdeki aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin miktarları Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İncir Örneklerinde Tespit Edilen Aflatoksin Miktarları

Örnek No	Aflatoksin B ₁ (ppb)	Toplam (Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ,G ₂) (ppb)
21	1,87	7,38
27	1,33	2,90
34	1,28	1,49
37	0,26	0,50

İncelenen örneklerden dördünde, toplam 7,38 ppb, 2,90 ppb, 1,49 ppb ve 0,50 ppb düzeylerinde aflatoksin tespit edilmiştir. Aflatoksin tespit edilen örneklerin aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin miktarları Şekil 4.3’de verilmiştir



Şekil 4.3. İncirlerde aflatoksin miktarları (ppb)

AFB1: Aflatoksin B1

AFT: Toplam aflatoksin

Aflatoksin belirlenen bu dört örnek içinde 21 nolu örnekte en yüksek AFB1 değeri 1.87 ppb, 37 nolu örnekte ise en düşük AFB1 0.26 ppb olarak tespit edilirken 4 örneğin ortalaması 1,185 ppb olarak tespit edilmiştir. Toplam aflatoksin miktarında ise aynı örnekler sırasıyla en düşük en yüksek 7,38 ppb, en düşük 0,50 ppb olarak belirlenmiş ve bu dört örneğin ortalaması 3,068 ppb olarak hesaplanmıştır.

Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ (2002/63)'e göre, fındık, yer fıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar için Maksimum Aflatoksin Seviyesi; Aflatoksin B₁ için 5 ppb, toplam aflatoksin için ise 10 ppb'dir. Buna göre incelenen örnekler toplam aflatoksin ve AFB1 değerlerinin izin verilen maksimum seviyeyi aşan miktarların altında kalmıştır.

Boyacıoğlu ve Gönül (1990), yaptıkları çalışmada, analiz edilen 284 örneğin %8' inde aflatoksine rastlamışlardır. Bu araştırmada da, analiz edilen 45 örnek içinde, aflatoksin ile kontamine örnek yüzdesinin % 8,89 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Boyacıoğlu ve Gönül'ün çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Özay vd., (1995) tarafından yapılan çalışmada incelenen 24 örnekten 1 tanesinde aflatoksin tespit edilmiştir. Özay vd. (1995)'nin yapmış olduğu çalışmada, aflatoksin tespit edilen örnek miktarı bizim çalışmamıza göre çok düşük olmasına rağmen, tespit edilen 30 µg/kg aflatoksin B₁ düzeyi, bizim çalışmamızda belirlenen aflatoksin düzeylerinden çok daha yüksektir.

Tunail (2000)'in bildirdiğine göre 1993 yılında İsviçre'de anlizi yapılan incir örneklerinin % 28'inde aflatoksin tespit edilirken Almanya'da yapılan çalışmaya göre 343 örnekten ' 10'unda aflatoksin tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız bu çalışmada ise aflatoksin bulunma sıklığı olarak her iki çalışmanın altında tespit edilmiştir. Yine Tunail'in bildirdiğine göre Almanya'da test edilen 105 incir örneğinin % 8,4 'ünde ve Türkiye'de test edilen 92 örneğin % 17,

4'ünde aflatoksin tespit edilmiştir. Bu analizlerde örneklerden 1 tanesinin sınır değeri geçtiğini 1 örnekte ise Okratoksin A tespit edildiğini bildirmiştir. İncirlerde Aflatoksin kadar okratoksin A da büyük risk teşkil etmektedir. Okratoksin üreten küflerinde incirlerde çok kolay gelişebildikleri araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Bu sebeplerden dolayı aflatoksin analizleri yanında okratoksin analizlerinin de yapılması gerekmektedir.

Brezilya'da satışa sunulan kuru incir örneklerinde yapılan çalışmada, analiz edilen 19 kuru incir örneğinin 10 adedinin (%53) 0,3 – 2,0 µg/kg aflatoksin ile kontamine olduğunun belirlendiği, bir örneğin ise 1500 µg/kg Aflatoksin B₁ içerdiği rapor edilmektedir (Iamanaka vd., 2007). Iamanaka vd., 2007, tarafından yapılan bu çalışmada elde edilen aflatoksinle kontamine örnek yüzdesi (%53) bizim çalışmamızda belirlenen düzeye göre çok yüksektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıdalardaki aflatoksinler ile ilişkili sağlık riskleri nedeniyle, gıdaların kalitesini ve aflatoksin içeriklerini belirlemek önemli bir konudur.

Direkt olarak tüketilen bir ürün olan incirin, izin verilen günlük alımın çok üzerinde vücuda aflatoksin yükleyeceği açıktır.

Bu çalışmada incelenen örneklerde maksimum izin verilen seviyeyi aşan miktarlarda aflatoksin tespit edilememesi sevindirici bir durumdur. Ayrıca, incelenen örnekler ile elde edilen aflatoksinle kontamine örnek yüzdelere ilişkin değerlerin, geçmiş yıllarda yapılan bazı çalışmalarda elde edilen değerlere göre daha düşük olması da olumlu bir gelişme olarak kabul edilebilir. Bu durum üreticilerin konuya olan duyarlılıklarının zaman içinde artmış olmasından ve aflatoksin oluşumunu engelleyici bazı uygulamalara yönelmelerinin sonucu olarak incirlerin içediği aflatoksin miktarının düşük seviyede kalmasından kaynaklanmış olabilir. Ancak konu ile ilgili yapılmış çalışmalar incelendiğinde, zamana bağlı olmak üzere belirlenen aflatoksin miktarlarında farklılıkların da söz konusu olduğu, bazı çalışmalarda izin verilen seviyeleri aşan düzeyde aflatoksin tespit edildiği görülmektedir. Bu nedenle, taze ve kuru incir kalitesinin yükseltilmesi ve sürekli hale getirilmesi için üreticilere gerekli eğitim ve girdi sağlanmalı, aflatoksin hakkında üretici bilinçlendirilmeli ve bu eğitim ve uygulamaların sürekli hale getirilmesi hedeflenmelidir.

Uluslararası ticarete, ihracat amacıyla aflatoksin standartlarına uyulması, ulusal üretimin kalitesini artırır ve tüketiciler için aflatoksin güvenliği olan ürünlerin tüketimini sağlar. Bilimsel çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, aflatoksin kontaminasyonunun düşük dozda bile yüksek kanserojen riski içerdiğini ortaya koymuştur. Böylece, insanların doğrudan tükettiği gıda

maddelerinde aflatoksin limiti daha düşük, fakat işlenmeden tüketilen gıda maddelerinde daha yüksek tutulmuştur.

Avrupa Birliği'nin maksimum aflatoksin limit uygulaması, sadece Türkiye' nin değil Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere pek çok gelişmiş ve gelişmekte olan ihracatçı ülkelerin aleyhine olmuştur. İhracat yapan ülkeler, yüksek maliyetleri nedeniyle maksimum aflatoksin limitlerine uyumda zorlanmış ve bu ülkelerin ihracat gelirlerinde azalma olmuştur. Bu nedenle, Avrupa Birliği gümrüklerinden ihracat yapılan ürünlerin geri dönmesini önlemek amacıyla Türkiye'deki özel ve kamu laboratuvarları için akreditasyon alınması ve güvenilir analiz sonuçlarının elde edilebilmesi için uluslararası karşılaştırmalarının yapılması sağlanmalıdır. Ayrıca ihracatı yapılan ürünlerin hasat edilmesi, kurutma, işleme ve depolama gibi işlemlerin gerçekleştirilmesi sırasında aflatoksin oluşumuna etki eden faktörlerin belirlenerek çiftçilere ve ihracatçılara yönelik eğitim programları da gerçekleştirilmelidir.

Taze ve kuru incir kalitesinin yükseltilmesi bakımından üreticilere gerekli eğitim ve girdi sağlanmalıdır. Aflatoksin hakkında üretici bilinçlendirilmeli, bu amaçla gerekli eğitim faaliyetleri yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

AKKURT, C.1991. Değişik Rutubetlerde Depolanan Bazı Mısır Çeşitlerinde Aflatoksin Oluşumu Üzerine Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ANONYMOUS 2006, <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210010320.pdf>
Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü 891112005

ANONYMOUS 2007a, http://www.tzob.org.tr/tzob/tzob_urun_rapor/rapor_2003_incir.htm

ANONYMOUS, 2007b. www.erbeyliincir.gov.tr

ANONYMOUS2007c,
<http://www.ordutarim.gov.tr/subeleler/kontrol/aflatoksin/toksinler.htm>

ANONYMOUS 2007d, [kkgm.gov.tr](http://www.kkgm.gov.tr)

AOAC 2000. - 999.07. Rhone –Diagnostics Technologies Instructions; Aflatoxin Extraction Method; Application note for analysis aflatoxins in hazelnuts using Aflaprep. Kobra Cell; An electrochemical cell for the derivatisation of aflatoxins.

AYTAÇ, S.A., 1983. Aflatoksinler ve Türkiye’de Aflatoksinler Üzerine Yapılan Çalışmalar, H.Ü. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Mezuniyet tezi, Ankara

- BENNET, J.W., PAPA, K.E., 1988, The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. Adv. Plant. Pathol. 6: 263-280.
- BETINA, V., 1984, Mycotoxins, Production Isolation, Separation and Purification. Developments in Food Science 8. Elsevier, Amsterdam
- BOYACIOĞLU, D., GÖNÜL, M. 1990. Survey of aflatoxin contamination of dried wigs grown in Turkey in 1986. *Food Additives and Contaminants*, 7, 235–237.
- BULLERMAN, L.B. 1978. Methods for detecting mycotoxins in foods and beverages: Food and beverage mycology. L.R. Beuchat (Ed.) AVI Publishing Company, Inc. Westport Connecticut 445-469.
- CEMEROĞLU, B. 2004. Meyve Sebze İşleme Teknolojisi. 2. Cilt. 2. Baskı, Sayfa: 479, 590 Başkent Klişe Matbaacılık. Ankara
- CEMEROĞLU, B. 2007. Gıda Analizleri. Sayfa: 407 – 409. Bizim Büro Basımevi, Ankara
- Charles, R ; Hurburgh, J.R, 1995. Mycotoxins in the Grain market, World Grain, October, page 23-26
- CİEGLER, A ; KADİS,S; AJL, S.A., 1971. Fungal toxins. Vol. Academic Press New York and London
- DEMİR, C.1996. Değişik Rutubet ve Sıcaklıklarda Depolanan Fındıkta Aflatoksin Oluşumunun Araştırılması, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ
- DENİZEL, T. 1979. Mısırların Depolanmaları Sırasında Oluşan Bazı Mikotoksinler ve Bunların Sinerjistik Etkileri Üzerine Araştırmalar, Ankara

- ERDEM,S, 1982. Ekmeklik Un ve Bu Unlardan Yapılmış Ekmeklerde Aflatoksin Durumunun Araştırılması, H.Ü., Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara
- FARBER, P. ; GEİSEN, R.; HOLZAPFEL, W.H., 1997, Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *Int J Food Microbiology* 36: 215-220
- HEATCOTE, J., G., 1984. The Physical and Chemical Properties. 98-111 s. Vlademir, B. (Ed). *Mycotoxins*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-Newyork-Tokyo
- HERRMAN, T. 2002. Mycotoxins in Feed Grains and Ingredients. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. <http://www.oznet.ksu.edu/agronomyblock2/aflatoxin.pdf>. Accessed 20 May 2005.
- KURTZMAN, C.P., HORN, B.W AND HESSELTİNE, C.W., 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus temari*:*Antonie von Leeuwenhoeu*, 53, 147-158
- IAMANAKA, B. T.; MENEZES, H.,C de; VICENTE, E.; LEITE, R. S.F.;TANIWAKI, M., H., 2007, Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil, *Food Control*, 18: 454-457.
- IARC. 1993. International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* (Vol. 56, pp. 489–521). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

- KARAGÖZLÜ, N., KARAPINAR, M., 2000, Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin-A ve Fungal Kontaminasyon, Turk J Biol 24 (2000) 561–572
- KARAMAN, S., ACAR, B. 2006, ULUSLARARASI GIDA ÜRÜNLERİ TİCARETİ VE AFLATOKSİN YASAL DÜZENLEMELERİ, Doğuş Üniversitesi Dergisi, 7 (2) 2006, 190-197
- KROGH, P., 1987, Mycotoxins in Food, Paston Press, s:35, Cambridge, Great Britain
- MATHOT, P. J., 1989. Approach in the Netherlands Concerning Aflatoxin In Dried Figs. International Dried Figsand aflatoxin Symposium, Çeşme, Turkey, 4-8 April 1989
- NELSON, P.E., DESJARDINS, A.E. and PLATTNER, R.D. 1993. Fumonisin, Mycotoxins Produced By Fusarium Species: Biology, Chemistry and Significance. In: R.J. Cook, (Ed) Ann. Rev. Phytopathol., 31: 233-249.
- ORUÇ, H. H., 2005, Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri, Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med., 24 (2005), 1-2-3-4: 105-110
- ÖZAY, G., ALPERDEN, İ., 1991. Aflatoxin and Ochratoxin-a Contamination of Dried Figs (*Ficus carica* L.) from the 1988 Crop. Tübitak, Marmara Research Center, Department of Food and refrigeration Technology, PO Box 21, 41401 Gebze, Kocaeli,, TÜRKİYE
- ÖZAY, G., ALPERDEN, İ., 1991. Kuru İncirlerde (*Ficus carica* L.) Aflatoksin ve Okratoksin A Oluşumu. Gıda Sanayi 1991/24 s.57-62
- ÖZAY, G., ARAN, N., PALA, M. 1995. Influence of harvesting and drying techniques on microflora and mycotoxin contamination of figs. *Die Nahrung*, 39, 156–165.

QUILLIEN, J.F. 2002. Mycotoxins. <http://www.fevia.be/pdf/FLAIR%20FLOW%20ONE%20PAGERS/Synthese/mycotoxins.pdf>. Accessed 20 May 2005

STEINER, W., RIEKER, R. H., BATTAGLIA, R. 1988. Aflatoxin contamination in dried figs, distribution and association with Fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 88–91.

ŞAHİN, E., 2003. Büyük Menderes ve Küçük Menderes Havzalarında Yetiştirilen Kurutmalık İncirlerde (*Ficus caria* L.) Aflatoksin ve Okratoksin A Varlığının, Dağılımının ve Kalite İle İlişkisinin Araştırılması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (doktora tezi) Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. İzmir.

TAYDAŞ, E.E, 1993. Kırmızı Biberlerde Aflatoksin ve Okratoksin Oluşumu Üzerine Araştırmalar, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü , Gıda Yüksek Mühendislik Tezi, Ankara

TOSUN, N. 1996. İncir Meyvelerinde Aflatoksijenik Fungusların Kimyasal Yöntemlerle Önlenmesi Yoluyla Aflatoksinlerin Azaltılma Olanakları Üzerinde Araştırmalar, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora tezi, İZMİR

TUNAİL, N. 2000. Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. “Alınmıştır. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları.” Sim Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara s.81-202

ÜNLÜTÜRK, A.; TURANTAŞ, F. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi 1. Baskı. Mengi Tan Basımevi İZMİR

ÖZGEÇMİŞ

03/02/1983 tarihinde İstanbul da doğdum. İlk öğrenimimi Tekirdağ Namık Kemal İlkokulu'nda, orta ve lise eğitimimi Tekirdağ Anadolu Lisesi'nde tamamladım.2000-2004 tarihleri arasında Erzurum Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimi gördüm. 2005 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalında yüksek lisansa başladım. Yüksek lisans öğrenimim ile eş zamanlı olarak 2005 yılında GNC Doğal Beslenme Ürünleri Firmasında göreve başladım. Halen aynı şirkette görev yapmaktayım

Fatih YIKILMAZ

TEŐEKKÖR

Bu araştırmada bana her tÖrlÖ bilgi ve yardımı sağlayan değerli bÖlÖm hocalarıma, konunun seğiminden tamamlanmasına kadar değerli tecrÖbe ve bilgilerinden sÖrekli faydalandığım DanıŐmanım Sayın Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK'e, bana her konuda destek olup yol gÖsteren Sayın Hocam Serap Duraklı VELİÖĞLU'na desteklerinden dolayı teŐekkÖrlerimi sunarım.

Bununla birlikte analizlerin gerçekteŐtirilmesi ve tezin yazımı sırasında sonsuz desteğini gÖrdÖğÖm ve tÖm çalıŐmalarım boyunca benden manevi yardımlarını esirgemeyen aileme sonsuz teŐekkÖr ederim.