

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TAHRİBATSIZ VE HIZLI YÖNTEMLERLE KIRMIZI BİBER
VE FINDIKTA KALİTE KONTROLÜ**

Meltem ÖZCAN

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Pervin BAŞARAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİMDALI
ISPARTA- 2008**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda
oybirliği ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK

Süleyman Demirel Üniversitesi

Mühendislik- Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Üye: Yrd. Doç. Dr. Kahraman KEPENEK

Süleyman Demirel Üniversitesi

Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

Üye: Yrd. Doç. Dr. Pervin BAŞARAN (Danışman)

Süleyman Demirel Üniversitesi

Mühendislik- Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

ONAY

Bu tez 17/09/2008 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda, yukarıdaki jüri
üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../ 2008

Prof. Dr. Fatma KOYUNCU
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Türkiye’de Üretimi Yapılan Kırmızı Biberin İhracattaki Önemi ve Aflatoksin Sorunu.....	4
2.2. Türkiye’de Üretimi Yapılan Fındığın İhracattaki Önemi ve Aflatoksin Sorunu.....	7
2.3. <i>Aspergillus</i> ’un Aflatoksijenik Suşları.....	9
2.4. Aflatoksinler ve Eliminasyonunda Kullanılan Kimyasal ve Tahribatsız Yöntemler.....	10
2.5. Hiperspektral Görüntüleme Sistemi ve Bu Sistemin Gıdalardaki Aflatoksin Sorununun Çözümüne Yönelik Kullanımı.....	14
2.6. Ultraviyole Işın Tipleri ve Kullanım Alanları.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	19
3.1.2. Dilüsyon Hazırlama.....	19
3.1.3. Örneklerin Hazırlanması ve İzlenecek Yol.....	19
3.1.3.1. Farklı İllerden Toplanan Kırmızı Biber ve Fındık Örnekleri.....	19
3.1.3.2. Fındıklarda <i>A. parasiticus</i> ’un Gelişim Süreci.....	20
3.1.3.3. Gama Radyoaktivite Yöntemi ile Gıdalarda Yüzey Sterilizasyonu....	20
3.1.3.4. Kabuklu, Çatlak ve İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Değişimlerin Tespiti.....	21
3.1.3.5. Kavrulmuş İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Değişimin Tespiti....	24

3.1.3.6. Kırmızı Pul Biberde Aflatoksin Analizi.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Fungal Suş ve Örnekler İnokülasyonu.....	27
3.2.1.1. Swab Yöntemiyle Örnek İnokülasyonu.....	28
3.2.1.2. Daldırma Yöntemiyle Örnek İnokülasyonu.....	28
3.2.2. Mikrobiyolojik Muayeneler.....	29
3.2.2.1. Yayma Plak Yöntemi ile Ekim ve Küf sayımı	29
3.2.3. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	29
3.2.3.1. Floresans Dedektör ve Performans Özellikleri.....	31
3.2.4. Görüntü Alımı.....	32
3.2.4.1. Kabuklu, Çatlak ve İç Fındıkta Aflatoksin Analizi.....	33
3.2.4.2. Kavrulmuş İç Fındıkta Aflatoksin Analizi.....	34
3.2.4.3. Kırmızı Pul Biberde Aflatoksinin Tahribatsız Yöntemle Tespiti.....	35
3.2.5. Aflatoksin Analizi.....	36
3.2.5.1. Fındıklarda Aflatoksin Analizi.....	37
3.2.5.2. Kırmızı Pul Biberde Aflatoksin Analizi.....	39
3.2.6. UV-C Işınının <i>Aspergillus flavus</i> ve <i>Aspergillus parasiticus</i> 'un Aflatoksijenik Suşları Üzerine Antifungal Etkisi.....	40
3.2.7. Diyaliz.....	41
3.2.8. Liyofilizasyon.....	42
3.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	45
4.1. Fındık ve Kırmızı Biber Örneklerinde Aflatoksin Analizi Sonuçları.....	45
4.2. Fındıklarda <i>A. parasiticus</i> 'un Gelişim Eğrisi.....	50
4.3. Kabuklu, Çatlak ve İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Değişimlerin Tahribatsız Yöntemle Tespiti.....	50
4.4. Kavrulmuş İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Değişimin Tahribatsız Yöntemle Tespiti	55
4.5. Kırmızı Pul Biberin Tahribatsız Yöntemle Tespiti	57
4.6. UV-C Uygulama Sonuçları.....	59

4.7. SDS-PAGE Sonuçları.....	61
5. SONUÇLAR.....	63
6. AYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ÖZET

Yükse Lisans Tezi

TAHRİBATSIZ VE HIZLI YÖNTEMLERLE KIRMIZI BİBER VE FINDIKTA KALİTE KONTROLÜ

Meltem ÖZCAN

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Jüri: Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK
Yrd. Doç. Dr. Pervin BAŞARAN (Danışman)
Yrd. Doç. Dr. Kahraman KEPENEK

Bu tez çalışmasında, ülkemizin dış ticaretinde önemli yeri olan fındık ve büyük bir potansiyele sahip kırmızı pul biberdeki aflatoksin sorununun UV-A ışını ile tahribatsız ve hızlı görüntüleme yöntemleri ile tespiti ve UV-C ışınının *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksijenik suşları üzerine antifungal etkisi incelenmiştir.

Kırmızı pul biber görüntüleme sisteminde iki yöntem kullanılmış ve aflatoksin bulaşması bölgesel özellikler kullanılarak % 92,8 ve genel özellikler kullanılarak %72,7 başarı oranıyla tespit edilebilmiştir.

Fındık örneklerinde ise görüntüleme sonuçları bize doğrudan aflatoksin varlığını işaret edememiş, ancak aflatoksijenik küf suşlarının varlığı % 97,5'lik oranla görüntülerde tespit edilebilmiştir.

Yine bu tez çalışmasında yapılan aşamalı UV-C uygulamaları aflatoksijenik küf suşlarında kontrol grubuna kıyasla 5,48 log'luk azalma meydana getirmiş ve UV-C ışınının bu suşlar üzerinde de antifungal özelliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu etkinin sebebinin küflerin protein yapılarının bozulması olduğu proteinlerinin SDS-PAGE ile incelenmesi sonucu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tahribatsız ve Hızlı Yöntem, Aflatoksin, UV-C Uygulama, Antifungal

2008, 70 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

QUALITY CONTROL OF RED PEPPER AND HAZELNUT WITH RAPID AND NON-INVASIVE METHODS

Meltem ÖZCAN

Süleyman Demirel University Graduate School of Applied and Natural Science
Food Engineering Department

Thesis Committee: Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK
Asst Prof. Pervin BAŞARAN (Supervisor)
Asst Prof. Dr. Kahraman KEPENEK

In this study, there have been two major objectives. First, to develop rapid and non-invasive aflatoxin detection method based on machine vision technology for red peppers and hazelnut both of which have important value for Turkey's export. Secondly, inhibition effect on aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by use UV-C treatment.

In red peppers' imaging system was two methods used, and aflatoxin contamination was detected at rate of 92.8 % successfully by using local feature and at a rate of 72.7 % successfully by using global feature. With hazelnut samples, aflatoxin was not detected directly. However, aflatoxigenic molds were detected at rate of 97.5 %. Consequently, hazelnuts which contained mold were seperated from uncontaminated. Thus, can be reduced to Turkey's aflatoxin problem by this study.

A 5.48 log reduction was observed when hazelnuts were exposed to UV-C. Thus, we concluded that UV-C has antifungal effect over aflatoxigenic molds. SDS-PAGE analysis' result was showed reduction in mold's protein.

Key Words: Machine Vision Technology, Aflatoxin, UV-C Treatment, Antifungal

2008, 70 pages

TEŞEKKÜR

Çalışmalarına yön vererek beni bilgilendiren, bana büyük tecrübe kazandıran bu projede yer almamı sağlayan Danışman Hocam Yrd. Doç Dr. Pervin BAŞARAN'a ,

Hayatımdaki yerleri ve destekleri için anneme, babama, kardeşime, anneanneme, Esro'ma ve tabi ki hayatımı paylaşacağım Alper GÜNAY'a,

Çalışmalarım sırasında tecrübelerinden beni mahrum etmeyen, sevgili dostlarım Meryem ATEŞ ve İsmail ŞEN'e,

Bendeki emeklerinden dolayı bölümümdeki tüm Hocalarıma,

Bu tez projesini Y.L. 1481 nolu proje ile destekleyen SDÜ-BAP'a,

ve EEEAG 106E057 nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Son olarak ODTÜ Enformatik Enstitüsü'ndeki proje ekibimize,

Sonsuz teşekkürler...

Meltem ÖZCAN

ISPARTA, 2008

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Aspergillus parasiticus</i> 2929 küf suşu.....	9
Şekil 2.2. Aflatoksin B1, G1, B2 ve G2'nin kimyasal yapıları.....	10
Şekil 2.3. UV ışık altındaki mısır demeti görüntüsü.....	11
Şekil 2.4. Çarpma seslerini kullanarak kabuğu çatlamış veya çatlamamış Antep fıstıklarını ayırt edebilen cihaz.....	12
Şekil 2.5. Çarpma seslerine göre fındıkların sınıflandırılması.....	13
Şekil 2.6. Tipik görüntü küpü.....	14
Şekil 2.7. Hiperspektral görüntüleme sistemi ve blok diyagram.....	16
Şekil 2.8. Görüntü alımında kullanılan örnekler.....	16
Şekil 2.9. Ceviz örneğinin hiperspektral görüntüleri.....	17
Şekil 2.10. Primidin molekülündeki çift bağ oluşumu ve UV'nin replikasyonu engellemesi.....	18
Şekil 2.11. Elektromanyetik Spektrum.....	18
Şekil 3.1. Kabuklu fındıktan akustik ve görüntüsel veri toplama işlem şeması.....	21
Şekil 3.2. Fındıkta örnek hazırlama ve aflatoksin analizi akış şeması	23
Şekil 3.3. Küfsüz kavrulmuş fındık grubu.....	25
Şekil 3.4. Kırmızı biber üretim süreci ve kritik kontrol noktalarının tespiti.	26
Şekil 3.5. Kırmızı pul biberin üretim prosesi.....	27
Şekil 3.6. <i>A. parasiticus</i> 1041 küf suşu.....	28
Şekil 3.7. HPLC sistemi.....	30
Şekil 3.8. Floresans dedektör.....	31
Şekil 3.9. LOD ve LOQ'un grafiksel gösterimi.....	31
Şekil 3.10. Multispektral görüntüleme sistemi.....	33

Şekil 3.11. Kullanılan kamera ve lens sistemi.....	33
Şekil 3.12. Kabuklu ve küflü fındık örneğinin 480 nm’de multispektral görüntüsü.....	34
Şekil 3.13. Fındığın 550 nm dalga boyundaki görüntüsü.....	35
Şekil 3.14. Filtre Seti.....	35
Şekil 3.15. 400 nm, 450 nm ve 510 nm frekans aralığında görüntü alımı...	36
Şekil 3.16. İç fındıklardan veri toplama işlem şeması.....	37
Şekil 3.17. Ekstraksiyon aşaması	37
Şekil 3.18. Dilüsyon ve filtrasyon aşaması.....	38
Şekil 3.19. Adsorpsiyon/elüsyon/tespit aşamaları	38
Şekil 3.20. Kırmızı biber aflatoksin analizi akım şeması.....	39
Şekil 3.21. PDB ortamına küf suşlarının aşılınması.....	40
Şekil 3.22. Aflatoksijenik küf suşlarına diyaliz uygulaması.....	42
Şekil 3.23. Aflatoksijenik küf suşlarının SDS-PAGE için hazırlanma aşamaları.....	44
Şekil 4.1. Aflatoksin içeren bir kırmızı biberin HPLC cihazında verdiği piklerin görünümü.....	48
Şekil 4.2. Fındıklarda <i>A. parasiticus</i> ’un gelişim süreci... ..	50
Şekil 4.3. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFG1 değişimi.....	51
Şekil 4.4. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFG2 değişimi.....	51
Şekil 4.5. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFB1 değişimi.....	52
Şekil 4.6. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFB2 değişimi.....	52
Şekil 4.7. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük toplam aflatoksin değişimi.....	53
Şekil 4.8. Aflatoksinli (AF+) ve aflatoksinsiz (AF-) fındıkların değişik dalga boylarındaki görüntüsü.....	56

Şekil 4.9. 14 örneğin aflatoksin miktarları.....	59
Şekil 4.10. <i>A. flavus</i> 123 sıvı örneklerin UV-C uygulaması verileri.....	59
Şekil 4.11. UV-C uygulaması ile <i>A. parasiticus</i> 1041'deki koloni miktarı değişimi.....	60
Şekil 4.12. SDS-PAGE sonuçları.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de son on yıl içindeki biber üretimi.....	2
Çizelge 2.1. Başlıca biber üreticisi ülkeler.....	4
Çizelge 2.2. Türkiye’de yıllara göre kırmızı biber ihracatı.....	5
Çizelge 2.3. Fındık dikim alanları ve üretim miktarları	7
Çizelge 2.4. Farklı çalışmalarda analiz edilen fındıkların aflatoksin içerme oranları ve aflatoksin miktarları.....	8
Çizelge 3.1. Fındıkta aflatoksin miktarındaki değişimin tespiti için kullanılan gruplar.....	24
Çizelge 3.2. Aflatoksjenik küf suşları üzerine UV-C uygulama programı....	41
Çizelge 4.1. Türkiye’de farklı şehirlerden toplanan fındıkların aflatoksin seviyeleri (ng/g)	45
Çizelge 4.2. Türkiye’de farklı şehirlerden toplanan kırmızı biberlerin aflatoksin seviyeleri(ng/g)	47
Çizelge 4.3. Farklı nem oranlarında depolama sonucu aflatoksin miktarındaki periyodik değişim.....	54
Çizelge 4.4. İncelenen örneklerin AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 ve toplam aflatoksin miktarları (ng/g).....	57
Çizelge 4.5. Görüntüleme sisteminin aflatoksinli ve aflatoksinsiz kırmızı biberi ayırma hataları.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
AFT	Toplam Aflatoksin
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AF	<i>Aspergillus flavus</i>
AP	<i>Aspergillus parasiticus</i>
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
LOD	Gözlenebilirlik Sınırı
LOQ	Ölçülebilirlik Sınırı
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
W	Watt
V	Volt
Hz	Hertz
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
ng	Nanogram
ppb	Milyardabir
mg	Miligram
g	Gram
sn	Saniye
dk	Dakika
sa	Saat

1. GİRİŞ

Mikotoksinler gıda güvenliğinde son yıllarda üzerinde sıkça durulan konuların başında gelmektedir. İnsanlar tükettikleri ürünlerin sağlık açısından zararsız ve de kaliteli olmasına her geçen gün daha fazla önem vermektedir. Bu gelişmelere paralel olarak üreticiler de sağlık açısından güvenilir ve kaliteli ürünleri tüketime sunmak durumundadırlar. Tüketici açısından bakıldığında tükettiği gıdalardaki en büyük kalite göstergesi o ürünün fiziksel özellikleri açısından uygun olması ve göze hoş gelmesidir. Tarım ürünleri tüketime sunulduğu ana kadar kötü üretim koşulları, mevsim koşulları, haşereler, kuşlar ve çeşitli küfler tarafından sebep olunan yıkıcı etkilere maruz kalmaktadır. Bu yıkıcı etkilerin bazıları gözle tespit edilebilirken özellikle küfler tarafından sebep olunan yapısal hasarlar ve küf kaynaklı toksinler gözle tespit edilememektedir. Bu amaç için kimyasal yöntemler kullanılmaktadır.

Aflatoksin bulaşma düzeyinin tüm ürünü temsil edecek şekilde kimyasal yöntemlerle belirlenmesi zaman alan ve pahalı bir yol olup, pratik açıdan uygulanabilirliği sınırlıdır. Ayrıca bu tür işlemlerden geçirilen örnekler tüketime tekrar sunulamamaktadır. Dolayısı ile kabuklu fındıkların ihracat veya iç piyasaya sunulmadan önce ayıklama-ambalajlama sırasında küflenme ve buna bağlı olarak aflatoksin bulaşma düzeylerinin belirlenmesine yönelik hızlı yapay işleme ve/veya görmeye dayalı tekniklerin geliştirilmesi ülkemiz ekonomisi için oldukça önemlidir. Özellikle işlemede kalite kontrol amacıyla üretim sırasında yapılacak kontrollerin hızlı ve örneği bozmayan bir şekilde uygulanabilmesi gereklidir.

Farklı ülkelerde aflatoksinin tespiti üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında problemlerin akademik ve bilimsel değerinin yanında ulusal değerinin de teşvik edici etkenlerden biri olduğu görülmüştür. Araştırmacılar kendi ülkeleri için ekonomik öneme sahip gıdalar üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Çoğunluğu ABD’de yapılan bu çalışmalar mısır ve yer fıstığı üzerine olmuştur. Tahribatsız tespit adına geliştirilen yöntemlerde genellikle spektrofotometre ve renkmetre gibi cihazlar kullanılmıştır. Bu cihazlarla genelde gıda örneğinin yalnızca “renk” değeri göz önüne alınmakta, rengin yüzey üzerindeki dağılımı, yüzey dokusu, konumu gibi olgular

değerlendirilememektedir. Ülkemiz için stratejik bir öneme sahip fındık ve kırmızı biberde yapılacak çalışmalar öncelikle ülkemiz araştırmacılarını ilgilendirmektedir.

Kırmızı biber dünyada en yaygın tüketilen ve ticarete önemli yeri olan baharatlardan biridir. Türkiye önemli kırmızı biber üreticisi ülkeler arasında yer almakta olup, kırmızı biber verimi dünya ortalamasının üzerindedir. Türkiye’de Güneydoğu, Akdeniz ve Ege bölgeleri başlıca kırmızı biber tarımı yapılan bölgelerdir. Ülkemizde 2003 yılı itibariyle 10.000 ha alandan 40.000 ton kırmızı biber üretimi gerçekleştirilmiştir. Yine bu yılın verilerine göre en fazla kırmızı biber üretimi yapılan iller sırasıyla Kilis (20.952 ton), Gaziantep (8.150 ton) ve Kahramanmaraş (3.839 ton)’tır (Paksoy ve Uslu, 2006).

Kırmızı biber taze olarak tüketilmekle birlikte; sanayi hammaddesi olarak tarımı başta konserve, salça, turşu, acı sos ve işlenmiş et ürünleri için yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Çizelge 1.1’de de görüldüğü gibi Türkiye’nin biber üretimi on yıl içinde artış göstermiştir. Bununla birlikte, kırmızı toz ve pul biber üretiminde karşılaşılan sorunlar, üretimde dalgalanmalar, belirsizlikler ve ihracatta büyük sorunlarla karşılaşılmamasına neden olmuştur (Duman vd., 2002).

Çizelge 1.1. Türkiye’de son on yıl içindeki biber üretimi (Duman , 2002)

Yıllar	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Ton (000)	920	954	965	1.008	1.080	1.150	1.130	1.390	1.390	1.390

Kırmızı biber üreticiliği yaygın olarak baharat olarak kullanılmak için yapılır. Hasattan sonra, baharatlar yıkama, kurutma, temizleme, sınıflandırma, parçalama, öğütme, paketlenme ve depolama gibi aşamalardan geçerler. Kırmızı biber, elde edildikleri bitkilerin yetiştirildiği ortamdan hasat ve satışına kadar geçen işlemler süresince önemli mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşsal değişimlere ve bozulmalara uğrayabilirler. Bununla birlikte günümüzde hala çoğu üretici ilkel koşullarda kırmızı biber üretimi yapmakta ve özellikle biberler toprak kökenli mikroorganizmalar tarafından bulaşmaktadır. Su, ışık, sıcaklık, oksijen ve mikroorganizmalar baharatta bozulmaya sebep olan etkenlerdir (Erdoğrul, 2000).

Fındık ülkemiz için tarıma dayalı dışsatımın gelirleri arasında önemli bir yere sahiptir. Ülke ekonomisinin 2004 yılında fındık ihracatından elde ettiği gelir yaklaşık olarak 1.220 milyar USD dir. Nitekim Karadeniz Bölgesinde halkın önemli bir kısmının asıl geçim kaynağı fındık üretimidir. Fındık dışsatımı özellikle başta Almanya olmak üzere Avrupa Birliği ülkelerine yöneliktir. Ancak fındıklarda aflatoksin düzeyinin zaman zaman Avrupa Birliği ülkelerinde halen geçerli olan limitleri aşması dışsatımda yaşanan önemli bir sorundur. Geçtiğimiz yıllarda Çekoslovakya'ya fındık sevkiyatı durdurulmuş ve fındığa el konulmuştur. Bu tür ürünlerin özellikle fabrikadaki işlemleri sırasında hızlı, ucuz ve etkin bir ayıklama ile aflatoksin bakımından dışsatım sorunu yaratmayacak hale getirilmesi ekonomik kayıpların önlenmesi için önem taşımaktadır.

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi tarafından yapılan bir araştırma sonucuna göre kabuklu fındıkta hasat, kurutma ve depolama süresince *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Rhizopus* cinsine ait türlere rastlanılmıştır. Kabuklu fındıkta *Aspergillus spp.* gelişmesi ağaçta başlamakta, hasat işlemleri boyunca artmaktadır. Tüketici ülkeler ve dünya piyasaları kanserojen olan aflatoksin açısından riskli ürünlerde aflatoksin limitinin en aza indirilmesini hedeflemektedirler. Bu hedef doğrultusunda birçok ülkede fındıkta aflatoksin B1 limiti 5 ng/g'den 2 ng/g'ye, toplam aflatoksin (B1+B2+G1+G2) 10 ng/g'den, 4 ng/g'ye indirilmiştir (Anonim, 2008-a).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Türkiye’de Üretimi Yapılan Kırmızı biberin İhracattaki Önemi ve Aflatoksin Sorunu

Günümüzde Antartika hariç bütün kıtalarda yaygın olarak üretilen biberin 2000 yılı dünya üretimi 18.5 milyon tona ulaşmıştır. En büyük üretime sahip ülke 7.7 milyon tonluk değerle Çin olup, bunu 1.8 milyon ton ile Meksika, 1.4 milyon ton ile de Türkiye izlemektedir. Türkiye taze biber üretiminde dünyada üçüncü sırayı almasına (Çizelge 2.1.) ve tek başına dünya biber üretiminin % 8’ini karşılamasına rağmen, dünya işlenmiş biber ticaretinde ne yazık ki yalnızca % 3’lük bir paya sahiptir (Duman vd., 2002).

Çizelge 2.1. Başlıca biber üreticisi ülkeler (Duman vd., 2002)

Üretici Ülkeler	Üretim Miktarı (Ton)
Çin	7.683.127
Meksika	1.813.252
Türkiye	1.390.000
İspanya	936.300
Nijerya	715.000
ABD	694.950
Ekvator	600.000
Endonezya	496.908
İtalya	316.209
Güney Kore	307.000
Dünya	18.500.622

Ülkemizde kırmızı biber tarımı her ne kadar Güneydoğu Anadolu, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde geniş çapta yapılmakta ise de, pazara uygunluk açısından en iyi biber çeşiti Kahramanmaraş ve Gaziantep’te yetiştirilmektedir. Ülkemizde kırmızı biber üretiminin yaklaşık % 80’i bu illerinde yapılmaktadır. Bu bölgelerde biber yetiştiriciliği, çoğunlukla kuru kırmızı biber üretimi amacıyla yapılmakta olup, elde edilen ürünler baharat ürünü olarak pul ve toz biber üretiminde kullanılmaktadır (Duman vd., 2002).

Çizelge 2.2’ye göre Türkiye’de kırmızı biber üretiminin yıllara dağılımında bir kararlılık görülmemektedir. İhracat 1991 yılında 2.252 ton olmasına rağmen, 2003 yılında 2.206 tona ve döviz geliri ise 6.603.000\$’dan 5.430.000\$’a gerilemiştir. Bu düşüşün nedeni ise ihraç edilen kırmızı biberlerde kanserojen etkiye sahip aflatoksin

miktarının AB standartlarının üzerinde bulunması olduğu tespit edilmiştir (Paksoy ve Uslu, 2006).

Çizelge 2.2. Türkiye’de yıllara göre kırmızı biber ihracatı (Paksoy ve Uslu, 2006)

Yıllar	İHRACAT	
	Miktar (ton)	Değer(1000\$)
1991	2.252	6.603
1992	3.704	4.615
1993	921	1.526
1994	2.525	2.298
1995	1.175	1.292
1996	528	1.197
1997	690	2.162
1998	2.154	7.411
1999	2.045	7.380
2000	1.402	5.259
2001	2.065	6.230
2002	1.779	5.701
2003	2.206	5.430

Ülkemizde kırmızı biberlerle ilgili ilk ciddi sorun; son on yıldır ihraç edilen ürünlerin Avrupa ülkelerinden iade edilmesi ile dikkati çekmiştir. Sorunun kaynağı olan aflatoksin üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda aflatoksinlerin bitki gelişme döneminde meydana gelebildiği gibi hasatta açıkta kurutma sırasında ve depolama döneminde meydana gelebildiği tespit edilmiştir (Duman, 2002).

Birçok Avrupa ülkesi baharatlarda aflatoksin seviyesini 4 ng/g olarak belirlemiştir. Geçmişte yapılmış birçok inceleme ve araştırmaya göre kırmızı biberde bu limiti aşmak sınırlandırılmıştır (Hirasa ve Takemasa, 1998).

Literatürde gıdalardaki aflatoksin tespiti üzerine çok sayıda çalışma mevcuttur. 1992 yılında Almanya’da Hamburg Federal Kimya ve Gıda Kontrol Servisi tarafından analiz edilen 11 adet kırmızı pul biberin 6 adedinde 1,3–35 ng/g düzeyinde aflatoksin B1 belirlenmiştir. Ayrıca 8 adet süs kırmızı biberin 3 adedinin de 1,0–156 ng/g düzeyinde aflatoksin B1 tespit edilmiştir (Dıraman ve Arıcı, 1999).

1992 yılında Almanya’nın Karlsruhe şehrindeki Kimya ve Tarım Araştırma Servisinde, Türkiye kökenli kırmızı pul ve süs biberlerinde aflatoksin taraması yapılmış ve örneklerin toplam % 75’inin aflatoksin B1 içerdiği belirlenmiştir. Bunlar

arasında 100 ng/g'yi geçen örneklerin bulunduğu da belirtilmiştir. Aynı yılda Almanya'ya, Türkiye'den ithal edilen kırmızı biberlerin aflatoksin riski nedeni ile Baden Württemberg eyaleti yönetimi tarafından imha edildiği de bildirilmektedir (Çelikay, 2003).

Bursa ve Sakarya'da kırmızı biber örneklerinde TLC yöntemi ile aflatoksin analizi yapılmış, 34 örnekten 8'inde aflatoksin tespit edilmiştir. Çalışmada aflatoksin B1 düzeyi 1,65-15 ng/g arasında saptanmıştır (Çoksöyler, 1995; Yıldırım vd., 1997).

Tarım Bakanlığı tarafından yapılan bir çalışmada ise, Güneydoğu Anadolu Bölgesi kökenli 60 kırmızı pul biber örneğinin 40 adedinde (% 66,7) limit değer 20 ng/g' nin altında aflatoksin B1 belirlenmiş; geri kalan 20 örnek (% 46,7)' de ise limit değer üzerinde sonuçlar alınmıştır. Örneklerin genel ortalaması 5,7 ng/g olmuştur (Dıraman ve Arıcı, 1999).

Türkiye'de satılan kırmızı biber çeşitlerinin aflatoksin içeriği üzerine yapılan bir çalışmada 44 kırmızı pul biber ve 26 kırmızı toz biber örnekleri Erzurum'daki çeşitli baharatçılardan alınmış, Şanlıurfa'da üretilen 20 isot biberi ile birlikte İnce tabaka kromatografisinde aflatoksin bulaşmau incelenmiştir. 8 kırmızı pul biber örneğinde % 18.2 oranında, 3 kırmızı toz biberde % 10.7 oranında ve 1 isot biberinde % 5 oranında aflatoksin (B+G) bulunmuştur. Tüm biberlerin aflatoksin içeriği dağılımı 1.1 ile 97.5 ng/g arasında değişim göstermektedir. En fazla aflatoksin içeren biber çeşidi ise kırmızı pul biber olmuştur (Erdoğan, 2004).

2.2. Türkiye’de Üretimi Yapılan Fındığın İhracattaki Önemi ve Aflatoksin Sorunu

Fındık, gerek Türkiye ekonomisi gerekse dış ticareti açısından önemli bir ürünüdür. Türkiye, dünya fındık tarımında; üretim miktarı ve kalitesi bakımından birinci sıradadır. Ülkemiz ortalama 500-550 bin ton civarındaki fındık üretimiyle her yıl dünya fındığının % 65-70’ini üretmekte ve dünya fındık ticaretinin % 70-75’ini karşılamaktadır. Çizelge 2.3’de görüldüğü üzere ülkemizde yaklaşık 621.000 hektar alanda üretimi yapılan fındıkla ortalama 395.000 aile geçimini sağlamak ve yaklaşık 8 milyon insan fındığın üretimi, hasadı ve işlenmesinden gelir elde etmektedir. Fındık üretiminde ülkemizi sırasıyla İtalya, Azerbaycan, Gürcistan, A.B.D., İspanya, Fransa ve Yunanistan izlemektedir (Anonim, 2007).

Yoğun olarak Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen fındık, bugün ülkemizin 33 ilinde üretilmektedir. Fındık üretimi yapan işletmelerin % 61’inin, başka bir ifade ile 240 bin işletmenin (Ordu, Trabzon ve Giresun illerinde) tek geçim kaynağını fındık oluşturmaktadır. Fındık üretimi özellikle Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinin engebeli ve sığ topraklı arazilerinde erozyonun önlenmesine katkıda bulunmaktadır. Türkiye üretiminin ortalama % 60’ının üretildiği bu bölgede fındık tarımının sürekli yapılması zorunluluğu bulunmaktadır. Çünkü bölgede fındığın alternatifi olabilecek başka bir ürün yetiştirme imkanı bulunmamaktadır (Anonim, 2007).

Çizelge 2.3. Fındık dikim alanları ve üretim miktarları (Anonim, 2007)

YILLAR	Dünya Üretimi (Ton)	TÜRKİYE	
		Dikim Alanı (Ha.)	Üretim Miktarı (Ton)
1975	502.356	387.000	317.000
1985	380.353	405.000	184.000
1990	560.757	500.000	375.000
1995	633.000	500.000	435.000
1996	613.000	525.000	446.000
1997	600.000	525.000	470.000
1998	767.000	540.000	595.000
1999	802.000	540.000	546.000
2000	691.000	544.000	495.000
2001	915.000	548.000	570.000
2002	785.000	548.000	615.000
2003	651.000	548.000	450.000
2004	540.000	621.000	358.000
2005	800.000	621.000	600.000
2006	-	621.000	649.000

Çizelge 2.3'e bakıldığında 1975 yılında 387000 ha. olan dikim alanı, 2006 yılında 621.000 ha.'ya ulaşmış aynı yıllardaki üretim miktarları kıyaslandığında artış yaklaşık 2 katına ulaşmıştır. Üretimdeki artışa rağmen fındık ihracatında zaman zaman yaşadığımız problemler kırmızı biberde olduğu gibi aflatoksin kaynaklıdır. Dünyada en büyük üretimi yapmamıza rağmen karşılaştığımız bu sorun nedeniyle Avrupa Birliği fındık üretimi için İspanya'yı teşvik etmiş ve bu destek uluslararası rekabette pazar payımızı etkilemeye başlamıştır (Heperkan, 2007).

Çizelge 2.4. Farklı çalışmalarda analiz edilen fındıkların aflatoksin içerme oranları ve aflatoksin miktarları (Heperkan, 2007)

Bölge	Yöntem	Örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı		Aralık (µg/kg)		Limitin üzerinde >2µg/kg		Yayın sahibi
			Sayı	%	En yüksek	En düşük	Sayı	%	
Giresun, Ordu	TLC	25	5	20	B1: 1,8	B1: 1,1	-	-	Eke ve Gökten, 1987
Giresun	TLC	30	0	-	-	-	-	-	Şimşek ve ark., 2002
Giresun, Ordu, Açakoca	HPLC	725	176	23.6	B1: 2,8 Σ: 5,6	B1:0,1 Σ:0,4	3	0,4	Özel sektör, 2003
Açakoca	HPLC	176	-	-	B1: 75 Σ:79	B1:2,7 Σ:4,7	10	5,7	Aluç ve Aluç, 2003
Giresun	HPLC	140	-	-	B1: 75,7 Σ: 150	B1:2,2 Σ:4,3	20	14,3	Özel sektör, 2005
Ordu	HPLC	161	-	-	B1: 29,4 Σ:135,5	B1:2,1 Σ:3,6	16	9,9	Özel sektör, 2002

Çizelge 2.4.'te görüldüğü gibi Türkiye'de üretilen fındıkta yapılan çalışmalar zaman zaman aflatoksin problemi ile karşılaşıldığını göstermektedir.

Fındıkta aflatoksin sorunu ilk olarak 1967'de Kanada'ya gönderilen 10 ton iç fındığın aflatoksin içerdiği gerekçesi ile geri çevrilmesi ile ortaya çıkmıştır. Bu tarihten itibaren fındıkta aflatoksin sorununu ortadan kaldırmak için birçok çalışma yapılmıştır (Demir, 2002).

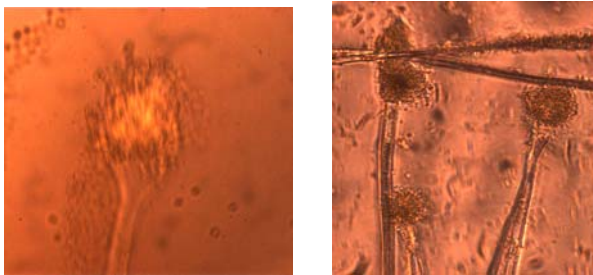
2.3. *Aspergillus*'un Aflatoksijenik Suşları

Aflatoksinler , *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* küfleri tarafından oluşturulan ve en başta karaciğer kanseri olmak üzere bir çok kansere neden olan mikotoksinlerdir. *A. flavus* baskın olarak aflatoksin B1 ve B2 üretir. Buna ek olarak *A. parasiticus* G1 ve G2 üretir . Bu toksinler ultraviyole ışığı altında gösterdiği floresans özelliğe göre; mavi (blue) floresans veren “B” ve yeşil (green) floresans veren “G” harfleri ile adlandırılmışlardır (Kurtzman v.d., 1987).

A. flavus ve *A. parasiticus* sıklıkla depo küfleridir ve depoda gelişimleri sonucunda aflatoksin üretirler, bu da tüm dünyada yaşanan önemli bir problemdir. Uygun ekolojik bölgelerde bu funguslar kolonize olurlar ve tarlada gelişen ürüne hücum ederler (Payne, 1998).

Aspergillus gelişimi ve aflatoksin oluşumlarına nem, sıcaklık, ürünlerdeki mekanik zedelenmeler, kuruma hızı, kızıışma, depo atmosferi, CO₂ ve O₂ miktarı, ürünün doğal yapısı, mineraller, kimyasal uygulamalar, böcekler ve diğer fungusların faaliyeti gibi birçok faktör etki etmektedir (Duman vd., 2002).

Bu tez çalışmasında TÜBİTAK-MAM'dan temin edilen *A. parasiticus* 2929 küf suşu kullanılmıştır. Şekil 2.1'de bu küf suşunun Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezinde alınmış görüntüleri verilmektedir.



a

b

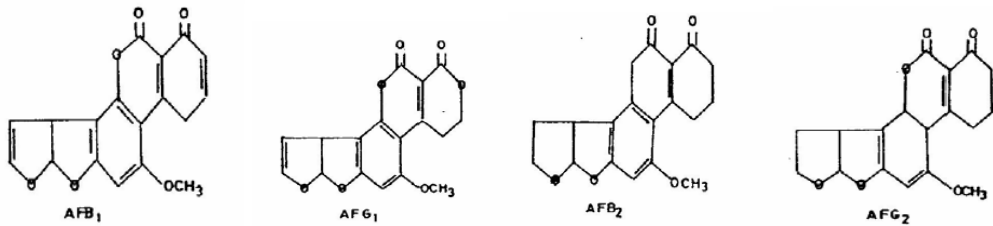
Şekil 2.1. a-b) *A. parasiticus* 2929.

2.4. Aflatoksinler ve Eliminasyonunda Kullanılan Kimyasal ve Tahribatsız Yöntemler

Aflatoksinlerin genel özellikleri;

- Kuvvetli alkalide hemen bozulur ve sulu çözeltide fazla saklanamazlar.
- Ayrıca ışığa da aşırı duyarlı olduklarından, kısa süreli ışıklandırmada bile yapısal değişime uğrarlar.
- Aflatoksinler renksiz veya sarı, iğne şeklinde kristallerdir.
- Saf aflatoksinler yüksek sıcaklığa karşı çok dayanıklıdır.
- Normal pişirme ve pastörizasyon için ısıtma aflatoksine zarar vermez.
- Besin hazırlama işlemleri ile aflatoksinlerin uzaklaştırılması mümkün değildir.
- Yüksek derecede polar çözücülerde iyonlaştığında, ışıkta ve özellikle UV radyasyonuna maruz bırakıldığında dayanıksızdırlar.
- Kloroform ve benzendeki çözeltileri eğer karanlıkta saklanırsa yıllarca dayanabilir.
- Aflatoksin kanser sebebi olarak bilinir ve B1, B2, G1 ve G2 olarak sınıflandırılır (Şekil 2.2).
- Aflatoksin B1 diğer aflatoksinlere göre daha fazla toksik etkiye sahiptir (Tunail, 2000).

Aflatoksin B1 miktarı birçok ülkede sınırlandırılmıştır. Bu limit AB ülkelerinde 2 ng/g olarak belirlenmiştir.

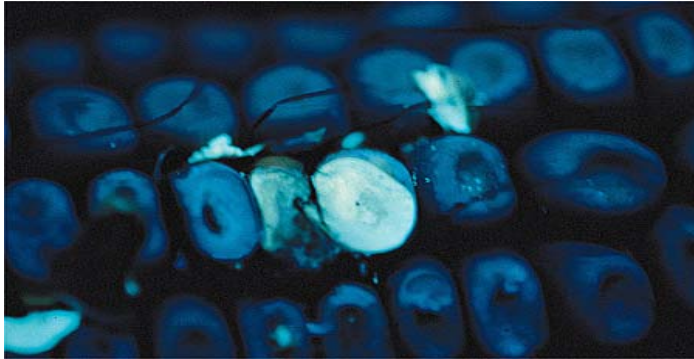


Şekil 2.2. Aflatoksin B1, G1, B2 ve G2'nin kimyasal yapıları (Tunail, 2000)

Gıdalarda aflatoksin analizi kimyasal yöntemlerle yapılmaktadır. Yaygın olarak HPLC testi kullanılmakla beraber ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) ve MS (mass spectrometry) testleri de aflatoksin tespiti için kullanılmaktadır.

Kimyasal olmayan yöntemlerle aflatoksin tespiti üzerine de çalışmalar yapılmıştır. Tyson ve Clark (1974), aflatoksin solüsyonunda bekletilmiş cevizlerle çalışmalar yapmıştır. Aflatoksin içeren cevizler 365 nm dalga boylu UV ışığı altında incelenmiştir. Görünür spektrumda aldıkları ışıkların oranları ile %90 başarı oranı ile 20 ppm'den yüksek dozda aflatoksin içeren cevizleri ayırt edebilmişlerdir. Farsaie ve McClure (1978)' de bu metodu yer fıstıkları üzerinde denemişlerdir.

Hesseltine ve Shortwell (1981) tarafından yapılan bir çalışmada UV ışık altında *A. flavus* küfü içeren mısırların aflatoksin ile birlikte ürettiği ikincil bir metabolit olan kojik asit ile ilgili olarak BGY (parlak-yeşil-sarı) florasan ışığı yaydığı görülmüştür (Şekil 2.3.). Fakat Wilson (1989) aflatoksin içeren mısırların her zaman BGY floresans (bright greenish yellow fluorescence) ışığı yaymadığını, yani ortamda her zaman da kojik asit oluşmadığını tespit etmiştir. Yapılan çalışmada açık mavi renk toksik madde içerdiğinin göstergesi olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2.3. UV ışık altındaki mısır demeti görüntüsü (Wilson,1989)

Şekil 2.3'de görüldüğü üzere aflatoksin içeren mısır tanesi diğerlerinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Bu kontamine mısır tanesi diğerlerinden ayrıştırıldığında bütün grubun aflatoksin miktarı kabul edilebilir sınırların altına inecektir. Buna benzer olarak çalışmamız sonucunda aflatoksinli fındık tanelerinin ayrıştırılması gerçekleştirilebilir. Burada mısırdan yansıyan yeşil ve kırmızı ışık oranları kullanılmıştır.

Hirano vd. (1998), fıstıkların 700 nm ile 1100 nm dalga boylarında ışığı geçirgenlik oranlarına bakarak sınıflandırma yapmıştır. Pearson vd. (2002), tarafından yapılan çalışmada ışığı yansıtma frekansları kullanılarak (R_{735}/ R_{1005}) 10 ng/g den yüksek dozda aflatoksin içeren mısırlar tespit edilebilmiştir. Wigger (1988), renkli görüntüleme sistemlerini kullanarak küflü soya fasulyelerini ayırt edebilmiştir. Wigger kırmızı/mavi, kırmızı/ yeşil ve yeşil/mavi oranlarını kullanarak sınıflandırma yapmıştır.

Görüntü yerine çarpma seslerine dayalı yöntemler de yapılan çalışmalarda yer almaktadır. Çetin vd. (2004), çarpma seslerini kullanarak kabuğu açılmamış ve kabuğu açılmış Antep fıstıkları ses tanıma yöntemi ile ayırt edilebilmiştir. Çatlak olan ve olmayan fıstıkları ses tanımaya dayalı yöntemle ayırt etmeye yarayan cihazlar (Şekil 2.4a) ABD’de USDA (United States Department of Agriculture) tarafından tasarlanmış olup saniyede 40 fıstığı işleyebilmektedir. Geliştirilerek fabrikaya entegre edilen ve halen Kaliforniya’daki fabrikalarda kullanılan (Şekil 2.4b) sistem yaklaşık 4000 fıstık (3-4 kilo) işleyebilme kapasitesine sahiptir.



a



b

Şekil 2.4. a-b)Çarpma seslerini kullanarak kabuğu çatlamış veya çatlamamış Antep fıstıklarını ayırt edebilen cihaz (Çetin ve Pearson,2004)

Gaziantep fıstık üreticilerinin talepleri doğrultusunda bu cihazların ülkemizde kullanımı için çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda bu cihazlardan bir tanesi ülkemize getirilmiş ve Ankara’da yapılan çalışmalar ile Gaziantep fıstığına göre eğitime başlanmıştır. Elde edilen ilk sonuçlar Gaziantep’te faaliyet gösteren bir firmanın yetkililerine geçtiğimiz aylarda sunulmuş ve bu cihazların geliştirilip Gaziantep’te kullanılması adına ortak kararlar alınmıştır.

Uygun olmayan koşullarda işlenen fındıkta ve hasat öncesi veya sonrası dönemde kabuğunda hasar (çatlak, kırık, delik, vs.) olan fındıkta aflatoksinine sebep olan küfün ürediğı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda aflatoksin içeren fıstıkların neredeyse tamamına yakınının kabuğunun erken çatlamış olduğı tespit edilmiştir. Benzer yaklaşımla kabuğunda hasar tespit edilen fındıkların ayrıştırılması fındık yığındaki ortalama aflatoksin içeriğini düşürebilir. Kabuğı hasarlı fındık taneleri çarpma sesleri kullanılarak ayrıştırılabilir. Onaran vd. (2005), tarafından yapılan bir çalışmada içi boş ve dolu fındıkları ses tanımaya dayalı olarak ayrıştırabilmiştir (Şekil 2.5).



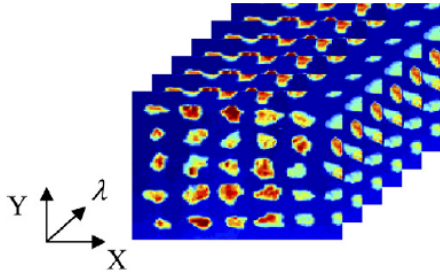
Şekil 2.5. Çarpma seslerine göre fındıkların sınıflandırılması (Onaran v.d., 2005)

Tahribatsız tespit alanında çalışan araştırmacılar öncelikle kendi ülkeleri için önemli olan gıda türleri üzerinde incelemeler yapmışlardır. Dünyadaki en büyük fındık üreticisi olduğumuz ve buna ek olarak kırmızı biber üretiminde dünya sıralamasında üçüncü sırada olduğumuz göz önüne alındığında bu gıdaların güvenliğı konusundaki araştırmalar öncelikle ülkemiz bilim adamlarının sorumluluğunda olmalıdır. Nitekim yurtdışında fındık ve kırmızı biber üzerine hiperspektral görüntüle sistemi ile yapılmış bir çalışma mevcut değildir. Bu ürünler üzerine yapılacak çalışma ülkemiz için önemli bir katma değer getireceğı gibi dünya literatüründe de ilk olma özelliğı taşıyacaktır.

2.5. Hiperspektral Görüntüleme Sistemi ve Bu Sistemin Gıdalardaki Aflatoksin Sorununun Çözümüne Yönelik Kullanımı

Hiperspektral görüntüleme sistemi tahribatsız bir tekniktir, genellikle yansıtılan enerjiye dayanır. Hiperspektral algılayıcılar ile dar bantlı ve sürekli aralıklandırılmış yüzlerce spektral bantta veri toplanabilmektedir. Spektral özellikler sayesinde görüntü elemanlarının değişimi, benzerlikleri ve farklılıkları algılanabilmektedir. Bu sayede görüntü içindeki bölgelerin sınıflandırması veya tanınması standart görüntü algılayıcılarına oranla çok daha yüksek bir başarımla sağlanabilmektedir.

Bir hiperspektral görüntü alım işleminde 3 boyutlu bilgi seti (hiper küp olarak adlandırılır) oluşturulur. Burada x, y boyutları uzaysal ve z boyutu ışın dağılımı ile ilgilidir. Şekil 2.6'daki küp hiperspektral görüntü ile oluşturulmuştur ve iki uzay boyutu ve bir hayali (ışın dağılımına dayalı) boyut (X, Y, λ) bulunmaktadır (Jiang vd., 2006).



Şekil 2.6. Tipik görüntü küpü (Jiang vd., 2006).

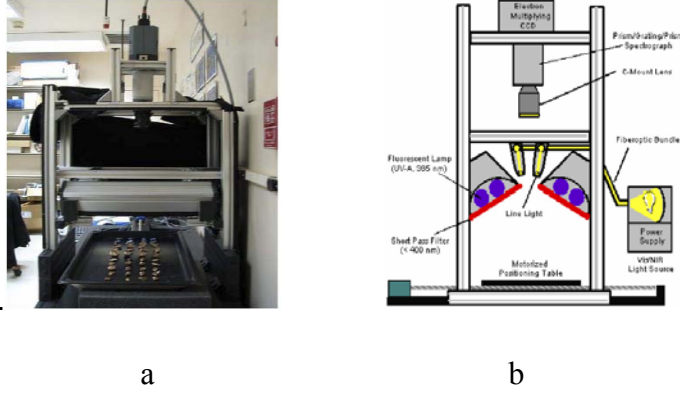
Bu görüntüleme sistemi arazi ölçümlerinde ve mikroskobik ölçümlerde kullanılmaktadır. Bu sistem ile görüntü alımının iki önemli yöntemi vardır. İlki iskelet kamera (Framing Camera)' ya sıralı görüntüleme sistemidir. Farklı dalga boylarında filtreler ile çoklu x-y görüntü alımı yapılır. Bu sistem kolay, ucuz ve hızlı uygulanabilen bir yöntemdir. Fakat hedeflenen görüntünün alınması sınırlıdır. İkinci metod ise "Pushbroom" olarak adlandırılan görüntüleri bantlar arasına ilave eden bir sistemdir. Bilginin bir uzaysal çizgisini alır karşısına spektral aralığı girer ve sonra hareket ederek sonraki bilgi çizgisini alır. Bu sistem çok sayıda x-z görüntüsü ve çeşitli y görüntüsü oluşturur. Bu sistem yığılmış dalga boylarını yakınlaştırır ve hedeflenen görüntüye ulaşmayı sağlar. Bununla birlikte bu sistem ilk sisteme nazaran

daha yavaştır ve daha pahalıdır. Teknoloji Geliştirme Enstitüsü hayvan yemlerinde küf tespiti için “pushbroom” sistemin daha faydalı olduğunu farklı bir çok küf türü ile yaptığı çalışmalarda tespit etmiştir. Yaptıkları diğer bir çalışmada ise geliştirdikleri “visible/near infrared” sistem ile aflatoksin tespiti yapmışlardır (Poole, 2002).

Hiperspektral (HS) veri tarım ürünlerinde denetimde çok yararlıdır. Hızlı ve kimyasallar gibi zarar vermeyen bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada mısırın aflatoksin denetimi için düşünülmüştür. HS data çok sayıda mısırın aynı anda denetimini sağlamıştır. HS metodları BGYF denetim doğruluğu sorunlarının üstesinden gelmiştir. 10000 ng/g aflatoksin seviyesindeki bir mısır tanesinin yeri HS metotta tespit edilirken BGYF metotta bu belirlenememiştir (Casasent vd., 2002).

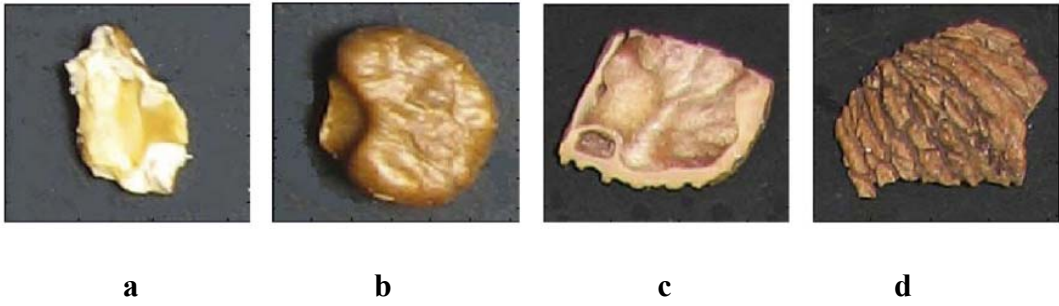
NIR (near infrared) reflektans spektra (500-1700 nm) kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada *A. flavus'un* da içinde bulunduğu çok sayıda küf suşu kendilerine özel göstermiş oldukları belirtilere bakılarak birbirlerinden % 95 başarı oranıyla ayrılabilmiş, aynı çalışmada aflatoksinli mısır tohumları 725-1175 nm bant aralığında 10 ng/g ve üzeri aflatoksin içeren örnekler % 99 başarı oranıyla ayrılabilmişlerdir (Pearson vd., 2002).

Amerika’da ceviz kabuğu ve içi arasındaki otomatik ayırımı hasattan sonra endüstride zorunlu hale getirilmiştir. Geçmiş yıllarda hiperspektral floresans görüntüleme tarım ürünlerinde kalite ve güvencenin denetimi amacıyla ve farklı kimyasalların tespiti ile ilgili denetimlerde kullanılmıştır. Bu çalışmada ise siyah ceviz kabuğu ve iç cevizin farklılık analizinde bahsi geçen görüntüleme sistemi kullanılmıştır. Gaussian-kernel destek vektör makinesi yaklaşımı kullanılarak (SVM) 6257 örneğin görüntü analizi yapılmış % 90.3 oranında tanıma gerçekleşmiştir. SVM geleneksel prensip bileşik analizi ve Fisher’s tanımlama Analizi ile (FDA) kıyaslanmış ve sonuçların daha başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Jiang vd., 2006).



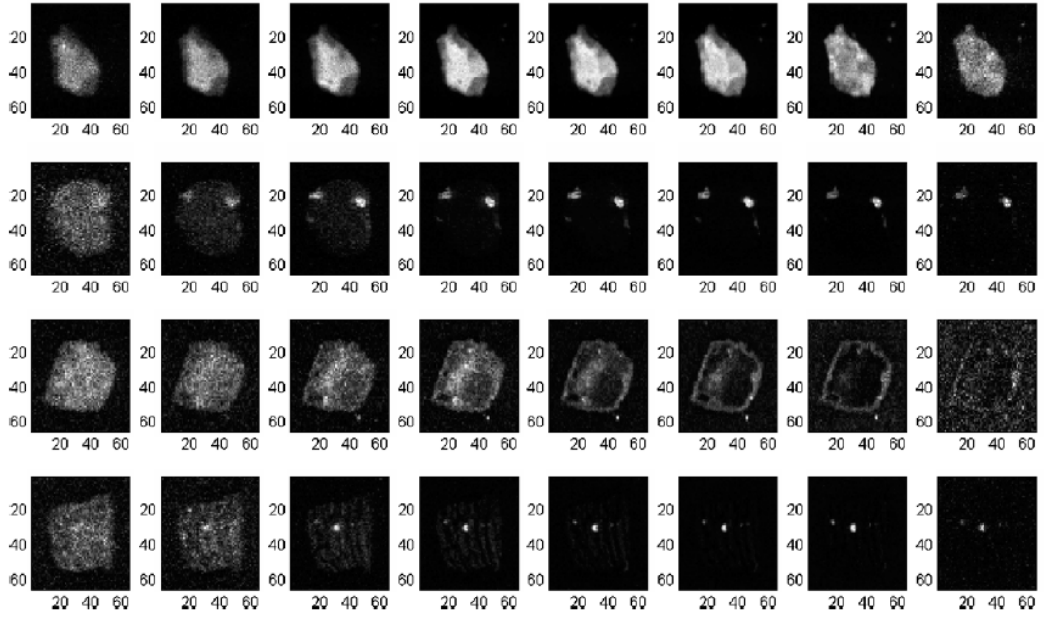
Şekil 2.7. a. Hiperspektral görüntüleme sistemi b. Blok diyagram (Jiang vd., 2006).

Şekil 2.7'deki hiperspektral görüntüleme sistemi USA Beltsville, MD, Ziraat Bölümü Enstrümental ve Duyusal Laboratuvarlarına geliştirilmiştir.



Şekil 2.8. Görüntü alımında kullanılan örnekler; a. parlak iç ceviz, b. koyu renkli iç ceviz, c. kabuğun iç yüzü, d. kabuğun dış yüzü (Jiang vd., 2006).

Jiang vd., (2006), bilgi setine 4 farklı kategoride ceviz örneği seçmiş, örnek şekilleri düzensiz olduğundan, şekiller değerlendirmeye alınmamıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2.9. Ceviz örneğinin hiperspektral görüntüleri (Jiang vd., 2006).

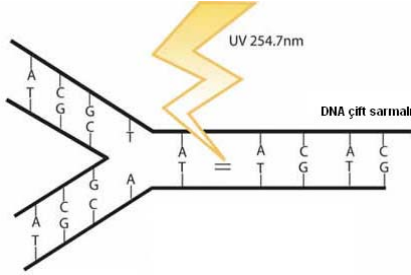
Şekil 2.9’da ceviz örneğinin hiperspektral görüntüleri her sütundaki şekiller farklı bir dalga boyunda, her satırdaki örnekler de farklı bir kategoride olmak üzere verilmiştir. Burada 1’den 8’e kadarki sütun sırayla 425nm, 470 nm, 515 nm, 560 nm, 615 nm, 660 nm, 745 nm ve 775 nm dalga boyunda çekilmiş örnek şekillerini göstermektedir (Jiang vd., 2006).

2.6. Ultraviyole Işın Tipleri ve Kullanım Alanları

Vakum UV: Dalga boyu 200 nm ile 10 nm aralığında olan ışıklara "Vakum UV" denilmektedir. Hava tarafından güçlü bir şekilde absorbe edildiğinden vakum etkisi yaratır. Özellikle 150-200 nm’lik dalga aralığında havanın oksijeni tarafından absorbe edilir. Yapılan çalışmalarda atmosferdeki serbest oksijen ve saf nitrojen kullanılarak vakum çemberi kurulmuştur (Anonim, 2008-b).

UV-C: Kısa dalga boyuna sahiptir. UV-C bir elektromanyetik radyasyon uygulamasıdır ve 200-280 nm arası dalga boyunu kapsar. 254.7 nm dalga uzunluğunda bakteri, virüs, maya ve küf sporlarına karşı antiseptik özellik gösterir. UV-C radyasyon mikroorganizmanın hücre duvarına nüfuz eder, hücre boyunca geçer, DNA (deoksiribonükleik asit)’ya ve diğer genetik materyale kadar uzanır. Böylelikle kimyasal olmayan yapı zarar görür (Şekil 2). Hava yüzey ve su

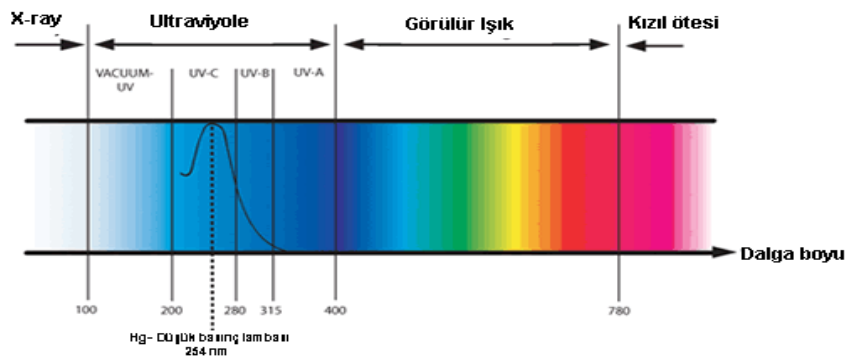
dezenfeksiyonunda kullanılır. UV-C'ye aşırı maruz kalmada deri kızarıklığı ve göz kızarıklığı oluşur fakat bu deri kanserine ya da kataraktlara neden olmaz (Anonim, 2008-b).



Şekil 2.10. Primidin molekülündeki çift bağ oluşumu ve UV'nin replikasyonu engellemesi (Tchobanoglous, 1997)

UV-B: Çok kısa aralıklı bir dalga boyudur fakat güneşin tehlikeli bir parçasıdır. Çoğu UV-B ışını atmosferde ozon tabakası tarafından absorbe edilerek azaltılır. Uzun maruz kalma süresi sonucu deride ve gözlerde olumsuz etkilere neden olur.

UV-A: Uzun dalga boyuna sahiptir. Siyah ışık olarak da bilinir. Tıpta ten renginin bronzlaştırılmasında, deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca hiperspektral görüntüleme sistemlerinde; uzaydan arazi şekilleri çekiminde ve mikroskopik ölçümlerde kullanılmaktadır. Bu çalışmada görüntüleme sistemi içinde kullanılan bu ışın türüdür (Anonim, 2008-b).



Şekil 2.11. Elektromanyetik Spektrum (Anonim, 2008-b)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada Ordu ilinden temin edilen fındık örneklerinde 300'e yakın aflatoksin analizi, Kahramanmaraş başta olmak üzere çeşitli illerden toplanan kırmızı pul biberlerde 62 aflatoksin analizi gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Küf sayımında ve küflerin stoklanmasında kullanılmak üzere Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri seçildi. Otoklavlanan PDA 50°C'ye kadar soğutulup pH değerinin küflerin gelişmesi için optimum hale gelebilmesini sağlamak amacıyla litreye 14 ml tartarik asit veya laktik asit ilave edilmiştir. Burada besiyeri soğutulmadan bahsi geçen asitlerin eklenmesi halinde besiyerinin enzimatik yapısını bozulacak ve donması engellenecektir. Hazırlanan besiyeri steril petrilere dökülerek (10-15 ml) donması beklenmiş ve ardından buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır.

3.1.2. Dilisyon Hazırlama

Dilüsyon için peptonlu su kullanıldı ve formülasyonda belirtilen miktarda hazırlanıldı. Otoklavlandıktan sonra steril tüplere 9'ar ml koyularak +4 °C'de saklanıldı.

3.1.3. Örneklerin Hazırlanması ve İzlenecek Yol

3.1.3.1. Farklı İllerden Toplanan Kırmızı Biber ve Fındık Örnekleri

Yapılan bu ön çalışmanın amacı farklı illerden toplanan örneklerle kırmızı biber ve fındıkta aflatoksin sorununun son durumunun incelenmesidir.

Antalya, Burdur, Isparta, Ankara, Yozgat ve İzmir'den 64 fındık örneği toplanmış ve bu örnekler toplandıkları illerden pazardaki koşullarda kalmaları için soğuk bir zincir oluşturularak aflatoksin analizine alınmışlardır.

En başta Kahramanmaraş olmak üzere Hatay, İzmir, Isparta, Antalya, Erzurum ve Diyarbakır gibi farklı illerden toplanan 62 adet kırmızı biber örneği toplanmış soğuk zincir oluşturularak alındığı yerdeki aflatoksin miktarını koruması sağlanmıştır.

3.1.3.2. Fındıklarda *A. parasiticus*'un Gelişim Süreci

20 adet eşit büyüklükte seçilen kabuklu fındık örneği iki gruba ayrıldı. Gruplardan biri daldırma yöntemi kullanılarak (3.2.1.2) küf ile bulaştırıldı. Diğer gruba ise bir uygulama yapılmadı. Birer hafta aralıkla yapılan ekimlerde 2 tekerrür uygulanarak sonuçta tekerrürlerin ortalamaları kob/ml olarak hesaplandı.

3.1.3.3. Gama Radyoaktivite Yöntemi ile Gıdalarda Yüzey Sterilizasyonu

Gama ışınları kısa dalga boylu elektromanyetik radyasyonlardır. Gama radyasyonu, alfa ve beta yayını türev çekirdek tarafından olur. Radyoaktif çekirdekten alfa ve beta ışınları yayımlandıktan sonra türev çekirdek uyarılmış halde bulunur. Bu çekirdekte aşırı bir enerji vardır. Çekirdek normal haline geçerken bu aşırı enerjiyi kaybetmesi, çekirdekten bir parçacığın fırlaması şeklinde olmazsa buna “izometrik geçiş” denir. Bu sırada bir gama ışını yayılır. Yüksek enerjili gama ışınları birkaç santimetre kalınlığındaki kurşundan geçerler. Yüksüz olduklarından elektrik ve manyetik alanlardan etkilenmezler. İyonlaştırıcı özelliğe sahiptirler (Anonim, 2008-c).

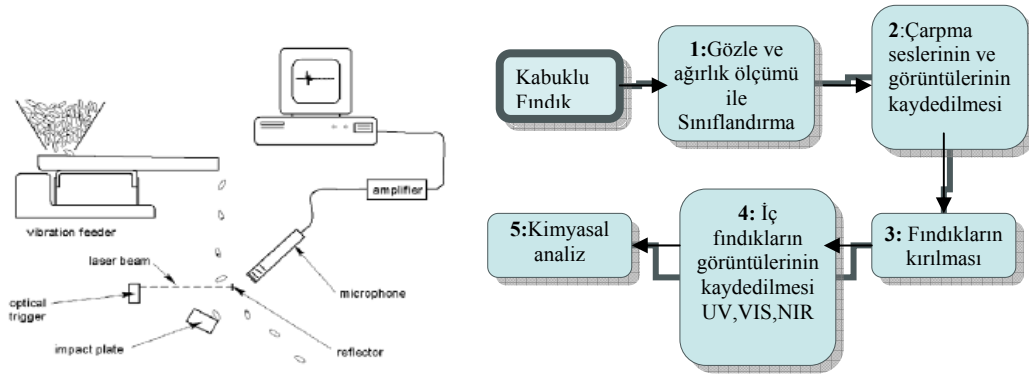
Gama ışınları ile sterilizasyon yöntemi; hızlandırılmış elektron demetleri/x-ışınları kullanılarak gerçekleştirilen ileri teknoloji bir soğuk sterilizasyon yöntemidir. İşlem esnasında sıcaklık artışı çok azdır. Sterilizasyon güvencesi seviyesi (SAL) çok yüksektir. Ürün üzerinde kalıntı bırakmaz. İşlem kontrolü çok kolaydır ve tek bir parametre (uygulanılan doz) ile yapılır (Anonim, 2008-c).

Sağlık ürünlerinde, polimer biçimlendirmede ve gıda ışınlanmasında kullanım alanı bulunmaktadır. Gama ışınlanması gıdaları koruyarak raf ömrünü uzatır, patojen mikroorganizmalardan temizlenmesini sağlar, ayrıca bazı gıda ürünlerindeki çimlenme ve filizlenmeyi de önler. Işınlamada kaynak olarak Co-60 veya Cs-137 izotopları kullanılır (Anonim, 2008-c).

3.1.3.4. Kabuklu, Çatlak ve İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Değişimlerin Tespiti

Uygun olmayan koşullarda işlenen fındıkta ve hasat öncesi veya sonrası dönemde kabuğunda hasar (çatlak, kırık, delik, vs.) olan fındıkta aflatoksinine sebep olan küfün geliştiği tespit edilmiştir. Literatürde Antep fıstığı ve mısır üzerinde aflatoksin tespiti yapabilen yöntemlere sıkça rastlanmıştır. Yapılan çalışmalarda aflatoksin içeren fıstıkların neredeyse tamamına yakının kabuğunun erken çatlamış olduğu tespit edilmiştir. Benzer yaklaşımla kabuğunda hasar tespit edilen fındıkların ayrıştırılması fındık yığını içerisindeki ortalama aflatoksin içeriğini düşürebilir. Bu düşüncemizi kanıtlayabilmek ve aynı zamanda tahribatsız ve hızlı görüntüleme sistemleri ile aflatoksinli ürünü toplam yığından ayırabilmek için kabuklu, çatlak kabuklu ve iç fındık olmak üzere 3 fındık grubu oluşturduk.

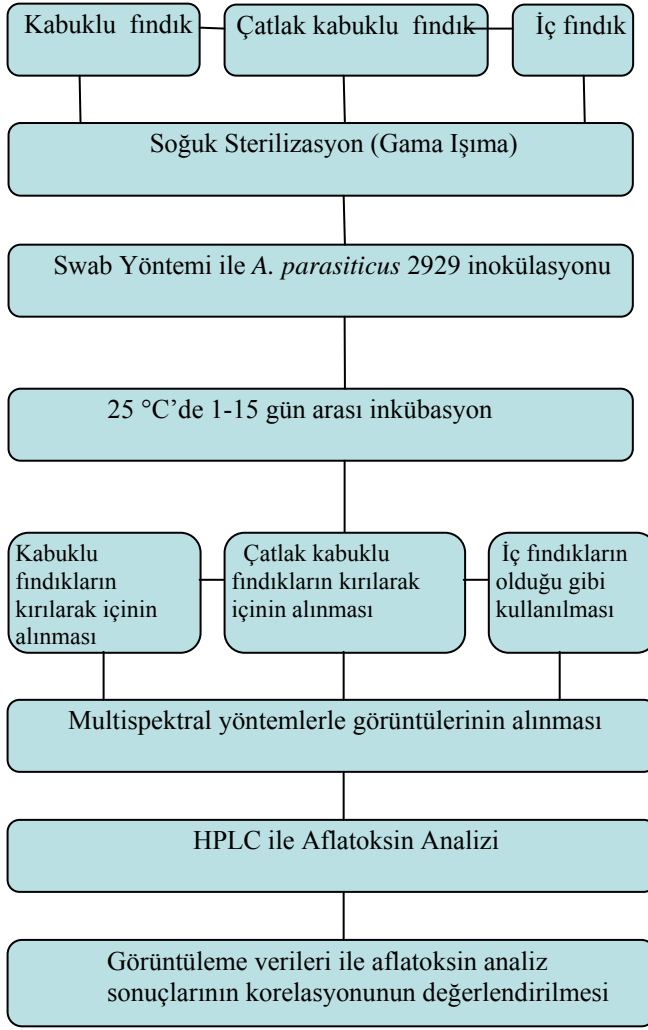
Genel olarak örnek hazırlama aşamasında proje ekibimiz ODTÜ Enformatik Enstitüsünde Şekil 3.1’de görüldüğü üzere kabuklu fındıkları, metal bir yüzeye çaptırmış ve ortaya çıkan sesleri kaydetmişlerdir. Sesi alınan fındık tanesinden hiperspektral yöntemlerle görüntü alımı da yapılmıştır. Bu iki tür bilgi fındığın otomatik olarak sınıflandırılmasında kullanılmıştır. Böylelikle fındıklar sağlam kabuklu ve çatlak kabuklu ve iç fındık olarak sınıflandırılabilmiştir.



Şekil 3.1. Kabuklu fındıktan akustik ve görüntüsel veri toplama işlem şeması (Onaran vd., 2005)

Günümüze kadar fındıklar üzerinde yapılmış aflatoksin denemeleri literatürden taranmış ve belirli bir süreçte aflatoksin miktarlarındaki artışın incelenmediği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda bu toksin artışıyla multispektral görüntü verileri arasında bir korelasyon kurulması planlanmıştır. Kimyasal analiz sonuçlarının elde edilen görüntülerle korelasyonunda fındığın hangi formlarında (kabuklu, kabuksuz, çatlak) daha olumlu sonuç elde edilebildiği araştırılmıştır.

Bu amaçla ilk deneme için tez projem kapsamında ODTÜ Enformatik Enstitüsü ve TÜBİTAK-ATAL ile ortak üç haftalık bir çalışma programı hazırlanmıştır. Bu programa göre ilk gün fındıklar sağlam kabuklu, çatlak kabuklu ve iç fındık örnekleri olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Deneme için kullanılacak bu fındıklar Türkiye Atom Enerjisi Kurumuna gönderilerek, gama radyoaktivite analizine tabi tutulmuş ve böylelikle yüzey sterilizasyonları sağlanmıştır. Ardından aflatoksin ürettiğini bildiğimiz ve TÜBİTAK-MAM'dan temin ettiğimiz *A. parasiticus* 2929 küf suşu kullanılarak swap yöntemi ile fındık örnekleri kontamine edilmiştir. Her grup için 16 petri ve her petride 15 fındık örneği hazırlandı. Bu örnekler görüntü alımı yapılmaya kadarki sürede 25°C'de muhafaza edildiler.



Şekil 3.2. Fındıkta örnek hazırlama ve aflatoksin analizi akış şeması

Görüntü alımı için kabuklu fındıklar ile çatlak kabuklu fındıkların kabukları kırılmış ve iç fındıklarla aynı konuma getirilerek, yani yalnız üzerlerindeki zarlarla görüntü alımı gerçekleşmiştir. Aflatoksin analizi yine fındıkların bu hali ile yapılmıştır (Şekil 3.2). Görüntü alımına götürülürken ve görüntüledikten sonra, aflatoksin analizine getirilirkenki süreçte küf miktarında ve dolayısı ile aflatoksin miktarında herhangi bir değişim olmaması için fındık örnekleri -20°C 'de muhafaza edilmişlerdir.

Sağlam kabuklu fındık örnekleri ve çatlak kabuklu fındık örneklerindeki aflatoksin miktarlarının diğer iç fındık grup örneklerine nazaran daha az aflatoksin içereceği düşünölmüş ve bu gruptaki örnekler 6. güne kadar beşerli gruplar halinde iki tekerrürlü olarak analize sokulmuştur. İç fındık örnekleri ise teker teker analize alınarak toplamda bir günde 12 iç fındık analizi yapılmıştır. Yapılan araştırmalar 6.

günden itibaren aflatoksin seviyesinde bir farklılık olacağını gösterdiğinden bu günden itibaren aflatoksin analizlerinde sağlam kabuklu ve çatlak kabuklu fındık grup sayısı iki katına çıkarılmıştır (yani 4 grup oluşturulmuştur). Buna ek olarak çatlak fındık grubunda aflatoksin artışının daha fazla olacağı düşünülerek gruptaki örnekler teker teker analiz edilmiştir. 9. deneme gününde aflatoksin analizlerinde beklenen değişime rastlanmadığından örnek grupları ve sayısı başlangıçtaki seviyeye düşürülmüştür.

Analizler sırasında çeşitli nedenlerle bazı örneklerden fire verildiğinden başlangıçta belirlenen sayıların altında örnek analizi, sonuca ulaşabilmiş sonuç olarak 216 fındık analizi gerçekleştirilmiştir.

3.1.3.5. Kavrulmuş İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Değişimin Tespiti

Fındık görüntülerinin sınıflandırılmasında ayırtırmayı yapabilecek bir sistem geliştirilmesi için elimizde aflatoksin içeren ve içermeyen fındıklar olması gerekmektedir. Bu fındıkların temini için yapay yolla ve aflatoksijenik suş kullanılarak fındıklar küflendirildi ve aflatoksin oluşumu sağlandı. Öncelikle bu deneme için 9 grup oluşturulması planlandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Fındıkta aflatoksin miktarındaki değişimin tespiti için kullanılan gruplar

	9 gün muhafaza edilen grup (25°C ve % 90 nem)	18 gün muhafaza edilen grup (25°C ve % 90 nem)
Küflü, zarlı ve kavrulmuş örnekler	100 fındık	100 fındık
Küflü, zarlı ve kavrulmamış örnekler	100 fındık	100 fındık
Küfsüz, zarlı ve kavrulmuş örnekler (Kontrol Grubu 1)	100 fındık	100 fındık
Küfsüz, zarlı ve kavrulmamış örnekler (Kontrol Grubu 2)	100 fındık	100 fındık
Küfsüz ve bekletilmemiş örnek grubu 100 adet (Kontrol grubu 3)	-	-

TÜBİTAK'tan temin edilen ve aflatoksin ürettiği bilinen *A. parasiticus* 2929 küf suşu PDA'da çoğaltılıp 500 ml steril saf su bulunan geniş bir beher içerisine alındı (3.2.1.2. Daldırma Yöntemi). Steril su içerisinde homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra 400 adet iç kabuklu fındık örnekleri bu sıvıya daldırılıp çıkarıldı. Diğer 400 fındık örneği de içerisinde yalnızca 500 ml steril saf su bulunan petriye daldırılıp çıkarıldı. Bu grup kontrol grubu (1-2) olarak kabul edildi. Son grup ise yalnız kavrulmuş temiz fındık örneklerini içermektedir.

İlk olarak küfsüz 100 adet fındık grubu 130°C'de 15 dk. yalnız kavrularak görüntü alımı için gönderildi.



Şekil 3.3. Küfsüz kavrulmuş fındık grubu

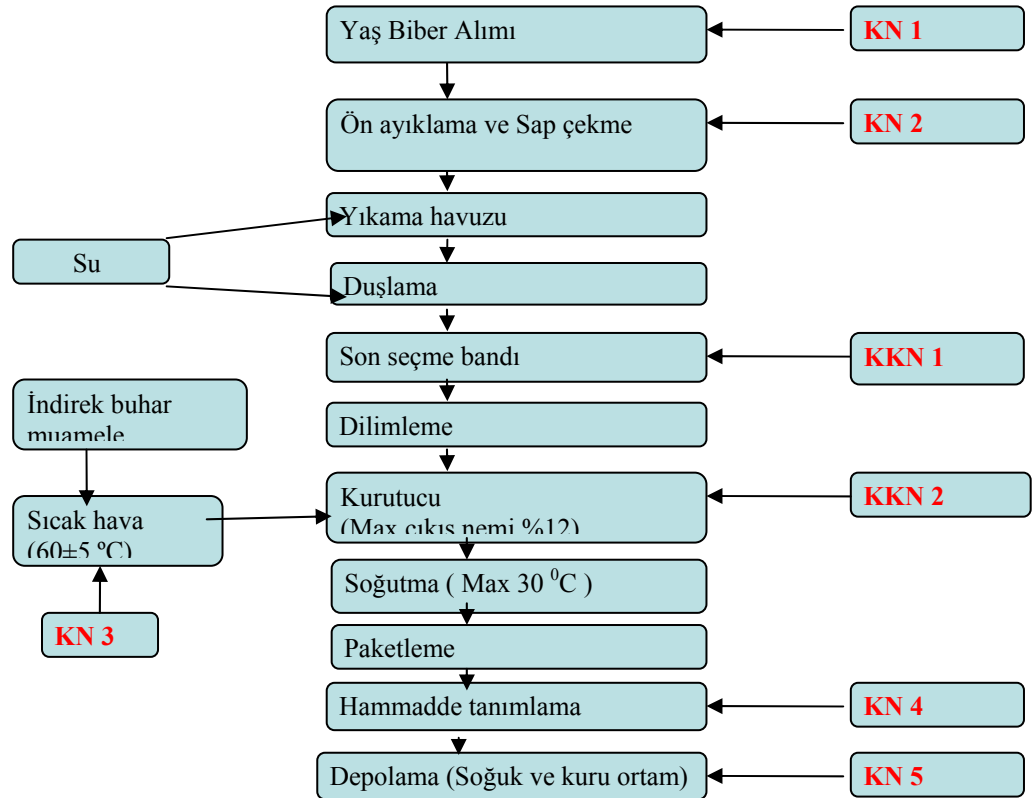
İkinci olarak; 9 gün sonunda 2 grup (küflü ve küfsüz) 130°C'de 15 dk kadar Pastör fırınında kavruldu. Kavurma işlemi literatür taraması sonucu uygun sıcaklığın tespiti ile yapıldı. Literatürde uygulanan 121-177°C arasındaki tüm kavurma uygulamalarında zar uzaklaşması (beyazlama) kolaylaşırken, renk kararması, kırılganlık ve gevreklik gibi duyuşal özelliklerde ise sıcaklık derecesi ve süresi artışı oranında artış görülmüştür (Şimşek, 2004). Bununla birlikte sıcaklık ve süre fındık çeşidine göre farklılık göstermekte olduğu yine literatürdeki bilgiler arasındadır. Fındıkların 9 günlük ve 18 günlük periyotta bekletilmelerine Şimşek vd.(2002)'nin yaptığı çalışma incelenerek karar verilmiştir

Kavruş örneklerin kabukları yüzeşlerinden soyulduktan sonra, bu 2 grup örnekle kavruşmamış 9 gün muhafaza edilmiş küflü ve küfsüz örnek grupları ODTÜ Enformatik Enstitüsüne görüntü alımı için gönderilmiştir.

Son olarak; 18 gün muhafaza edilen örneklerden yine 2 grup aynı koşullarda kavrulup kabuklarından ayrılmış ve kalan diğer 2 grup ise kavrulmadan steril kavanozlara alınıp ODTÜ Enformatik Enstitüsüne görüntü alımı için gönderilmiştir. Görüntü alım sonuçları “sonuçlar ve değerlendirme” bölümünde verilmiştir.

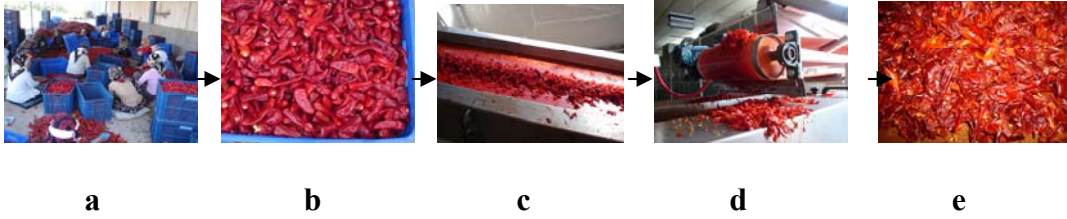
3.1.3.6. Kırmızı Pul Biberde Aflatoksin Analizi

Bu denememiz için başlangıç olarak Kahramanmaraş’a gidilip biber üreticilerinin üretimde karşılaştıkları aflatoksin sorunu başta olmak üzere sıkıntıları dinlendi. Birçok baharatçı dolaşarak piyasadaki örnekler toplandı. Kırmızı biber üretiminde Maraş’ın önde gelen firmaları araştırıldı ve diyalog kurulan birkaç örnek firma ziyaret edildi. Bunlardan biri olan ve projemize destek veren MÜSAN Gıda A.Ş.’nin üretim tesisleri detaylı olarak incelenip fotoğrafları çekildi. Projeden elde edilen sonuçlarla yapılması planlanan prototip sistemin monte edilmesi gereken bölgeyi tespit için üretim bantlarındaki kritik kontrol noktalarının tespiti yapıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kırmızı biber üretim süreci ve kritik kontrol noktalarının tespiti

Yapılan incelemeler sonucu ön ayıklama bandı ve depolamada prototip sistemin kullanılması uygun görüldü. Kahramanmaraş'ta üretim tesisinden alınan beş kırmızı biber örneği ve yine Kahramanmaraş'taki farklı baharatçılardan toplanılan beş biber örneği, buna ek olarak Hatay ve İzmir'den getirilen ikişer örnek olmak üzere toplamda 14 örnek hazırlandı. Şekil 3.5'deki fotoğraflar, Kahramanmaraş'ta MUSAN kırmızı biber üretim tesisinde çekilmiştir.

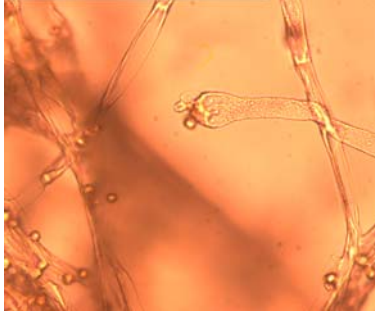


Şekil 3.5. Kırmızı pul biberin üretim süreci. a. sap ayırma, b. seçilmiş biberler, c. parçalama aşaması, d. kurutma aşaması, e. kurutulmuş biber

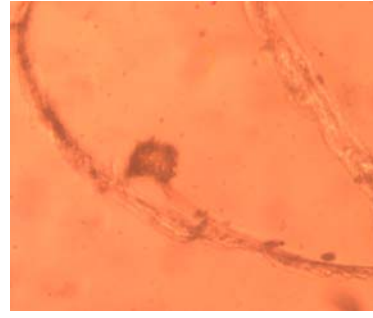
3.2. Yöntem

3.2.1. Fungal Suş ve Örneklerle Aşılınması

Aspergillus'un aflatoksjenik suşlarından olan *A. parasiticus* 2929 TÜBİTAK-MAM kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Örnekler +4 °C'de, 14 ml/l, %10 tartarik asit içeren Patates Dekstroz Agar (PDA)'da, cam tüplerde yatık agar üzerinde kültüre alınmıştır. Bahsi geçen küf suşunun aflatoksin B1, B2, G1, G2 ürettiği bilinmektedir. Alınan bu küf suşu ayda bir kere yeni hazırlanmış yatık agara aşılama yapıp 25°C'de 4 gün süre ile muhafaza edilerek yenilenmiş, ardından buz dolabında +4°C'de depo edilmiştir. Böylelikle küflerin tazeliğini koruması sağlanmıştır. Şekil 3.6'da verilen fotoğraflar Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi, Biyoteknoloji Laboratuvarında çekilmiştir.



a



b

Şekil 3.6. a-b. *A. parasiticus* 1041 küf suşu

Denemelerde kullanmak için küf sporları öze ile yatık agarlardan 9 ml steril peptonlu su içeren dilüsyonlara alınmışlardır. Bir dakika süresince 25 Hertz'de çalkalanan örneklerden 100 µl alınarak pH'sı tartarik asit veya laktik asit ile ayarlanmış PDA bulunan steril petrilere yayma yöntemi kullanılarak ekim yapılmış ve bu örnekler 25°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır.

3.2.1.1. Swab Yöntemiyle Örnek İnokülasyonu

Denemelerde kullandığımız bu yöntemde steril bir pamuklu çubuk bulunmaktadır. Stoklardan bu çubukla alınan *A. parasiticus* 2929 küf suşu hazırlanan steril fındık örneklerine inoküle edilmektedir (Davidson vd., 1999).

3.2.1.2. Daldırma Yöntemiyle Örnek İnokülasyonu

İçerisinde 500 ml saf su ve manyetik balık bulunan erlenmayer 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril hale getirildi. Kullanılacak diğer cam malzeme olan beherde ağzı folyo ile kapatılarak 171°C'de 1,5 sa. Pastör fırınında steril hale getirildi. Steril saf su içerisindeki manyetik balıkla birlikte bunzen beki alevinden geçirilerek steril behere alındı. Stok halde +4°C'de bekletilen *A. parasiticus* 2929 suşu üzerine beherde bulunan saf steril sudan ilave edilerek vortekslendi ve bu kontamine olmuş su behere geri dökülerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve küfün su içerisinde homojen dağılımı sağlanmaya çalışıldı. Denemede kullanılacak fındık örnekleri bu sıvıya daldırılıp 30 sn karıştırılarak alındı. Daldırma yöntemi kullanılarak inokülasyonu yapılan fındık örneklerinin 5 hafta boyunca küf miktarındaki değişimi izlendi.

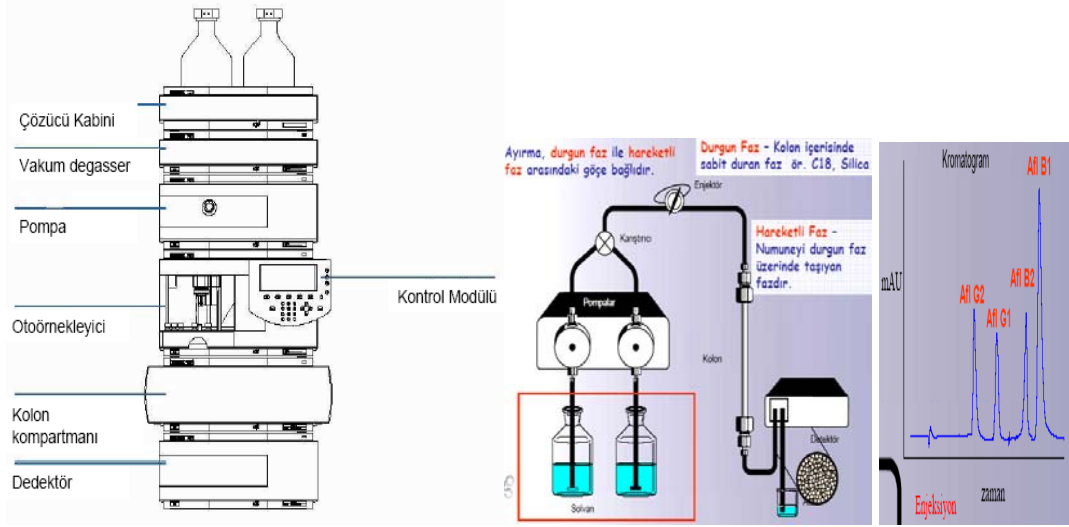
3.2.2. Mikrobiyolojik Muayene

3.2.2.1. Yayma Plak Yöntemi ile Ekim ve Küf Sayımı

Fındık örneklerinde bulunan toplam küf miktarının tespiti için steril şartlarda uygun ölçüde seyreltilmiş dilüsyonlardan 100µl alınarak PDA içeren petrilere ikişer paralelli olarak ekildi. %70'lik metanol içinde bulunan drigalski spatülü alevden geçirilerek yayma plak yöntemi ile petri içerisindeki sıvının petrinin her yerine eşit bir şekilde yayılması sağlanarak ekim gerçekleştirildi. Petriler 20 dakika bekledikten sonra kapakları alta gelecek şekilde inkübatöre yerleştirilerek, 25 °C de 2 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 20-200 arası koloni ihtiva eden petri kutularındaki koloniler sayıldı. Paralel petri kaplarındaki koloni sayılarının ortalaması alındı ve bu rakam seyreltme faktörü ile çarpılarak örneğin gramındaki küf sayısı bulundu (Halkman, 2005; Özçelik, 1998; Ünlütürk ve Turantaş, 2002).

3.2.3. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC genelde uçucu olmayan organiklerin tespitinde kullanılan bir cihazdır (Şekil 3.7). Bu yöntem amino asitlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin, hidrokarbonların, yağ asitlerin, karbonhidratların, phenollerin, pestisitlerin ve antibiotiklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Burada taşıyıcı sıvı, sisteme yaklaşık 40 atm basınçta verilir. Bazen kolon öncesinde bir ön kolon bulunabilir bu ön kolonun amacı mevcut analizin gerçekleştirildiği kolonun ömrünü uzatmak ve girişim yapabilecek kirletici parametreleri önlemek amacı ile kullanılmaktadır. HPLC'de analitik kolondan çıkan numuneler detektörde tutulur ve tayin edilerek kaydedilir. Ölçüm aralığının hassasiyetine ve tespit edilecek bileşiğin türüne göre uygun taşıyıcı solvent, kolon ve detektör seçimi yapılmalıdır. Kullanılan çözücüler su, hekzan veya methanol olabilir. HPLC'de kolon uzunluğu 10 ile 30 cm arasında değişir (Avşar, 2006).

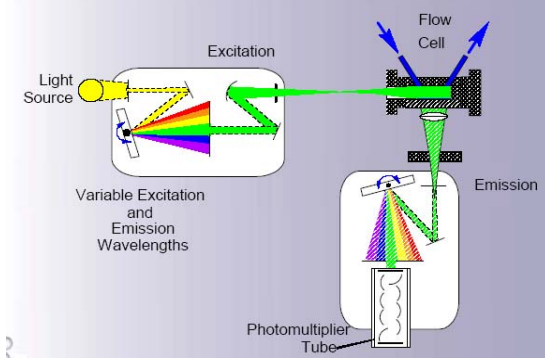


Şekil 3.7. HPLC sistemi (Anonim, 2005)

HPLC ile aflatoksin analizi; ekstraksiyon, filtrasyon ve seyreltme, adsorpsiyon/elüsyon/tesbit, HPLC'ye enjeksiyon, hesaplama aşamalarından oluşmaktadır. Aflatoksin analizinde R-Biopharm Rhone Ltd.'nin geliştirdiği ekstraksiyon metodu, kolon olarak da immunoaffinite kolon kullanılmıştır.

HPLC sisteminde ayırmada rol alan unsurlar; kolon uzunluğu, kolon sıcaklığı, durgun faz, hareketli faz bileşimi, partikül büyüklüğü ve akış hızıdır. HPLC'de kullanılan dedektörler ise; kütle spektroskopisi (MS), floresans dedektör (FLD), Elektro, UV-VIS, RI-LS'dır. Bizim kullandığımız dedektör floresans dedektördür (Şekil 3.8).

3.2.3.1. Floresans Dedektör ve Performans Özellikleri

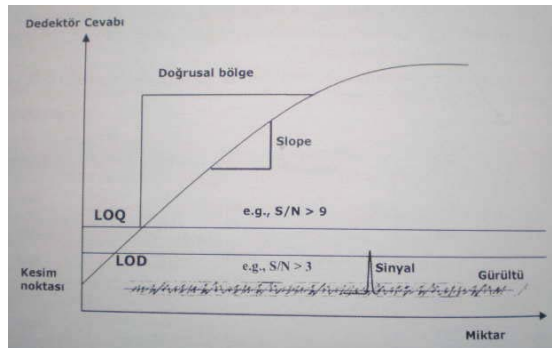


Şekil 3.8. Floresans dedektör (Anonim, 2005)

Floresans dedektörleri akış hızı ve ısı değişikliğinden fazla etkilenmeyen seçici dedektörlerdir. Dedektörlerin sahip olduğu performans özellikleri; hassasiyet (LOD, LOQ), seçicilik, lineerlik, kalitatif bilgi, güvenilirlik, kullanım kolaylığı, üniversal olmasıdır.

Gözlenebilirlik Sınırı (LOD); herhangi bir analit için gözlenebilirlik limiti, analit sinyalinin arka plan gürültüden ayırt edilebilmesi için gerekli en az analit miktarıdır. Bir pikin LOD'da olabilmesi için sinyal değeri, gürültünün 3 katı olması gerekir (Şenyuva ve Gilbert, 2006).

Belirlenebilirlik Sınırı (LOQ); bir analitin LOQ'u o analitin güvenilir bir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli en düşük miktardır (Şekil 3.9) (Şenyuva ve Gilbert, 2006).



Şekil 3.9. .LOD ve LOQ'un grafiksel gösterimi (Şenyuva ve Gilbert, 2006).

Bir analitik prosedürün doğrusallığı; ölçülen analitin konsantrasyonu ile dedektör cevabının ne derece doğru orantılı olduğu ile belirlenir (Şenyuva ve Gilbert, 2006).

Keskinlik; bir analit işlemin keskinliği, önceden belirlenmiş koşullarda birden çok kez alt örnekleri alınan homojen bir numuneden yapılan ölçümlerin birbiriyle uyumudur (Şenyuva ve Gilbert, 2006).

Bir analit metodun doğruluğu; ölçülen konsantrasyon ile gerçek değer birbirlerine yakınlığını gösterir. Doğruluk genellikle, bilinen değer geri kazanımı, eklenmiş miktar veya ortalama değer ile gerçek değer arasındaki farkın güven aralıkları olarak tespit edilir (Şenyuva ve Gilbert, 2006).

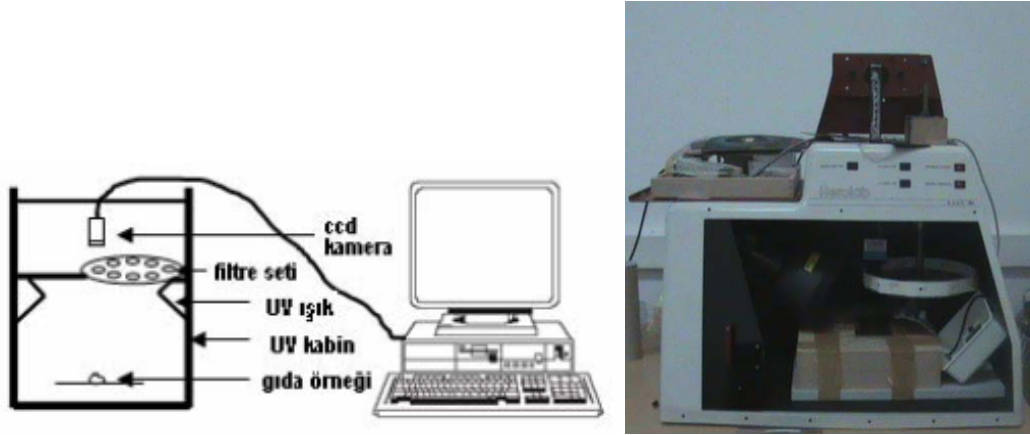
Bir analitin geri kazanım oranı, o analitten numune ortamına eklenen miktarın ortaya çıkardığı dedektör yanıtının saf standardın cevabına oranıdır. Geri kazanım bir analitik yöntemin ekstraksiyon verimliliğini ölçerken, belirli limitler içerisindeki sapmalar göz önüne alınarak, numune saflaştırma sırasında ortaya çıkan kayıpları gösterir (Şenyuva ve Gilbert, 2006).

3.2.4. Görüntü Alımı

Çoğu uzaktan algılama sistemleri enerjiyi birçok dalga boyu aralığında ve çeşitli spektral çözünürlükte kaydederler. Bu tür sistemler multi-spektral algılayıcılar olarak adlandırılırlar. Gelişmiş multi-spektral algılayıcılar ise hiperspektral algılayıcılardır ve elektromanyetik spektrumun görünür, yakın kızılötesi ve orta kızılötesi kısımları boyunca yüzlerce çok dar spektral bantlarda algılama yapabilirler. Hiperspektral görüntüleme, spektral aralığı 10 nm den küçük olan yüz veya yüzden çok mekansal verinin, süreklilik içeren ardışık dalga boyularından elde edilmesiyle oluşur (Anonim, 2006).

Bu çalışmada yapay olarak aflatoksijenik küf suşu bulaştırılmış fındık örnekleri multispektral görüntüleme ile incelendi. Multispektral görüntüleme gıda örnekleri birden fazla frekans bandında görüntülenmektedir. Elde edilen görüntü seti çeşitli amaçlar (sınıflandırma, izleme, inceleme v.s.) için zengin bilgi içeriğine sahip olmaktadır. En yaygın uygulaması sınıflandırma problemlerinde olan multispektral görüntüler çoğunlukla uzaktan algılama amacıyla kullanılmaktadır. Gıda

güvenliğinde kullandığımız multispektral görüntüleme sistemi (Şekil 3.10); ccd kamera, UV ışık kaynağı, filtreler ve bunların takıldığı filtre platformu, karanlık ortam sağlayan UV kabin ve bilgisayardan oluşmaktadır (Kalkan ve Yardımcı, 2008).



Şekil 3.10. Multispektral görüntüleme sistemi (Kalkan ve Yardımcı, 2008)

3.2.4.1. Kabuklu, Çatlak ve İç Fındıkta Aflatoksin Analizi

Sağlam kabuklu ve çatlak kabuklu fındıkların kabukları kırıldıktan sonra, iç fındıkla birlikte farklı aydınlatma koşullarında (400-550 nm aralığında) 12 farklı lens kullanılarak görüntüleri alındı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Kullanılan kamera ve lens sistemi (orijinal)

Görüntüleme sırasında fındıkların yüzeyinde bulunan kahverengi zarın kapalı görüntüleme düzeneği içinde UV-A ışınının neden olduğu ısı ile çatlaması (Şekil

3.12) ve bu çatlakların görüntülerde ışımaya şeklinde görülmesi algoritmik hesaplamalarda ekibimiz için olumsuz etki yaratmıştır.



Şekil 3.12. Kabuklu ve küflü fındık örneğinin 480 nm’de multispektral görüntüsü

3.2.4.2. Kavrulmuş İç Fındıkta Aflatoksin Analizi

Çalışmamızda UV ışık altındaki fındık örneklerinin 400 nm’den başlayıp 600 nm’ye kadar uzanan bir spektrumdaki görüntüleri 14 farklı bantta alındı. Buna ek olarak fındık örnekleri herhangi bir filtre kullanılmadan da görüntülendi. Görüntü sonuçlarına göre iki sınıf arasında en iyi ayrımı yapabilecek olan spektral bantlar tespit edilerek sınıflandırma yapıldı.

Çalışmada örnek hazırlama aşamasında hazırlanan fındıklardan 106 adet aflatoksinsiz, 57 adette aflatoksinli fındık seçilmiştir. Multispektral görüntüsü alınan fındıklar hemen kimyasal analize tabi tutulup aflatoksin içeriği belirlenmiştir. Kavrulma işlemi sırasında bazı fındıkların yüzeyinde kahverengi zarın tam olarak uzaklaştırılmadığı tespit edilmiştir. Bu bölgeleri farklı yansıtma özelliklerinden dolayı sınıflandırma işlemlerinde ön plana çıkacağından zarlı bölge ve arka plandan arındırılmıştır. Fındığı zarlı bölgelerden ve arka plandan ayırt etmek için 550 nm dalga boyundaki görüntüsü kullanıldı. Aynı fındığın bütün görüntüleri maskeleyen sistemi kullanılarak zarlı bölge ve arka plandan arındırılmıştır (3.13) (Kalkan ve Yardımcı, 2008).

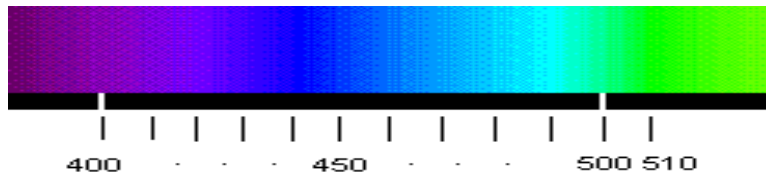


Şekil 3.13. a) Fındığın 550 nm dalga boyundaki görüntüsü, b) maske, c) maskelenmiş görüntü (Kalkan ve Yardımcı, 2008)

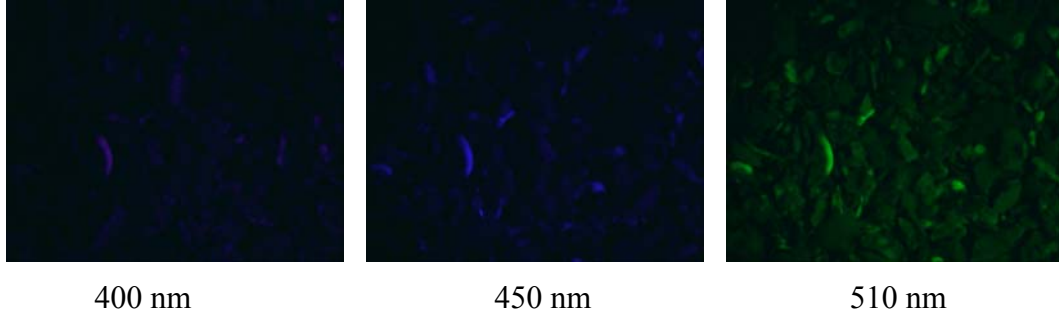
Kabin içerisindeki fındık örnekleri filtresiz ve 400 nm'den 510 nm ye kadar 10 nm'lik geçirme bandına sahip filtreler kullanılarak görüntülendi. Bunlara ek olarak merkez ferkansı ve geçirme bandı (550-70nm), (600-40nm) olan filtrelerde kullanılmıştır (Kalkan ve Yardımcı, 2008).

3.2.4.3. Kırmızı Pul Biberde Aflatoksinin Tahribatsız Yöntemle Tespiti

Tarım ürünlerinde aflatoksin tespiti için yapılan ön deneme testlerinde UV-A ışığı (365 nm) kullanılır. Bu dalga boyunda aflatoksinli ürün parlak-yeşil-sarı floresans (BGYF) ışımaya yapar (Casasent vd., 2002) (Şekil 3.14). UV-A ışığı altında "IC Capture Software" programı kullanılarak örneklerden yansıyan ışımalar ODTÜ Enformatik Enstitüsünde görüntülendi. Kameranın yeterli yansıma ışığını yakalaması için UV-A'ya maruz kalma zamanı 2 saniye olarak ayarlanmıştır. 14 kırmızı biber örneğinin her birinden frekans aralığı 400 ile 510 nm olan 12 farklı görüntü alınmıştır. Ayrıca aynı biber örneklerinin farklı parçalarından 3 kez görüntü alınmıştır (Kalkan vd., 2007) (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. Filtre Seti (Kalkan vd., 2007)



Şekil 3.15. 400 nm, 450 nm ve 510 nm frekans aralığında görüntü alımı (Kalkan vd., 2007)

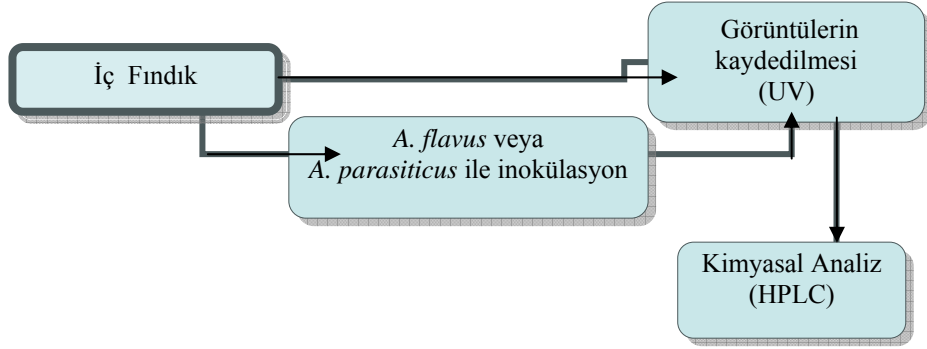
3.2.5. Aflatoksin Analizi

Aflatoksin Analizleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Ankara Test ve Analiz Laboratuvarlarında (ATAL) AOAC'nin (Association of Official Analytical Chemists) geliştirdiği metot kullanılarak yapılmıştır (Patey vd., 1992).

Aflatoksin tespiti için analizlerimizde HP Agilent 1100 HPLC sistem ve Zorbax Eclipse XDB C18 ters faz kolon (3,5 µm, 4.6 × 75 mm) kullanılmıştır. Aflatoksin standartları ve aflaprep kolondan elüe edilen örnekler mobil faz içeren [1 litre için su:metanol:asetonitril; (62:22:16; v:v:v)+120 mg KBr+4M 350µl HNO₃ , akış hızı 1 ml/dk.] HPLC sistemine enjekte edildi. Aflatoksin floresans dedektör kullanılarak belirlendi (FLD:Ex: 365 Em: 435 nm RF-10A×L). Ekstraksiyon ve emisyon dalga boyları sırası ile 360-430 nm ve kolon sıcaklığı 40°C'dir. Ölçümlerin lineerliği standart solüsyonların içerdiği 100 ng/ml konsantrasyona göre LOD (limits of detection)'taki aflatoksin miktarları ile karşılaştırılarak kontrol edildi. Metoda göre LOD değerleri AFB1 (aflatoksin B1) için 0.036 ng/ml, AFG1 için 0.031638 ng/ml, AFB2 için 0.053967 ng/ml, AFG2 için 0.072301 ng/ml olarak verilmiştir. Ayrıca LOQ değerleri AFB1 için 0.111412 ng/ml, AFB2 için 0.163538 for ng/ml, AFG1 için 0.095872 ng/ml ve AFG2 için 0.21909 ng/ml olarak verilmiştir.

3.2.5.1. Fındıklarda Aflatoksin Analizi

Sağlam kabuklu ve çatlak kabuklu fındıkların kabukları kırıldıktan sonra ve iç fındıktan farklı aydınlatma koşullarında görüntüler alındı. Bu fındıklar daha sonra aflatoksin bulaşmasının belirlenmesi için kimyasal analize alındı. Kimyasal analizde HPLC cihazında örneklerin aflatoksin seviyeleri belirlendi (Şekil 3.16).

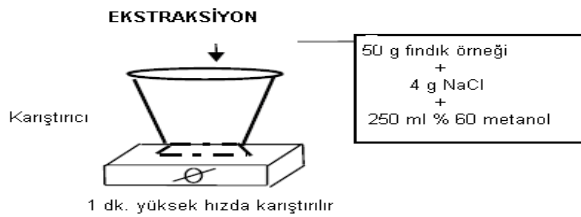


Şekil 3.16. İç fındıklardan veri toplama işlem şeması

Takip ettiğimiz prosedür AOAC'nin fındık ve Antepfıstığı üzerine belirlemiş olduğu aflatoksin ekstraksiyon metodudur (Patey vd., 1992).

Bu metod, 50 gr. fındık örneği üzerine olup, denemelerde bir fındık tanesi veya beş fındık tanesi analizi yapıldı. Bu da ortalama 0,70- 6,25 gr. arası örnek miktarına tekabül etmektedir. Bu yüzden AOAC'ye ait prosedür üzerinden fındık miktarına göre eklenecek kimyasal oranını ayarlandı.

Ekstraksiyon Aşaması: 50 gr. fındık örneği ve 4 gr. NaCl karıştırıcıya koyulur. 100 ml su eklenerek 1 dk. yüksek hızda karıştırılır. Daha sonra 150 ml metanol eklenerek 2 dk daha karıştırılır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Ekstraksiyon aşaması

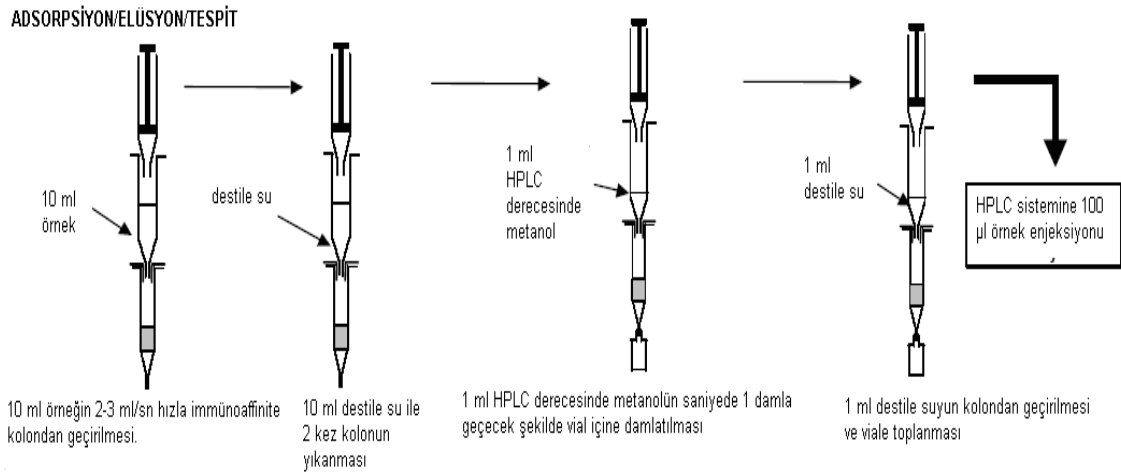
Dilüsyon ve Filtrasyon: Yukarıdaki karışım Whatman no.4 filtre kağıdından geçirilerek filtrat elde edilir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Dilüsyon ve filtrasyon aşaması

Adsorpsiyon/Ayrırma (Elüsyon)/Tespit:

Filtratın 5 ml'sine 5 ml fosfat tamponu (PBS) eklendi. Bu 10 ml'lik çözelti Aflaprep immunoaffinite kolondan enjektörle dakikada 3 ml hızla geçirildi. Ardından 20 ml destile su ile 5 ml/dk hızla kolon yıkandı. Bu aşamadan sonra kolona tutunan aflatoksinlerin kolondan ayrılması (elüsyonu) isteneceğinden kolonun alt ucuna vial yerleştirildi. Daha sonra kolondan 1 damla/sn hızla 1 ml metanol geçirildi. Son olarak kolon 1 ml destile su ile yıkanarak vialde toplandı. Vialdeki toplam hacim 2 ml olup bu ekstraktın 100µl'si HPLC'ye enjekte edildi (Şekil 3.19).

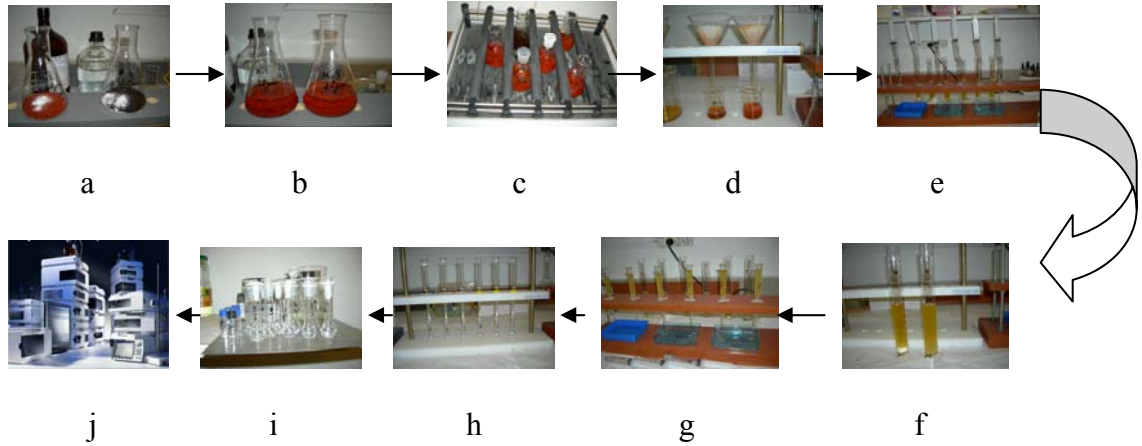


Şekil 3.19. Adsorpsiyon/elüsyon/tespit aşamaları

3.2.5.2. Kırmızı Pul Biberde Aflatoksin Analizi

62 kırmızı biber örneği aşağıdaki gibi AOAC'nin kırmızı biber üzerine belirlemiş olduğu ekstraksiyon metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

Kırmızı biber örnekleri 250 ml'lik flask içerisine alındı (3.20a). Her 5 gr örnek için 5 gr NaCl ve 300 ml metanol:su (80:20 v/v) karışımı eklendi (3.20b) ve 30 dk süresince yüksek hızda karıştırıldı (3.20c). Bu karışım Whatman No.4 filtre kağıdı ile filtre edildi (3.20d). 10 ml fitrata altı katı oranla PBS solüsyonu eklendi (3.20e). Daha sonra seyreltilmiş bu ekstrakt (70 ml), önceden PBS ile şartlandırılmış immunoaffinite kolondan 3 ml/dk akış hızında geçirildi (3.20f ve 3.20g) (Aflaprep, Vicam Afla Test P, R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow/Scotland). Ardından kolon 5 ml/dk akış hızında 10 ml distile su ile yıkandı. Son olarak kolondan 1,5 ml metanol geçirilerek aflatoksin elüsyonu gerçekleştirildi (3.20h) ve buradaki metanole eşit miktarda saf su yine kolondan geçirilerek elüet seyreltildi (3.20i). Elüetin alındığı balon jöjelerin üzeri 3 ml'ye tamamlandı. 100µl aflatoksin içeren örnek HPLC sistemine enjekte edildi (3.20j).

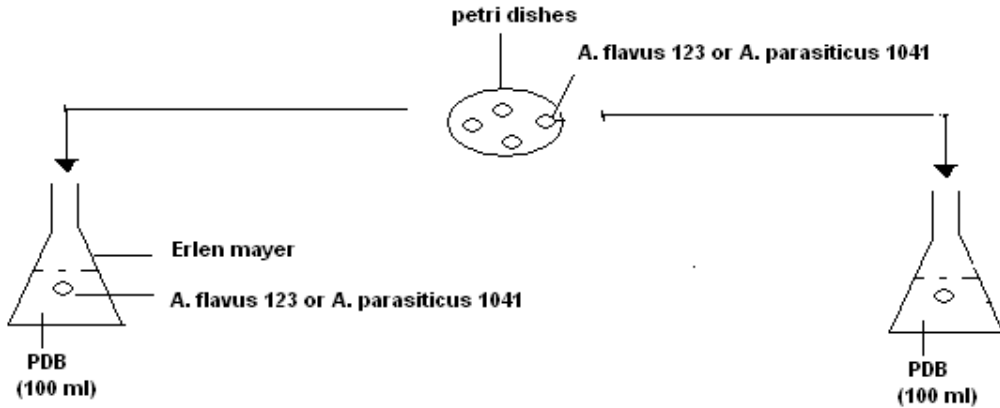


Şekil 3.20. Kırmızı biber aflatoksin analizi akım şeması (orjinal)

3.2.6. UV-C Işınının *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un Aflatoksijenik Suşları Üzerine Antifungal Etkisi

UV uygulaması ile hem aflatoksijenik küf suşları üzerinde oluşan stresin hem de proteolitik aktivitedeki değişimin değerlendirilebilmesi için 15 günlük bir çalışma programı hazırlandı. Bu programa göre;

A. flavus 123 ve *A. parasiticus* 1041 küf suşları öze ile 9 ml'lik dilisyona (peptonlu su) alındı. Bu dilisyonlar vortekslendi ve içerisinden 400 µl çekilip yayma yöntemi ile petrilere ekim gerçekleştirildi. Bu şekilde her petride eşit oranda küf geliştirilmeye çalışıldı. 3 gün süre ile gelişen bu petrilereki küflerden eşit oranlarda kesilip (1 cm çaplı daireler), bu daireler 100 ml PDB içeren erlenlere koyuldu (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. PDB ortamına küf suşlarının aşılması

A. flavus ve *A. parasiticus* içeren şekildeki erlenlerden 4'er tekerrür hazırlandı. Bu erlenlerde küf örnekleri 7 gün 25 °C' de inkübasyona bırakıldı. Gelişen *A. flavus* 123 ve *A. parasiticus* 1041 suşları kontrol grubu hariç 48 saat arayla UV muamelesine alındılar. Aynı örneklerden 24 saat arayla 1'er ml alınarak mikrobiyal ekim yapıldı. Bu şekilde UV' nin aflatoksijenik küf suşları üzerine etkisi ml'deki koloni sayısındaki azalma ile tespit edildi. Yine 24 saat arayla alınan 1'er ml örnekler aflatoksin analizi için ayrıldı. Uygulanan programın daha iyi anlaşılabilmesi için aşamalar Çizelge 3.2'de detaylı bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 3.2. Aflatoksijenik küf suşları üzerine UV-C uygulama programı

	7. GÜN (PZT)	8. GÜN (SALI)	9. GÜN (ÇRŞM)	10. GÜN (PRŞM)	11. GÜN (CUMA)	12. GÜN (CMTS)	13. GÜN (PAZAR)	14. GÜN (PZT)	15. GÜN (SALI)
Kontrol (AFK&APK)	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	-	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)
1 nolu örnek (AF1&AP1)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	-	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)
2 nolu örnek (AF2&AP2)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	-	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)
3 nolu örnek (AF3&AP3)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	-	Uygulama yok	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)
4 nolu örnek (AF4&AP4)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)	-	2 saat UV	Aflatoksin analizi (1 ml) ve ekim (1 ml)

15 günlük uygulama sonrası her örnekten erlenlerde kalanlar tülde geçirilerek süzüldü. Bu şekilde küflerin oluşturduğu katı partiküller tülde kalırken misellerin sıvı PDB içerisinde kalması sağlandı. Ardından diyaliz işlemi uygulandı.

3.2.7. Diyaliz

Protein çözeltilerindeki tuzların uzaklaştırılmasında veya çözelti tamponunun değiştirilmesinde çoğunlukla diyaliz işlemi uygulanır. Bu işlem için özel imal edilmiş, genellikle selüloz asetatından yapılmış, gözenekli ve küçük molekülleri geçiren ancak büyük molekülleri geçirmeyen yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası kullanılır. Protein çözeltisi bu diyaliz torbasına koyulur. Protein aktivitesindeki kaybı en aza indirebilmek için diyaliz +4°C’de gece boyunca yapılır (Yıldırım vd., 2007).

Denememizde diyaliz torbaları soğuk su ile yumuşatılıp içlerine yaklaşık 35 ml olan örnekler koyuldu. Diyaliz torbası içindeki örnekler pH 6.8 olarak ayarlanmış 1 mM Tris-HCl çözeltisi içerisinde, +4°C’de çalkalayıcı inkübatörde bir gece diyalize bırakıldı (Şekil 3.22).



a

b

Şekil 3.22. a-b. Aflatoksijenik küf suslarına diyaliz uygulaması

3.2.8. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon kısa anlatımla dondurarak kurutma işlemidir. Örneklerin uzun süre saklanması hem kapladığı hacim açısından hem de dayanıklılığının artması açısından kolaylık sağlar. Yaptığımız ön denemelerde protein miktarındaki azlık jelde net sonuç almamıza neden olmuştu. Bu sorunu gidermek amacıyla, diyaliz sonrası örnekler geniş yüzey alanı sağlamak için petriyeler içerisine alınarak -20°C’ de bir gece bekletilip ertesi gün soğuk zincir kırılmadan liyofilizasyona alındı. Örnekler yaklaşık 12 sa liyofilize edildi ve miktarları 1 ml’ye kadar indi. Fungusların ekstrasellüler protein yapılarındaki değişikliğin tespit edilmesi için SDS-PAGE yapıldı.

3.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

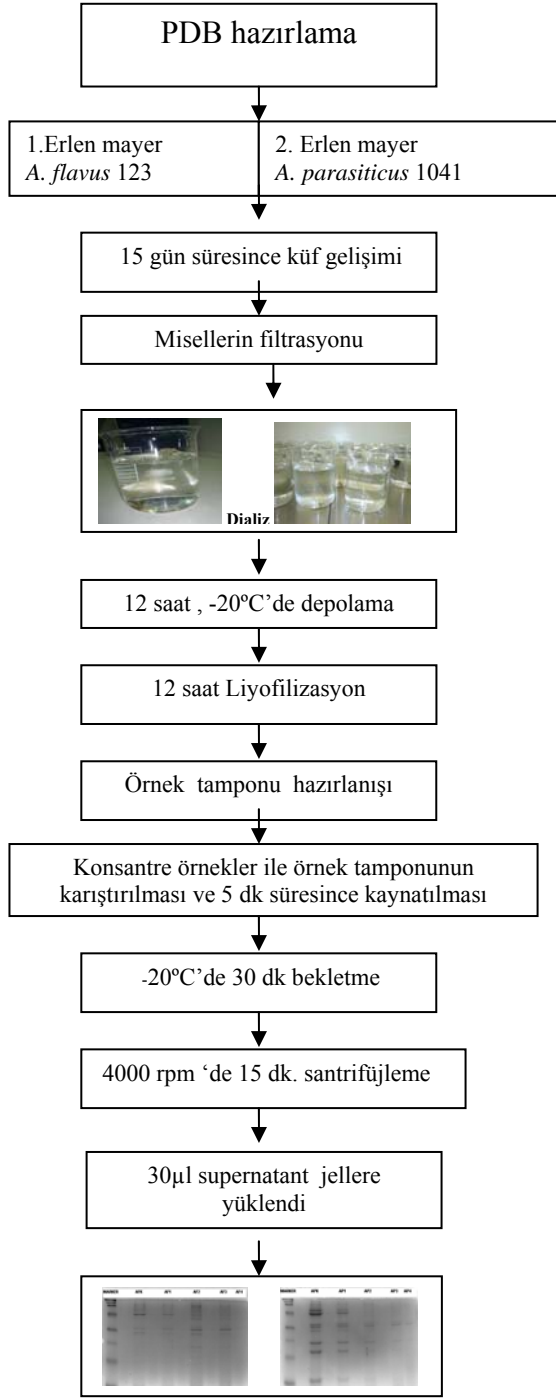
Aşamalı UV uygulamada hazırlanan liyofilize edilmiş örnekler için örnek tamponu hazırlandı.

Örnek Tamponu Hazırlanışı :

• Deiyonize su	3.8 ml
• 0.5 M Tris-HCl , pH 6.8	1.0 ml
• Gliserol	0.8 ml
• % 10 (ağırlık/hacim) SDS	1.6 ml
• 2- mercaptoethanol	0.4 ml
• 1% (ağırlık/hacim) bromofenol blue	<u>0.4 ml</u>
	8.0 ml

Öncelikle örnek tamponu ve örnek miktarının hangi oranlarda hazırlanacağını belirlemek için literatürler ışığında denemeler yapıldı. Denemelerde jelde en net sonucu veren oran; örnek tamponu/örnek miktarı (10/45) olarak tesbit edildi. Bu sonuçlara göre liyofilize *A. flavus* 123 ve *A. parasiticus* 1041 örneklerinin 45µl'sine 10µl örnek tamponu eklendi. Bu karışımlar vortekslenip 5 dk süresince kaynatıldılar. Ardından 30 dk -20°C' de bekletilip tekrar vortekslandılar. Son olarak 4000 rpm' de 15 dk. santrifüjlandılar. Süpernatant kısımlardan 30µl alınıp kuyulara yüklendi.

SDS-PAGE Laemmli (1970)'nin metoduna göre yapıldı. Bio-Rad elektrofrez sistemi kullanılarak yığıma jeli (stacking gel) %5'lik, ayırma jeli (seperating gel) %15'lik hazırlandı ve elektrofrez işlemi 80 voltta 3 sa boyunca gerçekleştirildi ve commesie brillant blue boyası ile 1 gece boyunca boyandı. Ertesi gün 1/4/5 oranında metanol/asetik asit/saf su içeren çözücü içinde boyası akıncaya kadar bekletildi. Bu şekilde farklı UV uygulama süreçlerinde fungal suşların protein yapılarında meydana gelen değişim ve molekül ağırlıklarındaki farklılık tespit edilmiş oldu (Şekil 3.26).



Şekil 3.23. Aflatoksijenik küf suşlarının SDS-PAGE için hazırlanma aşamaları

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Fındık ve Kırmızı Biber Örneklerinde Aflatoksin Analizi Sonuçları

Çizelge 4.1. Türkiye’de farklı şehirlerden toplanan fındıkların aflatoksin seviyeleri (ng/g)

Örnek no.	Şehir	Kaynak	Örnek Ağırlığı (g)	AFB1 (ng/g)	AFB2 (ng/g)	AFG1 (ng/g)	AFG2 (ng/g)	Toplam AFs (ng/g)
Fındık – 1	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 2	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 3	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 4	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 5	İzmir	Pazar	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 6	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 7	İzmir	Pazar	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 8	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 9	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 10	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık – 11	İzmir	Pazar	10	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Fındık – 12	İzmir	Pazar	10	<LOD	<LOD	0,0476	<LOD	0,0476
Fındık – 13	İzmir	Pazar	10	0,0117	<LOD	<LOQ	<LOD	0,117
Fındık – 14	Antalya	Kuruyemişçi	10	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Fındık- 15	Antalya	Kuruyemişçi	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 16	Antalya	Kuruyemişçi	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 17	Antalya	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 18	Antalya	Kuruyemişçi	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 19	Antalya	Kuruyemişçi	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 20	Antalya	Kuruyemişçi	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 21	Burdur	Kuruyemişçi	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 22	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 23	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 24	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 25	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 26	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 27	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 28	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 29	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 30	Isparta	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 31	Isparta	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 32	Isparta	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Çizelge 4.1. (devam)

Örnek no.	Şehir	Kaynak	Örnek Ağırlığı (g)	AFB1 (ng/g)	AFB2 (ng/g)	AFG1 (ng/g)	AFG2 (ng/g)	Toplam AFs (ng/g)
Fındık- 33	Isparta	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
Fındık- 34	Isparta	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	0,0094	0,0094
Fındık- 35	Isparta	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 36	Isparta	Tarla	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 37	Burdur	Pazar	10	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
Fındık- 38	Isparta	Tarla	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 39	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	0,0161	<LOD	0,0161
Fındık- 40	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 41	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 42	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 43	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 44	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 45	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 46	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 47	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 48	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 49	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 50	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 51	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 52	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 53	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 54	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 55	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 56	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 57	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 58	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 59	Ankara	Tarla	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 60	Ankara	Kuruyemişi	10	0,0117	<LOD	<LOQ	<LOD	0,0117
Fındık- 61	Ankara	Kuruyemişi	10	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Fındık- 62	Ankara	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 63	Ankara	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fındık- 64	Ankara	Pazar	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Çizelge 4.1’de, AFs; Aflatoksin, AFB1; Aflatoksin B1, AFB2; Aflatoksin B2, AFG1; Aflatoksin G1, AFG2; Aflatoksin G2, LOD; tespit edilebilir değer, LOQ; belirlenebilirlik sınırı olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere 64 fındık örneğinin hiç birinde AB ülkeleri tarafından belirlenen ve 4 ng/g olan limit aşılmamıştır. Bu sonuçlar fındıklardaki aflatoksin sorununun giderilmeye başladığının göstergesi olarak tarafımızca yorumlanmıştır.

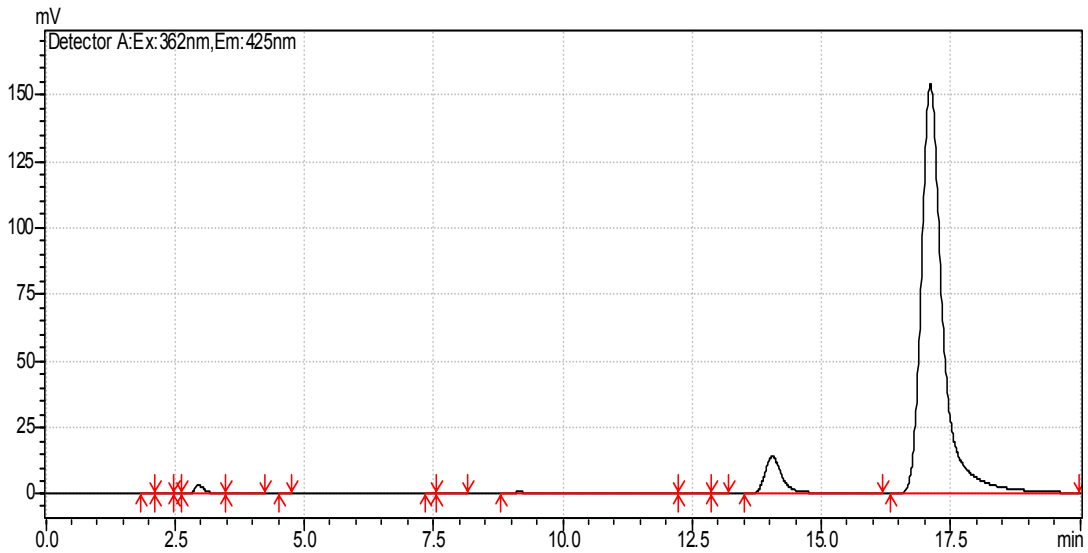
Çizelge 4.2. Türkiye’de farklı şehirlerden toplanan kırmızı biberlerin aflatoksin seviyeleri (ng/g)

	Şehir	Kaynak	Afatoksin B1 (ng/g)	Afatoksin B2 (ng/g)	Afatoksin G1(ng/g)	Afatoksin G2(ng/g)	Total Aflatoksin (ng/g)
1	Kahramanmaraş	Pazar	0.135	<LOD	<LOD	<LOD	0.135
2	Kahramanmaraş	Pazar	6.210	0.369	<LOD	<LOD	6.579
3	Kahramanmaraş	Pazar	3.150	0.144	<LOD	<LOD	3.294
4	Kahramanmaraş	Pazar	0.171	0.036	<LOD	<LOD	0.207
5	Kahramanmaraş	Pazar	7.200	0.279	<LOD	<LOD	7.479
6	Kahramanmaraş	Pazar	12.600	0.774	<LOD	<LOD	13.374
7	Antalya	Baharatçı	80.457	3.679	0.334	<LOD	84.476
8	İzmir	Baharatçı	54.678	2.752	0.938	<LOD	58.368
9	İzmir	Baharatçı	40.119	1.963	0.255	<LOD	42.337
10	İzmir	Baharatçı	14.56	0.63	34.67	1.96	51.82
11	Antalya	Baharatçı	0.96	<LOD	<LOD	0.32	1.28
12	İzmir	Baharatçı	10.471	0.409	0.299	<LOD	11.179
13	Antalya	Baharatçı	5.47	0.17	0.14	0.06	5.84
14	Antalya	Baharatçı	17.09	0.41	18.11	0.26	35.87
15	Antalya	Baharatçı	0.96	<LOD	<LOD	<LOD	0.96
16	Antalya	Baharatçı	7.86	0.45	1.14	0.21	9.66
17	Antalya	Baharatçı	285.55	15.14	0.64	<LOD	301.33
18	İsparta	Baharatçı	3.18	0.24	2.41	0.25	6.08
19	İsparta	Baharatçı	13.55	0.92	0.84	0.13	15.44
21	Kahramanmaraş	Fabrika	0,05	<LOD	<LOD	<LOD	0,05
22	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
23	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
24	Kahramanmaraş	Fabrika	0,09	<LOD	0,31	0,06	0,46
25	Kahramanmaraş	Fabrika	0,08	<LOD	<LOD	<LOD	0,08
26	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
27	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
28	Kahramanmaraş	Fabrika	2,01	0,98	<LOD	<LOD	2,99
29	Kahramanmaraş	Fabrika	3,00	0,11	<LOD	<LOD	3,11
30	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
31	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
32	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
33	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
34	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
35	Kahramanmaraş	Fabrika	0,11	0,08	<LOD	<LOD	0,19
36	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
37	Kahramanmaraş	Fabrika	1,16	0,87	<LOD	<LOD	2,03
38	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
39	Kahramanmaraş	Fabrika	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
40	Kahramanmaraş	Fabrika	0,49	0,15	<LOD	<LOD	0,64
41	Kahramanmaraş	Pazar	23,03	2,71	1,34	0,13	27,21
42	Kahramanmaraş	Pazar	4,49	0,13	0,26	<LOD	4,88
43	Kahramanmaraş	Pazar	12,83	0,41	4,85	0,13	18,22
44	Kahramanmaraş	Pazar	4,66	0,16	0,28	<LOD	5,1
45	Kahramanmaraş	Pazar	15,83	1,76	0,31	<LOD	17,9
46	Kahramanmaraş	Pazar	21,70	1,48	1,19	<LOD	24,37
47	Kahramanmaraş	Pazar	23,58	1,72	7,02	<LOD	33,32
48	Kahramanmaraş	Pazar	25,95	2,06	1,89	<LOD	29,9
49	Kahramanmaraş	Pazar	33,80	3,53	2,75	<LOD	40,08

Çizelge 4.2. (devam)

	Şehir	Kaynak	Afatoxin B1 (ng/g)	Afatoxin B2 (ng/g)	Afatoxin G1(ng/g)	Afatoxin G2(ng/g)	Total Afatoxin (ng/g)
50	Diyarbakır	Baharatçı	7,37	0,42	0,48	<LOD	8,27
51	Diyarbakır	Baharatçı	196,90	11,13	34,81	1,57	244,41
52	Diyarbakır	Baharatçı	2,36	0,56	0,53	<LOD	3,45
53	Diyarbakır	Baharatçı	1,94	0,88	0,11	<LOD	2,93
54	Diyarbakır	Baharatçı	26,69	2,73	0,78	0,16	30,2
55	Diyarbakır	Baharatçı	39,22	3,72	1,02	<LOD	43,96
56	Erzurum	Baharatçı	2,10	0,12	0,27	<LOD	2,49
57	Erzurum	Baharatçı	3,06	0,13	0,43	<LOD	3,62
58	Antalya	Baharatçı	69,93	4,66	9,02	0,46	83,61
59	Kahramanmaraş	Pazar	32,54	2,67	0,96	<LOD	36,17
60	Hatay	Pazar	58,72	3,69	0,40	<LOD	59,54
61	Hatay	Pazar	7,28	0,42	0,40	<LOD	8,1
62	Kahramanmaraş	Fabrika	5,82	0,28	0,36	<LOD	6,46

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere 62 kırmızı biber örneğinin 30’u AB ülkeleri tarafından kabul edilebilir limit olan 4 ng/g değerinin üzerinde bir değerdedir. 17 örnek ise ülkemizde Tarım Bakanlığı tarafından limit değer olarak belirlenmiş 20 ng/g değerinin üzerinde aflatoksin sahtiptir. Bununla birlikte 301,33 ng/g aflatoksin içeren kırmızı biberlerde analizi yapılan örnekler arasında yer almaktadır.



Şekil 4.1. Aflatoksin içeren bir kırmızı biberin HPLC cihazında verdiği piklerin görünümü

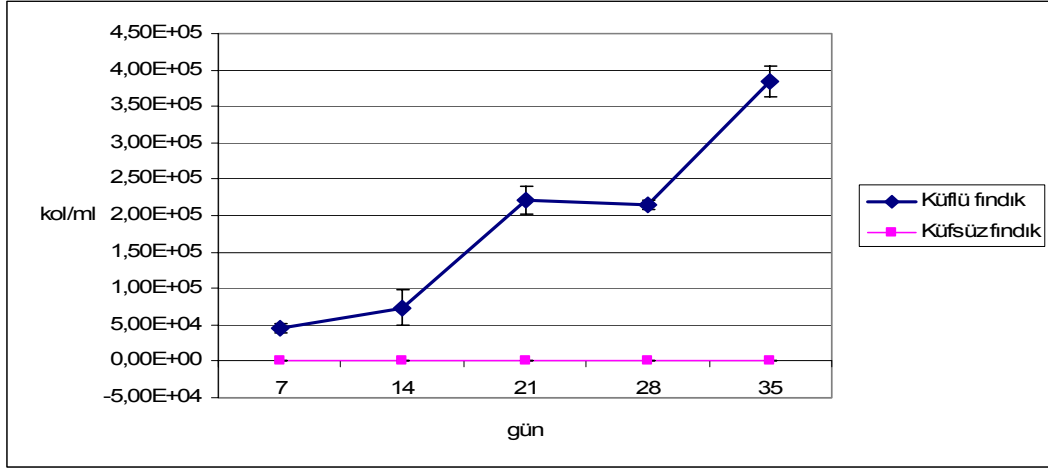
Yaptığımız bu ön çalışmada, ülkemizdeki kırmızı biberlerin aflatoksin açısından durumunun fındığa göre çok daha vahim olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle alınması gereken önlemler yetkili kuruluşlar ve araştırmacılarla yapılan ortak çalışmalarla belirlenmeli ve üreticiye anlatılmalı, dahası alınan kararların yaptırımını sağlanmalıdır.

Nitekim örnek toplamak ve üreticiyle sorunun nedenini net bir şekilde tartışmak için yaptığımız Maraş seyahatinde Tarım Bakanlığı tarafından yapılan denetimlerin arttığı, bu sebeple uygunsuz üretimin ve depolamanın yapıldığı bir çok iş yerinin kapatıldığı saptanmıştır. Bu sorunun temel nedenlerinden biri olan toprakta güneşlendirerek kurutma işlemi üreticiye maliyeti az geldiğinden cazip görünmekte, bu sebeple fırınla hızlı kurutma uygulanan işletme sayısı kısıtlı kalmaktadır.

Üretim koşullarının ardından aflatoksin oluşumunda önemli diğer bir etkense depolama koşullarıdır. Örneklerin toplandığı dönem mayıs ayı ve toplanan iller arasında Antalya ve İzmir gibi nem oranı ve sıcaklık dereceleri yüksek iller bulunmasına rağmen baharatçılarda karşılaşılan ortak sorun kırmızı biberin açık bir şekilde oda koşullarında satışı olarak tespit edilmiştir. Bu sorunun giderilmesi denetimlerin ve yaptırımların artırılmasıyla mümkün olacaktır.

4.2. Fındıklarda *A. parasiticus*'un Gelişim Eğrisi

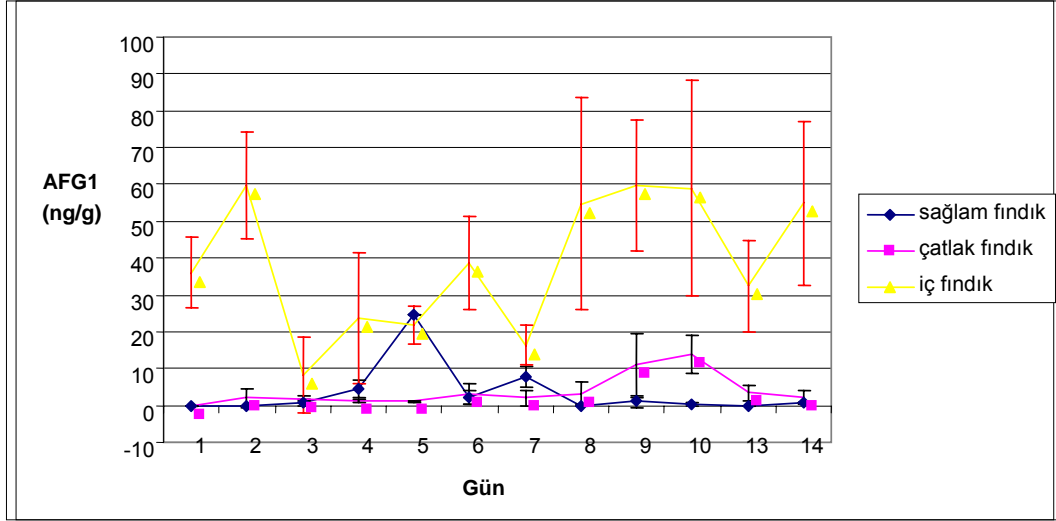
Kabuklu fındıkta ön çalışma olarak yapılan bu denemede bir ay boyunca bir haftalık periyotlarda küf gelişimi üçer tekerrürlü olarak incelenmiş ve bu süreçteki sonuçlar 3. hafta ile 4. hafta arasında küf gelişiminde bir durağanlık olduğunu göstermiş son hafta ise küf miktarındaki artış devam etmiştir (Şekil 4.2). Kabuklu fındık üzerinde yaptığımız bu deneme ile küf artışının hızlı olup, 4,65 log kob/ml'den 5,34 log kob/ml'ye çıktığı ilk üç haftalık süreç göz önünde bulundurularak bir sonraki denemeye geçilmiştir.



Şekil 4.2. Fındıklarda *A. parasiticus*'un gelişim süreci (kob/ml)

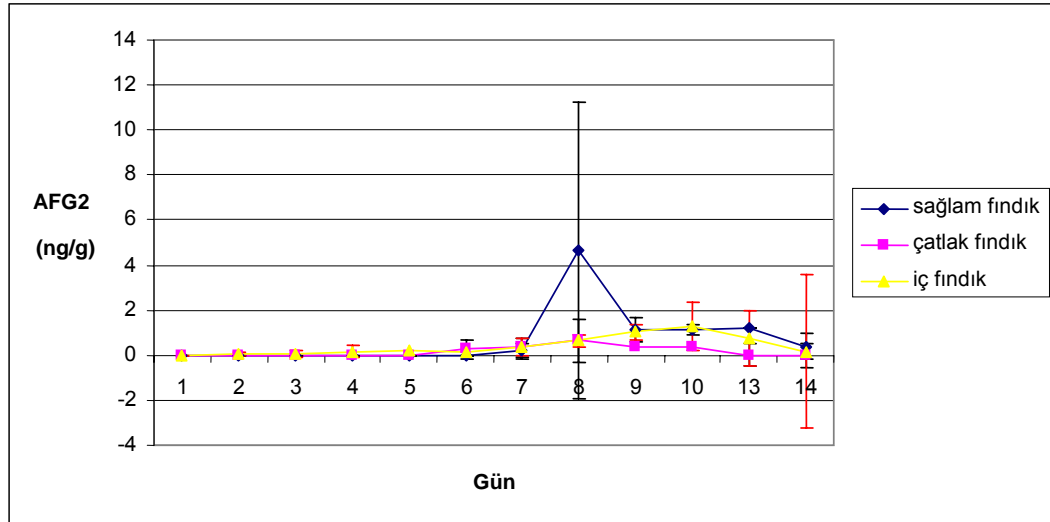
4.3. Kabuklu, Çatlak ve İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Günlük Değişimlerin Tahribatsız Yöntemle Tespiti

Şekil 4.3.'e bakıldığında ve iç fındıktaki AFG1 miktarının günlere dağılımı incelendiğinde çatlak ve sağlam fındığa nazaran miktarın yüksek olduğu ve 2. günde 60 ng/g mertebesine kadar ulaştığı bununla birlikte sağlam ve çatlak fındıkta maksimum AFG1 seviyesinin 25 ng/g olduğu görülmektedir. Sağlam ve çatlak fındıklarda kıyaslama yapıldığında ise en küçük AFG1 değerlerinin sağlam fındıkta ve tespit edilebilir değerin altında olduğu görülmektedir. 7. gün ise sağlam kabuklu, çatlak ve iç fındıktaki AFG1 değerlerinin birbirine en yakın olduğu zaman olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFG1 değişimi

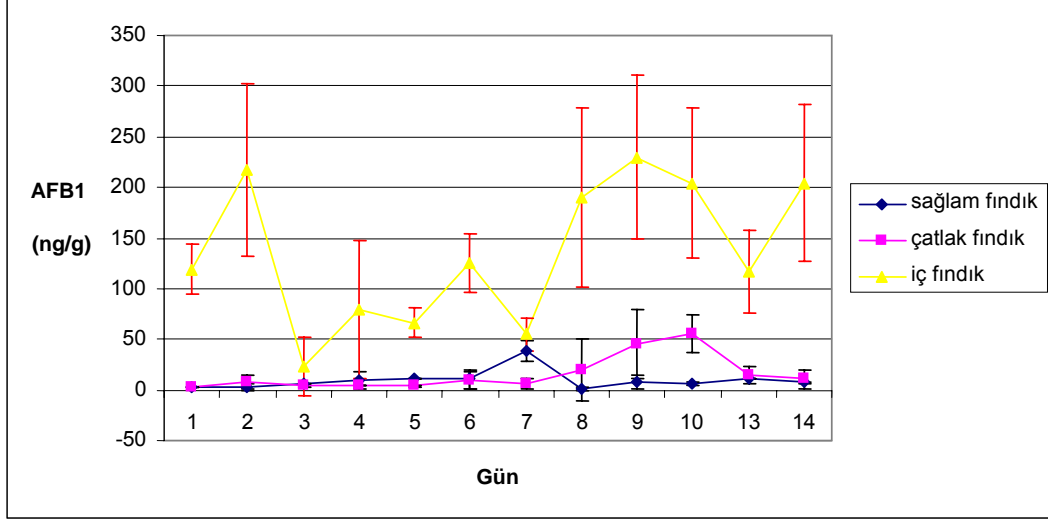
AFG2 değerleri Şekil 4.4.' de görüldüğü gibi 5 ng/g değerinin altında tespit edilmiştir. En yüksek AFG2 değerine ise 4.8 ng/g değeri ile sağlam fındıkta 8. günde rastlanmıştır. AFG2 değerlerinin AFB1 ve AFG1'e oranla çok düşük çıkması sebebiyle bu değerler hesaplamalarda belirleyici bir etkiye neden olmamıştır.



Şekil 4.4. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFG2 değişimi

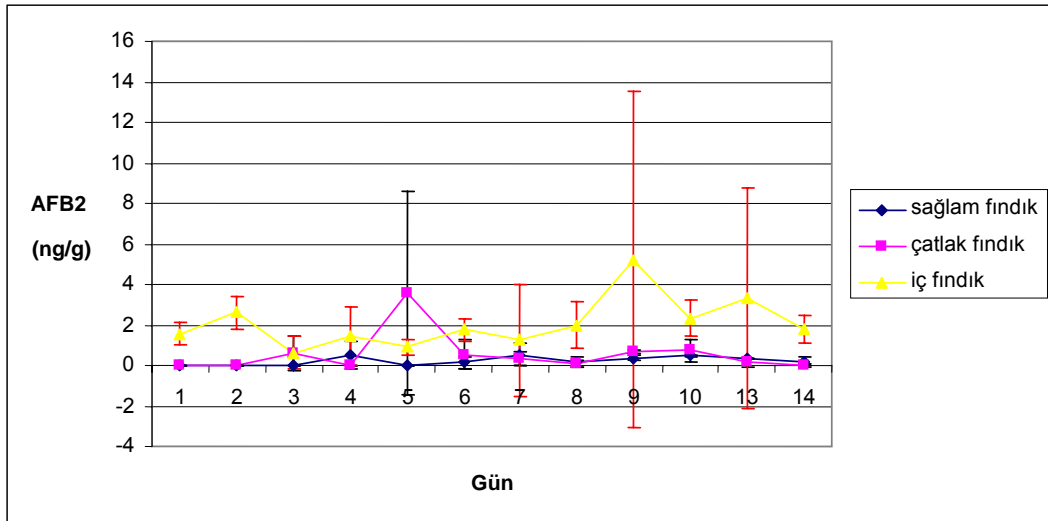
Şekil 4.5'de AFB1 değerleri AFG1 değerleri ile paralellik göstermekte ancak toksik miktar bakımından AFG1 değerlerinin yaklaşık üç katı ölçüm sonucu vermektedir. İç fındıktaki maksimum AFB1 miktarı olan 215,7 ng/g değerine AFG1'de olduğu gibi

2. günde ulaşılmış, 7. günde ise sağlam kabuklu fındıktaki AFB1 değerine yaklaşık bir değer saptanmıştır.



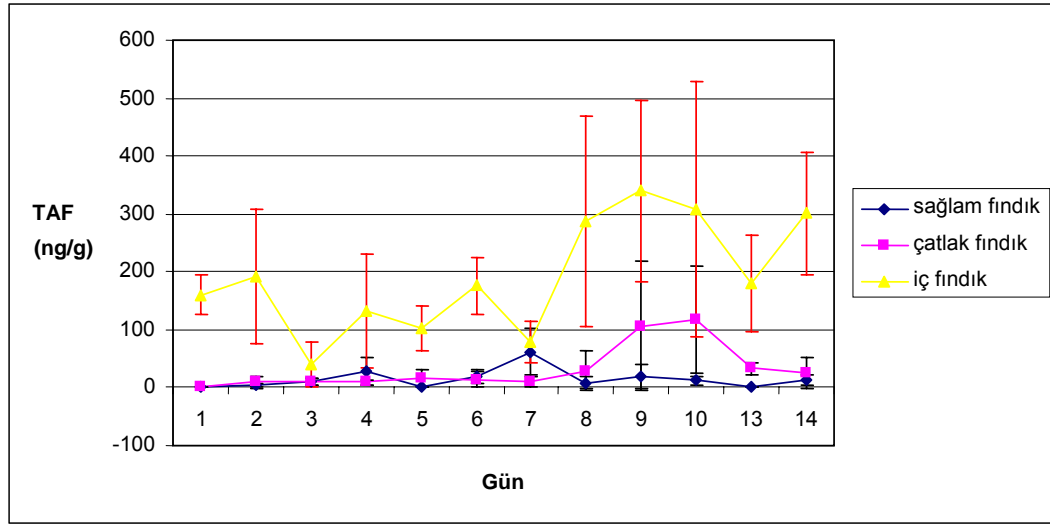
Şekil 4.5. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFB1 değişimi

AFB2 değerleri tüm fındık çeşitlerinde 6 ng/g değerinin altında tespit edilmiş ve AFG2'de olduğu gibi analiz sonuçlarında belirleyici olmamıştır. Bununla birlikte Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi en yüksek değerlere iç fındıkta 9. gün ve çatlak fındıkta 5. gün rastlanmıştır.



Şekil 4.6. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük AFB2 değişimi

Şekil 4.7.'te toplam aflatoksin değerlerine bakıldığında ise sonuçlar AFB1 ve AFG1 değerleri ile paralellik göstermektedir. Tüm günlere bakıldığında en yüksek aflatoksin seviyesine 306,72 ng/g ile iç fındıkta ulaşılmakta, üç grubun aflatoksin miktarlarının birbirlerine en yakın olduğu gün ise 7. gün olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.5.'te de görüldüğü gibi aflatoksin seviyelerinde çok dik iniş-çıkışlar dikkati çekmektedir. Bu noktada sonuçlarımızı literatürle kıyasladık. Fındık üzerine yapılmış benzer bir denemede belirli periyotlarda (5, 9, 18, 28, 35 ve 45. günlerde), üç farklı nem oranında (%85, %90, %98) fındıklar muhafaza edilmiş, belirlenen süreler sonunda fındıklar aflatoksin analizine alınmış ve sonuçlar nem oranları ve günlere göre karşılaştırılmıştır (Şimşek vd., 2002).



Şekil 4.7. Sağlam, çatlak ve iç fındıkta günlük toplam aflatoksin (TAF) değişimi

Çizelge 4.3. Farklı nem oranlarında depolama sonucu aflatoksin miktarındaki periyodik değişim (Şimşek vd., 2002).

Günler	Nem Oranı %	B1	B2	G1	G2	Toplam (ng/g)
5	85	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-
	98	5.5	-	7.2	-	10.7
9	85	-	-	-	-	-
	90	23.5	7.0	45.3	-	75.8
	98	50.5	15.2	81.3	11.1	158.1
18	85	-	-	-	-	-
	90	252.3	42.5	381.7	50.5	727.0
	98	310.2	52.4	409.8	132.2	904.6
28	85	4.6	-	6.5	-	11.1
	90	241.0	24.7	320.0	52.5	638.2
	98	316.7	31.5	415.4	57.8	821.4
35	85	-	-	-	-	-
	90	135.9	10.9	220.1	19.6	386.5
	98	197.3	45.1	380.0	48.5	670.9
45	85	-	-	-	-	-
	90	92.5	11.9	127.0	21.4	252.8
	98	105.2	21.3	205.7	32.4	364.6

Bu araştırmada dikkatimizi çeken ve bizi ilgilendiren nokta aflatoksin seviyelerinde düzenli bir artışın olmayışıdır. % 90 nemli ortamda muhafaza edilen örneğin aflatoksin miktarına bakıldığında 5. günde aflatoksin tespit edilememiş, 9. günde 75 ng/g, 18. günde 727 ng/g, 28. günde 638 ng/g, 35. günde 386,5 ng/g ve 45. günde 252,8 ng/g toplam aflatoksine rastlanmıştır. Yine benzer şekilde % 98 nem oranında da aflatoksin miktarında iniş çıkışlar görülmektedir.

Bu hızlı değişimler inokülasyondaki hatalardan kaynaklanabileceği gibi farklı fındıklar üzerindeki aflatoksin miktarındaki artışın da kontrol edilememesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Aflatoksinin zaman içinde bozunup bozunmayacağı ise sonraki çalışmalarımızda araştırılması düşünülen bir konudur. Bununla birlikte analiz sonuçlarımız bize iç fındıktaki toplam aflatoksin miktarındaki artışın en fazla olduğunu ve bunu takiben çatlak ve sağlam kabuklu fındığın geldiğini göstermektedir. Bu da bize fındık kabuğunun koruyucu etkisini net bir şekilde göstermektedir.

Bu verilerin ışığında çatlak ve içi boş fındık tanelerinin ses ve görüntülemeye dayalı sistemlerle toplam üründen ayrılmasının aflatoksin seviyesini düşüreceği tespit

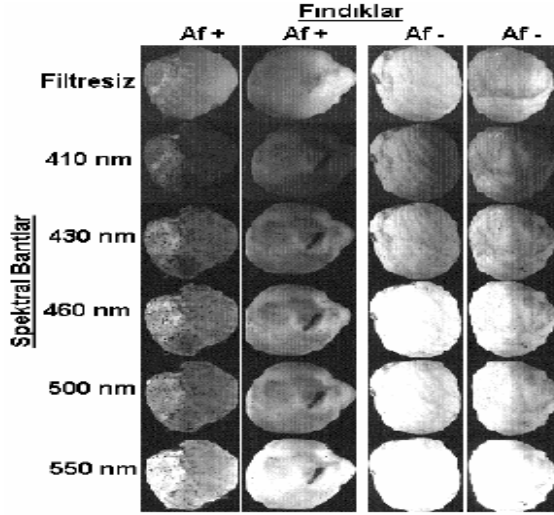
edilmiştir. Ancak bu denememizde aflatoksin analizleriyle eş zamanlı olarak yapılan hiperspektral görüntü alımı sırasında fındıkların yüzeyinde bulunan kahverengi zarın kapalı görüntüleme düzeneği içinde UV-A ışınının neden olduğu ısı ile çatlaması ve bu çatlakların görüntülerde ışınma şeklinde görülmesi algoritmik hesaplamalarda ekibimiz için olumsuz etki yaratmıştır. Bu sebeple bir sonraki çalışmamızda fındık yüzeyindeki zardan kurtulmak için kavurma işlemi uygulanmıştır.

Bu çalışmada aflatoksin analizi sonuçlarıyla yaptığımız değerlendirme bizi çalışmanın devamında iç fındıkla çalışmaya yönlendirmiştir.

4.4. Kavrulmuş İç Fındıkta Aflatoksin Miktarındaki Değişimin İnkübasyon Süreci Sonunda Tahribatsız Yöntemle Tespiti

Bu denemede 18 gün süreyle 25°C’de ve % 90 nemli ortamda muhafaza edilen, hem steril suya daldırılmış kontrol grubunda (kendi florasından kaynaklanan) hem de kontamine edilmiş örneklerde küf gelişimi fazla olmuş bu sebeple bu örnekler görüntü alımı ve aflatoksin analizi için kullanılmamışlardır. Bunun dışında kalan 3 grup; 9 günlük kontamine edilmiş ve kontamine olmayan fındık örnekleri ve inkübasyon yapılmamış-temiz-kavrulmuş fındık örnekleri görüntüleme ve aflatoksin analizinde kullanılmışlardır.

Denemede 106 adet aflatoksinsiz, 57 adette aflatoksinli fındık kullanılmıştır. Yapılan analizler neticesinde küfe bulaştırılan fındıklarda aflatoksin miktarı 2500–4200 ng/g aralığında değişirken küfe bulaştırılmadan nemli ortamda bekletilen fındıklarda ise bu rakam yine standartların üstünde olan 9-185 ng/g aralığındadır. Bu durumda ilk iki grup birleştirilerek “aflatoksinli” grup oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki fındıklar ise aflatoksinsiz fındık grubu olarak belirlenmiştir. Aflatoksinli ve aflatoksinsizler sınıfından rastgele seçilmiş ikişer adet fındık örneğine ait bazı multispektral görüntüler Şekil 4.8’de verilmiştir (Kalkan ve Yardımcı, 2008).



Şekil 4.8. Aflatoksinli (Af+) ve aflatoksinsiz (Af-) fındıkların değişik dalga boylarındaki görüntüsü

Bu ön denemeler neticesinde beklenen UV-A ışını altında aflatoksin tespiti yapılamadı. Böylelikle direkt olarak tahribatsız ve hızlı yöntemle 410-550 nm aralığında aflatoksin içeren ve içermeyen iç fındıklar belirlenemedi. Ancak multispektral görüntüler kullanılarak aflatoksin üretimi yapan küf hifleri belirlenebildi. Bununla birlikte aflatoksin analizi sonuçları görüntülerde daha koyu görünen yani üzerinde daha çok küf bulunan fındıkların aflatoksin seviyelerinin fazla olduğunu göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar neticesinde 450-550 nm arasındaki spektral bantların küflü ve küfsüz fındık sınıflandırması açısından önemli bilgiler taşıdığı görüldü. Bu sebeple endüstride yalnız bu aralıktaki bantların kullanımı tavsiye edilebilir. Doğrusal sınıflandırıcı ile yapılan sınıflandırmada fındıklar % 97.5'lik bir doğru sınıflandırma oranı ile fındıklar sınıflandırılabilir. Spektral bantlarda elde edilecek özneliliklerin çeşitlendirilmesinin, yani fındık üzerindeki farklılıkların görüntüleme sistemiyle daha iyi algılanması için farklı verilerin girilmesinin (f değerlerinin çoğaltılmasının) sınıflandırma doğruluğunu artıracakı düşünülmektedir.

Özet olarak, yapılan çalışma ile fındıkta kimyasal yöntemlerde tespit edilen aflatoksin içeriğinin yüzeydeki küf miktarının belirlenmesine bağlı olarak tahribatsız yöntemlerle hızlı ve düşük maliyetli olarak belirlenebileceği tespit edilmiştir. Bununla beraber yüzeydeki küf aflatoksijenik suşlar içermeyebilecektir. Ancak

sonuçta küflenmiş bir ürünün toplam üründen ayrılması yine de insan sağlığı açısından ve sağlam fındık tanelerinin korunması açısından faydalı olacağından olumlu sonuç getirecektir.

4.5. Kırmızı Pul Biberin Tahribatsız Yöntemle Tespiti

14 kırmızı biber örneğinde yapılan aflatoksin analizinde 0,13 ng/g ile 84,47 ng/g arasında aflatoksin tespit edildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İncelenen örneklerin AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 ve toplam aflatoksin miktarları (ng/g)

	Örnek kaynağı	Afatoksin B1(ng/g)	Afatoksin B2(ng/g)	Afatoksin G1(ng/g)	Afatoksin G2(ng/g)	Toplam Afatoksin (ng/g)
1	Kahramanmaraş	0,135	<LOD	<LOD	<LOD	0,135
2	Kahramanmaraş	<LOD	<LOD	0,07	0,11	0,18
3	Kahramanmaraş	<LOD	<LOD	0,05	0,49	0,54
4	Kahramanmaraş	0,92	<LOD	<LOD	<LOD	0,92
5	Kahramanmaraş	<LOD	0,11	0,66	1,94	2,71
6	Kahramanmaraş	3,150	0,144	<LOD	<LOD	3,29
7	Kahramanmaraş	6,210	0,369	<LOD	<LOD	6,58
8	Kahramanmaraş	7,200	0,279	<LOD	<LOD	7,479
9	Hatay	10,47	0,41	0,29	<LOD	11,18
10	Kahramanmaraş	12,60	0,774	<LOD	<LOD	13,37
11	Kahramanmaraş	40,119	1,963	0,255	<LOD	42,33
12	İzmir	15,36	0,63	36,67	1,96	54,60
13	İzmir	54,678	2,752	0,94	<LOD	58,37
14	Hatay	80,46	3,68	0,33	<LOD	84,47

Aflatoksin ürettiğini bildiğimiz *Aspergillus* küf suşlarının biber yüzeyinde oluşturacağını düşündüğümüz ışımaya varlığının tespiti için Kahramanmaraş başta olmak üzere İzmir ve Hatay'dan toplanan 14 örnek ODTÜ Enformatik Enstitüsünde araştırma grubumuz tarafından geliştirilen özgün hiperspektral sınıflandırma algoritmaları ile incelenmiş ve beklenildiği gibi biber yüzeyinde renk değişimlerine rastlanmıştır. Görüntü alımının ardından yapılan aflatoksin analizi sonucu aflatoksinli çıkan örneklerle aflatoksinsiz çıkan örneklerin görüntüleri özgün hiperspektral sınıflandırma algoritmalarının, yüksek başarımla sağladığı gözlemlenmiştir. Çıkan olumlu sonuçlar XII. Uluslar arası IUPAC mikotoksin ve fikotoksin sempozyumunda sunulmuştur (Kalkan vd., 2007).

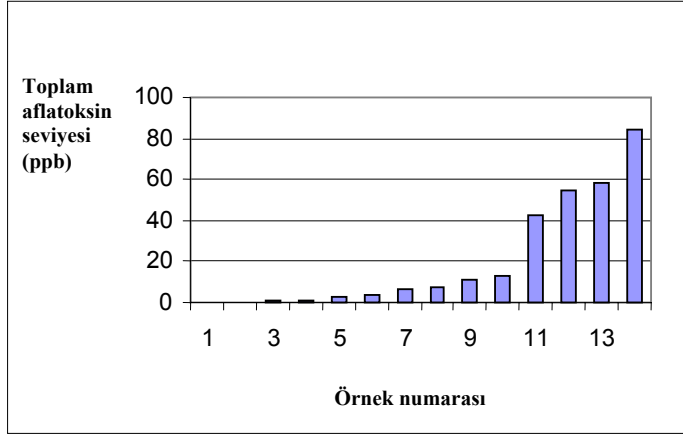
Çizelge 4.5’de verilen bölgesel özellik hatalarını belirlemek için biber görüntüsü küçük pencerelere bölünmüş ve her pencere için ortalama piksel değeri hesaplanmıştır. Genel özellik görüntüsünde ise biber görüntüsü pencerelere bölünmeden ortalama piksel değeri hesaplandı. Buna göre görüntüleme sistemine görüntülediği şeyin ne olduğu 11 yoldan anlatıldı. Daha sonra bu anlatımlar silinerek sisteme önceden anlatılan veriler soruldu. Sistemin bu sorulardaki hata payı çizelge 4.9’da 11 üzerinden belirlenmiştir ve özellik hatalarının karşısındaki sütunlarda yer almaktadır.

11 değeri üzerinden saptanan bu hata paylarında 6 ve üzeri hatalı sonuç olarak kabul edilmiştir. Analizi yapılan örneklerden 3 ng/g ve altındaki örnekler aflatoksinsiz olarak görüntüleme sistemine tanıtılmış ve sisteme sorulan sorularda bölgesel özellikte km1 örneğine 10 kez hatalı sonuç vermiş ve örnek aflatoksin içermediği halde içeriyor denmiş, genel özellikte ise, fm3’e 6 kez, f23’e 9 kez hatalı sonuç vermiş ve aflatoksin içermediği halde içeriyor demiş, km3’e ise 10 kez hatalı sonuç vermiş ve aflatoksin içerdiği halde içermiyor demiştir.

Çizelge 4.5. Görüntüleme sisteminin aflatoksinli ve aflatoksinsiz kırmızı biberi ayırma hataları (Kalkan vd., 2007)

	km1	f13	fm3	f33	f23	km3	km2	km5	h7	km6	k1	F43	B1	h2
Aflatoksin Konsantrasyonu (ng/g)	0.13	0.18	0.54	0.92	2.71	3.29	6.57	7.47	11.1	13.3	42.3	54.6	58.3	84.4
Bölgesel özellik hataları	10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0
Genel özellik hataları	5	4	6	0	9	10	0	0	1	0	3	0	4	1

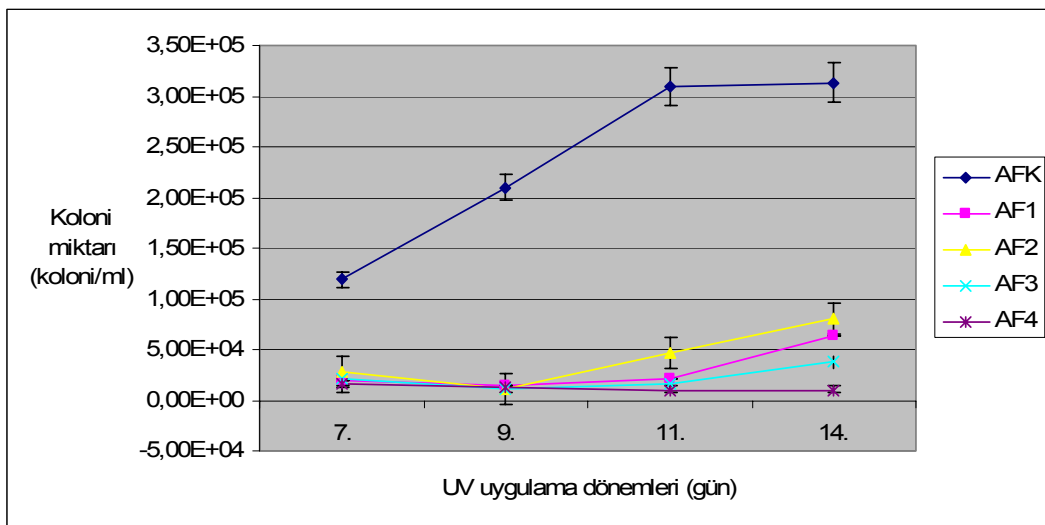
Çizelge 4.5’e göre; biber örneklerinde aflatoksin bulaşmasının hiperspektral görüntüleme sisteminde bölgesel özellikler kullanılarak % 92,8 ve genel özellikler kullanılarak % 72,7 başarı oranıyla tespit edilebildiği gözlemlenmiştir. Ancak sistemin doğruluğunun daha iyi anlaşılabilmesi için örnek sayısının artırılmasının gerektiği kanaatine varılmıştır.



Şekil 4.9. 14 örneğin aflatoksin miktarları

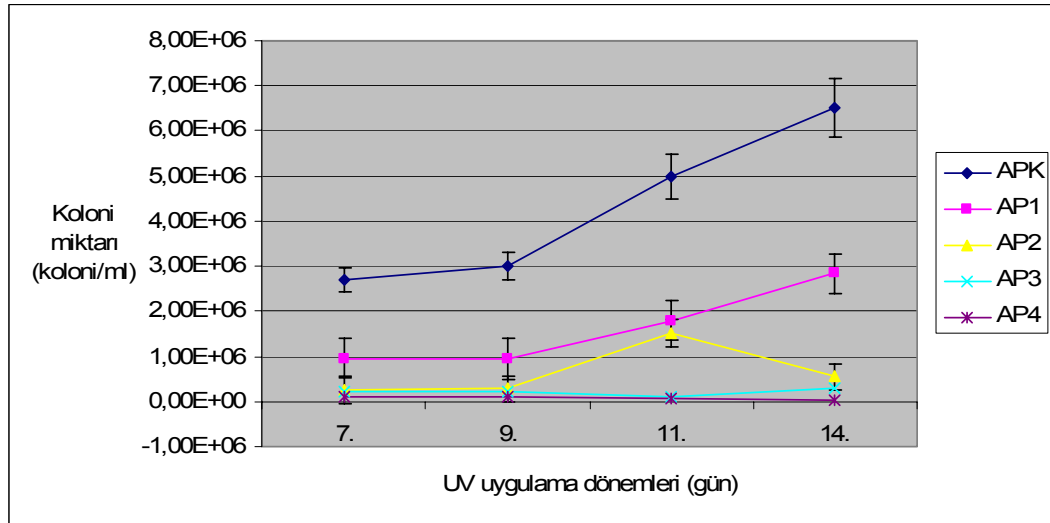
4.6. UV-C Uygulama Sonuçları

Şekil 4.10'deki verilere göre, 4 uygulama boyunca hiçbir işlem uygulanmamış *A. flavus* 123 kontrol grubundaki (AFK) belirgin artışa karşın UV-C uygulanan örnek gruplarında ise belirgin bir azalış görülmektedir. UV-C uygulanan örnekler kıyaslandığında ise en fazla azalma 4 gün UV-C uygulanan örnekte (AF4) görülmektedir. Kontrol grubunun ml'deki son koloni miktarı $31 \cdot 10^4$ iken, AF4 grubunun ml'deki koloni miktarı $86 \cdot 10^2$ olarak tespit edilmiştir. Yani dört uygulama sonucunda kontrol grubu ile 4 uygulama gören grup arasında $30 \cdot 10^4$ kol/ml'lik azalma görülmektedir.



Şekil 4.10. *A. flavus* 123 sıvı örneklerin UV-C uygulaması verileri

Şekil 4.11’deki verilere göre, *A. parasiticus* 1041 kontrol gurubu (APK) 4 uygulama boyunca hiç işlem görmemiştir. Bu nedenle şekilde devamlı artış eğrileri oluşturmaktadır. APK’daki bu artışa karşın 1. uygulama ile birlikte diğer örneklerdeki azalış görülmektedir. AP1, 1 kez UV-C’ye maruz kalmış bu uygulamanın ardından başka bir uygulama almadığı için fungal artış devam etmiştir. AP2 grubu, 2 kez UV-C uygulamasından geçmiş ve dolayısıyla 2. uygulamanın ardından fungal gelişim artmıştır. AP3, 3 uygulamaya tabi tutulmuş bu uygulamalar boyunca ml’deki koloni miktarı azalış göstermiş ardından bir miktar artmıştır. AP4 grubu 4 kez UV-C uygulamasına maruz kalmış ve ml’deki koloni miktarı en az kalan örnek olmuştur. Uygulamalar boyunca zaman zaman bazı grup sıvı örneklerde koloni miktarı artış gösterse de ml’deki koloni miktarı hiçbir zaman kontrol grubuna eşit olmamıştır. Son uygulama sonrası yapılan ekim sonuçlarında APK 6,70log değerindeyken AP4 4,58 log değerindedir. Bu durum yapılan çalışmanın olumlu sonuçlarından biridir.

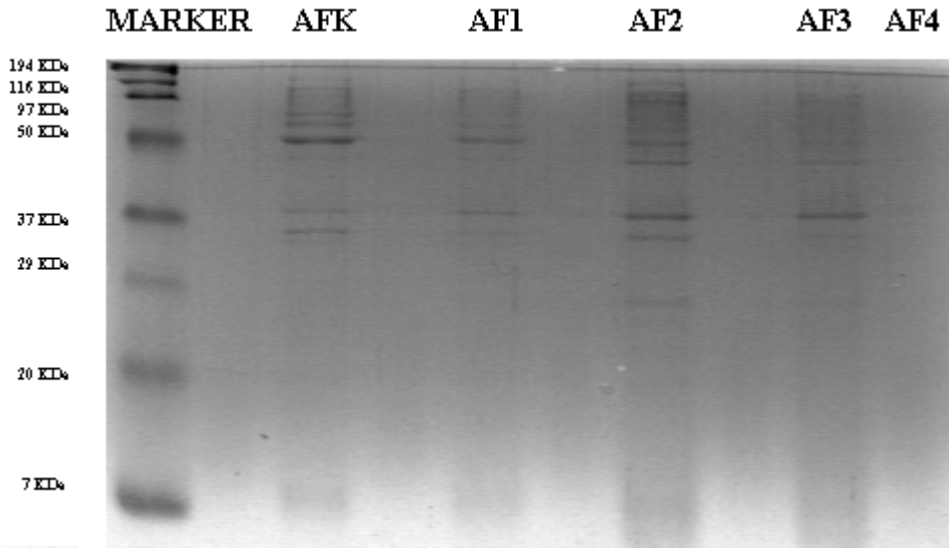


Şekil 4.11. UV-C uygulaması ile *A. parasiticus* 1041’deki koloni miktarı değişimi

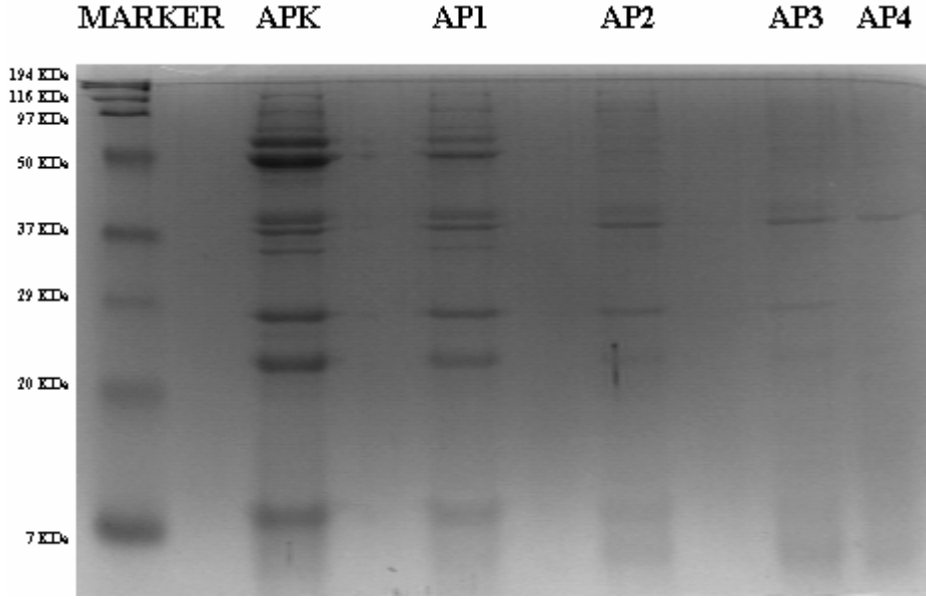
4.7. SDS-PAGE sonuçları

Şekil 4.12a'da, *A. flavus* 123 örnekleri kontrol (AFK) grubuna göre kıyaslandığında örneklerin bant sayıları ve konsantrasyonları arasında AF3 ve AF4'te düzenli bir değişim (azalma) görülürken AF1 ve AF2'deki değişim (azalma) düzensizdir. Şekil 4.12a'daki düzensiz bant dağılımının, *A. flavus* 123 örneklerinin liyofilize olmadan önceki miktarlarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte kontrole göre 4 nolu örnekteki belirgin protein kaybı UV-C uygulamasının fungal suş üzerindeki etkisini açık bir şekilde göstermektedir.

Şekil 4.12b'de ise *A. parasiticus* 1041 örnekleri kontrol (APK) grubu ile kıyaslandığında AP1, AP2, AP3 ve AP4'te hem bant sayılarında hem konsantrasyon miktarlarında düzenli bir azalış görülmektedir. Şekil 4.12b'deki bu durum düzenli aralıklarla UV uygulanan örneklerin yine UV etkisiyle protein yapılarındaki değişimi doğru orantılı olarak göstermekte olduğu şeklinde ve olumlu olarak yorumlanmıştır.



a



b

Şekil 4.12. SDS-PAGE sunu ları; **a.** *A. flavus* 123, **b.** *A. parasiticus* 1041

Şekil 4.12a'da AFK; kontrol, AF1; 1 g n UV, AF2; 2 g n UV, AF3; 3 g n UV, AF4; 4 g n UV uygulanmış  rn klerdir. Şekil 4.12b'de APK; kontrol, AP1; 1 g n UV, AP2; 2 g n UV, AP3; 3 g n UV, AP4; 4 g n UV uygulanmış  rn kleri g stermektedir.

5. SONUÇLAR

Elde edilen sonuçlara göre 450-550 nm arasındaki spektral bantların küflü ve küfsüz fındık sınıflandırması açısından önemli bilgiler taşıdığı görülmüştür. Bu sebeple endüstride yalnız bu aralıktaki bantların kullanımı yeterli olacaktır. Doğrusal sınıflandırıcı ile yapılan sınıflandırmada fındıklar % 97.5'lik bir doğru sınıflandırma oranı ile sınıflandırılabilmiştir. Spektral bantlarda elde edilecek özneliklerin çeşitlendirilmesinin, yani fındık üzerindeki farklılıkların görüntüleme sistemiyle daha iyi algılanması için farklı verilerin girilmesinin (f değerlerinin çoğaltılmasının) sınıflandırma doğruluğunu artıracığı düşünülmektedir.

Özet olarak, yapılan çalışma ile fındıkta kimyasal yöntemlerde tespit edilen aflatoksin içeriğinin yüzeydeki küf miktarının belirlenmesine bağlı olarak tahribatsız yöntemlerle hızlı ve düşük maliyetli olarak belirlenebileceği tespit edilmiştir. Bununla beraber yüzeydeki küf aflatoksijenik küf suşları içermeyebilecektir. Ancak sonuçta küflenmiş bir ürünün toplam üründen ayrılması yine de insan sağlığı açısından ve sağlam fındık tanelerinin korunması açısından faydalı olacağından bize olumlu sonuç getirecektir.

Biber örneklerinde ise aflatoksin bulaşmasının hiperspektral görüntüleme sisteminde bölgesel özellikler kullanılarak % 92,8 ve genel özellikler kullanılarak % 72,7 başarı oranıyla tespit edilebildiği gözlemlenmiştir. Ancak sistemin doğruluğunun daha iyi anlaşılabilmesi için örnek sayısının arttırılmasının gerektiği kanaatine varılmıştır.

UV-C uygulaması ile sıvı besiyerinde geliştirilen *A. flavus* 123 ve *A. parasiticus* 1041 örneklerine 254 nm dalga boyunda 99,99 jul'lük enerji ile yapılan aşamalı uygulama sonucunda küf gelişimi üzerinde engelleyici etkisi yapılan mikrobiyal ekimler sonucu tespit edilmiş, bu etkinin küfün protein yapısıyla ilgisinin anlaşılabilmesi için SDS-PAGE analizi yapılmış ve uygulama görmüş örneklerdeki belirgin protein kaybı UV-C uygulamasının fungal suş üzerindeki etkisini açık bir şekilde ortaya koymuştur.

6. KAYNAKLAR

- Alkan, H., 2002. Elektron Demeti ve Işınlamanın Endüstriyel Uygulamaları., Gamma-Pak Sterilizasyon Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul.
- Anonim, 2006. Yücel Akova. T.C.Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd. Merkezi.
- Anonim, 2007. Ordu Kontrol Şube Müdürlüğü, 2007.
- Anonim, 2008-a . www.fiskobirlik.org.tr Erişim Tarihi: 07.04.2008.
- Anonim, 2008-b. www.americanairandwater.com/Uv-Facts/Uv-Hazards.Htm Erişim Tarihi: 03.03.2008.
- Anonim, 2008-c. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu. www.taek.gov.tr Erişim Tarihi: 12.04.2008
- Avşar, Y., 2007. Kromotografik Metodlar, HPLC. Yıldız Teknik Üniversitesi. Basılmamış Ders Notları.
- Casasent, D., Wen, X.C. ve Nakariyakul S., 2002. Hyperspectral Methods To Detect Aflatoxin Inwhole Kernel Corn. Department of Ece, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pa. Aflatoxin And Fumonisin Elimination And Fungal Genomics Workshops, Mycopathologia 157, p. 422, 2004.
- Çelikay, A., 2003. Kurutulmuş Kırmızı Biberin Mikrobiyolojik Kalitesi ve Aflatoksin Aranması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Çetin, A. E., Pearson, T. C., Tewfik, A. H., 2004. Classification of Closed and Open Shell Pistachio Nuts Using Voice Recognition Technology. Published by the American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, Michigan.
- Çoksöyler, N., 1995. Aflatoksin Oluşumu ve Aflatoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler; Kahramanmaraş Kırmızı Biber Semineri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, 11, 18–25 s.
- Davidson, C.A. , Gri/Th, C.J., Peters, A. C. And Fieding, L.M., 1999. Evaluation of Two Methods For Monitoring Surface Cleanliness Atp Bioluminescence and Traditional Hygiene Swabbing. Luminescence 14, 33-38. Davidson, C.A. , Gri/Th, C.J., Peters, A. C. And Fieding.
- Demir, C., Şimşek, O., Hamzaçebi, H., 2002. Fındıkta Küf Florası ve Aflatoksin Oluşumunun Araştırılması. Gıda 27(4), 291–295.

- Dıraman, H., Arıcı, M., 1999. Tekirdağ İlinde Tüketime Sunulan Kırmızı Pul Biberlerde Aflatoksin Aranması Üzerine Bir Çalışma, Gıda 12, 41-43.
- Duman, A. D., Zorlugenç, B., Evliya, B., 2002. Kahramanmaraş'ta Kırmızı Biberin Önemi ve Sorunları. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 5 2002. KSÜ Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, K. Maraş. ÇÜ Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana.
- Erdoğrul, Ö., 2000. Kahramanmaraş'ta Satılan Acı Kırmızı Pul Biberin Bazı Mikrobiyolojik Özellikleri. Fen ve Mühendislik Dergisi 2000, Cilt 3, Sayı 2 KSÜ, Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, Kahramanmaraş.
- Farsaie, A. L., McClure, F. W., Monroe, R. J., 1978. Development of Indices for Sorting Iranian Pistachio Nuts According to Fluorescence. Journal of Food Science 43 (5), 1550–1552.
- Gilbert, J. 1984. Analysis Of Food Contaminants, Ministry Of Agriculture, Fisheries And Food, Food Laboratory, Norwich, UK, Elsevier Applied Science Publishers, London and Newyork.
- Halkman, K., 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık, 358s., Ankara.
- Heperkan, D., 2007. Fındıkta Aflatoksin Varlığı ve Önemi. İ.T.Ü. Kimya Metalurji Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvar Testleri Kalite Konferansı '07.
- Hesseltine, C. W., Rogers, R. F., Shotwell, O. L., 1977. Aflatoxin and Mold Flora in North Carolina in 1977 Corn Crop. *Mycologia*, (Mar. - Apr., 1981), pp. 216-228.
- Hirano, S., Okawara, N., Narazaki, S., 1998. Near Infra Red Detection of Internally Moldy Nuts. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62, No. 1, pp. 102-107.
- Hirasa, K., Takemasa, M., 1998. Spice Science and Technology, pp. 219. Marcel Dekker, New York.
- Jiang, L., Zhu, B., Rao, X., Berney and G., Tao., 2006. Discrimination of Black Walnut Shell and Pulp in Hyperspectral Fluorescence Imagery Using Gaussian Kernel Function Approach Bio-imaging and Machine Vision Lab, Room 1427, Building 142, The Fischell Department Of Bioengineering, University Of Maryland, College Park, Md 20742, United States.

- Kalkan, H., Yardımcı, Y., Başaran, P., Özcan, M., Beriat, P., 2007. A Novel Prospective Technological Approach: Machine Vision Techniques For Noninvasive Aflatoxin Detection in Chili Peppers. XII. International Iupac Symposium On Mycotoxins Ad Phycotoxins, İstanbul, Turkey From 21-25 May 2007.
- Kalkan, H., Yardımcı, Y., 2008. Bozulmuş Fındıkların Multispektral Görüntüleme İle Tespit Edilmesi, Enformatik Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 16. Sinyal İşleme, İletişim ve Uygulamaları Kurultayı.
- Kurtzman, C.D., Horn B.W., & Hesselton C.W., 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *A. flavus* and *A. tamarii*. Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology, pp. 203.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Moore, G., and Gri, C., 2002. A Comparison Of Surface Sampling Methods For Detecting Coliforms On Food Contact Surfaces Food Microbiology, 2002, 19, 65-73.
- Onaran, İ., Dulek, B., Pearson, C.T., Yardimci Y., Cetin, A.E., 2005. Detection Of Empty Hazelnuts From Fully Developed Nuts By Impact Acoustics Metu, Ankara, Turkey.
- Özcan, S, 2005. HPLC Sistemleri, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Basılmamış sunum.
- Özçelik, S. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 7, Ders Kitapları No: 7, İkinci Basım, 135 s., Isparta.
- Paksoy, M., Uslu, Ö. S., 2006. Türkiye’de Kırmızı Biberin Pazarlanması ve Sorunları. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 19-22 Eylül 2006.
- Patey A.L., Sharman M., Gilbert J. Worner F.M., 1992. Association Of Official Analytical Chemists (AOAC) International Validated Method.
- Payne A.G., 1998. Process of Contamination by Aflatoxin-Producing Fungi and Their Impact on Crops. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. This publication into Mycotoxins in Agriculture and Food Safety written by Kaushal K. Sinha, Deepak Bhatnagar.

- Pearson, T.C. and Schatzki, T. F.,1998. Machine Vision System For Automated Detection Of Aflatoxin-Contaminated Pistachios Western Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department Of Agriculture, Albany, California 94710. Journal Agricultural Food Chemistry, 46, 2248-2252.
- Pearson, T. C., Wicklow, D., Schwartz, C., 2002. Physical and Optical Properties of Corn Infested with *A. flavus*, *Fusarium Verticillioides* and Other Molds. Aflatoxin And Fumonisin Elimination And Fungal Genomics Workshops, *Mycopathologia*, 157: 424, 2004.
- Pearson, T. C., Wicklow, D. T., Pasikatan, 2004. Reduction of Aflatoxin and Fumonisin Contamination in Yellow Corn by High-Speed Dual-Wavelength Sorting. Publication no. C-2004-0524-01 R.
- Poole, G.H.,2002.The Potential Of Hyperspectral Imaging For The Detection Of Aflatoxin. San Antonio, Texas,Institute For Technology Development, Stennis Space Center. Aflatoxin And Fumonisin Elimination And Fungal Genomics Workshops, *Mycopathologia* 157: 421, 2004.
- R-Biopharm Rhône Ltd, 2007. Hplc Analysis For Aflatoxins. West of Scotland Science Park, Unit 3.06 Kelvin Campus, Maryhill Road, Glasgow, Scotland.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 2001. Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition. University of Texas South Western Medical Center, Genetics Institute, Harward University.
- San, T.B., 2006. Hiperspektral Uydu Görüntülerinin Yer Bilimlerinde Uygulaması. Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Jeoloji Etütleri Dairesi, Uzaktan Algılama ve Coğrafi Bilgi Sistemleri Koordinatörlüğü.
- Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Pusey, P. L., Igwegbe, E. C. K., Mafolo,Y., Liu, J., Chalutz, E., Droby, S., 1997. Integration Of Ultraviolet (Uv-C) Light With Yeast Treatment For Control Of Postharvest Storage Rots Of Fruits And Vegetables. Biological Control 10, 98–103, Artical No.Bc970551.
- Şenyuva, H., Z., Gilbert, J., 2006. Metot Geliştirme ve Validasyonu İçin Basit Kullanım Kılavuzu. Uluslararası Standart Kitap Numarası (ISBN) 975-00884-0-9, Ankara.
- Şimşek, A., 2004. Değişik Kavurma İşlemlerinin Bazı Fındık Çeşitlerinde Oluşturduğu Biyokimyasal Değişiklikler, Doktora Tezi, Ankara, 2004, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D.

- Şimsek, O., Arıcı M., and Demir, C., 2002. Mycoflora Of Hazelnut (*Corylus Avellana* L.) and Aflatoxin Content in Hazelnut Kernels Artificially Infected With *A. parasiticus* Molecular Nutrition & Food Research (Nahrung/Food), 3, 194-196.
- Tyson, T. W., Clark, R. L., 1974. An investigation of the fluorescent properties of aflatoxin-infected peans. Trans. American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASAE) 17:942-944, 948.
- Tchobanoglous, G.T., 1997. "UV Disinfection: An Update." Presented at Sacramento Municipal Utilities District Electrotechnology Seminar Series. Sacramento, CA.
- Tunail, N., 2000. Funguslar ve Mikotoksinleri. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522s 03. Bölüm, 13. kısım.
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., 2002. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi. Meta Basım Matbaacılık. 186s. Bornova-İzmir.
- Yao, H., Z R., L. Hruska, T., E. Brown, Cleveland, 2006. Hyperspectral Bright Greenish-Yellow Fluorescence (Bgyf) Imaging of Aflatoxin Contaminated Corn Kernels . Proceedings Of The Spie, Volume 6381, Pp. 63810b.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., 2007. Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı. Nobel Yayın Dağıtım/ Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi, Ankara.
- Yıldırım, T., Tanrıseven, A., Özkaya, Ş., 1997. Bursa ve Sakarya Kırmızı Biberlerinde Aflatoxin Çalışması, Gıda Teknolojisi, 2 (6).
- Xujun Y., E., Sakaib, K., Okamoto, H., Garcianod., L. O., 2008. A Ground-Based Hyperspectral Imaging System For Characterizing Vegetation Spectral Features. A United Graduate School Of Agriculture, Tokyo University Of Agriculture And Technology, Tokyo 183-8509, Japan. Science Direct, computers and electronics in agriculture 63, 13-21.
- Aquafine, 2008. İnternet Sitesi. www.aquafineuv.com/uvtechnology/index.shtm) Erişim Tarihi: 17.05.2008.
- Epa, 2008. İnternet Sitesi. www.epa.gov/Ogwdw/Mdbp/Pdf/Alter/Chapt_8.Pdf Erişim Tarihi: 04.05.2008.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meltem ÖZCAN

Doğum Yeri ve Yılı: Burdur, 1983

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Burdur Cumhuriyet Süper Lisesi

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

2005-2006 Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Yurt-Kur Öğrenci Yemekhanesi
Sorumlu Yönetici Gıda Mühendisi

2006-2008 Tübitak Projesi Araştırmacı Çalışanı

Yayımları (SCI ve diğer makaleler):

1-Basaran, P., **M. Ozcan**, Denisov, Y., S. Freeman.2007. Elucidation of pectinolyticenzyme activities of a non pathogenic watermelon pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* mutant M87. Journal of Ausasian Phyropathol, 2007.

2- Basaran, P., **M. Ozcan**. 2007.Characterization of B-xylosidase from Pichiamutant. Journal of Bioreseource Technol, 2007.

3- Kalkan, H., Yardımcı, Y., Başaran, B., **Özcan, M.**, Beriat, P., 2007. A Novel Prospective Technological Approach: Machine Vision Techniques for Noninvasive Aflatoxin Detection in Chilli Peppers. XII. International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.



4- Oksuz, L., GÜLEÇ , A., Selcuk, M., **Özcan, M.**, Basaran, P., 2007. Plasma Surface Treatment of Processed and Semi-Processed Ready to Eat Foods (RTEs) NATO ASI Izmir Cesme September 2007.

5- **Ozcan, M.**, Günay, A., Başaran, P., Akgül, N., 2007. Incidence of aflatoxins in hazelnuts of Turkey: A pilot screening survey. IFT(International food technology) presentation number 226-04.

6- **Ozcan, M.**, Basaran, P., 2008. Occurrence of Aflatoxins in Various Nuts Commercialized in Turkey. (Basımda)