

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTEP FISTIKLARINDA OKRATOKSİN A VE AFLATOKSİN VARLIĞININ
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cansu SEDEFOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

EYLÜL 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTEP FISTIKLARINDA OKRATOKSİN A VE AFLATOKSİN VARLIĞININ
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Cansu SEDEFOĞLU
(506111508)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek HEPERKAN

EYLÜL 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506111508 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Cansu SEDEFOĞLU**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**ANTEP FISTIKLARINDA OKRATOKSİN A VE AFLATOKSİN VARLIĞININ İNCELENMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Dilek HEPERKAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülden Omurtag**
Marmara Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Filiz ALTAY
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **3 Eylül 2013**
Savunma Tarihi : **11 Eylül 2013**

Sevgili Aileme,

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca araştırmamın gerçekleştirilmesi, geliştirilmesi ve değerlendirilmesi konusunda desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN'a teşekkür ederim. Ar. Gör. Ceren DİKMEN-DAŞKAYA ve Sibel ERTUĞRUL'a tüm yardımları için teşekkürü borç bilirim.

Çalışmanın yürütülmesinde göstermiş olduğu katkıdan dolayı Karin Gıda San. ve Tic. A.Ş. ve Sayın Mehmet ALUÇ'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her konuda her zaman yanımda olan sevgili ailem Hayriye-Candaş SEDEFOĞLU ve Candan-Ceyhun-Mert BOZOK'a teşekkür ederim. Saime Merve AKSU, Gülümser UYAROĞLU, Ahmed ABBASOV ve Umut CANLI başta olmak üzere sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eylül 2013

Cansu Sedefoğlu
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ	1
2. ANTEP FISTIĞI	3
2.1 Antep Fıstığı Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.2 Antep Fıstığı Ekonomik Verileri.....	6
2.3 Antep Fıstığı Üretimi	10
2.3.1 Hasat öncesi basamaklar.....	12
2.3.1.1 Bitki koruma uygulamaları	12
2.3.1.2 Sulama ve gübreleme	12
2.3.2 Hasat.....	12
2.3.3 Hasat sonrası basamaklar	12
2.3.3.1 Kabuk ayırma	12
2.3.3.2 Kurutma	13
2.3.3.3 Elle ayırma	13
2.3.3.4 Depolama	13
2.4 Antep Fıstığı Kalite Kriterleri	13
3. OKRATOKSİN A	15
3.1 Okratoksin A Üreticisi Küfler	18
3.2 Okratoksin A' nın Sağlık Üzerine Etkileri	20
3.3 Gıdalarda Okratoksin A Varlığı	21
3.4 Okratoksin A ile İlgili Yasal Düzenlemeler	23
3.5 Okratoksin A Analiz Yöntemleri	24
4. AFLATOKSİNLER	27
4.1 Aflatoksin Üreticisi Küfler	28
4.2 Aflatoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	30
4.3 Gıdalarda Aflatoksin Varlığı	31
4.4 Aflatoksinler ile İlgili Yasal Düzenlemeler	34
4.5 Aflatoksinler Analiz Yöntemleri	36
5. MATERYAL VE METOT	39
5.1 Antep Fıstığı Örnekleri.....	39
5.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Mikotoksin Tayini	39
5.2.1 Okratoksin A tayini	39
5.2.1.1 Okratoksin A standartlarının hazırlanması.....	39
5.2.1.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi.....	40
5.2.1.3 Okratoksin A ekstraksiyonu	41

5.2.1.4 Okratoksin A analizi HPLC koşulları	41
5.2.2 Aflatoksin tayini	42
5.2.2.1 Aflatoksin standartlarının hazırlanması	42
5.2.2.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi	43
5.2.2.3 Aflatoksin ekstraksiyonu	44
5.2.2.4 Aflatoksin analizi HPLC koşulları	44
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	45
6.1 Antep Fıstığı Örneklerinde Okratoksin A ve Aflatoksin Varlığı	39
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	53
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	89

KISALTMALAR

a_w	: Su aktivitesi
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AF	: Aflatoksin
AFB₁	: Aflatoksin B ₁
AFB₂	: Aflatoksin B ₂
AFG₁	: Aflatoksin G ₁
AFG₂	: Aflatoksin G ₂
AFs	: Aflatoxins
AFT	: Toplam aflatoksin
BEN	: Balkan Endemik Nefropatisi
EC	: Avrupa Komisyonu
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	: Enzim bağlı immun assay
EtOTB	: Okratoksin C etil ester
FAOSTAT	: Gıda Tarım Örgütü istatistik veri tabanı
GAP	: Good Agricultural Practices
GHP	: Good Hygiene Practices
GMP	: Good Manufacturing Practices
HA	: Hacimce
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IAK	: immunoafinite kolon
IARC	: Uluslar arası kanser araştırmaları ajansı
LC-FLD	: Sıvı kromatografisi-floresans dedektör
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Ölçüm limiti
MeOTA	: Okratoksin A metil ester
MeOTB	: Okratoksin B metil ester
MS	: Kütle spektrometresi
MTL	: Maximum Tolerable Level
OTA	: Okratoksin A
OTB	: Okratoksin B
OTC	: Okratoksin C
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
Ppb	: Parts per billion
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
TWI	: Tolerable Weekly Intake
UV	: Ultraviyole

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Antep fıstığı besin içeriği	4
Çizelge 2.2 : Türk ve İran Antep fıstıkları yağ içerikleri	5
Çizelge 2.3 : Dünya Antep fıstığı üretimi.....	7
Çizelge 2.4 : Dünya Antep fıstığı ihracatı	8
Çizelge 2.5 : Dünya Antep fıstığı ithalatı	9
Çizelge 2.6 : Türkiye ihracatı	10
Çizelge 2.7 : Türkiye’de sıklıkla yetiştirilen Antep fıstıkları	11
Çizelge 3.1 : Gıdalarda okratoksin A varlığı	23
Çizelge 3.2 : Gıdalarda okratoksin A limitleri	24
Çizelge 4.1 : Gıdalarda aflatoksin varlığı	31
Çizelge 4.2 : Gıdalarda aflatoksin limitleri.....	35
Çizelge 5.1 : Örnek tablosu	39
Çizelge 5.2 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltileri ve içerikleri	40
Çizelge 5.3 : Aflatoksin kalibrasyon çözeltileri ve içerikleri	42
Çizelge 6.1 : Antep fıstığı örneklerinde okratoksin A varlığı	45
Çizelge 6.2 : Antep fıstığı örneklerinde toplam aflatoksin varlığı	46
Çizelge 6.3 : Antep fıstığı çeşitleri ve aflatoksinlerle kontaminasyonu	46
Çizelge 6.4 : Aflatoksin ve okratoksin A birlikte bulunduran örnekler	47
Çizelge 6.5 : Antep fıstıkları örneklerinde okratoksin A ve aflatoksin varlığı.....	47

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Dünya Antep fıstığı üretimi.....	6
Şekil 2.2 : Dünya Antep fıstığı ihracatı	7
Şekil 2.3 : Dünya Antep fıstığı ithalatı	9
Şekil 3.1 : Okratoksin A'nın kimyasal yapısı.....	16
Şekil 3.2 : Okratoksinlere ait moleküler yapılar	17
Şekil 3.3 : Okratoksin A biyosentezi	18
Şekil 4.1 : Aflatoksin B ₁ 'in kimyasal yapısı.....	28
Şekil 4.2 : Aflatoksinlerin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 5.1 : Okratoksin A kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 5.2 : Aflatoksin analizi kalibrasyon eğrisi.....	43

ANTEP FISTIKLARINDA OKTATOKSİN A VE AFLATOKSİN VARLIĞININ İNCELENMESİ

ÖZET

Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.), Anacardiaceae ailesinin bir üyesi olup, kökeni Orta ve Batı Asya kurak bölgeleridir ve Akdeniz havzası genelinde dağılmıştır. Besin değeri yüksek, lezzetli bu ürün tarih boyunca birçok ülkeye yayılmış ve farklı bölgelerde yetiştirilmeye başlanmıştır. Sert kabuklu meyvelerden olan Antep fıstığı, ülkemiz için yüksek ekonomik değere sahip bir ihraç ürünüdür. Sert kabuklu meyveler sahip oldukları besin bileşenleriyle; steroller, vitaminler, mineraller, yağ asitleri, fenolik bileşikler, antioksidan ve antiproliferatif özellikleriyle tercih edilen bir üründür.

2011 yılı verilerine göre Türkiye dünya genelinde sahip olduğu %13'lük payla Antep fıstığı üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır. 2011 yılı Antep fıstığı üretim kapasitesi 112.000 tona erişmiştir. Türkiye dünya Antep fıstığı ihracatında ise 2010 yılı verilerine göre 12. sırada yer almaktadır. Antep fıstığı ihracat miktarı 717 tondur. Dünya antep fıstığı ithalat verileri incelendiğinde ise Türkiye ilk 20 ülke arasında yer almamaktadır. Türkiye'nin ihracat yaptığı ülkelerle ilgili verilere bakıldığında ise 2010 ve 2011 yılında İtalya, Almanya ve İsrail ilk 3 sırada yer alan ülkelerdir. İtalya %47,9'luk paya, Almanya %9,8 ve İsrail %9,0'luk paya sahiptir.

Ticari değere sahip, lezzetli ve besin öğelerince zengin Antep fıstığı, üretim yöntemi ve diğer çevresel faktörler nedeniyle küf kontaminasyonu ve gelişimine maruz kalmaktadır. Bu küfler, doğada ve gıdalarda yaygın olarak bulunan, mikotoksin olarak adlandırılan ikincil metabolitleri oluşturmaktadırlar. Okratoksin A (OTA), *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından üretilen mikotoksinlerdendir ve kahve, şarap, tahıllar, üzüm, baharat ve kakao ürünlerinde sıklıkla rastlanmaktadır. Toksin; berrak, renksiz, mavi floresans veren kristal bir bileşiktir ve asidik karaktere sahiptir. Zayıf organik asit gibi davranır ve göreceli kararlıdır; pişirme, kavurma ve fermantasyon gibi gıda işlemlerine dayanıklıdır. Üretimi karanlık evrelerde daha yüksek, ışık altında ise daha düşüktür. Hayvanlar ve insanlar üzerinde nefrotoksik, immunosupresif, teratojenik, genotoksik, karsinojenik, hepatotoksik özellik göstermektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) tarafından insanlar için olası kanserojenik gruba dahil edilmiştir (grup 2B). Hedef organ böbreklerdir ve Balkan Endemik Nefropatisi'ne (BEN) yol açtığı belirlenmiştir.

Aflatoksin (AF); kristal yapıda, kloroform ve metanol gibi polar çözücülerde kolaylıkla çözünebilen, saf halde ultraviyole (UV) radyasyon altında parçalanan, düşük (<3) ve yüksek (>10) pH ve oksitleyici maddeler varlığında stabil olmayan bir bileşiktir. Gıda ve yemlerde ise bu mikotoksin oldukça stabildir. Işık ve UV radyasyona maruz kalmadıklarında, kristal halde yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. Tüm omurgalı canlılar üzerinde karsinojen, mutajen, teratojen, hepatotoksik ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkiye sahiptir. IARC tarafından aflatoksin B₁ (AFB₁) öncelikle ciğerleri hedef alan, grup 1 kanserojen madde olarak sınıflandırılmaktadır.

Ticari değeri yüksek bu ürünün, halk sağlığı açısından mikotoksin düzeyi önem taşımaktadır. Birçok ülkede, mikotoksinlerin insanlar ve hayvanlar üzerinde zararlı etkilerine karşı bilinçlenme başlamış ve gıdalarda bulunabilecek maksimum tolere edilebilir seviyeleri belirlenmiştir.

Bu projede, Türkiye’de yetiştirilen Antep fıstıklarında okratoksin A ve aflatoksin varlığının incelenmesi ve miktarlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışma, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yer alan bir işletmeden temin edilen ve İstanbul marketten toplanan Antep fıstıkları ile yürütülmüştür. Gaziantep’ten temin edilen numunelerin her biri 2-3 tonu temsil etmektedir. İstanbul’da ise market, pazar ve küçük işletmelerden toplanan ürünler paketlenmiş ve paketsiz, kabuklu ve kabuksuz olarak farklı markalardan ve semtlerden temin edilmiştir. Analitik metot olarak immunoafinite kolon temizlemesini takip eden, floresans dedektörle birleştirilmiş yüksek performans sıvı kromatografisi kullanılmıştır.

Antep fıstığı yüksek yağ içeriğine sahip bir üründür. Okratoksin A ve aflatoksin analizlerinde, ekstraksiyon aşamasında yağın ve diğer bileşenlerin uzaklaştırılması için organik çözügen ve su karışımı kullanılmıştır. Vicam marka immunoafinite kolonlarda toksinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ardından HPLC ile analizlenen örneklerde toksin tayini ve miktar belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Aflatoksin analizinde KoBra-cell kimyasal türevlendirilmesi uygulanmıştır.

73 örnekte okratoksin A ve aflatoksin taraması yapılan çalışmada, 54 örnek (%74) pozitif bulunmuştur. 19 örnekte ise toksin tespit edilmemiştir.

Tüm Antep fıstığı örneklerinin %6’sında 1,238 - 3,720 µg/l arasında değişen düzeylerde OTA varlığı belirlenmiştir. OTA kontaminasyonu yalnızca Antep kırmızı örneklerinde (%7 oranında) tespit edilmiş, Antep yeşil ve Siirt çeşitlerinde OTA varlığına rastlanmamıştır. OTA tespit edilen örneklerin tümünde aflatoksin varlığına da rastlanmıştır.

Aflatoksin analizi sonucunda 73 adet örnekte 54 adet toplam aflatoksin (AFT) kontaminasyonu tespit edilmiştir. AFT seviyeleri, 0,001 ile 23,542 µg/l arasında değişiklik göstermiştir. 23,542 ve 11,504 µg/l’lik toksin içerikleri ile yasal limitlerin (doğrudan tüketim ve hammadde olarak kullanım için; 10 µg/l) üzerinde 2 adet örnek tespit edilmiştir. 58 Antep kırmızı örneğinde 44 pozitif, 4 Antep yeşil örneğinde 4 pozitif ve 11 adet Siirt çeşidi örnekte 6 pozitif numune gözlenmiştir.

73 örnekte yalnızca AFB₁ kontaminasyonu saptanan 20 örnek (%27) bulunmaktadır. Bu 20 örneğin 15 tanesi Antep kırmızı, 2 tanesi Antep yeşil ve 3 tanesi Siirt fıstığıdır. Tüm örnekler içinde 6 örnekte (%8), aflatoksin B₁ ve aflatoksin B₂ (AFB₁ + AFB₂) birlikte tespit edilmiştir. Bu 6 örneğin 4 tanesi Antep kırmızı ve 2 tanesi Antep yeşil çeşidine aittir. Antep kırmızı çeşidinde ait 1 örnekte (%1) aflatoksin B₁ ve aflatoksin G₁ (AFB₁ + AFG₁) birlikte tespit edilmiştir. Siirt çeşidinde ait 1 örnekte (%1) aflatoksin B₁ ve aflatoksin G₂ (AFB₁ + AFG₂) birlikte tespit edilmiştir. 5 adet örnekte (%7) ise AFB₁ + AFB₂ + AFG₂ belirlenmiştir. Bunların 3 tanesi Antep kırmızı diğer 2 tanesi de Siirt çeşidine aittir. Örneklerin 21’inde (%29) 4 aflatoksin türü birarada tespit edilmiştir. 4 aflatoksini bir arada bulunduran örneklerin tümünün Antep kırmızı olduğu gözlenmiştir.

DETERMINATION OF OCHRATOXIN A AND AFLATOXINS IN PISTACHIO NUTS

SUMMARY

Pistachio nut (*Pistacia vera* L.) is a member of Anacardiaceae family and its origin is arid regions of Central and West Asia and scattered throughout the Mediterranean basin. It has high nutritional value and delicious taste which resulted in spreading to many countries throughout the history and starting to be grown in different regions. Pistachio is one of the tree nuts which is an important export product for our country with its high economic value. Tree nuts have sterols, vitamins, minerals, fatty acids, phenolic compounds. Moreover, they show antioxidant and antiproliferative properties and they have been preferred with their rich nutritional components. According to data from the year 2011, Turkey took third place in globe pistachio production with 13% ratio. The production of Turkish pistachios in 2011 year has reached 112.000 tonnes. The world's pistachio export data which belong to 2010 year shows that Turkey took twelfth place and the amount of export was 717 tons. According to the world's pistachio import data which belong to same year shows that Turkey was not among the top 20 countries. In terms of exporting countries of Turkey in 2010 and 2011, Italy, Germany and Israel ranks the top three ones. Italy 47.9%, Germany 9.8% and 9.0% of Israel have a share.

Commercially valuable, tasty and rich in nutrients pistachio nuts are exposed to the mold growth due to the production method and other environmental factors. Fungi species are commonly found in nature as well as can occur jointly in a wide range of food commodities. Mycotoxins are secondary metabolites produced by some fungal species.

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by many phytopathogenic and food spoilage fungi, which can cause a variety of adverse effects in humans, from allergic responses to cancer and death. Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin which is produced by *Aspergillus* and *Penicillium* genus. OTA is a pentaketide secondary metabolite that contaminates different plant products, cereals, coffee beans, nuts, cocoa, pulses, beer, wine, spices and dried vine fruits. It is mainly produced by *Penicillium verrucosum* and *P. nordicum*, and by a range of *Aspergillus* species assigned to sections *Circumdati*, *Nigri* and *Flavi* which *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* species are the main source of ochratoxin contamination in foods and feeds. This toxin is colorless, blue fluorescent crystalline compound and has acidic character; acting as a weak organic acid, and relatively stable to baking, roasting and fermentation, as well as in food products. In dark phase its production is higher than under the light. OTA exhibits nephrotoxic, immunosuppressive, teratogenic, genotoxic, hepatotoxic properties which make it one of the most important mycotoxins of concern for human health. It has been grouped as possible cancerogen for human (group 2B) by International Cancer Research Center (IARC). Kidney has thought as target organ and it is associated with Balkan Endemic Nephropathy and urinary tract tumours. OTA contamination can

also be transferred from feed into animal products, especially in organ meat (kidney, liver and blood).

OTA contamination is a great concern for tropical countries where the elevated temperature and water activity favor growth of mycotoxigenic fungi in agricultural products, especially in post-harvest activities. The European Commission Regulation has not established legal limits for OTA in pistachio nuts. *Aspergillus* species are more commonly associated with warmer and tropical climates from stored foods mostly. Growth and OTA production by members of the *Aspergillus* spp. Can be influenced by agricultural practices such as the use of pesticides, the time and conditions of harvesting, drying and handling the crop.

Aflatoxins (AFs) are the most toxic and the strongest natural carcinogens that are produced primarily by two species of *Aspergilli*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The AFs consist of about 20 similar compounds belonging to a group called the difuranocoumarins, but only four aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁ and aflatoxin G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) are naturally found in foodstuffs. AFB₁ is the most toxic and amongst the most commonly found in foods. These secondary metabolites can be found in a variety of food commodities, including cereals, spices and dried fruits (figs, raisins). Moreover, AFs have also been detected in oilseeds, peanuts and tree nuts (pistachios, almonds, pecans, walnuts etc.). These mycotoxins are crystalline, easily soluble in polar solvents such as chloroform and methanol. Pure form of AFs are degradable under ultraviolet (UV) radiation and at low (<3) and high (>10) pH. Besides under the presence of oxidising agents it is unstable compound. These mycotoxins are very stable in food and feed compounds. They are resistant to temperatures above 100 °C in the crystalline form, unless exposed to light and UV radiation. When feed products are contaminated with mycotoxins, there might be a health hazard for animals. Furthermore, mycotoxin residues in feed to be consumed by animals may cause a threat to humans. IARC has classified AFB₁ as a group 1 carcinogen which means it is carcinogenic for human, mainly affecting the liver. AFB₂, AFG₁ and AFG₂ are also classified as possible carcinogen to humans. They have carcinogenic, mutagenic, teratogenic, hepatotoxic and immune-suppressing effects on human and animal health. Aflatoxicosis causes acute liver damage, liver cirrhosis, induction of tumors, impaired central nervous system, skin disorders, hormonal defects and decreased bone strength. This product has high commercial value and in terms of public health its presence in food and feed products has great importance. In many countries, the awareness against the harmful effects of mycotoxins become more of an issue. Those countries have established the maximum tolerable levels of mycotoxins to protect health of animals and human and prevent economical losses. According to European Commission Regulation (2010), pistachio nuts are not permitted to exceed 8,0 ng/g for AFB₁ and 10 ng/g for total aflatoxins for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs; 12,0 ng/g for AFB₁ and 15,0 for total aflatoxins in pistachios to be subjected to sorting or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs.

The purpose of this study to investigate the ochratoxin A and aflatoxins presences and detect their amounts in pistachio nuts cultivated in Turkey. This study was carried out with pistachio nuts that some of the samples were obtained from a company which is located in Southeastern Anatolia Region and the remaining samples were collected from Istanbul market. Each of the samples gathered from Southeastern Anatolia Region represents 2-3 tonnes. In Istanbul, the pistachios are

collected from the markets, bazaars and small businesses with packaged and unpackaged, shelled and unshelled product properties that were supplied in different districts with different brands. High performance liquid chromatography (HPLC) is now the most commonly used chromatographic technique for the detection of wide diversity of mycotoxins. In this study, an analytical method based on immunoaffinity column clean-up and followed by the high performance liquid chromatography equipped with fluorescence detection were performed for both ochratoxin A and aflatoxins analysis. 73 pistachio samples were analysed and the results were evaluated with respect to European Commission Regulation and Turkish Food Codex.

At the beginning of the analysis the samples were subjected to extraction and subsequently clean-up stage. The tree nuts have high amount of lipid content. Thus, its important to performance effective extraction. By the purpose of removal of the oil phase and the other components, organic solvent and water mixture were used. In order to purification of toxin, samples were subjected to immunoaffinity columns with the brand of Vicam. Afterwards, samples were analysed by HPLC to detect the presences of toxin and determine their amounts in pistachio samples. In aflatoxins analysis the koBra-cell derivatization was applied which differ from ochratoxin A analysis.

73 pistachio samples were analysed and the results obtained from the study are 54 of them (74%) were positive with mycotoxin contamination. The screening 19 pistachio samples were toxin-free. OTA was identified in 4 samples (6%) from the levels ranging from 1,238 to 3,720 µg/l levels.

In all red kernel pistachios the contamination ratio was 7%. OTA was not detected in green kernel pistachios and Siirt cultivars. In all OTA found samples, the presence of aflatoxins were also detected.

The analysis of aflatoxins was performed and results showed that 54 of 73 samples were contaminated by these detrimental toxins. The total aflatoxin (AFT) levels of positive samples are ranging from 0,001 to 23,542 µg/l. The detected levels of 2 samples, 23,542 and 11,504 µg/l, were above the legal limits. 44 of 58 red kernel pistachios, 4 of 4 green kernel pistachios and 6 of 11 Siirt cultivars were positive with AFT.

AFB₁ contaminate 20 pistachio nuts of total 73 samples (27%). These 20 positive samples include 14 red kernel pistachios, 2 green kernel pistachios and 3 Siirt cultivars. AFB₁ and AFB₂ was found together in 6 samples of total 73 samples (8%). These 6 samples include 4 red kernel pistachios and 2 green kernel pistachios. Just 1 red kernel pistachio sample was found to be contaminated by AFB₁ and AFG₁. Moreover, 1 sample of Siirt cultivar type was positive with AFB₁ and AFG₂ types. AFB₁, AFB₂ and AFG₂ were detected together in 5 samples of total 73 samples (7%). 2 samples of them belong to the type of red kernel pistachio and the remaining 2 samples belong to the type of Siirt cultivar. Four types of aflatoxins, AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ were found in 20 samples of total 73 samples. All positive samples which contaminated by them belong to the red kernel pistachio samples.

Raw material control, good agricultural practices (GAP), good manufacturing practices (GMP), good hygiene practices (GHP) are necessary during harvesting and post harvesting phases, in order to prevent OTA and AFs. It is vitally important to prevent contamination in raw material to prevent to mycotoxin producing. As well as controlling raw material, the place where it is kept being under control is significant.

During harvesting and post harvesting, occurrence of OTA and AFs can be prevented using good manufacturing practices, proper storing conditions and using high quality raw material. Preventing OTA and AFs is necessary in terms of protecting health and preventing economic losses.

1. GİRİŞ

Mikotoksinler, çok çeşitli yiyecek ve hayvan yeminde gelişen küflerin toksik metabolitleridir ve 300'den fazla mikotoksin keşfedilmiştir. (Jinab ve diğ, 2012). Mikotoksinlerin her zaman gıdalarda mevcut olduğu tahmin edilmektedir. Mikotoksin tüketiminin zararlı etkileri hakkında ilk veriler 5000 yıl önce Çin'de kaydedilmiştir. Bugün, geçmiş bin yılda Avrupa ve diğer kıtalarda mikotoksinlerin çok sayıda zehirlenme, yüz binlerce hayvan ve insan ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Kirilov ve diğ, 2013).

Antep fıstığı (*Pistacia vera L.*), Anacardiaceae ailesinin bir üyesi olup, kökeni Orta ve Batı Asya kurak bölgeleridir ve Akdeniz havzası genelinde dağılmıştır (Tomaino, 2010). Besin değerleri yüksek, lezzetli bu ürün tarih boyunca birçok ülkeye yayılmış ve farklı bölgelerde yetiştirilmeye başlanmıştır (Gül-Yavuz, 2011). Başlıca üreticiler İran, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Türkiye'dir (Bayram, 2012).

Antep fıstıkları kabukları çıkarılmış, kabuklu, çoğunlukla kurutulmuş veya tuzla kavrulmuş olarak satılabilir. Çekirdeğinin boyutları, ağırlığı, çıtlama yüzdesi ve çekirdek/fıstık oranı (g/g) fiziksel kalite özelliklerini oluşturur (Tsantili ve diğ, 2010). Şekil, boyut, renk, çıtlama yüzdesi Antep fıstığı piyasasında önemli kriterlerdir (Seferoğlu ve diğ, 2006). Küf gelişimi ise mikrobiyolojik kalite kriterlerinden biridir.

Tarım ürünler ile ilgili ciddi sorunlardan biri küf kontaminasyonudur; gıda üretimi ve depolamanın her aşamasında ortaya çıkabilir. Küf kontaminasyonu, insan sağlığı, gıda güvenliği ve ekonomik açıdan önem teşkil eder. Dünyada tarım ürünlerin %5-10'u insan ve hayvanlar tarafından tüketilmeden, küfler tarafından bozulmaya uğramaktadır. Küf gelişimi tarımsal ürünlerin gıda kalitesini düşürmekle birlikte, mikotoksin üretimi insan sağlığı açısından ciddi sorunları beraberinde getirmektedir. Okratoksin A ve aflatoksin çok çeşitli gıdalarda oluşabilen, oldukça yaygın gıda kontaminantlarıdır (Jalili ve Jinab, 2012).

OTA, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından üretilmektedir. Kahve, şarap, tahıllar, üzüm, baharatlar ve kakao ürünlerinde OTA varlığına sıklıkla rastlanmaktadır (Frizzell ve diğ, 2013). Hepatotoksik, nefrotoksik, immunotoksik ve karsinojenik etkilerinin olduğu belirlenen bu birleşik, insanlar ve hayvanlar için zararlıdır. Böbreklerin OTA'ya karşı en hassas organ olduğu düşünülmektedir. BEN'e yol açtığı belirlenmiştir. Bu nefropati türü, nadir görülen üriner sistem tümörleri ile ilişkilendirilmektedir. Okratoksin A, IARC tarafından 2B sınıfı kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (Daşkaya-Dikmen ve Hepekan, 2013). Birçok ülkede mikotoksinlerin insanlar ve hayvanlar için zararlı, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkilerine karşı bilinçlenme başlamış ve gıdalarda bulunan maksimum tolere edilebilir seviyeleri belirlenmiştir (Dini ve diğ, 2013). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), insanlarda okratoksin A için tolere edilebilir haftalık alımı (TWI) 120 ng OTA/ kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (Heperkan ve diğ, 2012).

AF grubu toksik ve karsinojenik poliketit ikincil metabolitlerdir ve *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* ve *Aspergillus pseudotamarii* başlıca üretici suşlardır. (Dini ve diğ, 2013; Cheraghali ve diğ, 2007). AF kontaminasyon riski yüksek olan ürünler arasında mısır, yer fıstığı, pamuk tohumu, Brezilya fındığı, Antep fıstığı, incir, baharat ve kurutulmuş hindistan cevizi içi (kopra) yer almaktadır (El tawila ve diğ, 2013; Cheraghali ve diğ, 2007). AF'nin beslenme ile alımında en önemli kaynaklar; darı, yer fıstığı ve onların ürünleri olarak belirlenmiştir. Birçok aflatoksin akut ve kronik toksisite göstermektedir. Çok çeşitli organizmalarda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler sergilemektedir. IARC aflatoksin B₁ (AFB₁)'i öncelikle ciğerleri hedef alan, grup I karsinojen olarak sınıflandırmaktadır (Cheraghali et al, 2007).

Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştirilen Antep fıstıkları örneklerinde okratoksin A ve aflatoksin varlığının incelenmesi amaçlanmıştır.

2. ANTEP FISTIĞI

2.1 Antep Fıstığı Tanımı ve Tarihçesi

Antep fıstığı en eski sert kabuklu meyvelerden biri olup, antik çağlarda kral sofralarında yer almış ve elit sınıf için bir ayrıcalık simgesi olmuştur. Antep fıstığının kültüre alınış tarihi Eti Uygarlığı'na dayanmaktadır. Birinci yüzyılın başlarında doğal yetişme alanlarından biri olan Suriye'den İtalya'ya götürülmüş ve diğer Akdeniz ülkelerine de yayılarak yetiştirilmeye başlanmıştır (Gül-Yavuz, 2011).

Pistacia (Anacardiaceae) cinsine ait 11 tür bulunmaktadır. Bunlardan bazıları Akdeniz ve Asya ülkelerinde yüksek ekonomik ve kültürel değere sahiptir (İsfendiyyaroğlu ve Özeke, 2009). Örneğin, Çin Halk Cumhuriyeti'nde *Pistacia chinensis* biyolojik ailesine ait Antep fıstığı, biyodizel yakıt üretimi çalışmalarında kullanılmak üzere yetiştirilmektedir (Gül-Yavuz, 2011). Bu türler içinde yalnızca *Pistacia vera* L. türünün meyveleri yenmektedir (Parfitt ve diğ, 2012). *Pistacia vera* L., bir fıstık ağacı türü olup, ekstrem çevre koşullarına (pedoklimatik ve hidrolojik) karşı belirgin direnç göstermektedir. Bu özellik, Avrupa ve Asya'da başka hiçbir meyvenin yetişemeyeceği topraklarda Antep fıstığının yetiştirilmesini mümkün hale getirmektedir (Bellomo ve Fallico, 2007).

Antep fıstığı, subtropikal bir meyvedir (Bagheri ve diğ, 2011). İran, Türkiye, ABD, Suriye, İtalya, Tunus ve Yunanistan başlıca Antep fıstığı üreticisi ülkelerdir (Bellomo ve Fallico, 2007; Tsantili ve diğ, 2010). Her ülkede ekili alanlar kendilerine has özelliklere sahiptir ve yetiştirilen mahsüller yeşil veya sarı çenekli olma, boş meyve yüzdeleri, yıllık düzenli meyve verme gibi özellikler bakımından farklılık gösterir (Bellomo ve Fallico, 2007). İran güney-doğu bölgelerinde, özellikle Kerman eyaletinde, Antep fıstığı egemen bitkidir (Bagheri ve diğ, 2011). ABD'ye, Antep fıstığı ilk olarak 1848 yılında İran'dan getirilmiştir ve yetiştiriciliğinde Kaliforniya eyaleti ilk sırada yer almaktadır. ABD'de başlıca yetişen çeşitler Kirman ve Peter olup; İbrahmim, Ohadi, Safidi, Şasti ve Vahidi çeşitleri de bulunmaktadır. Dünyada Yakındoğu, Akdeniz ve Asya'nın batı bölgelerinde yetişen Antep fıstığı

ülkemizde ise adından da anlaşılacağı üzere en çok Gaziantep ilinde yetişmektedir (Gül-Yavuz, 2011).

Sert kabuklu meyvelerin steroller, vitaminler, mineraller, yağ asitleri, fenolik bileşikler dahil olmak üzere sahip olduğu besin bileşenleri, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri onu daha cazip hale getirmektedir (Tsantili ve diğ, 2010). Çizelge 2.1’ de Antep fıstığının ağırlıkça vitamin ve minarel içerikleri detaylı olarak yer almaktadır.

Çizelge 2.1 : Antep fıstığı besin içeriği (Gül-Yavuz, 2011).

100 gr Antep fıstığı	mg
Fosfor	500
Potasyum	1020
Kalsiyum	136
Magnezyum	158
E vitamini	5
C vitamini	7

Lezzetli bir meyve olan Antep fıstığı besin elementlerince oldukça zengindir (Çizelge 2.1). Bunun yanı sıra, Antep fıstığı meyvesi zengin bir yağ kaynağıdır ve insan beslenmesi için gerekli olan yağ asitlerini içerir. Antep fıstığı çekirdek yağı, yüksek miktarda tekli doymamış yağ asitleri içerir. Özellikle kolesterol düzeyi ile ters ilişkili olan oleik asit açısından zengindir. Ayrıca düşük oranda çoklu doymamış ve çok düşük oranda doymuş yağ asitleri içermektedirler (Ghrab ve diğ, 2010). Antep fıstıkları, oleik, linoleik ve linolenik gibi doymamış yağ asitleri içerirler ve bu üç yağ asidi beslenme için oldukça önemlidir. Farklı ekolojik koşullar, aynı çeşit Antep fıstıklarının farklı yağ içeriğine ve yağ asidi kompozisyonuna sahip olmalarında etkilidirler. Seferoğlu ve diğ. (2006), çalışmalarda Türk Antep fıstıklarının yağ içeriğinin %54-60 aralığında tespit edildiğini belirtmişlerdir. Türk ve İran fıstık çeşitlerinin yağ içeriklerini kıyasladıkları çalışmalarında, Çizelge 2.2’de yer alan değerler tespit edilmiştir.

Çizelge 2.2’de Türk ve İran fıstıklarının yağ içerikleri arasındaki farklılıklar yer almaktadır. Birçok araştırmacı Antep fıstıkları yağ asidi kompozisyonlarının; ekolojik koşullar, çeşitlilik, konum, coğrafik köken, teknik ve tarımsal uygulamalara bağlı olarak farklılık gösterdiğini belirlemiştir (Seferoğlu ve diğ, 2006). Ghrab ve diğ. (2010), çevre koşullarının yanı sıra genetik faktörlerin de yağ içeriği ve yağ asidi kompozisyonunu etkilediğini bildirmişlerdir.

Çizelge 2.2 : Türk ve İran Antep fıstıkları yağ içerikleri (Seferoğlu ve diğ, 2006).

Yağ içeriği	Türkiye Antep fıstıkları (%)	İran Antep fıstıkları (%)
Palmitik asit	8,27-11,07	8,40–10,87
Stearik asit	0,20-2,79	0,44–1,80
Oleik asit	53,16-72,63	51,80–71,23
Linoleik asit	16,58-35,40	17,36–35,16
Toplam	48,5-58,5	47,65–63,31

Antep fıstıkları, kabukları çıkarılmış, kabuklu, çoğunlukla kurutulmuş veya tuzla kavrulmuş olarak satılabilir. Aynı zamanda lezzetli bu ürün, yemeklerde ve şekerleme sektöründe kullanılmakta ve fıstık ezmesi olarak da tercih edilmektedir (Tsantili ve diğ, 2010).

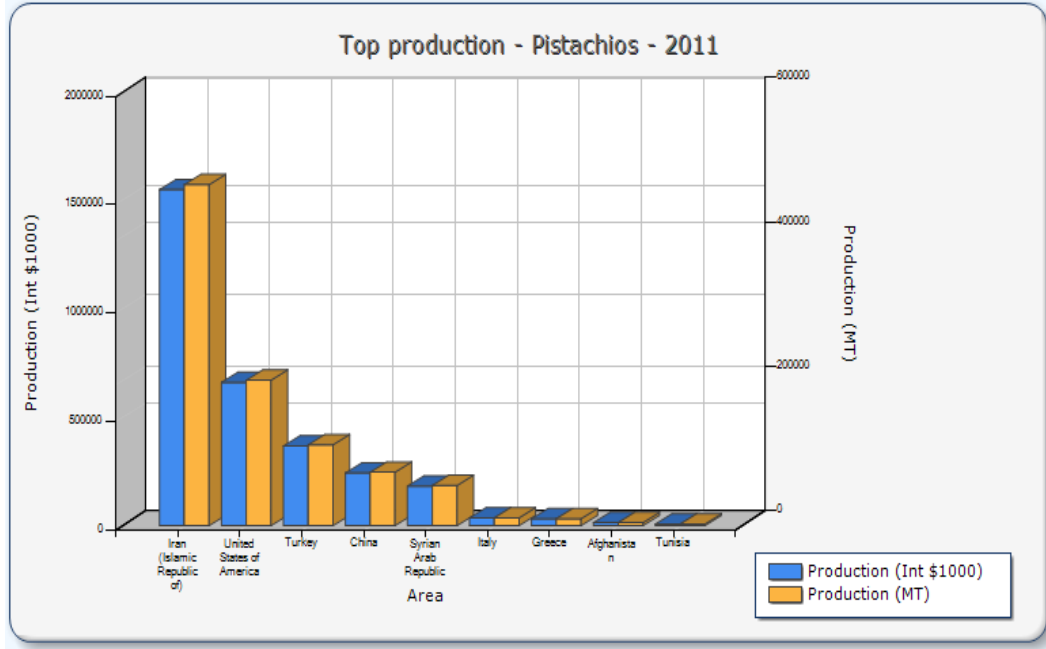
Türkiye’de profesyonel Antep fıstığı yetiştiriciliği 1948 yılında Ceylanpınar Devlet Çiftliği’ndeki 114 dekar alanda başlamıştır. Günümüzde de bu kurum Antep fıstığı araştırmalarında önemli bir yere sahiptir ve 10.7 milyon hektarlık bir alanı bu araştırmalar için ayırmaktadır. Güneydoğu, Akdeniz, Ege ve İç Anadolu Bölgeleri’nde toplam 56 ilde üretim yapılmakla birlikte, en yüksek paya sahip başlıca iller Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman, Şanlıurfa, Mardin, Kilis, Diyarbakır ve Siirt’tir (Babadoğan, 2007).

Türkiye’de, yenilebilir tür *Pistacia vera* L.’nin yetiştirilmesi çoğunlukla sulama yapılmayan koşullarda gerçekleştirilmektedir. Bu da ağaç başına verimi düşürür. Sulama yapılan koşullarda verimin artacağı belirtilmektedir. Türkiye’ nin en popüler fıstık çeşitleri Uzun, Kırmızı ve Siirt’tir. Uzun çeşidi, uzun fıstığı ve yeşil çekirdeği ile hoş bir tada sahiptir. Üretimde Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ni takip eden Ege Bölgesi, Antep fıstığı yetiştirmek için uygun iklime sahiptir ve Aydın, Manisa, Muğla, Çanakkale ve İzmir Antep fıstığı yetiştiriciliğinin artış gösterdiği illerdendir. Aydın şehrinde ve Büyük Menderes Nehri Havzası çevresindeki ilçelerde, Uzun, Siirt ve Ohadi çeşitleri ticari olarak yetiştirilir. Her yıl düzenli meyve vermeyen Uzun çeşidi, içlerinde en yaygın olanıdır (Seferoğlu, 2006).

2.2 Antep Fıstığı Ekonomik Verileri

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü’nün istatistik veri tabanından alınan (FAOSTAT) 2011 yılı verilerine göre; dünyada Antep fıstığı üretiminde lider ülke

İran'dır. İran'ı, üretim ve sulama tekniklerini geliştirerek üretim hacmini devamlı arttırmış olan ABD izlemektedir. Türkiye ise bu ülkelerin ardından üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 : Dünya Antep fıstığı üretimi (FAOSTAT, 2013).

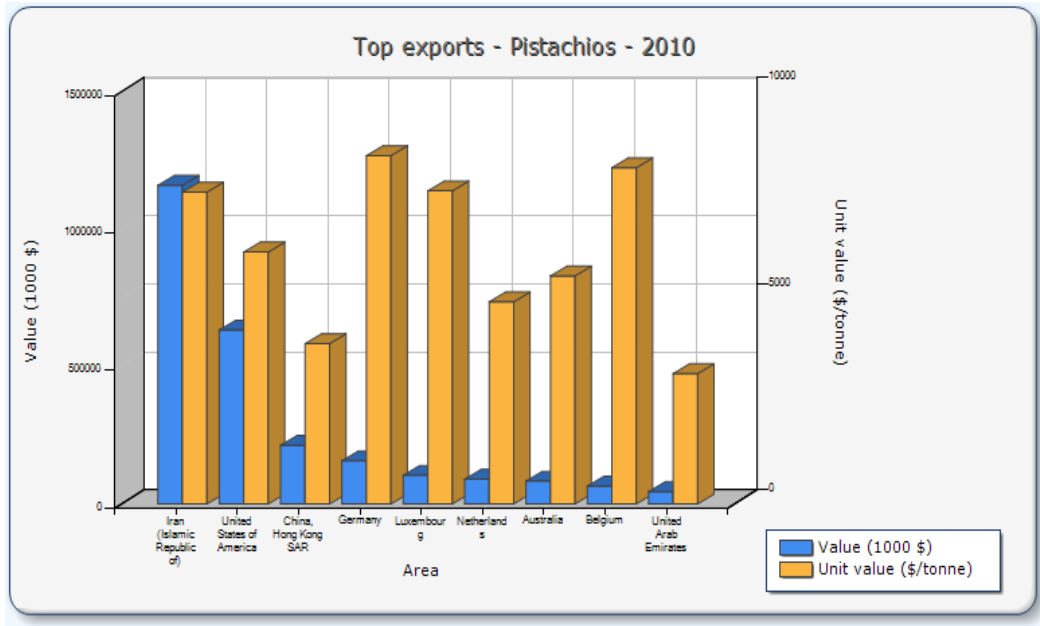
Şekil 2.1’de İran, ABD ve Türkiye’nin öncü üretici ülkeler olduğu görülmektedir. İran fıstıklarının fiyatlarının göreceli olarak daha düşük ve iri taneli olması dünya çapında talep edilmesine neden olmaktadır. Ancak, geçmiş yıllarda üretim esnasında oluşan aflatoksin, ürünün ithalatında sorunlar yaşanmasına neden olmuş, özellikle Avrupa Birliği (AB) ve Amerika bu konuda ciddi önlemler almıştır (Gül-Yavuz, 2011). Dünya Antep fıstığı üretimine ait detaylar Çizelge 2.3’te yer almaktadır.

Çizelge 2.3 : Dünya Antep fıstığı üretimi (FAOSTAT, 2013).

Ülkeler	2011 (Ton)	2011 (Int \$ 1000)
İran	472.097	1.550.430
ABD	201.395	661.408
Türkiye	112.000	367.823
Çin Halk Cum.	74.000	243.026
Suriye	55.610	182.630
İtalya	10.801	35.471
Yunanistan	9.580	31.462
Afganistan	4.203	13.803
Tunus	2.100	6.896
Kırgızistan	888	2.916

FAOSTAT 2011 yılı verilerine göre dünyada üretim 3 milyar ABD dolarına ulaşmıştır ve en büyük pay 427.097 ton/yıl üretim kapasitesiyle İran'dadır. Türkiye 2011 yılında 112.000 ton üretim kapasitesine ulaşmıştır (Çizelge 2.3).

Son yıllara ait ihracat verileri incelendiğinde ise üretimde lider iki ülke olan İran ve ABD'nin ihracatta da ilk sıralarda yer aldığı görülmektedir. Üretimde üçüncü sırada yer alan ülkemizin ise dünya ihracat sıralamasında çok gerilerde olduğu bulunmaktadır (Çizelge 2.4).



Şekil 2.2 : Dünya Antep fıstığı ihracatı (FAOSTAT, 2013).

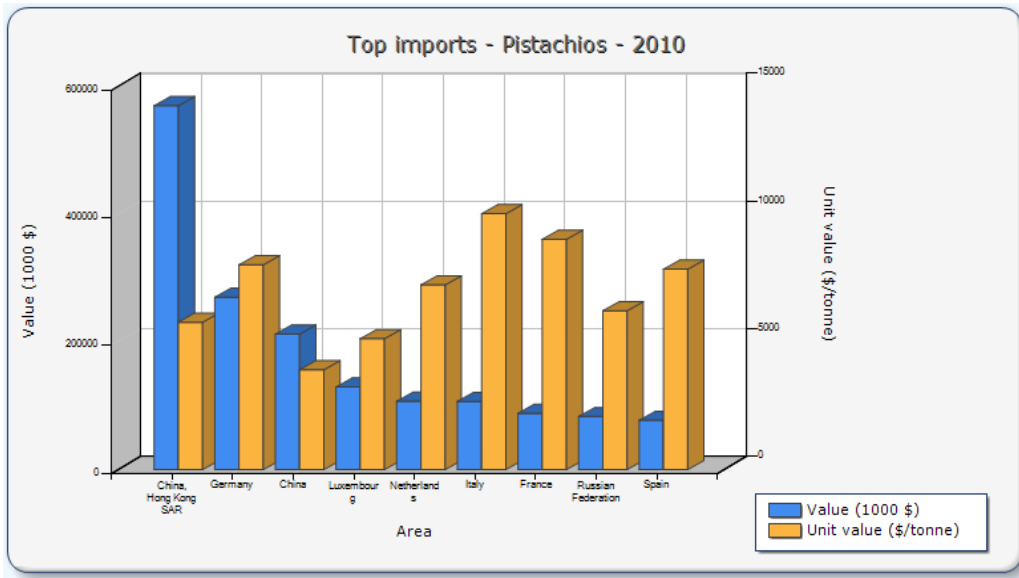
Şekil 2.2 incelendiğinde üretici ülkeler arasında yer almayan Hong Kong, Almanya, Hollanda, Lüksemburg gibi ülkelerin ihracatta önemli rol oynadığı görülmektedir. Bu da Antep fıstığının re-eksporta tabi olduğunu göstermektedir.

Dünya Antep fıstığı ihracatı 2010 yılına ait verilerin ülke bazında sıralaması Çizelge 2.4'te yer almaktadır. Toplam 2.6 milyar ABD dolarını geçen dünya fıstık ihracatında en büyük pay 1.2 milyar dolar ile İran'dadır. Türkiye, üretim ve ekili alan miktarları göz önüne alındığında potansiyel ihraç miktarının çok gerisindedir. Uluslararası pazarlarda, İran ve ABD kökenli fıstıkların fiyatlarının düşük olması, iri taneli olması ve çıtlak oranının yüksek olması daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır.

Çizelge 2.4 : Dünya Antep fıstığı ihracatı (FAOSTAT, 2013).

Ülkeler	2010 (ton)	2010 (1000\$)
İran	153.259	1.159.352
ABD	103.579	632.881
Hong Kong, Çin	54.871	213.432
Almanya	18.593	157.082
Lüksemburg	13.712	104.114
Hollanda	18.329	89.832
Avustralya	14.994	82.929
Belçika	7.926	64.637
Birleşik Arap Emirlikleri	14.155	44.763
Suriye	4.985	28.915
Afganistan	915	14.225
Türkiye	717	13.973
İtalya	737	12.960

Türkiye yaklaşık 14 milyon ABD dolar ihracat miktarı ile dünya genelinde 12. sırada yer almaktadır (Çizelge 2.4). Fıstıkların daha küçük ve fiyatının yüksek olması uluslararası piyasa açısından zorluklar oluşturmaktadır. Tadının daha yoğun olması ise önemli bir avantajdır. Söz konusu ürünlerin tanıtımında bu özelliğin vurgulanması pazarlama açısından önemlidir. Üretici konumunda bulunan ABD'nin son yıllarda ülkemiz Antep fıstığı ithalatçısı durumuna gelmesi bu özelliğin pazarlanmasıyla ilişkilendirilmektedir (Babadoğan, 2007). Dünya Antep fıstığına ait veriler Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 : Dünya Antep fıstığı ithalatı (FAOSTAT, 2013).

Şekil 2.3'te de görüldüğü üzere Hong Kong-Çin, Almanya ve Çin Halk Cumhuriyeti ithalat yapan başlıca ülkelerdendir. FAOSTAT 2010 yılı verilerine göre 2 milyar ABD dolarını aşan dünya Antep fıstığı ithalatında, Hong Kong %28'lik pay ile ilk sırada yer almaktadır. Bu ülkeyi sırasıyla Almanya (%14) ve Çin Halk Cumhuriyeti (%11) takip etmektedir. Diğer bazı ülkelere ait veriler Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5 : Dünya Antep fıstığı ithalatı (FAOSTAT, 2013).

Ülkeler	2010 (ton)	2010 (1000\$)
Hong Kong, Çin	98.747	569.756
Almanya	33.675	269.874
Çin Halk Cum.	54.281	212.136
Lüksemburg	25.239	129.299
Hollanda	14.784	106.892
İtalya	10.655	106.697
Fransa	9.770	88.066
Rusya Federasyonu	13.355	82.999
İspanya	9.840	77.168
Belçika	9.032	72.483

2010 yılı ithalat miktarı 330 bin tonu aşmıştır ve dünya Antep fıstığı ithalatında Hong Kong yaklaşık %30'luk paya sahiptir (Çizelge 2.5).

Türkiye'nin Antep fıstığı ihracat verileri incelendiğinde ise dalgalanmalar gözlenmektedir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6 : Türkiye ihracatı (Ekonomi Bakanlığı Bilgi Sistemi, 2012).

Ülkeler	2010 İhracat ton	2010 1000 \$	2011 İhracat ton	2011 1000 \$	Değişim (%) 2010-2011 (\$)	Pay (%)
İtalya	252	5.069	549	11.180	120,6	47,9
Almanya	91	2.408	96	2.298	- 4,6	9,8
İsrail	104	2.005	107	2.097	4,6	9,0
Belçika	55	1.126	87	1.623	44,1	7,0
Suudi Arabistan	3	48	69	1.446	2.882,3	6,2
Mersin Serbest Bölgesi	6	100	64	1.059	957,8	4,5
ABD	19	271	57	929	243,2	4,0
Fransa	5	127	21	521	308,7	2,2
İsviçre	12	267	17	444	65,9	1,9
Tunus	3	28	21	322	1.043,2	1,4
Genel Toplam	717	13.971	1.160	23.342	67,1	100,0

Çizelge 2.6'daki ülke bazında ihrac pazarlarımız incelendiğinde en büyük payı %48 ile İtalya'nın oluşturduğu, bu ülkeyi sırasıyla Almanya (%10), İsrail (%9) ve Belçika'nın (%7) izlediği görülmektedir. İhracattaki bu dalgalanmaların sebebi, ürünün periodisite (ağacın bir yıl ürün verirken, diğer yıl daha az vermesi ya da hiç vermemesi) eğiliminde oluşuna, iklim koşulları kaynaklı üretim miktarlarındaki düşüşlere veya artışlara bağlıdır.

2.3 Antep Fıstığı Üretimi

Antep fıstığı, kuzey ve güney yarım küre 30-45° paralellerinin uygun iklime sahip bölgelerinde yetişir ve “Yakın Doğu Gen Merkezi” ve “Orta Asya Gen Merkezi” olmak üzere iki vatanı vardır. Yakın Doğu Gen Merkezi; Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan'ın yüksek kısımlarını içine alır. Orta Asya Gen Merkezi ise Hindistan'ın kuzeyi, Afganistan, Tacikistan ve Pakistan'ın yer aldığı bölgeyi kapsar. Antep fıstığının kültür formlarının gen merkezi ise Anadolu, İran, Suriye, Afganistan ve Filistin'dir.

Antep fıstığı, başka bitkilerin yetişemeyeceği bölgelerde yaşamını devam ettirebilir ve ürün verebilir. Dikilen fidanın çabuk gelişmesi, erken meyveye yatması, bol ve düzenli ürün vermesi için toprak şartlarının uygun olması ve bakım işlerinin iyi yapılması gerekmektedir. Toprak özellikleri ise, derin kumlu-tınlı bünyede ve kısmen kireç içermelidir (Gül-Yavuz, 2011). Özellikle verimsiz, tuzlu ve alkali topraklarda, değişen periyotlarda kuraklık stresine maruz ortamlarda üretilebilmektedirler. Antep fıstığının derin kök sistemi ve yaprak yapısı nedeniyle, kuraklık stresine yüksek kapasitede dayanıklıdır. Diğer meyve ağacı türlerine kıyasla su stresine karşı en yüksek performansa sahip tür olduğu bilinmektedir. Ağaç kökleri, su potansiyeli son derece az olan topraklarda, etkin bir şekilde toprak neminden faydalanabilmektedir (Bagheri ve diğ, 2011). Ağaçlar ilk 5-8 yıl arasında meyve vermemekte, 15-20 yıldan önce verim maksimum düzeyde sağlanamamaktadır. Ayrıca fıstık ağaçları ya iki yılda bir meyve vermekte ya da bir sonraki yıl daha küçük boyutta meyve vermektedir.

Antep fıstığının ekonomik olarak yetiştirileceği bölgelerde iklim özellikleri ise yazları uzun, sıcak ve kurak, kışları nispeten soğuk olmalıdır. Yaz aylarında, meyvenin gelişebilmesi ve olgunlaşması için oldukça fazla ve uzun süre yüksek sıcaklığa, kış aylarında ise belli bir süre düşük sıcaklığa ihtiyaç duyulmaktadır (Gül-

Yavuz, 2011). Türkiye’de üretim en yüksek Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde gerçekleştirilmektedir. Üretim bölgelerine bağlı olarak, mevcut fıstık çeşidi Çizelge 2.7’de yer almaktadır.

Çizelge 2.7 : Türkiye’de sıklıkla yetiştirilen Antep fıstıkları (Babadoğan, 2007).

Çeşit	Antep fıstığı çeşidinin özellikleri
Uzun	Ebatı küçük olmasına rağmen lezzeti ile çok ünlüdür. Diğer çeşitlerle kıyaslandığında daha geç olgunlaşır fakat verimi daha yüksektir. Gıda sanayinde kullanımı yüksek, ülkemizde bulunan en yaygın çeşittir.
Kırmızı	Ağırlıklı olarak Gaziantep ilinin yüksek kesimlerinde yetişir ve erken olgunlaşması tercih edilme nedenidir.
Siirt	İri taneli ve yüksek çıtlak oranı ile popülerdir.
Halebi	Sıcak bölgelerde yetişir. Kuruyemiş olarak tüketilmesinin yanı sıra, gıda sanayisinde hammadde olarak kullanılmaktadır.
Ohadi	Ebatları büyüktür, daha çok kuruyemiş olarak tüketilir ve geç olgunlaşır.

Çizelge 2.7’de belirtilen türlerin dışında keten gömleği, beyaz ben, değirmi, çakmak, sultani, vahidi, mümtaz, sefidi, hacı şerifi ülkemizde yetiştirilen Antep fıstığı çeşitlerindendir (Babadoğan, 2007).

Antep fıstığı üretim basamakları incelendiğinde ise süreci hasat öncesi, hasat ve hasat sonrası olarak gruplanmaktadır.

2.3.1 Hasat öncesi basamaklar

2.3.1.1 Bitki koruma uygulamaları

Antep fıstığı ağaçlarında genellikle mayıs ve haziran aylarında meyvelerin kabukları hala yumuşak olduğundan böcek istilasına karşı zedelenebilir yapıdadır ve genellikle çiftçiler böceklere karşı bitki koruma uygularlar. Olgunlaşma (çekirdek geliştiğinde, rengi kırmızı-mora döner ve kolayca kabuğundan ayrılır, kabuk sertleşir ve çatlar, gövde yumuşar) temmuz ayında başlar ve ağustos ayının son günlerinde, hasat başlarken sona erer. Böcek istilaları eşik değerlerin üzerinde değilse genellikle bu aşamada bitki koruyucu ürünler kullanılmaz (Georgiadou ve diğ, 2012).

Aspergillus türleri bitki hastalıklarının ana etkenleri olarak düşünülmesine de çeşitli bitkilerde bazı hastalıklara yol açabilirler. Antep fıstıklarında, *Aspergillus niger* küf türü “*Aspergillus* meyve çürümesi” hastalığına yol açmaktadır (Kocsube ve diğ, 2013).

2.3.1.2 Sulama ve gübreleme

Olgunlaşma döneminde (temmuz-ağustos), fıstık ağaçları genellikle iki ila dört defa arası sulanmaktadır. Sulama ile paralel olarak, potasyum nitrat ve amonyum nitrat gibi suda çözünür gübre kullanılır (Georgiadou ve diğ, 2012).

2.3.2 Hasat

Hasat zamanı, her Antep fıstığı bahçesi için farklıdır ve üretici tarafından karar verilir. Mekanik hasat yöntemi kullanılmıyorsa hasat işlemi, ağaç altındaki alanı ve etrafını koruyucu sert bir kumaş ile çevreleme, ağaç dallarını elle sallama ve düşen meyveleri çuval içinde muhafaza etme adımlarını içerir (Georgiadou ve diğ, 2012).

2.3.3 Hasat sonrası basamaklar

2.3.3.1 Kabuk ayırma

Yumuşak gövdeyi kabuktan ayırma işlemi, hasattan sonra mekanik olarak su içi kabuk ayırıcılar tarafından gerçekleştirilir. Bu adımda çöp, boş, tam gelişmemiş veya düşük ağırlıktaki fıstıklar yüzdürme yöntemine göre sınıflandırılmaktadır. Kabuğu uzaklaştırılmış fıstıklar çuval içine doldurulur ve kurutma işlemine geçilir (Georgiadou ve diğ, 2012).

2.3.3.2 Kurutma

Kurutma, kabuk ayırmadan hemen sonra (normalde aynı günde) ya mekanik olarak sıcak hava kurutucularda ya da güneş altında (fıstıklar düz beton çatılara, 2-3 cm kalınlığında ince tabaka halinde yayılarak) gerçekleştirilir. Georgiadou ve diğ. (2012) yaptığı çalışmada, mekanik kurutmanın, kabuk ayırmadan sonraki gün 63°C sıcaklıkta 8 saat sürdüğünü belirtmiştir. Güneş altında kurutma ise kabuk ayırmadan hemen sonra 25-35 °C sıcaklık, %54-80 bağıl nem aralığında 4 gün sürmüştür.

Yapılan çalışmalar, kurutma koşullarının ve/veya kurutulmuş ürünlerin depolanmasının, çekirdeğin kompozisyonel değişiklikleri üzerine etkisi olduğunu göstermiştir. Kurutma, kabuk çıkarmaya kıyasla daha kolay bir süreç olarak kabul edilebilir ancak yüksek kurutma sıcaklığı, lipid hidrolizi ve oksidasyonu sebebiyle kötü tatlar oluşturabilmektedir (Tsantili ve diğ, 2010).

2.3.3.3 Elle ayırma

Elle ayırma düşük kaliteli meyveleri (renksiz, küçük boyutlu veya düzensiz şekilli) uzaklaştırmak için kullanılan yaygın bir uygulamadır (Georgiadou ve diğ, 2012).

2.3.3.4 Depolama

Saklama koşulları üreticilerin kendine has uygulamalarına göre farklılık gösterir. Kurutulmuş fıstıklar oda sıcaklığında depolanabilir ya da buzdolabı sıcaklıklarında saklanabilir (2-6 °C) (Georgiadou ve diğ, 2012).

2.4 Antep Fıstığı Kalite Kriterleri

Antep fıstığı çeşitlerinin arzu edilen karakteristik özellikleri; büyük fıstık ve çekirdek, yüksek çıtlama oranı, yıllık düzenli meyve verme ve yüksek yeşil renkli çekirdek yüzdesi olarak sıralanmıştır (Seferoğlu ve diğ, 2006). Bu sebeple; şekil, boyut, renk, çıtlama yüzdesi Antep fıstığı piyasasında önemli kriterlerdir. Çeşit ve kurutma koşulları; nem içeriği, fıstık oranı, çekirdek boyutları, kabuk görünümü, çıtlama yüzdesi ve kompozisyon farklılıklarını etkilemektedir (Tsantili ve diğ, 2010). Çekirdek rengi, kompozisyon farklılıklarını yansıtır ve Antep fıstığı kalite özelliklerinden biridir; ancak bu konuda raporlar nispeten sınırlıdır (Bellomo ve Fallico, 2007; Seferoglu ve diğ, 2006).

Küf kontaminasyonu, mikrobiyolojik kalite kriterlerindendir. Tarımsal ürünlerde, OTA düzeyi enleme bağılı olarak iklimden etkilenir. Ayrıca hasattan önce gözlenen, sıcaklık ve bağıl nem değerleri gibi ürünün yetiştirildiği yılın özel koşulları etkili olmaktadır (Remiro ve diğ, 2012). Antep fıstıkları yüksek aflatoksin kontaminasyon riskine sahip gıda maddeleridir. Kontaminasyon; sıcaklık, nem, toprağın işlenmesi sırasında düşen yağışın boyutu, hasat ve hasat sonrası süreçte düşen yağışın boyutu gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Hem tüketici sağlığını korumak hem de üreticilerin çıkarlarını göz etmek amacıyla aflatoksin kontaminasyonunu mümkün olabilecek en düşük seviyeye indirecek pratik müdahaleler uygulamaya konmalıdır. Bu konuda başarısız olmak ise, üreticilere yıkıcı ekonomik sonuçlar doğurmaktadır. Ayrıca tüketicileri değerli bir besin ögesinden ve Antep fıstığı tüketim zevkinden mahrum bırakır (Dini ve diğ, 2013).

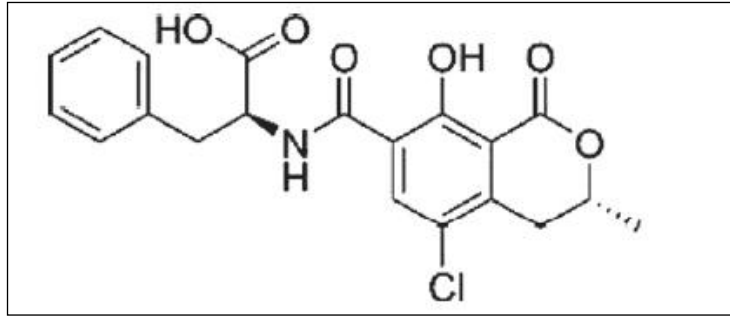
Yer fıstığı ile yapılan bir çalışmada, ekim, hasat, kurutma, taşıma ve depolama sırasındaki kötü tarım ve üretim uygulamalarının, yüksek aflatoksin kontaminasyonuna yol açtığı bildirmiştir (Stojanovska ve diğ, 2013). Benzer şekilde Antep fıstığında İyi Tarım Uygulamaları (GAP), İyi Üretim Uygulamaları (GMP) ve İyi Hijyen Uygulamaları (GHP)'nın her aşamada dikkatle uygulanması kontaminasyonların önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Aspergillus türlerinden sadece sınırlı sayıda olanı, canlı bitki dokularında bulunabilmekle birlikte, sık sık tarım ürünlerinde hasat sonrası kontaminasyonlardan sorumludurlar. Aspergilli işleme, taşıma ve hasat dahil olmak üzere farklı aşamalarda, tarımsal ürünleri kontamine edebilir. Bu organizmaların neden olduğu gıda bozulmalarından en önemlisi ise mikotoksin oluşturmalarıdır. Mikotoksinler, insan ve hayvan sağlığı üzerinde zararlı etkilere sahiptir. Tarım ürünlerine zarar verebilecek bazı mikotoksinler tespit edilmiş olup, ekonomik açıdan en önemlileri aflatoksin, okratoksin, fumonisin ve patulin olarak belirlenmiştir (Kocsube ve diğ, 2013).

3. OKRATOKSİN A

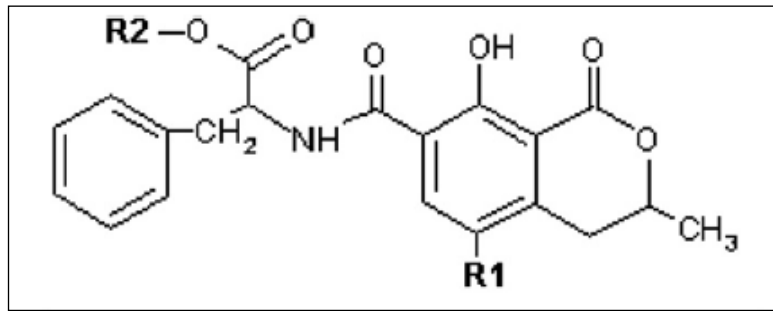
Okratoksin A (OTA), küfler tarafından üretilen ikincil metabolitlerden biridir ve *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından üretilir (Jaksic ve diğ, 2013; Afsah-Hejri ve diğ, 2012). *Aspergillus* cinsi küflerden *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus carbonarius* ile *Penicillium verrucosum* OTA üreticisi ana küflerdir. *Aspergillus*, tropik bölgelerde gıda ve yemlerin okratoksin kontaminasyonundan sorumlu olan ana küf cinsi olarak bilinmektedir (Afsah-Hejri ve diğ, 2012). *Aspergilli* cinsi *Penicillia*'ya kıyasla daha sıcak iklimleri severken, *Penicillia* düşük sıcaklıklarda optimum gelişme gösterir (Hayat ve diğ, 2012). OTA dünya genelinde farklı bölgelerde; tahıllarda (arpa, buğday, mısır ve yulaf), yeşil kahvede, kakaoda, baharatlarda, üzüm suyu ve şarapta tespit edilmiştir (Toffa ve diğ, 2013). Nefrotoksik, karsinogenik, hepatotoksik, teratojenik ve immunotoksiktir (Hashemi, 2009). Danimarka domuz nefropatisi için etiyolojik etmendir. BEN olası etkenidir; böbreklerde tübüllerin dejenerasyonu, doku içi fibrozis ve hiyalinizasyon ile ilişkilendirilir. IARC tarafından 1993 yılında insanlar için olası karsinogen olarak sınıflandırılmıştır (Grup 2B) (Kocsube ve diğ, 2013). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), insanlarda okratoksinlerin tolere edilebilir haftalık alımını (Tolerable Weekly Intake-TWI) 120 ng OTA/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (EFSA, 2006).

OTA, 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* suşlarının ikincil metaboliti olarak keşfedilmiştir (Fabiani ve diğ, 2010). 7-(1-b-fenilalanil-karbonil)-karboksil-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-3R metil izokumarin yapıdadır (Şekil 3.1). Toksin; berrak, renksiz, mavi floresans veren kristal bir bileşiktir ve asidik karaktere sahiptir (Frenette ve diğ, 2008). Analitik prosedürlerde, OTA'nın zayıf organik asit davranışı önem teşkil etmektedir (Hashemi, 2009). OTA göreceli karardır; pişirme, kavurma ve fermantasyon gibi gıda işlemlerine dayanıklıdır (Novo ve diğ, 2013). Schmidt-Heydt ve diğ. (2011) tarafından, Okratoksin A üretiminin karanlık evrelerde daha yüksek, ışık altında ise daha düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.1 : Okratoksin A' nın kimyasal yapısı (Bazin ve diğ, 2013).

Şekil 3.1'de kimyasal yapısı gösterilen OTA, pentaketit yapıdadır ve düşük molekül ağırlığına sahiptir (Kocsube ve diğ, 2013; Hayat ve diğ, 2012). OTA üreticisi küfler, ilgili diğer bileşikler de oluşturabilirler. Bunlara örnek olarak okratoksin B (OTB), okratoksin C (OTC), okratoksin A metil ester (MeOTA) ile OTB metil ve etil esterler (sırasıyla MeOTB ve EtOTB) verilebilir. Şekil 3.2'de bu bileşiklere ait moleküler yapılar gösterilmiştir.



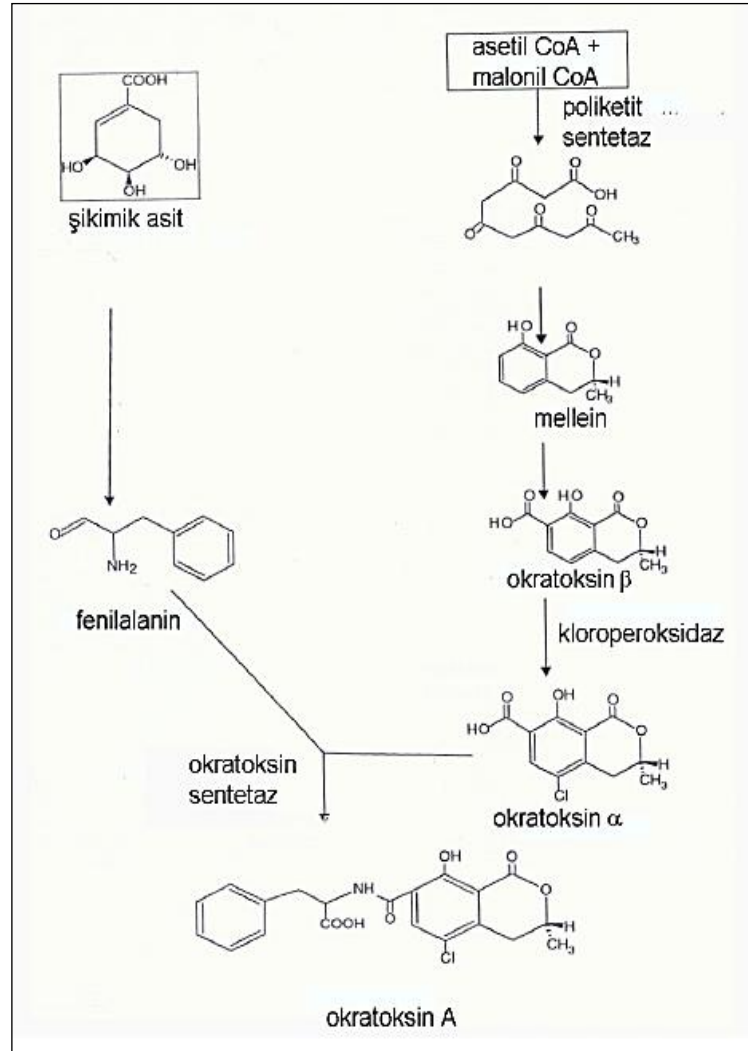
Okratoksin	R ₁	R ₂
OTA	Cl	H
MeOTA	Cl	CH ₃
OTC	Cl	CH ₃ CH ₂
OTB	H	H
MeOTB	H	CH ₃
EtOTB	H	CH ₃ CH ₂

Şekil 3.2 : Okratoksinlere ait moleküler yapılar (Remiro ve diğ, 2012).

Şekil 3.2'de yer alan okratoksinlerden, OTC'nin hücre kültürlerinde OTA'dan daha toksik olduğu kanıtlanmıştır. Esterleşme OTC'nin hücrelere penetrasyonuna olanak sağlar ve vücutta hızla OTA'ya dönüştürülür; bu da doku konsantrasyonlarını ve tüm toksisiteyi maksimum düzeyde etkiler. Bu sebepten dolayı OTA ile OTC arasında sinerjist toksik etkiler bulunur. OTB'nin ise OTA'ya kıyasla on kat daha az toksik

olduğu belirtilmiştir; ancak bazı çalışmalar OTB'nin sitotoksik, nefrotoksik ve teratojenik etkilerinden bahsetmektedir (Remiro ve diğ, 2012).

OTA, 7-karbonil grubu yoluyla 1-β-fenil alanine bağlı klor içeren dihidroizokumarin yapısındadır (Fabiani ve diğ, 2010). Şekil 3.3' de OTA'nın biyosentezi yer almaktadır.



Şekil 3.3 : Ochratoxin A biyosentezi (Ünal, 2009).

Şekil 3.3'te biyosentezi ayrıntılı olarak gösterilen izokumarin türevleri olan OTA, L-β fenilalanine amid bağı ile bağı, biyosentetik orijinine göre poliketidler grubu içinde pentaketitler olarak sınıflandırılmış bileşiktir. Pentaketitler, asetil ve malonil CoA'dan oluşurlar ve sikülizasyon ve aromatisasyon ile pentaketitler izokumarine dönüşmektedirler. Karboksi türevinin oksidasyon, klorinasyon, metilasyon ve asit aktivasyonları ile şikimik asit yolu sonrası oluşan fenilalanin ve fosfoochratoxin A, OTA'yı oluşturmaktadır. Klorinasyon işlemi, kloroperoksidaz enziminin aktivitesi ile

gerçekleşmektedir. Kloroperoksidaz, biyosentezi başlatan enzimdir; düşük substrat spesifitesi gösterir, hayvan ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. OTA biyosentezinde ana kısımlar fosfookratoksin A ve fenilalanin etil esteri oluşumu, ardından bunların birleşme reaksiyonlarıdır. Birleşme, okratoksin sentetaz kompleksi ile olur. Bu sırada, ATP ve Mg^{++} reaksiyon için gereklidir (Ünal, 2009).

3.1 Okratoksin A Üreticisi Küfler

Okratoksin A, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait bazı küf türleri tarafından üretilen toksik, ikincil metabolitlerdir. Aspergilli cinsine ait önemli üreticiler; *Aspergillus ochraceus* (ilk toksin izolasyonu gerçekleştirilen tür), *Aspergillus carbonarius* ve daha az yaygın olan *Aspergillus niger* olarak sıralanabilir.

Aspergillus cinsi küfler *Circumdati*, *Nigri* ve *Flavi* olmak üzere üç sectiona ayrılır. *Circumdati*, yüksek miktarda OTA üreticisi 10 farklı tür içerir; *Aspergillus cretensis*, *Neopetromyces muricatus*, *Aspergillus pseudoelegans*, *Aspergillus roseoglobulosus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus flocculosus*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus sclerotiorum*. *Flavi* üyesi türler, *Aspergillus alliaceus* ve *Aspergillus albertensis*, section *Nigri* türleri ise *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus lacticoffeatus* ve *Aspergillus sclerotioniger*'dir.

Aspergillus steynii ve *Aspergillus westerdijkiae*, yakın zamanda *A. ochraceus*'tan ayrılmıştır ve *A. ochraceus* toksijenitesine kıyasla güçlü, kararlı okratoksin A üreticileri olarak bildirilmişlerdir (Kocsube ve diğ, 2013). Diğer yandan, *Penicillium* cinsine ait *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nordicum* OTA üreten küflerdendir (Heperkan ve diğ, 2009; O'Callaghan ve diğ, 2013).

Aspergilli, üzüm ve üzüm ürünlerinde, özellikle şarapta (*A. carbonarius*, *A. niger*), baharat, kahve ve kakaoda (*A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. carbonarius*, *A. niger*), incirde (*A. alliaceus*, *A. niger*) OTA varlığından sorumlu olan başlıca küf cinsidir.

Penicillium cinsi küflerin tahıllarda (*P. verrucosum*), et ve peynirde (*P. nordicum*) tespit edildiği gözlenmiştir (Kocsube ve diğ, 2013; Schmidt-Heydt ve diğ, 2011). *P. nordicum* jambon, peynir ve zeytin gibi sodyum klorür (NaCl) açısından zengin fermente gıdalarda bulunurken, *P. verrucosum*, yalnızca tahıl ve tahıl ürünlerinde

okratoksin A varlığından sorumludur ve neredeyse sadece hububat kontaminasyona sebep olan depo küfü olarak bilinmektedir (Heperkan ve diğ, 2009; O'Callaghan ve diğ, 2013).

OTA üreticisi *Aspergillus ochraceus* tropikal bölgelerde hakimken, *Penicillium verrucosum* daha ılıman bölgelerde; Doğu ve Kuzey Doğu Avrupa, Kanada ve Güney Amerika'nın bazı kısımlarında daha yaygındır (O'Callaghan ve diğ, 2013). Bu küf türü Danimarka gibi nispeten soğuk iklimli ülkelerde, OTA üreticisi birincil küf olarak bildirilmektedir (Heperkan ve diğ, 2009).

Aspergillus section *Nigri* okratoksijenik küfleri, ılık ve tropikal iklime sahip bölgelerde tespit edilmiştir. Çeşitli substratlarda gelişebilme yeteneğinin yanı sıra, farklı nem, pH ve sıcaklık koşullarını tolere etme özellikleri vardır (Suarez-Quiroz ve diğ, 2004). Avrupa'dan izole edilen *A. carbonarius* ve *A. niger* için optimum küf gelişme ve OTA üretme sıcaklıkları sırasıyla 35-37°C ve 15-25°C'dir (Heperkan ve diğ, 2012). *A. carbonarius* en yüksek okratoksijenik potansiyele sahip olan küf türüdür. Özellikle Akdeniz bölgesi şaraplarını kontamine etmekle sorumludur (Hayat ve diğ, 2012). Üzümleri ve dolayısıyla bu üzümlerden elde edilen şarapları kontamine etmektedir. *Aspergillus alliaceus* incirin yanı sıra sert kabuklu meyvelerde tespit edilmektedir. Antep fıstığında okratoksin A üretiminden sorumlu birincil küf ise *Aspergillus ochraceus*'tur.

Nem, sıcaklık, substrat yapısı ve diğer faktörler OTA üreten suşların gelişmesinde ve toksijenitelerinde önemli rol oynar. Bu faktörlerden biri olan pH, hasat sonrası proste (geleneksel veya ekolojik ıslak metot ve kuru metot) *A. ochraceus* gelişiminde veya OTA üretiminde etkin bir rol oynamaz. Ancak su aktivitesinin (a_w) etkisi önemlidir; gelişim ve toksin oluşturma için optimum değer 0,95'tir. 0,80 altındaki a_w 'lerde küf gelişimi gerçekleşemez. Kahve gibi düşük a_w 'ye sahip gıdalar küf gelişimi açısından güvenli gıda maddeleridir. Su aktivitesinin gelişim için uygun olduğu koşullarda ise sıcaklık toksin miktarını etkilemektedir. Toksin oluşumu, 10 °C ile optimum sıcaklık olan 35 °C arasında gerçekleşebilmektedir. Proses basamaklarında ise, kurutma kritik bir aşamadır; çünkü *A. ochraceus* için elverişli koşullar (0,99-0,80 a_w) iki ya da daha fazla gün boyunca sağlanmış olabilir. Depolama esnasında ise küf gelişimini etkileyen faktörler su aktivitesi ve sıcaklıktır (Suarez-Quiroz ve diğ, 2004). Barberis ve diğ. (2009), yer fıstıklarında depolama esnasında küf gelişimini incelemiştir ve ürün için uygun saklama koşullarını,

maksimum %9 nem, %70 bağıl nem ile 20°C çevre sıcaklığı olarak bildirmiştir. Bu değerler üzerinde küf (başlıca *Aspergillus* cinsi) gelişimi ve yer fıstığında bozulmalar gözlemlenmiştir.

3.2 Okratoksin A'nın Sağlık Üzerine Etkileri

Gıdalarda mikotoksinlerin neden olduğu değişiklikler, mikotoksin türüne ve maruz kalınan miktara bağlıdır. Mikotoksin kaynaklı hastalıklar bulaşıcı değildir; antibiyotik veya diğer ilaçlar ile tedavi edilemez. Zehirlenmeler, ikincil toksikoz şeklinde olduğu gibi, primer akut veya kronik zehirlenme şeklinde de kendini göstermektedir. Mikotoksinlerin çalışma mekanizması, çeşitli doku, organ ve organ sistemlerinde fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olan karmaşık bir mekanizmadır. İnsan ve hayvan sağlığı üzerine zararlı etkileri sıklıkla kümülatiftir; hedef dokuya giriş ve birikim uzun bir süreçtir. Kimyasal yapılarındaki bir dizi farklılıklar göz önüne alındığında mikotoksinler, karsinojenik, mutajenik, teratojenik, embriyotoksik gibi farklı biyolojik etkiler göstermektedirler (Krilove ve diğ, 2013).

Okratoksin A, gıdaları, yemleri ve meşrubatları sıklıkla kontamine eden zararlı bir mikotoksindir (Ranaldi ve diğ, 2009). Nefrotoksik, immunosupresif, teratojenik, genotoksik ve karsinojenik özellikler göstermektedir. Hayvanlarla yapılan deneyler OTA'nın hedef organının böbrek olduğunu göstermiştir. OTA, hayvanların yanı sıra insanları etkileyen çeşitli böbrek hastalıklarından da sorumludur (Kocsube ve diğ, 2013; Domijan ve diğ, 2003). Farklı hayvan türleri üzerinde çeşitli toksik etkileri gözlenmiştir; güçlü nefrotoksik ve böbrek kanserojeni davranışı sergilediği, aynı zamanda hepato-toksisiteye, immunosupresyona ve teratojeniteye neden olduğu bildirilmiştir (Ranaldi ve diğ, 2009). Danimarka domuz nefropatisi için etiyolojik etmen olup, OTA'ya maruz kalan başka hayvan türlerinde de böbrek bozukluklarına neden olmaktadır. İnsanlarda, BEN olası etkenidir; böbreklerde tübüllerin dejenerasyonu, doku içi fibrozis ve hiyalinizasyon ile ilişkilendirilir. IARC tarafından 1993 yılında insanlar için olası karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (Grup 2B) (Kocsube ve diğ, 2013).

OTA, sindirim sistemden nispeten yavaşca emilir. OTA'nın plazma proteinlerine yüksek afinitesi, iyonize olmayan formdaki toksinlerin sindirim sisteminden pasif emilmesine yol açan önemli bir faktördür. Ancak bu, aynı zamanda glomerüler

filtrasyon ve renal atılım yolu ile elimine edilmesini de zorlaştırmaktadır. Karaciğerde OTA hidrolizi, daha az toksik metabolitler oluşturmaktadır. Bağırsak içine safra yoluyla atılır ve geri emilime tabi tutulur. Atılım etkin şekilde idrar yoluyla yapılır (%11 değişmeyen OTA), fakat böbrek tübüllerinde geri emilime uğraması, böbrekler ve muhtemelen tüm vücuttaki mikotoksin kalıntısının temel sebebidir (Radulovic ve diğ, 2013).

OTA'nın organlar ve dokular üzerine, apoptoz indüksiyonu, oksidatif stres, protein sentezinin engellenmesi, kalsiyum homeostazı bozukluğu, transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu gibi farklı hücresel etkileri vardır. Ancak, metabolizma ve etki mekanizmaları henüz tam olarak ortaya konamamıştır ve yayınlanan verilerin yorumlanması da doku, tür ve cinsiyete özgü farklı etmenler sebebiyle oldukça karmaşıktır. Bağırsak hücrelerinin yüksek konsantrasyonlarda OTA'ya oldukça dayanıklı oldukları bildirilmiştir; ancak beslenme faktörleri ya da belirli beslenme koşullarıyla ilişkili olarak bağırsak mukozasında OTA toksisitesinin artabileceği belirlenmiştir (Ranaldi ve diğ, 2009).

OTA'nın devretme/geçiş etkisi ile süt, karaciğer, böbrekte de varlığı tespit edilmiştir (Li ve diğ, 2013). OTA'lı yemlerle beslenen domuz, kümes hayvanları ve diğer türlerde OTA varlığının gözlenmesi bu özelliği kanıtlanmıştır (Duarte ve diğ, 2012). Domuzların ve kümes hayvanlarının yenilebilir kısımlarında özellikle böbrekler ve karaciğerlerinde, OTA birikimi olasılığı yüksektir. Birikim, kaslar ve yağ dokularında daha azdır (Radulovic ve diğ, 2013).

3.3 Gıdalarda Okratoksin A Varlığı

Çizelge 3.1' de OTA varlığının belirlendiği bazı gıdalar gösterilmiştir. Kocube ve diğ. (2013) tahıllarda, et ve peynirde, üzüm ve şarapta, kahve ve baharatta, incirde sıklıkla *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından oluşturulan OTA varlığına rastlandığını bildirmişlerdir. Gıdalarda ilk OTA kontaminasyonu 1969 yılında mısırdan tespit edilmiştir. Çok sayıda küfün OTA üreticisi olmasından dolayı farklı ürünlerde kontaminasyonlar saptanmıştır. Bunlar arasında organik süt, kurutulmuş biber, şerbetçiotu gibi gıda maddeleri de bulunmaktadır.

Çizelge 3.1 : Gıdalarda okratoksin A varlığı.

Gıda Örneği	Ülke	Yöntem	Ör- nek Sa- yısı	Po- zitif Ör- nek Sa- yısı	Aralık Değer ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referans
Toplam			65	17		Zhang ve
Buğday			22	8	4,248	diğ, 2011
Mısır	Çin	ELISA	23	6	7,360	
Pirinç			20	3	3,380	
Kahvaltılık gevrekler	Türkiye	HPLC	37	8	0,32	Özden ve diğ, 2012
Tahıllı bebek mamaları			21	4	0,14	
Tarhana örnekleri			84	47	0,41	
Arpa	Çek	UPLC	39	1	0,3	Beláková ve diğ, 2011
Malt			58	1	0,7	
Şerbetçiotu			5	1	0,6	
Normal bira	Çek	UPLC	72	30	0,122	Beláková ve diğ, 2011
Dark bira			18	8	0,025	
Spesiyal bira			10	4	0,023	
Alkolsüz bira			15	5	0,026	
Kırmızı şarap	Çin	HPLC	28	28	0,003-0,044	Mao ve diğ, 2013
Kırmızı şarap	İspanya	HPLC	96	95	<LOD-0,455	Remiro ve diğ, 2013
Organik Süt	İtalya	HPLC	63	3	0,07 – 0,11	Pattono ve diğ, 2011
Süt			20	0	-	
Kurutulmuş biber	Malezya	HPLC	80	65	0,2-101,24	Jalili ve Jinap, 2012
Kırmızı biber	Macaristan	HPLC– MS/MS	17	6	35	Goryacheva ve diğ, 2006
Antep fıstığı	Katar	HPLC	6	0	<LOD	Abdulkadar ve diğ, 2004
Yer fıstığı			4	0	<LOD	
Yer fıstığı ezmesi			7	0	<LOD	
Karışık baharat tozu			6	5	0,16-5,12	
Toz biber			6	4	5,50-69,28	

3.4 Okratoksin A İle İlgili Yasal Düzenlemeler

Birçok ülke zaman içerisinde, mikotoksinlerin insan ve hayvanların sağlığına zarar veren, karsinogenik, mutajenik, teratojenik ve diğer olumsuz etkilerine karşı bilinçlenmiş, böylece mikotoksinlerin gıdalarda bulunabilecek maksimum tolere edilebilir seviyeleri belirlenmiştir (Dini ve diğ., 2013). Okratoksin A, potansiyel kanserojen olarak sınıflandırılan zararlı mikotoksinlerden biridir. Çizelge 3.2’de Avrupa Komisyonu (EC) tarafından belirlenen gıdalarda OTA maksimum limitleri yer almaktadır.

Çizelge 3.2 : Gıdalarda okratoksin A limitleri (EC, 2006).

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
OKRATOKSİN A	
İşlenmemiş tahıllar	5,0
Tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil)	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,0
Şarap (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az %15 olan şaraplar hariç) ve meyve şarapları	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0
Üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi, üzüm nektarı ile doğrudan tüketime sunulan üzüm şırası ve üzüm şırası konsantresi	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,5
Baharatlar	15
Meyan kökü, bitki özü içerikli infüzyon gıdalar	20,0
Şekerleme ve içeceklerde kullanılan meyan kökü ekstraktı	80,0

Çizelge 3.2’de yer alan Avrupa Komisyonu Direktifleri ile Türk Gıda Kodeksi (TGK)’nde belirtilen yasal düzenlemeler paralellik göstermektedir. AB ülkeleri ve Türkiye’de Antep fıstığı için OTA varlığına ait maksimum limitler belirlenmemiştir. TGK (2008) tarafından belirlenen OTA limitlerinde, diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar) için maksimum limit 10 µg/kg olarak belirlenmiştir. EFSA 2006 raporuna göre, genel nüfusun OTA’ya haftalık maruz kalma miktarı 15 ile 60 ng/kg vücut ağırlığı arasında değişmektedir. Bu oran, belirlenen tolere edilebilir haftalık alım miktarı 120 ng/kg vücut ağırlığı’ nın altındadır (Raiola ve diğ, 2012).

3.5 Okratoksin A Analiz Yöntemleri

Gıdalarda geniş ölçüde OTA varlığına rastlanmaktadır. Tüketicilerin sağlığını korumak amacıyla, OTA tespitinde kullanılan hızlı, güvenilir ve hassas analitik yöntemlerin varlığı gereklidir (Bazin ve diğ, 2013). OTA analizi zor bir işlemdir; yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), enzim bağlı immün test (ELISA), biyosensör ve görünür immunokromatografi ve diğer immunokimyasal yöntemler gibi köklü metodolojiler kullanılmaktadır (Zhang ve diğ, 2011).

Mikotoksin analizlerinde HPLC etkin, yüksek hassasiyete sahip, diğer yöntemlere kıyasla en dikkat çeken yöntemdir. Özellikle floresans dedektörle birlikte kullanıldığında; yüksek seçicilikte, düşük ölçüm limiti (LOQ) değerine sahip, doğru analizler verir (Stojanovska ve diğ, 2013). OTA’nın floresans doğası nedeniyle; immunoafinite kolon (IAK) veya katı faz ekstraksiyon temizlemeden sonra, floresans dedektörle birleştirilmiş sıvı kromatografisi (LC / FLD) gıdalarda OTA tespiti için resmileşmiş yöntemdir (Frenette ve diğ, 2008).

Mikotoksin analizleri söz konusu olduğunda örnek hazırlama ve temizleme aşamaları çok önemlidir (Stojanovska ve diğ, 2013). OTA analizinin temel adımları; örnekleme, gıda matrisinden toksin ekstraksiyonu, ekstraktı saflaştırma (temizleme), konsantre etme, ayırma, algılama, miktar belirleme ve pozitif bulguların doğrulanmasını içermektedir (Fabiani ve diğ, 2010). IAK uygulaması; antikora özgü oluşu, karmaşık matrislere uygulanabilirliği, iyi hassasiyet, doğruluk ve duyarlılığı ile temiz ekstraktlar sağlamaktadır (Stojanovska ve diğ, 2013).

LC / FLD, kütle spektrometresi (MS) ile kıyaslanacak olursa daha düşük deteksiyon limitlerine (LOD) sahiptir. Ayrıca daha kolay, daha düşük maliyetli ve daha duyarlıdır (Frenette ve diğ, 2008).

TLC yöntemi değerlendirilecek olursa; gıda ve yem taramalarında kesinlik ve doğruluk açısından yeterli değildir. Biyosensör yöntemi ise hızlı bir tarama sağlar ancak ekipmanlar yeni ve pahalı olup, yaygın olarak kullanılmamaktadır. Immünokromatografi testi ise hızlı fakat yalnızca nitel analizlerde kullanılabilir.

ELISA yöntemi; yüksek duyarlılıkta, kolay numune hazırlama ve çalışma imkanı sunan, hızlı bir OTA genel tanı yöntemidir. Bununla birlikte, homojen immüno teknikler heterojen olanlardan daha az hassas olarak bildirilmekte; rekabetçi-dolaylı ci-ELISA'nın, doğrudan ELISA yönteminden daha duyarlı olduğu kabul edilmektedir (Zhang ve diğ, 2011). Rekabetçi ELISA kiti de OTA saptanmasında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Bazin ve diğ, 2013).

HPLC'nin olumsuz yönlerini ise Zhang ve diğ. (2011); zahmetli ve zaman alıcı, çok yönlü ekipman ve eğitilmiş personel gerekliliği şeklinde sıralamıştır. IAK işlem de Bazin ve diğ. (2013) tarafından, oldukça basit, hassas ve tekrarlanabilir olmasına rağmen, kolonların kısa raf ömürleri sebebiyle maliyetli olarak bildirilmiştir.

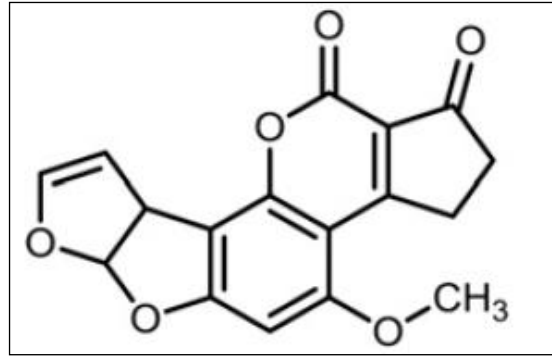
Son on yılda, çeşitli gruplar maliyet azaltma ile birlikte, hız ve hassasiyet geliştirmek için uygun alternatif yöntemler üzerinde çalışmaktadır. Bu yöntemlere immunoserolojik yöntem, test şeritleri ve biyosensörler örnek verilebilir. Yine de günümüzde, en yaygın olarak kullanılan yöntem, immunoafinite kolon ardından izlenen, floresans dedektörle birleştirilmiş ters faz yüksek performans sıvı kromatografisidir (Bazin ve diğ, 2013).

4. AFLATOKSİNLER

Aflatoksin (AF) grubu, toksik ve karsinojenik poliketit ikincil metabolitlerdir ve *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* and *Aspergillus pseudotamarii* suşları tarafından üretilir (Dini et al, 2013, Cheraghali et al, 2007). En yüksek aflatoksin kontaminasyon riski, sıklıkla *Aspergillus flavus* gelişimininden kaynaklanmaktadır (Georgiadou ve Yanniotis, 2012). Birçok aflatoksin, akut ve kronik toksisite göstermekte; çok çeşitli organizmalarda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler sergilemektedir. IARC, AFB₁'i öncelikle ciğerleri hedef alan, grup I karsinojen olarak sınıflandırmaktadır (Heperkan ve diğ, 2012; Cheraghali ve diğ, 2007). AF kontaminasyon riski yüksek olan ürünler arasında tahıllar, mısır, yer fıstığı, pamuk tohumu, Brezilya fındığı, Antep fıstığı, incir, baharat ve kurutulmuş hindistan cevizi içi (kopra) yer almaktadır (El tawila ve diğ, 2013; Cheraghali ve diğ, 2007). AF'nin beslenmeyle alımında en önemli kaynaklar, darı, yer fıstığı ve onların ürünleri olarak belirlenmiştir. Aflatoksinler, çok çeşitli tarım ürünlerini, özellikle yüksek karbonhidrat ve/veya yağ içeriğine sahip gıdaları kontamine ederler. Aflatoksin kontaminasyonuna karşı hassas olan gıda matrisleri, sert kabuklu meyveler, baharatlar, mısır ve diğer hububatlardır (Campone ve diğ, 2011).

Son yıllarda, mikotoksinlerin insanlar ve hayvanlar üzerinde ciddi etkilere sahip olduğu bilgisi, birçok ülkede gıda ve yemlerdeki mikotoksinlerin maksimum tolere edilebilir seviyelerinin (MTL) belirlenmesine yol açmıştır. Burada amaç, insan sağlığını korumak, aynı zamanda üreticiler ve tüccarların ekonomik çıkarlarını kollamaktır. AFB₁ ve toplam aflatoksin (AFT) için dünya genelinde belirlenen ve bugün de geçerliliğini sürdüren limit değerler sırasıyla 1–20 ng/g ve 0–35 ng/g' dır (Cheraghali ve diğ, 2007).

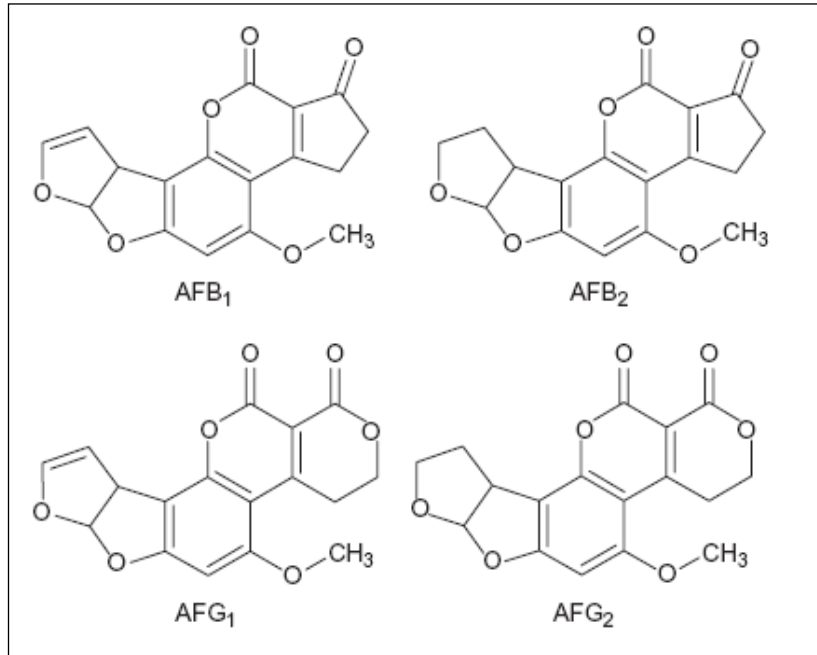
Aflatoksinler dekaketit-türevi, karmaşık biyosentetik yolla üretilen ikincil metabolitlerdir ve ekonomik açıdan en kritik mikotoksinlerdir. AFB₁ hepatokarsinojenik ve hepatotoksik özellikler sergiler (Kocsube ve diğ, 2013). Şekil 4.1'de bu aflatoksine ait kimyasal yapı yer almaktadır.



Şekil 4.1 : Aflatoksin B₁'in kimyasal yapısı (Luo ve diğ, 2013).

Aflatoksin B₁ doğal olarak oluşan, en etkili kanserojen olarak dünya genelinde adından sıkça söz ettirmektedir (Şekil 4.1).

Bugüne kadar 20 aflatoksin türü tanımlanmıştır ve bunlardan 4 tanesi gıda ve yemlerde bulunmaktadır (Luttfullah ve Hussain, 2011). Bu 4 aflatoksin türüne ait kimyasal yapılar Şekil 4.2' de yer almaktadır.



Şekil 4.2 : Aflatoksinlerin kimyasal yapısı (Coppock ve diğ, 2012).

AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂'ye ait moleküler yapılar Şekil 4.2'de yer almaktadır.

4.1 Aflatoksin Üreticisi Küfler

Tüm Antep fıstığı üretici ülkeler (İran, ABD, Türkiye ve diğerleri) aflatoksin kontamasyonu problemiyle karşılaşmaktadır. Bu durum yalnızca tüketicilerin

algısında bir belirsizlik yaratmakla kalmaz; üretimde ek maliyete; üretici, dağıtıcı ve diğer yan sanayilerin gelir kaybına neden olmaktadır. Çeşitli çalışmalar aflatoksinlerin tarlada, ayrıca işleme ve depolama sırasında gelişebildiklerini göstermektedir. (Georgiadou ve Yanniotis, 2012).

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsine ait 3 farklı sectiona ait küf türü tarafından üretilir; *Flavi* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus parvisclerotigenus*, *Aspergillus minisclerotigenes*, *Aspergillus arachidicola*, *Aspergillus togoensis*), *Nidulantes* (*Emericella astellata*, *Emericella venezuelensis*, *Emericella olivicola*) ve *Ochraceorosei* (*Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus rambellii*) (Kocsube ve diğ., 2013). Rodriguez ve diğ. (2012), *Aspergillus toxicarius*, *Aspergillus arachidicola* ve *Aspergillus minisclerotigenes* ile *Rhizopus*'un da aflatoksin ürettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca *Penicillium* cinsi küflerin, aflatoksin üretici küfler arasında yer almamasına karşın bazı belirli suşlarının aflatoksin üretebileceği düşünülmektedir.

Section *Flavi* aflatoksinler, siklopiazonik asit ve kojik asit de dahil olmak üzere geniş yelpazede toksik bileşikler üretme kapasitesine sahiptir. Bunlar arasında ise, aflatoksinler gıda güvenliği açısından en fazla öneme sahip olanıdır. Ekonomik açıdan önemine bakıldığında, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* en sık izole edilen aflatoksin üreticisi türlerdir. Ayrıca, *Aspergillus nomius* Brezilya fındıklarında önemli aflatoksin üreticisi tür olarak tespit edilmiştir (Luo ve diğ., 2012).

Küfler toprak içinde bulunurlar; bitkileri, otları ve tahılları çürütürler. Gelişmeleri için uygun olan koşullarda organik substratları ele geçirirler. Yüksek nem içeriği ve sıcaklık bu koşullardandır (Luttfullah ve Hussain, 2011).

Antep fıstıkları AF kontaminasyon riski yüksek ürünler arasında yer almaktadırlar. *Aspergillus* cinsi küfler sıklıkla Antep fıstıklarının çekirdeğini çürütürler. (Cheraghali et al, 2007). Antep fıstıklarında, bu küfler fıstık hala ağaçtayken çekirdeği infekte edebilir ve çürütebilirler (Georgiadou ve Yanniotis, 2012). AF kontaminasyonunun fıstık ağacında oluş sıklığı düşük, seviyeleri oldukça çeşitlidir. Ağaçta yüksek seviyelerde kontaminasyon fıstıkların küçük yüzdesinde gerçekleşmektedir (Cheraghali et al, 2007).

Mikrobiyal yükün olası varlığı mikotoksinlerin tekrar oranı riskini de beraberinde getirmektedir. Jubeen ve diğ. (2012), depolama süresince nemin; ağaçta yetişen sert kabuklu meyvelerde ve yer fıstıklarında mikrobiyal yüke, aflatoksin B₁ (AFB₁) varlığına, tokoferoller ve yağ asitleri profillerine etkilerini incelemiştir. Nem oranının %10 ve %16'ya çıktığı depolama koşullarında küf gelişiminin arttığını ve 12 haftalık depolama süresince tüm sert kabuklu meyvelerde, AFB₁ üretiminin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca tokoferol içeriğinin bu süreçten etkilendiği ve serbest yağ asitlerinin numunelerde arttığını gözlemlemişlerdir.

4.2 Aflatoksinlerin Sağlık Üzerine Etkisi

Mikotoksinler tarih boyunca dünyanın birçok farklı bölgesinde çok sayıda büyük ölçekli zehirlenme, hayvan ve insan ölümüne neden olmuştur. 1960 yılında nedeni bilinmeyen “Hindi X hastalığı”, 100.000 'den fazla hindi ölümü ve diğer 20.000 kümes hayvanında akut karaciğer nekrozu bulguları ile sonuçlanmış; ardından bu olaya neden olan faktörlerin belirlenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. 1 yıl sonra, hayvan yemlerinde kullanılan ithal yer fıstıklarından *Aspergillus flavus* küfü izole edilmiştir. UV ışık altında floresans veren aflatoksinlerin keşfi araştırmalarda bir dönüm noktası olmuştur (Kirilov ve diğ, 2013).

Aflatoksinler oldukça toksijenik ve karsinojenik ikincil metobelitlerdir ve gıda güvenliğini ilgilendiren önemli bir konudur (Luo ve diğ, 2012). Birçok aflatoksin akut ve kronik toksisite göstermektedir. Çok çeşitli organizmalarda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler sergilemektedir. IARC, AFB₁'i öncelikle ciğerleri hedef alan, grup I karsinojen olarak sınıflandırmaktadır (Heperkan ve diğ, 2012; Cheraghali ve diğ, 2007). AF'nin zararlı etkilerine örnek olarak; Nisan 2004'te Kenya'nın orta ve doğu illerinde yaşayan insanlar arasında, kontamine mısır alımıyla aflatoksin zehirlenmesi sonucu akut hepatotoksisite salgını tespit edilmiştir (Luo ve diğ, 2012).

Aflatoksinlerin en yaygın Emilimi mide-bağırsak sindirim kanalından, akciğer ve deriden gerçekleşir. Yumuşak dokularda ve hayvanların depo yağlarında birikme eğilimi gösterirler. Karaciğer, böbrekler gibi kendi biyosentezini gerçekleştiren dokularda en yüksek seviyede birikmektedirler. Yem yoluyla alınan aflatoksinler 30 dakika içerisinde mide-bağırsak kanalından geçerek kan dolaşımına katılırlar ve 1 saat içinde karaciğere ulaşmış olurlar. AF moleküllerinin karaciğer hücrelerinde

bozulmaları en az 6 yolla gerçekleşir ve tüm metabolitler içerisinde AFB₁ karaciğerde kansere sebep olan en mutajen ajandır.

Aflatoksinli yemlerle beslenen hayvanların doku ve organlarında, sütte, tavukların yumurtalarında aflatoksin kalıntıları bulunabilir (Radulovic ve diğ, 2013).

4.3 Gıdalarda Aflatoksin Varlığı

Gıdaların küf içeriği ve baskın türlerin tanımlanması; substrat kalitesi, işleme ve depolama sırasında potansiyel olarak üretilebilecek aflatoksinler açısından önemlidir (Luo ve diğ, 2012). Aflatoksinlerin, yer fıstığı, mısır, pamuk, baharatlarda (*A. flavus*, *A. parasiticus*) ve Brezilya fındığında (*A. nomius*) varlığı dikkat çekicidir (Kocsube ve diğ, 2013). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda, gıdalarda ve özellikle sert kabuklu meyvelerde tespit edilen aflatoksin düzeyleri Çizelge 4.1’de yer almaktadır.

Çizelge 4.1 : Gıdalarda aflatoksin varlığı.

Gıda Örneği	Toksin	Metot	Ülke	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı	Aralık Değer (ppb)	Referans
Antep Fıstığı	AFB ₁ AFT	HPLC	İran	8203	1921 1927	2,18 2,42	Dini ve diğ, 2013
Toplam	AFT	HPLC	Suudi Arabistan	264	70		El tawila ve diğ, 2013
Yer fıstığı			Mekke	49	9	8,1	
Antep fıstığı				53	18	16,6	
Ceviz				28	14	3,4	
Kaju				53	8	1,6	
Fındık				28	12	2,5	
Badem				53	9	3,5	
Yer Fıstığı (taze)	AFB ₁	HPLC	Çin	1040	260	0,01- 720	Ding ve diğ, 2012
Paketsiz Antep Fıstığı	AFB ₁ AFT	HPLC	Türkiye	95	48	0,007 7,72	Set ve Erkmen, 2010

Çizelge 4.1 (devam) : Gıdalarda aflatoksin varlığı.

Gıda Örneği	Toksin	Metot	Ülke	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı	Aralık Değer (ppb)	Referans
Taze Yer Fıstığı	AFB ₁	HPLC- ELISA	Güney Kore	4	1	0,20	Chun ve diğ, 2007
Kavrulmuş Yer Fıstığı	AFB ₁			8	4	7,97	
	AFB ₂					0,77	
	AFG ₁					1,04	
	AFG ₂					0,87	
Antep Fıstığı	AFB ₁			4	1	3,36	
Fıstık Ezmesi	AFB ₁			2	2	6,13	
	AFB ₂					1,07	
Karışık Kuruyemiş	AFB ₁			1	1	6,68	
	AFB ₂					1,21	
Toplam				31	9		
Antep Fıstığı (2002)	AFB ₁	HPLC	Türkiye	134	24	2,04-55,1	Aluç ve Aluç, 2005
	AFT				19	4,5-60,03	
Antep Fıstığı (2003)	AFB ₁	HPLC	Türkiye	165	18	2,19- 39,59	Aluç ve Aluç, 2005
	AFT				13	4,96-44,9	
Kurutulmuş biber	AFT	HPLC	Malezya	80	52	0,2-101,2	Jalili ve Jinap, 2012
	AFB ₁				52	0,2-56,61	
	AFB ₂				14	0.1-11.45	
	AFG ₁				21	0.3-17.65	
	AFG ₂				3	0.2-3.2	

Çizelge 4.1 (devam) : Gıdalarda aflatoksin varlığı.

Gıda Örneği	Toksin	Metot	Ülke	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı	Aralık Değer (ppb)	Referans
Kuru kayısı	AFT	HPLC	Pakistan	20	4	4,55	Luttfullah ve Hussain, 2011
Dates				20	2	2,5	
Kuru incir				10	5	5,81	
Kuru dut				15	4	2,22	
Kuru üzüm				10	2	5,05	Luttfullah ve Hussain, 2011
Kayısı	AFT	HPLC	Pakistan	15	4	2,65	
çekirdeği				10	0	-	
Kabuklu Badem				10	3	2,13	
Kabuksuz Badem				10	4	6,45	
Kabuklu Ceviz				10	7	3,43	
Kabuksuz Ceviz				10	4	5,10	
Kabuklu Yerfıstığı				10	5	5,20	
Kabuksuz Yerfıstığı				10	2	2,10	
Kabuklu Antep Fıstığı				10	5	6,34	
Kabuksuz Antep Fıstığı				10	2	3,25	
Kabuklu Çam Fıstığı							

Çizelge 4.1’de yer alan veriler değerlendirildiğinde, Türkiye’de yetiştirilen Antep fıstıklarında toplam aflatoksin varlığının 4,24-60,03 ppb aralığında değiştiği gözlenmektedir.

Aflatoksinlerin varlığı çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Küf gelişimi ve bu küflerin toksin oluşturmaları için gerekli olan optimum sıcaklık ve nem değerleri, özellikle tropik ve sub-tropik bölgelerde gözlenmektedir.

AF'lerin oluş sıklığı ve kontamine ürünlerdeki miktarı en çok bitki gelişimi ve depolama sırasındaki sıcaklık ve nemden etkilenmektedir. Bunların yanı sıra, aflatoxin kontaminasyonu; coğrafik konuma, tarımsal uygulamalara, bilimsel tarım uygulamalarına, ön hasat, depolama ve/veya işleme esnasında ürünlerin küf saldırısına karşı hassasiyetine göre değişiklik göstermektedir.

Aflatoxinlerin, iklim koşulları nedeniyle Orta Avrupa'da nadir tespit edildiği görüşü yaygındır. AF tespit edilen ürünler ise, Antep fıstığı, Brezilya fındığı, yer fıstığı ve incir gibi ithal ürünlerdir. Ancak küresel ısınmanın sebep olduğu iklimsel değişiklikler, Romanya, Macaristan gibi ülkelerde, gıdalarda küf ve beraberinde mikotoksin oluşumu riskini oluşturmuştur. Bu da aflatoxin üreten küflerin ve dolayısıyla aflatoxinlerin iklim değişiklikleriyle birlikte daha yaygın hale geldiğini vurgulamaktadır (Kocsube ve diğ, 2013).

4.4 Aflatoxinler ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Gıda ve yemler için belirlenen maksimum aflatoxin miktarları AB tarafından 2010 yılında revize edilmiştir. Çizelge 4.2'de aflatoxinler ile ilgili yasal düzenlemeler yer almaktadır.

Çizelge 4.2 : Gıdalarda aflatoxin limitleri (EC, 2010).

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)				
AFLATOKSİNLER	B ₁	B ₁ + B ₂	G ₁ + G ₂	M ₁	
Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0			—
-Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç Badem, Antep fıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işleme tabi tutulacak olan)	12,0	15,0			—

Çizelge 4.2 (devam) : Gıdalarda aflatoksin limitleri (EC, 2010).

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)			
AFLATOKSİNLER	B ₁	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	M ₁	
Fındık ve Brezilya fıındığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işleme tabi tutulacak olan) - Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç Sert kabuklu meyveler (Üstte belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işleme tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	-	
Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	15,0	-	
Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	5,0	10,0	-	
Badem, Antep fıstığı ve kayısı çekirdeğı (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	-	
Fındık ve Brezilya fıındığı (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (2 üst satırdakiler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0	10,0	-	
Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	8,0	10,0	-	
Mısır ve pirinç (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işleme tabi tutulacak olan)	2,0	40,0	-	
Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	5,0	10,0	-	
	-	-	0,050	

Çizelge 4.2 (devam) : Gıdalarda aflatoksin limitleri (EC, 2010).

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)			
	B ₁	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	M ₁	
AFLATOKSİNLER				
Baharatlar	5,0	10,0		
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	-	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,050	
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	-	0,025	

Aflatoksin limitleri incelendiğinde, Antep fıstıklarında maksimum izin verilen aflatoksin düzeyi, doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan ürünlerde AFB₁ için 8 ppb ve AFT için 10 ppb'dir. Ürün tüketilmeden önce fiziksel işlemlere tabi tutulacak ise bu değerler AFB₁ için 12 ppb ve AFT için 15 ppb olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

4.5 Aflatoksin Analiz Yöntemleri

Mikotoksin analizlerinde kullanılacak analitik yöntem seçilirken doğruluk, hassasiyet gibi kriterler önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, hız, analizi yürütmek için gereken teknik bilgi düzeyi, testin nitel ve nicel sonuçları pratikte önemli etkenlerdir (Pittet ve diğ., 2005). Metot seçilirken, mikotoksinin kimyasal yapısı, molekül ağırlığı ve fonksiyonel grubu göz önüne alınmaktadır. Çünkü bu faktörler analiz yöntemini etkileyen; toksin uçuculuğu ve çözünürlüğü gibi özellikleri belirlemektedir. Ayrıca ekstraksiyon yöntemi belirlenmesinde gıda matrisi de önemlidir.

Aflatoksinlerin ekstraksiyonu organik bir çözgen ve su karışımı kullanılarak yapılmaktadır. En yaygın kullanılan ekstraksiyon çözgeni metanol-su ve asetonitril-su'dur (Deshpande, 2002). Organik çözgenle ekstraksiyon işleminin ardından, temizleme-saflaştırma aşamasında üründen yağların ve diğer bileşenlerin ayrılması için monoklonal antikorlar içeren immunoafinite kolonlar kullanılır (Scudamore, 2005). Yüksek performans sıvı kromatografisinde, ayırmadan sonra analite kimyasal türevlendirme (kolon-sonrası türevlendirme), daha yüksek hassasiyet ve daha iyi seçicilik elde etmek için uygulanmaktadır (Neue, 2010).

Bir çalışmada kırmızı biberlerde aflatoksin varlığının belirlenmesinde kullanılan analitik metotların kıyaslanması yapılmıştır. Öncelikle yüksek geri kazanım ve toksinin immunoafinite kolona bağlanması üzerine yoğunlaşılmıştır. Ekstraksiyonda kullanılan 80:20, hacimce (HA), metanol-su karışımının en yüksek geri kazanımı verdiği görölmüşür. Temizlik, yani aflatoksin saflaştırılması için kullanılan ticari immunoafinite kolonların etkinliğinin de incelendiği çalışmada, Vicam kolonların R-Biopharm immünoafinite kolonlardan daha iyi performans gösterdiği tespit edilmiştir. ELISA ve HPLC analitik yöntemleri arasında yapılan karşılaştırmadan sonra, HPLC daha hassas ve uygun bulunmuştur. Ayrıca, KoBra-cell içinde brom türevlendirmesinin, reaksiyon bobini içinde iyot türevlendirmesinden, daha hassas ve aflatoksin tespitinde daha yüksek geri kazanıma sahip olduğu görölmüşür (O’Riordan ve diğ, 2009).

5. MATERYAL VE METOT

5.1 Antep Fıstığı Örnekleri

Çalışmada Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde faaliyet gösteren bir işletmeden temin edilen 37 adet Antep fıstığı örneği ile İstanbul marketinden toplanan 36 adet Antep fıstığı örneği kullanılmıştır. Antep fıstıkları analize alınmadan önce +4 °C'de saklanmıştır. Elde edilen sonuçlar Avrupa Komisyonu Direktiflerinde ve TGK'da kabul edilen maksimum limit değerlerine göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 5.1 : Örnek tablosu.

İl	Çeşit	Örnek Sayısı	Pay (%)
Gaziantep (İşlenmemiş)	Antep kırmızı	30	51
	Antep yeşil	4	
	Siirt	3	
İstanbul (İşlenmiş)	Antep kırmızı	28	49
	Siirt	8	

5.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Mikotoksin Tayini

5.2.1 Okratoksin A tayini

5.2.1.1 Okratoksin A standartlarının hazırlanması

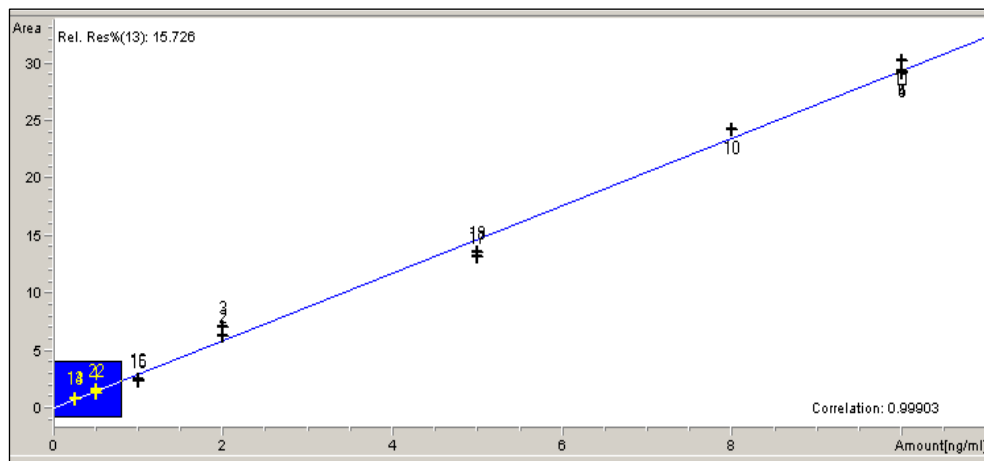
Toz haldeki OTA (Sigma Aldrich O1877 $\geq$ % 98 saflıkta) standardına toluen: asetik asit (99:1, HA) eklenerek, 29,25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona sahip 1. aşama standart çözeltisi hazırlanmıştır. 2. aşama standart çözeltisi 2,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda toluen: asetik asitte (99:1, HA) hazırlanmıştır. 2. aşama standart çözeltisi (0,5 ml), çalışma standardını (3. aşama standart çözeltisini) hazırlamak için azot altında kurutulmuştur. Kurutulan standart, 1-2 ml mobil faz (asetonitril:su:asetik asit, 99:99:2, HA) ile çözülmüş ve 5 ml' ye tamamlanmıştır. Böylece 0,25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda çalışma çözeltisi elde edilmiştir. HPLC'de kalibrasyon grafiğinin çizilebilmesi için, 7 farklı konsantrasyonda (0,25-10 ng/ml arası) kalibrasyon

çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon çözeltilerinin içerikleri Çizelge 5.1’de detaylı olarak yer almaktadır.

Çizelge 5.2 : Okratoksin A kalibrasyon çözeltileri ve içerikleri.

Kalibrasyon çözeltisinin konsantrasyonu (ng/ml)	Çalışma standartından alınan mikotoksin çözeltisi miktarı (µl)	İlave edilen solvent (asetonitril:su:asetik asit) miktarı (µl)
0,25	5	4995
0,5	10	4990
1	20	4980
2	40	4960
5	100	4900
8	160	4840
10	200	4800

Çizelge 5.1’de kalibrasyon çözeltilerinin içerdikleri OTA miktarları ve hazırlanışı görülmektedir. Okratoksin A analizi kalibrasyon grafiği ise Şekil 5.1’de yer almaktadır.



Şekil 5.1 : Okratoksin A analizi kalibrasyon eğrisi.

Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2) OTA için 0,99903 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.1).

5.2.1.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi

Geri kazanım oranının belirlenmesi için örnekte 29,25 ng/ml konsantrasyonunda OTA olacak şekilde 1. aşama standart çözeltisi ilave edilmiştir. 25°C’de, karanlık ortamda çeker ocak içerisinde 24 saat bekletilmiş, ardından analize alınmıştır. Geri kazanım %98,3 olarak hesaplanmıştır.

5.2.1.3 Okratoksin A ekstraksiyonu

Antep fıstığında okratoksin A analizinde Afsah-Hejri ve diğ. (2012) ve AOAC 991.31 (AOAC, 2000)'de belirtilen yöntemler bazı modifikasyonlarla birlikte uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik veya HPLC kalitededir. Immunoafinite kolonlar (ochratest) Vicam firmasından temin edilmiştir. Tüm cam malzemelerden teknik metanol veya aseton geçirilmiş, 200°C'de sterilizatörde 4 saat boyunca tutularak sterilize edilmiştir.

Çalışmada, 10 gr örnek üzerine 1 gr sodyum klorür (NaCl) ve 20 ml metanol:su (80:20, HA) ilave edilerek 2 dakika boyunca blenderda yüksek hızda çalkalanmıştır. Karışım Whatman No 4 filtre kağıdından süzölmüştür. 2 mL filtrat üzerine 8 mL saf su eklenerek mikrofiber cam filtreden geçirilmiştir. Filtrat, saflaştırma işlemi için immunoafinite kolona (IAK) verilmeden önce, fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanılarak kolonun koşullandırılması yapılmıştır. PBS, 900 ml distile su içerisine 8 gr sodyum klorür, 1,16 gr susuz disodyum hidrojen fosfat, 0,2 gr potasyum dihidrojen fosfat ve 0,2 gr potasyum klorür ilave edilip çözödüröldükten sonra hacmin saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. 0,1 M hidroklorik asit (HCl) veya sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak pH 7,4' e ayarlanmıştır. Kolonların koşullandırılmasının ardından, filtrattan 7 mL alınarak immunoafinite kolondan geçirilmiştir. Ardından kolondan 7 mL PBS dakikada 2 mL hızla geçirilmiştir. Kolon 10 ml'lik tüpe alınarak önce hava geçirilerek kurutulmuş, ardından 1,5 ml metanol yer çekimiyle akışa yakın bir hızda geçirilmiş ve üzerine 1,5 mL su ilave edilerek HPLC cihazına verilmiştir.

5.2.1.4 Okratoksin A analizi HPLC koşulları

Okratoksin analizi, Agilent 1100 serisi HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Floresans dedektör ile ayırım, ODS-Hypersil C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm partiköl çaplı) ters faz kolonda, 1 ml/dakika akış hızında uygulanmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'dir. Tespit eksitasyon dalga boyu 333 nm (λ_{ex}) ve emisyon dalga boyu 477 nm (λ_{em})'dir. Mobil faz asetonitril:su:asetik asit (99:99:2, HA) karışımı olup, kullanılmadan önce Sartolon 25006-47-N (0,45 µm) filtrede süzölmüş ve ardından ultrasonik su banyosunda degassing işlemi uygulanmıştır (3 dakika). Örnek enjeksiyon hacmi 100 µl olup, kolonda OTA alıkonma süresi yaklaşık olarak 8 dakikadır. Veriler Chemstation 3D yazılım programı ile değeriendirilmiştir.

5.2.2 Aflatoksin tayini

5.2.2.1 Aflatoksin standartlarının hazırlanması

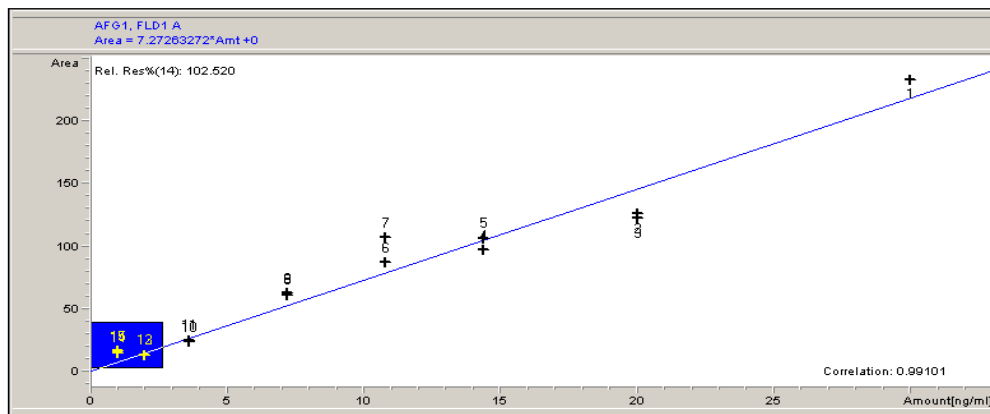
1 ml'lik ampul Supelco; 46304-U aflatoksin standardı metanol içerisinde çözünmüş olarak 0,3 µg/ml aflatoksin B₂, G₂ ve 1 µg/ml aflatoksin B₁, G₁ içermektedir. Standarttan 0,5 ml alınarak 5 ml'lik balon jojode metanolla seyreltilir ve 2. Aşama standart çözeltisi elde edilir. Kalibrasyon çözeltileri, 2. aşama standart çözeltinin metanol:su kullanılarak seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Kalibrasyon çözeltilerinin içerdikleri aflatoksin miktarları ve hazırlanış bilgileri Çizelge 5.2'de yer almaktadır.

Çizelge 5.3 : Aflatoksin kalibrasyon çözeltileri ve içerikleri.

Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonu (ng/ml)				2. aşama std. (µl)	MeOH (µl)	Saf su (µl)
B ₁	B ₂	G ₁	G ₂			
1,00	0,30	1,00	0,30	50	1950	3000
2,00	0,60	2,00	0,60	100	1900	3000
3,60	1,08	3,60	1,08	180	1820	3000
7,20	2,16	7,20	2,16	360	1640	3000
10,80	3,24	10,80	3,24	540	1460	3000
14,40	4,32	14,40	4,32	720	1280	3000
20,00	6,00	20,00	6,00	1000	1000	3000
30,00	9,00	30,00	9,00	1800	200	3000

8 farklı konsantrasyondaki kalibrasyon çözeltileri, Çizelge 5.2' de belirtildiği gibi, 2. aşama standart çözeltiden uygun miktarlarda alınıp, balon jojode metanol:su (20:30, HA) ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Hazırlanan standart çözeltilerin HPLC enjeksiyonları yapılarak aflatoksin analizi için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 : Aflatoksin analizi kalibrasyon eğrisi.

Şekil 5.2’de yer alan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2), lineer regresyon kullanılarak 0,99101 olarak hesaplanmıştır.

5.2.2.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi

Geri kazanım oranının belirlenmesi için, örnekte 30 ng/ml konsantrasyonunda aflatoksin B₁ ve G₁; 9 ng/ml konsantrasyonunda da B₂ ve G₂ olacak şekilde standart çözeltiden örneğe enjeksiyon yapılmıştır. Çeker ocak içerisinde, oda sıcaklığında, karanlık koşullarda 24 saat bekletildikten sonra analizlenmiştir. Geri kazanım oranı AFB₁ için % 80, AFB₂ için % 84, AFG₁ için % 81 ve AFG₂ için % 70 olarak hesaplanmıştır.

5.2.2.3 Aflatoksin ekstraksiyonu

Aflatoksin analizinde Set ve Erkmen (2010) ve AOAC 999.07 (AOAC, 2000)’de belirtilen yöntemler bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik veya HPLC saflığındadır ve immunoafinite kolonlar (aflatest) Vicam firmasından satın alınmıştır. 50 gr örnek üzerine 5 gr sodyum klorür (NaCl) ve 250 ml metanol:su (30:20, HA) ilave edilerek 30 dakika boyunca mekanik çalkalayıcıda en yüksek hızda çalkalanmıştır. Karışım Whatman No 4 filtre kağıdından süzölmüştür. 10 mL filtrat üzerine 40 mL saf su ilave edilerek mikrofiber cam filtreden geçirilmiştir. Filtrat, IAK’ye verilmeden önce, kolon koşullandırılması PBS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolonlar koşullandırıldıktan sonra 50 mL filtrat immunoafinite kolondan dakikada 2-3 mL hızla geçirilmiştir. Ardından kolondan 20 mL saf su geçirilmiş ve 10 ml’lik tüpe alınmıştır. 1 ml metanol yavaşça geçirilmiş ve üzerine 1 mL su ilave edilerek HPLC ile analiz edilmiştir.

5.2.2.4 Aflatoksin analizi için HPLC koşulları

HPLC ile aflatoksin analizinde tespit eksitasyon dalga boyu 360 nm (λ_{ex}) ve emisyon dalga boyu 420 nm (λ_{em})’dir. Kolon sıcaklığı 35 °C ayarlanmıştır. Mobil faz 1000 mL’sine 110 µl %65’lik nitrik asit ve 132 mg potasyum bromid (KBr) ilave edilmiş su:asetonitril:metanol (6:3:2, HA) karışımı olup akış hızı 1 ml/dak.’dır. KBr ile kolon sonrası türevlendirme KoBra-cell (Rhone Diagnostic, Glasgow, UK) ile 100 µA akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Örnek enjeksiyon hacmi 100 µl’dir.

Kolonda alıkonma süreleri aflatoksin B₁ için yaklaşık 8,5 dakika, aflatoksin B₂ için 7,4 dakika, aflatoksin G₁ için yaklaşık 6,9 dakika ve aflatoksin G₂ içinse 6 dakikadır. Mobil faz kullanılmadan önce Sartolon 25006-47-N (0,45 µm) filtreden geçirilmiş ve ardından ultrasonik su banyosu uygulanmıştır (3 dakika). Veriler Chemstation 3D yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1 Antep Fıstığı Örneklerinde Okratoksin A ve Aflatoksin Varlığı

Antep fıstıklarında OTA ve aflatoksin analizi, hazırlanan örneklerin ekstraksiyonu, IAK ile toksinin saflaştırılması ve HPLC cihazında nitel, nicel analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analizde ters faz kolon ve floresans dedektör kullanılmıştır.

Antep fıstıklarında OTA geri kazanım değeri % 98,3 olarak belirlenmiştir. OTA için belirleme limiti (LOD) 0,2 ppb' dir.

Antep fıstıklarında aflatoksin geri kazanım değerleri ise AFB₁ için % 80, AFB₂ için % 84, AFG₁ için % 81 AFG₂ için % 70 olarak belirlenmiştir. Aflatoksin analizinde belirleme limiti (LOD) 0,001 ppb'dir.

Antep fıstıklarında yapılan analizlerde elde edilen sonuçlara göre OTA ile kontamine olmuş pozitif örneklerin sayısı ve içerdikleri toksin miktarlarının en düşük ve en yüksek düzeyleri Çizelge 6.1'de yer almaktadır.

Çizelge 6.1 : Antep fıstığı örneklerinde okratoksin A varlığı.

Çeşit	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Aralık (µg/l) OTA
Antep Kırmızı	58	4	1,238-3,720
Antep Yeşil	4	0	nd
Siirt	11	0	nd

nd: Miktar < LOD

Çalışılan 73 örneğin % 80'i Antep kırmızı, % 6'sı Antep yeşil ve % 15'i Siirt fıstığıdır. Antep kırmızı örneklerinin % 7'si OTA ile kontamine olduğu Çizelge 6.1'de yer almaktadır. Antep yeşil ve Siirt çeşitlerinde OTA varlığına rastlanmamıştır. Çalışılan 73 örnekte toplam OTA kontaminasyonu ise % 6 olarak tespit edilmiştir.

Aflatoksinler, çok çeşitli tarım ürünlerini, özellikle yüksek karbonhidrat ve/veya yağ içeriğine sahip gıdaları kontamine ederler. Sert kabuklu meyveler, aflatoksin kontaminasyonuna karşı hassas gıda matrisine sahiptirler (Campone ve diğ, 2011).

Çalışmada 73 Antep fıstığı örneğinin 54'ünde (%74) toplam aflatoksin kontaminasyonu tespit edilmiştir. Çizelge 6.2'de bu kontaminasyonlara ait detaylar belirtilmektedir.

Çizelge 6.2 : Antep fıstığı örneklerinde toplam aflatoksin varlığı.

Çeşit	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Aralık (µg/l) AFT
Antep Kırmızı	58	44	0,001-23,542
Antep Yeşil	4	4	0,009-0,047
Siirt	11	6	0,002-0,768

Antep kırmızı örneklerinde % 76 oranında pozitif örnek tespit edilmiştir. Antep yeşil örneklerinde ise analizlenen 4 örneğin hepsinde aflatoksin bulunmuştur. Siirt fıstıklarında ise %55 oranında pozitif örnek değeri Çizelge 6.2'de belirtilen aralıklarda saptanmıştır.

Antep kırmızı örneklerinde aflatoksin varlığı detaylı incelenecek olursa, 58 örneğin 14'ünde küf kontaminasyonuna rastlanmamıştır, kalan 44 örnekte Çizelge 6.3'te gösterilen aflatoksin türleri tespit edilmiştir.

Çizelge 6.3 : Antep fıstığı çeşitleri ve aflatoksinlerle kontaminasyonları.

Toksin varlığı	Antep Kırmızı	Antep Yeşil	Siirt	AFT Aralık (ppb)
Yalnızca AFB ₁	15/58	2/4	3/11	0,0014-0,0473
AFB ₁ +AFB ₂	4/58	2/4	-	0,0185-0,0611
AFB ₁ +AFG ₁	1/58	-	-	0,0138
AFB ₁ +AFG ₂	-	-	1/11	0,0158
AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₂	3/58	-	2/11	0,0341-23,541
AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂	21/58	-	-	0,2831-11,504
Toplam	44/58	4/4	6/11	0,0014-23,541

- : miktar < LOD

Çizelge 6.3'te Antep fıstıklarında aflatoksinlere ait kontaminasyon bilgileri yer almaktadır. Çalışmada, OTA varlığı tespit edilen Antep kırmızı örneklerinin hepsinin aflatoksinler tarafından kontamine olmaları ilgi çekicidir. Detaylar Çizelge 6.4'te yer almaktadır.

Okratoksin A bulunan 4 örnekte, aflatoksin gelişimleri de gözlenmiştir (Çizelge 6.4). Bu örneklerin hepsi Antep kırmızı olup, miktarları AFT ve OTA sırasıyla; 2,557 µg/l ve 1,2376 µg/l, 11,5042 µg/l ve 3,7197 µg/l, 0,0081 µg/l ve 1,3147 µg/l, 0,0014 µg/l ve 2,9106 µg/l olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 6.4 : Aflatoksin ve okratoksin A birlikte bulunduran örnekler.

Toksin varlığı	Pozitif Örnek	Antep fıstık çeşidi
AFB ₁ +OTA	2	Antep kırmızı
AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂ +OTA	2	Antep kırmızı

Çizelge 6.5'te tüm örnekler bir arada, saptanan mikotoksin türleri ve miktarlarıyla verilmektedir. Örnekler Güneydoğu Anadolu Bölgesi Gaziantep ilinden ve Marmara Bölgesi İstanbul ilinden temin edilmiştir.

Çizelge 6.5 : Antep fıstığı örneklerinde okratoksin A ve aflatoksin varlığı.

Sıra No	Antep Fıstığı Örnekleri	AFB ₁ (µg/l)	AFB ₂ (µg/l)	AFG ₁ (µg/l)	AFG ₂ (µg/l)	AFT (µg/l)	OTA (µg/l)
1	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	Antep Kırmızı	0,0266	0,0007	nd	0,0015	0,0341	nd
3	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	Antep Kırmızı	0,0084	nd	nd	nd	0,0084	nd
5	Antep Kırmızı	0,0032	nd	nd	nd	0,0032	nd
6	Antep Kırmızı	1,7106	0,1975	0,0498	1,1301	2,0881	nd
7	Antep Kırmızı	2,0257	0,2242	0,0472	0,2600	2,5570	1,2376
8	Antep Kırmızı	3,3910	3,6697	0,0975	0,1393	7,2975	nd
9	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	Antep Kırmızı	9,6241	1,0235	0,0705	0,7832	11,5042	3,7197
11	Antep Kırmızı	0,0081	nd	nd	nd	0,0081	1,3147
12	Antep Kırmızı	0,0053	nd	nd	nd	0,0053	nd
13	Antep Kırmızı	0,2289	0,0246	0,0020	0,0275	0,2831	nd
14	Antep Kırmızı	1,3952	0,1351	0,0065	0,0716	1,6083	nd
15	Antep Kırmızı	0,4790	0,0343	0,0042	0,0294	0,5469	nd
16	Antep Kırmızı	0,4662	0,0448	0,0050	0,0057	0,5725	nd
17	Antep Kırmızı	0,8312	0,1031	0,0152	0,1640	1,1135	nd
18	Antep Kırmızı	0,3915	0,0538	0,0105	0,0973	0,5532	nd
19	Antep Kırmızı	1,4752	0,1676	0,0106	0,0581	1,7115	nd

a : İşletmeden temin edilen örnekler

nd : Miktar < LOD

Çizelge 6.5 (devam) : Antep fıstığı örneklerinde okratoksin A ve aflatoksin varlığı.

Sıra No	Antep Fıstığı Örnekleri	AFB ₁ (µg/l)	AFB ₂ (µg/l)	AFG ₁ (µg/l)	AFG ₂ (µg/l)	AFT (µg/l)	OTA (µg/l)
20	Antep Kırmızı	0,6885	0,0736	0,0086	0,0692	0,8400	nd
21	Antep Kırmızı	0,9619	0,1024	0,0092	0,0689	1,1425	nd
22	Antep Kırmızı	2,0950	0,2472	0,0178	0,0880	2,4480	nd
23	Antep Kırmızı	0,3571	0,0374	0,0019	0,0190	0,4155	nd
24	Antep Kırmızı	1,1300	0,1069	0,0105	0,1619	1,4093	nd
25	Antep Kırmızı	0,6405	0,0711	0,0044	0,0298	0,7458	nd
26	Antep Kırmızı	0,3802	0,0334	nd	0,0281	0,4417	nd
27	Antep Kırmızı	2,2711	0,2520	0,0056	0,0568	2,5855	nd
28	Antep Kırmızı	0,0084	nd	nd	nd	0,0084	nd
29	Antep Kırmızı	1,6204	0,1714	0,0061	0,0994	1,8974	nd
30	Antep Kırmızı	1,0329	0,1045	0,0044	0,0449	1,1868	nd
31	Antep Kırmızı	0,0019	nd	nd	nd	0,0019	nd
32	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
33	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
34	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
35	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
36	Antep Kırmızı	0,0550	0,0061	nd	nd	0,0611	nd
37	Antep Kırmızı	0,0053	nd	nd	nd	0,0053	nd
38	Antep Kırmızı	0,0014	nd	nd	nd	0,0014	2,9106
39	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40	Antep Kırmızı	0,0146	nd	nd	nd	0,0146	nd
41	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
42	Antep Kırmızı	0,0089	nd	nd	nd	0,0089	nd
43	Antep Kırmızı	0,0369	0,0021	nd	nd	0,0391	nd
44	Antep Kırmızı	1,7617	0,1926	0,0134	0,1615	2,1292	nd
45	Antep Kırmızı	21,9585	1,4606	nd	0,1226	23,5417	nd
46	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
47	Antep Kırmızı	0,0023	nd	nd	nd	0,0023	nd
48	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
49	Antep Kırmızı	0,0060	nd	nd	nd	0,0060	nd
50	Antep Kırmızı	0,0022	nd	nd	nd	0,0022	nd
51	Antep Kırmızı	0,0317	nd	nd	nd	0,0317	nd
52	Antep Kırmızı	0,0315	0,0139	nd	nd	0,0318	nd
53	Antep Kırmızı	0,0030	nd	nd	nd	0,0030	nd
54	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
55	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd

a : İşletmeden temin edilen örnekler

nd : Miktar < LOD

Çizelge 6.5 (devam) : Antep fıstığı örneklerinde okratoksin A ve aflatoksin varlığı.

Sıra No	Antep Fıstığı Örnekleri	AFB ₁ (µg/l)	AFB ₂ (µg/l)	AFG ₁ (µg/l)	AFG ₂ (µg/l)	AFT (µg/l)	OTA (µg/l)
56	Antep Kırmızı	0,0185	0,0110	nd	nd	0,0185	nd
57	Antep Kırmızı	0,0013	nd	0,0126	nd	0,0138	nd
58	Antep Kırmızı	nd	nd	nd	nd	nd	nd
59	Antep Yeşil ^a	0,0268	0,0005	nd	nd	0,0273	nd
60	Antep Yeşil ^a	0,0473	nd	nd	nd	0,0473	nd
61	Antep Yeşil ^a	0,0338	0,0022	nd	nd	0,0360	nd
62	Antep Yeşil ^a	0,0088	nd	nd	nd	0,0088	nd
63	Siirt Yeşil	0,7421	0,0229	nd	0,0026	0,7675	nd
64	Siirt Yeşil	nd	nd	nd	nd	nd	nd
65	Siirt Yeşil	0,0077	nd	nd	nd	0,0077	nd
66	Siirt Yeşil	nd	nd	nd	nd	nd	nd
67	Siirt Yeşil	0,0062	nd	nd	nd	0,0062	nd
68	Siirt Yeşil	0,0145	nd	nd	0,0013	0,0158	nd
69	Siirt Yeşil	nd	nd	nd	nd	nd	nd
70	Siirt Yeşil	0,0022	nd	nd	nd	0,0022	nd
71	Siirt Yeşil ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd
72	Siirt Yeşil ^a	0,0969	0,0047	nd	0,0033	0,1049	nd
73	Siirt Yeşil ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd

a : İşletmeden temin edilen örnekler

nd : Miktar < LOD

Çizelge 6.5'te tüm örneklerin okratoksin A ve aflatoksin içerikleri bir arada yer almaktadır. 23,5417, 11,5042 ve 7,2975 ppb AFT değerleri yasal limiti geçen ve limite yaklaşan değerler olması açısından önemlidir. Örneklerin çeşit olarak ise Antep kırmızı 58 adet, Antep yeşil 4 adet ve Siirt çeşidine ait 11 adet örnek bulunmaktadır. İşletmeden temin edilen Siirt fıstıklarının tümü ve Antep fıstıklarının 4'ü lüks fıstıktır. Bu sınıflandırma erken hasat edilmiş, yeşil renkli çekirdekler için kullanılır. Siirt fıstıkları üreticilere daha yüksek kazanç sağlamaktadır. En çok üretildiği iller ise Siirt, Manisa ve Çanakkale'nin yüksek kesimleridir. Siirt fıstıkları ağaç dalında çıtlar. Yüksek çıtlama oranı, lezzetli aroması ve büyük çekirdekleri ile tüketicilerin ilgisini çeker. Ağaçta çıtlamanın, tarlada küf bulaşma riskini arttırması beklenmektedir. Ancak örnekler incelendiğinde en az kontaminasyon yüzdesi Siirt fıstıklarındadır (Antep yeşil % 100, Antep kırmızı: % 65 ve Siirt % 76 oranında pozitif örnek içerir).

Analizlenen 73 adet Antep fıstığı örneklerinde OTA kontaminasyonlarına bakılacak olursa, Antep yeşil ve Siirt fıstıklarında OTA varlığı saptanmamıştır. Antep kırmızı çeşidine ait örneklerin ise %7'si pozitifdir. OTA tespit edilen tüm örneklerde aflatoksin varlığının saptanması dikkat çekicidir.

HPLC analizinde toksinlerin tutunma süreleri $AFG_1 < AFG_2 < AFB_2 < AFB_1$ sıralamasındadır. Ayrıca toksisitelerine göre sıralanması $AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$ şeklindedir. AFB_1 tarladan depolamaya kadar her adımda en baskın türdür ($AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$). Baskın türlerin sırası bu 4 türün toksisite sıralamasıyla aynıdır. AFB_1 diğer türlere kıyasla oldukça yaygın olarak tespit edilmektedir. Çalışmada bazı örneklerde AFB_1 ile AFG_2 'nin birlikte tespit edilmeleri dikkat çekicidir.

Örneklerin toksin düzeyleri değerlendirilecek olursa, OTA 1,238-3,720 µg/l seviyesinde tespit edilmiştir. Antep fıstıklarında OTA bulunmasına dair bir maksimum limit düzeyi belirlenmemiştir. Ancak TGK'nın 2008 yılı standardında OTA ile kontaminasyon riski bulunan diğer gıdalar için 10 µg/l'lik bir limit değeri belirlenmiştir. Antep fıstığı okratoksin A kontaminasyonuna karşı hassas gıda matrisine sahiptir. Örneklerde belirlenen düzeyler bu limitin altındadır ancak 3 µg/l'i aşan toksin değerleri sağlık açısından risk teşkil etmektedir. Çünkü OTA'nın insan ve hayvan sağlığı üzerine zararlı etkileri sıklıkla kümülatiftir; hedef dokuya giriş ve birikim uzun bir süreçtir.

Örneklerin % 66'sında (36 adet) aflatoksin kontaminasyonu gözlenmiştir. AFT, 0,001 ile 23,542 µg/l aralığında tespit edilmişlerdir. Gıdaların doğrudan tüketim ve gıda bileşeni olarak kullanılmaları durumunda, bulundurabilecekleri maksimum AFT değeri 10 µg/l, tüketilmeden yada gıda bileşeni olarak kullanılmadan fiziksel işlem görecektir ise bu değeri 15 µg/l'dir. 2 örnekte belirlenen AFT değerleri (23,5417 ve 11,5042 µg/l) doğrudan tüketim ve gıda bileşeni olarak kullanılmak için limit değerlerin üzerindedir. 1 örnekte de tespit edilen 7 µg/l AFT değeri limitlerin altında olmasına rağmen oldukça yüksek seviyede toksin içermektedir.

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Güneydoğu Anadolu Bölgesi Gaziantep’te bir işletmeden temin edilen ve İstanbul’da marketlerden, pazardan ve küçük işletmelerden toplanan Antep fıstıkları ile yürütülmüştür. İşletmeden temin edilen numunelerin her biri 2-3 tonu temsil etmektedir. İstanbul marketten toplanan ürünler ise paketli ve paketsiz, kabuklu ve kabuksuz olarak farklı markalardan ve semtlerden temin edilmiştir. Çalışmada Antep fıstıklarında okratoksin A ve aflatoksin varlığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar EC ve TGK tarafından kabul edilen maksimum limitlerle kıyaslanmıştır.

Antep fıstıklarında okratoksin A ve aflatoksin varlığı yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırmanın başında örnekler hazırlanmış, ekstrakte edilmiştir.

Sert kabuklu meyveler yüksek yağ içeriğine sahiptirler. Türkiye’de yetiştirilen Antep fıstıklarının da yağ içeriği seviyeleri % 48,5-58,5 aralığındadır. Bu sebeble örneklerin efektif ekstraksiyonu önem taşımaktadır. Ekstraksiyonun ardından temizleme aşaması için örnekler immunoafinite kolona verilmiştir. Bu aşamada toksin saflaştırılmış, ardından HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Ters faz kolonda floresans dedektörle tespit ve tayin gerçekleştirilmiştir.

Analizlenen 73 adet örneğin 58’i Antep kırmızı, 4’ü Antep yeşil ve 11’i Siirt çeşididir. 55 örneğin 19’unda toksin tespit edilmemiştir. Tüm Antep fıstığı örneklerinin % 6’sinde 1,2376-3,7197 µg/l arasında değişen düzeylerde OTA varlığı belirlenmiştir. OTA kontaminasyonu yalnızca Antep kırmızı örneklerinde (%7’sinde) tespit edilmiş, Antep yeşil ve Siirt çeşitlerinde OTA varlığına rastlanmamıştır. OTA tespit edilen örneklerin hepsinde aflatoksin varlığına da rastlanmıştır.

Aflatoksinler, çok çeşitli tarım ürünlerini, özellikle yüksek karbonhidrat ve/veya yağ içeriğine sahip gıdaları kontamine ederler. Sert kabuklu meyveler, aflatoksin kontaminasyonuna karşı hassas gıda matrisine sahiptirler.

73 örnekte yalnızca AFB₁ kontaminasyonu saptanan 20 örnek (% 27) bulunmaktadır. Örneklerin %8'i, AFB₁ ve AFB₂ birlikte tespit edilmiştir. Antep kırmızı çeşidinde ait 1 örnekte AFB₁ ve AFG₁ birlikte tespit edilmiştir. Siirt çeşidinde ait 1 örnekte AFB₁ ve AFG₂ birlikte tespit edilmiştir. 5 adet örnekte ise AFB₁, AFB₂, AFG₂ birlikte belirlenmiştir. Örneklerin 21'inde (% 29) 4 aflatoksin türü aynı anda tespit edilmiştir.

Mikotoksinlerin kontamine gıdalarda tespiti ve ortadan kaldırılması insan sağlığı için ölümcül sonuçları önleyebilir. Üretim esnasında gıda hijyen kalitesi çok aşamalı olarak sürekli izlenmelidir, böylece hızlı ve etkin bir müdahale yapılabilir ve mikotoksinlerin zararlı etkileri başarıyla önlenabilir Aflatoksinler, en toksijenik özellikle mikotoksin olmaları ve sert kabuklu meyvelerde sıklıkla tespit edilmeleri sebebiyle önem taşımaktadır. Sonuçlar incelendiğinde okratoksin A tespit edilen tüm 4 örnekte aflatoksin kontaminasyonunun da gözlenmiştir. Bu, farklı küf türlerinin birbirini sinerjist etkilemeleri riskini işaret etmektedir. Bu açıdan ilerleyen çalışmalarda, Türkiye'de yetiştirilen Antep fıstıklarında hangi küf türünün baskın olduğu ve türlerin toksijenite bilgilerinin tespiti özellikle mikotoksinlere yönelik hasat öncesi önleyici tedbirlerin alınması konusunda faydalı olacaktır. Ayrıca sıcaklık, nem, depolama koşulları gibi etkenlerin küflerin gelişim ve mikotoksin oluşturma özelliklerinde belirleyicidir. Dolayısıyla ürünlerin hangi koşullarda yetiştirilip, saklandığı önem taşımaktadır. Çevresel faktörlerden sıcaklık ve bağıl neme ilave olarak su aktivitesi, nem, depolama süresi, haşereler ve kabuğun hasarlanıp hasarlanması, hasat ve hasat sonrası düşen yağışın boyutu küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunu etkilemektedir.

Antep fıstığı yetiştirme alanlarında, hasat sırasında ve sonrasında kontaminasyonların önlemesi amacıyla GAP, GMP ve GHP oldukça önemlidir. Tarlada yüksek su aktivitesi, yüksek sıcaklık, kuraklık, hasat esnasında mekanik hasarlar, böcek enfeksiyonları, hasat sırasında yağmur ve depoda nem birikimi küf gelişimini arttıran koşullardır. Bu tedbirlerin alınmasıyla okratoksin A ve aflatoksinlerin sağlık üzerine zararlı etkilerinin, ekonomik ve uluslar arası piyasada itibar kaybının önüne geçilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A. A., Al-Kildi, A. F. ve Al-Jedah, J. H.** (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar, *Food Control*, **15**, 543-548.
- Afsah-Hejri, L., Jinap, S. ve Mirhosseini, H.** (2012). Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions, *Food Control*, **23**, 113-119.
- Aluç, M. ve Aluç, S.** (2005). Antep Fıstıklarında Aflatoksin Kirliliği, Türkiye’de Mikotoksin Çalışmaları II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 23-24 Mayıs.
- Babadoğan, G.** (2007). Antep Fıstığı, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi.
- Bagheri, V., Shamshiri, M. H., Shirani, H. ve Roosta, H. R.** (2011). Effect of mycorrhizal inoculation on ecophysiological responses of pistachio plants grown under different water regimes, *Photosynthetica*, **49**, 4, 531-538.
- Barberis, C., Astoreca, A., Asili, R., Fernandez-Juri, G., Chulze, S., Magnoli, C. ve Dalcero, A.** (2009). In vitro control of growth and ochratoxin A production by butylated hydroxyanisole in *Aspergillus* section *Nigri* species, *Food Control*, **20**, 709–715.
- Bayram, M.** (2011). Comparison of unsplit inshell and shelled kernel of the pistachio nuts, *Journal of Food Engineering*, **107**, 374–378.
- Bazin, I., Andreotti, N., Hady-Hassine, A. N., DeWaard, M., Sabatier, J. M. ve Gonzalez, C.** (2013). Peptide binding to ochratoxin A mycotoxin : A new approach in conception of biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, **40**, 240–246.
- Beláková, S., Benesová, K., Mikulíková, R. ve Svoboda, Z.** (2011). Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Food Chemistry*, **126**, 321-325.
- Bellomo, M. G. ve Fallico, B.** (2007). Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin, *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**, 352–359.
- Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E. ve Zamanian, F.** (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts, *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 812–816.

- Daşkaya-Dikmen, C. ve Heperkan, D.** (2013). Fumonisin production of black Aspergilli in vitro, fumonisin and ochratoxin A production in figs of positive strains and their growth assessment, *Toxin Reviews*, doi: 10,3109/15569543,2012,756524.
- Dini, A., Khazaeli, P., Roohbakhsh, A., Madadlou, A., Pourenamdari, M., Setoodeh, L., Askarian, A., Doraki, N., Farrokhi, H., Moradi, H. ve Khodadadi, E.** (2013). Aflatoxin contamination level in Iran's pistachio nut during years 2009, *Food Control* , **30**, 540-544.
- Domijan, A., Peraica, M., Miletic-Medved, M., Lucic, A. ve Fuchs, R.** (2003). Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine, *Journal of Chromatography B*, **798**, 317–321.
- Duarte, S. C., Lino, C. M. ve Angelina, P.** (2012). Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products, *The Veterinary Journal*, **192**, 286–292.
- EC (European Commission)** (2006). Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs, B Commission Regulation (EC), EC-1881/2006, 17-18.
- EFSA (European Food Safety Authority)** (2006). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission Related to Ochratoxin A in Food, *The EFSA Journal*, **365**, 1-56.
- El tawila, M. M., Neamatallah, A. ve Serdar, S. A.** (2013). Incidence of aflatoxins in commercial nuts in the holy city of Mekkah, *Food Control*, **29**, 121-124.
- Fabiania, A., Corzania, C. ve Arfelli, G.** (2010). Correlation between different clean-up methods and analytical techniques performances to detect Ochratoxin A in wine, *Talanta*, **83**, 281–285.
- Frenette, C., Paugh, R. J., Tozlovanu, M., Juzio, M., Pfohl-Leszkowicz, A. ve Manderville, R. A.** (2008). Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites, *Analytica Chimica Acta* **6**, **17**, 153–161.
- Frizzell, C., Verhaegen, S., Ropstad, E., Elliott, C. T. ve Connolly, L.** (2013). Endocrine disrupting effects of ochratoxin A at the level of nuclear receptor activation and steroidogenesis, *Toxicology Letters*, **217**, 243–250.
- Georgiadou, M., Dimou, A. ve Yanniotis, S.** (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study, *Food Control*, **26**, 580-586.
- Ghrab, M., Zribi, F., Ayadi, M., Elloumi, O., Mnaïki, N. ve Mimoun, B. M.** (2010). Lipid characterization of local pistachio germoplasm in central and southern Tunisia, *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 605–612.
- Gül-Yavuz, G.** (2011). Sert Kabuklu Meyveler/ Antep Fistiği, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü TEPGE Bakış, Nüsha, 5, Issn, 1303-8346, Aralık.

- Hashemi, J. ve Alizadeh, N.** (2009). Investigation of solvent effect and cyclodextrins on fluorescence properties of ochratoxin A, *Spectrochimica Acta Part A*, **73**, 121–126.
- Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J. ve Barthelmebs, L.** (2012). Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices, *Food Control*, **26**, 401-415.
- Heperkan, D., Dazkir, D. S., Kansu, D. Z. ve Güler, F. K.** (2009). Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verucosum* in black table olives, *Toxin Reviews*, **28**, 180–186.
- Heperkan, D., Moretti, A., Dikmen, C. ve Logrieco, A.** (2012). Toxigenic fungi and mycotoxin associated with figs in the Mediterranean area, *Phytopathologia Mediterranea*, **51**, 1, 119-130.
- Jaksic, S. M., Jajic, I. M., Nesic, K. D., Stojanov, I. M., Zivkov-Balos, M. M., Mihaljev, Z. A. ve Abramovic, B. F.** (2013). Interlaboratory Comparison for Determination of Ochratoxin A by ELISA in Maize, *Jour. Nat. Sci*, **124**, 77-84, Matica Srpska, Novi Sad.
- Jalili, M. ve Jinab, S.** (2012). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili, *Food Control*, **24**, 160-164.
- Jinab, S., De Rijk, T. C., Arzandeh, S., Kleijnen, H. C. H., Zomer, P., Van der Weg, G. ve Mol, J. G. J.** (2012). Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods, *Food Control*, **26**, 42-48.
- Kirilov, I. M., Dokic, G. M. ve Popov, S. Z.** (2013). Validation of Immunoenzymatic Tests for The Detection of Aflatoxin Presentin Food, *Jour. Nat. Sci*, **124**, 37-50, Matica Srpska, Novi Sad.
- Kocsube, S., Varga, J., Szigeti, G., Baranyi, N., Suri, K., Toth, B., Toldi, E., Bartok, T. ve Mesterhazy, A.** (2013). *Aspergillus* Species as Mycotoxin Producers in Agricultural Products in Central Europe, *Jour. Nat. Sci*, **124**, 13-25, Matica Srpska, Novi Sad.
- Li, X., Li, P., Zhang, Q., Zhang, Z., Li, R., Zhang, W., Ding, X., Chen, X. ve Tang, X.** (2013). A Sensitive Immunoaffinity Column-Linked Indirect Competitive ELISA for Ochratoxin A in Cereal and Oil Products Based on a New Monoclonal Antibody, *Food Anal. Methods*, doi: 10.1007/s,12161,013,9561,4.
- Mao, J., Lei, S., Yang, X. ve Xiao, D.** (2013). Quantification of ochratoxin A in red wines by conventional HPLC-FLD using a column packed with core-shell particles, *Food Control*, **32**, 505-511.
- O'Callaghan, J., Coghlan, A., Abbas, A., García-Estrada, C., Martín, J. ve Dobson, A. D. W.** (2013). Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum*, *International Journal of Food Microbiology*, **161**, 172–181.

- Ozden, S., Akdeniz, A. S. ve Alpertunga, B.** (2012). Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey, *Food Control*, **25**, 69-74.
- Pattono, D., Gallo, P. F. ve Civera, T.** (2011). Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms, *Food Chemistry*, **127**, 374–377.
- Radulovic, S. S., Markovic, R. V., Milic, D. D., Jakic-Dimic, D. P. ve Sefer, D. S.** (2013). Degree of Mycotoxicological Contamination of Feed and Complete Feed Mixtures for Pigs and Poultry During the Period 2007-2012 on the Territory of the Republic of Serbia, *Jour. Nat. Sci*, **124**, 153-169, Matica Srpska, Novi Sad.
- Raiola, A., Meca, G., Mañes, J. ve Ritieni, A.** (2012). Bioaccessibility of Deoxynivalenol and its natural co-occurrence with Ochratoxin A and Aflatoxin B₁ in Italian commercial pasta, *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 280–287.
- Remiro, R., Irigoyan, A., Gonzales-Penas, E., Lizarraga, E. ve Lopez de Cerain, A.** (2013). Levels of Ochratoxins in Mediterranean Red Wines, *Food Control*, **32**, 63-68.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G. ve Geisen, R.** (2011). Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species, *International Journal of Food Microbiology*, **145**, 229–237.
- Seferoğlu, S., Seferoğlu, H. G., Tekintas, F. E. ve Balta, F.** (2006). Biochemical composition influenced by different locations in Uzun pistachio cv. (*Pistacia vera* L.) grown in Turkey, *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 461–465.
- Stojanovska-Dimzoska, B., Hajrulai-Musliu, Z., Dimitrieska-Stojkovic, E., Uzunov, R. ve Sekulovski, P.** (2013). Occurrence of Aflatoxins in Peanuts and Peanut Products Determined by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Jour. Nat. Sci*, **124**, 27-35, Matica Srpska, Novi Sad.
- Suarez-Quiroz, M. L., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S. ve Guiraud, J. P.** (2004). Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee, *Food Microbiology*, **21**, 629–634.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi)** (2008). Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, Türk Gıda Kodeksi. **Tebliğ No: 2008/26**, *Resmî Gazete*, No: 17.05.2008- 26879.
- Toffa, D. D, Mahnine, N., Ouaffak, L., El Abidi, A., El Alaoui Faris, F. Z. Ve Zinedine, A.** (2013). First survey on the presence of ochratoxin A and fungi in raw cereals and peanut available in the Republic of Niger, *Food Control*, **32**, 558-562.

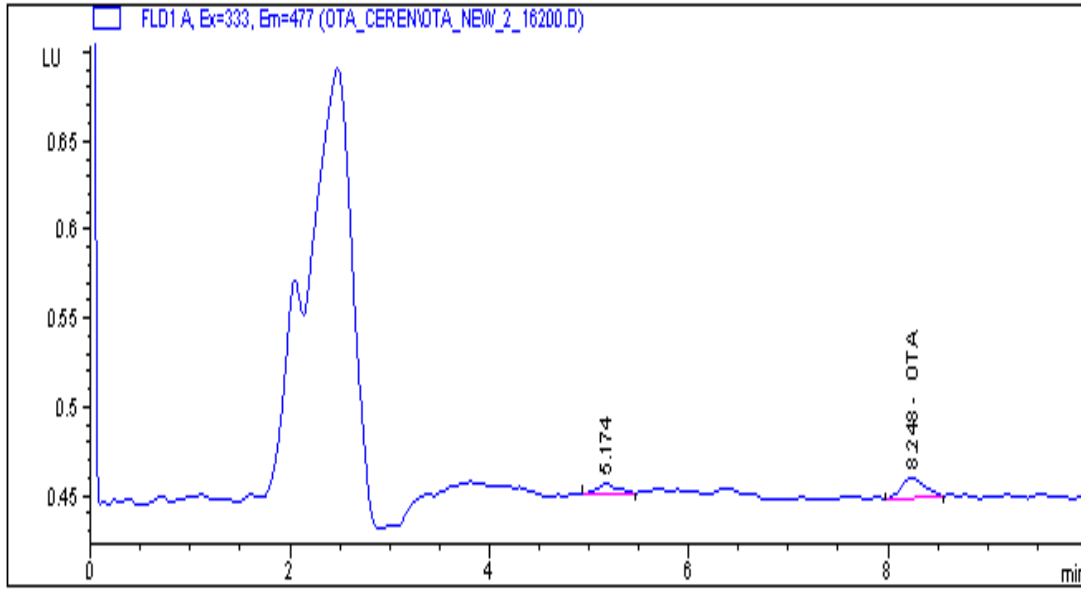
- Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C. ve Saija, A.** (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins, *Biochimie*, **92**, 1115-1122.
- Tsantili, E., Takidelli, C., Christopoulou, M. V., Lambrineab, E., Rouskasc, D. ve Roussosa, P. A.** (2010). Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistachia vera* L.) varieties, *Scientia Horticulturae*, **125**, 562–568.
- Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X. Ve Zhang, H.** (2011). Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China, *Food Control*, **22**, 1723-1728.

EKLER

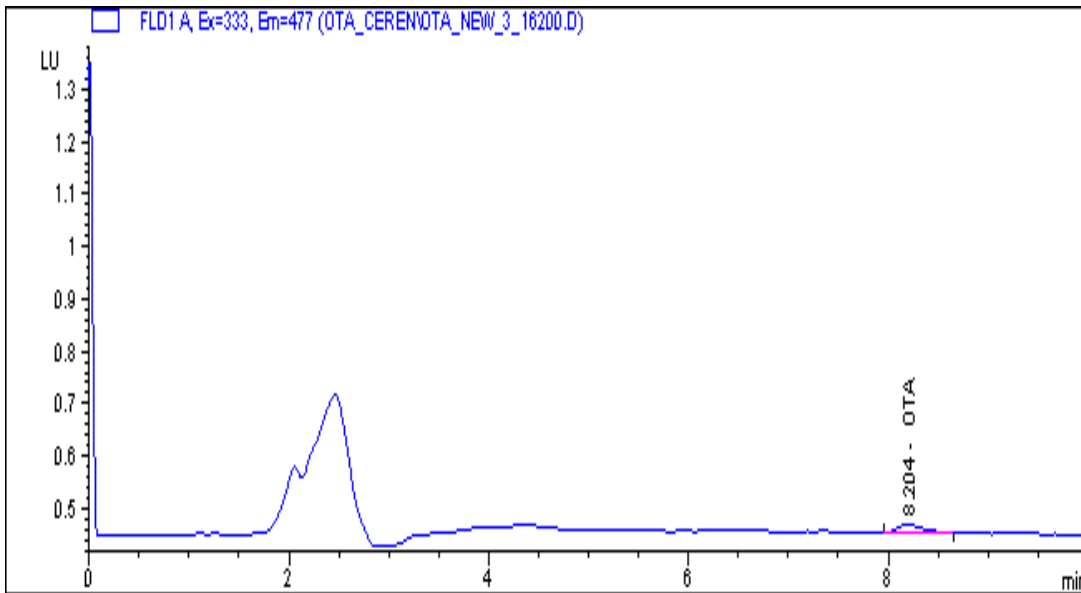
EK A : Okratoksin A saptanan örneklere ait HPLC Sonuç Kromatogramları

EK B : Aflatoksin saptanan örneklere ait HPLC Sonuç Kromatogramları

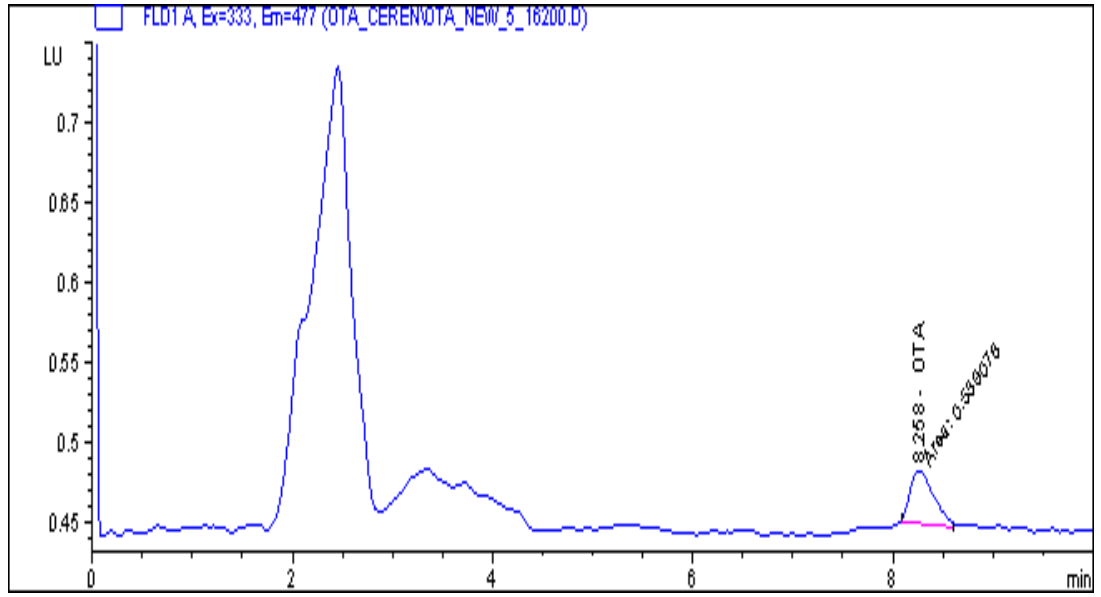
EK A



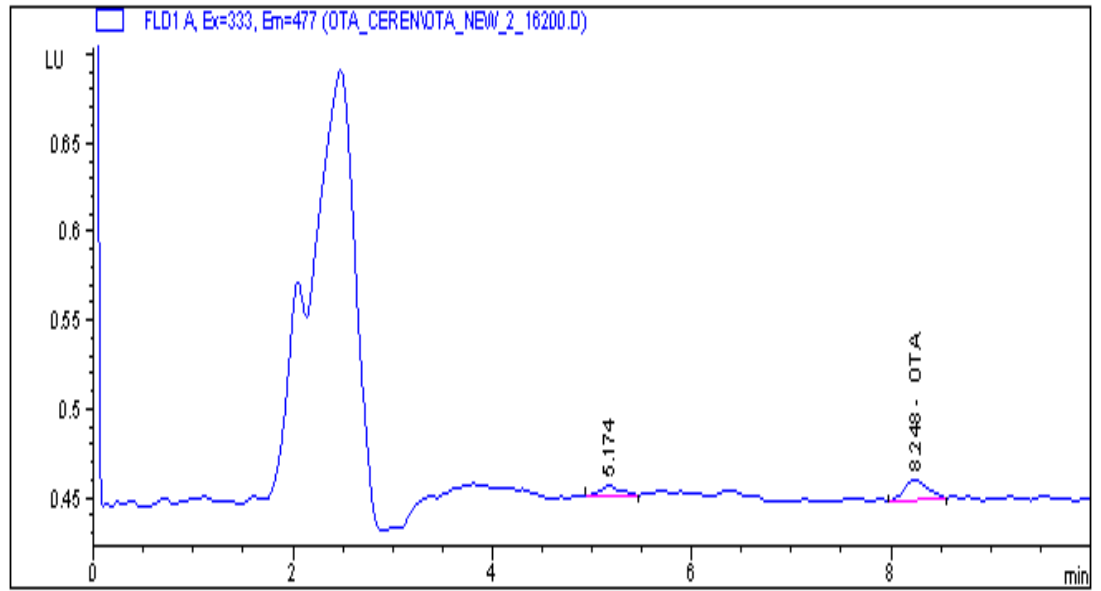
Şekil A.1 : OTA_NEW_2_16200 nolu örneğe ait kromatogram.



Şekil A.2 : OTA_NEW_3_16200 nolu örneğe ait kromatogram.

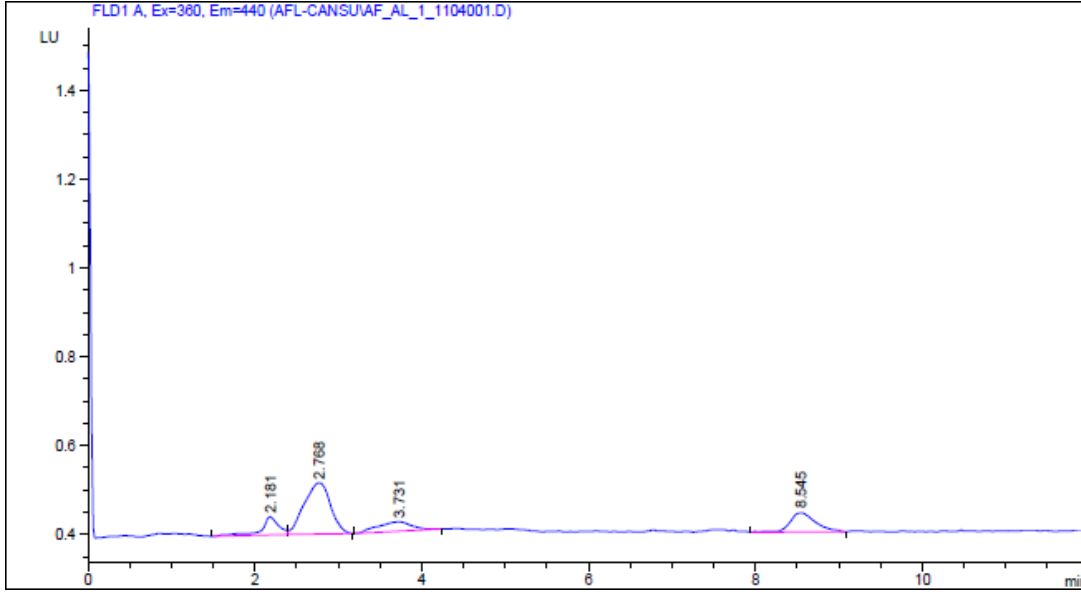


Şekil A.3 : OTA_NEW_5_16200 nolu örneğe ait kromatogram.

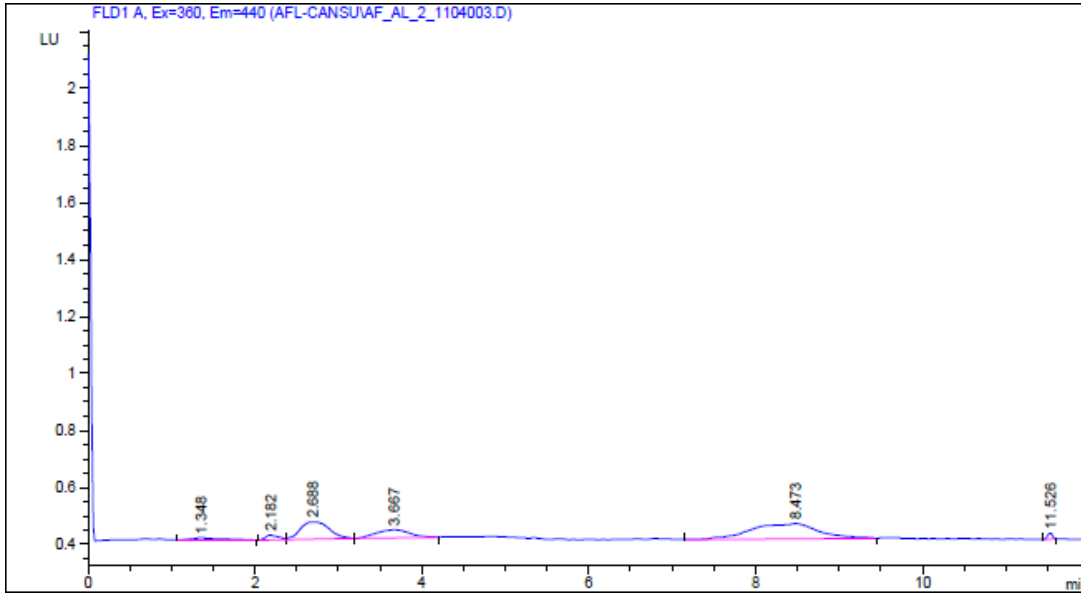


Şekil A.4 : OTA_NEW_2_16200 nolu örneğe ait kromatogram.

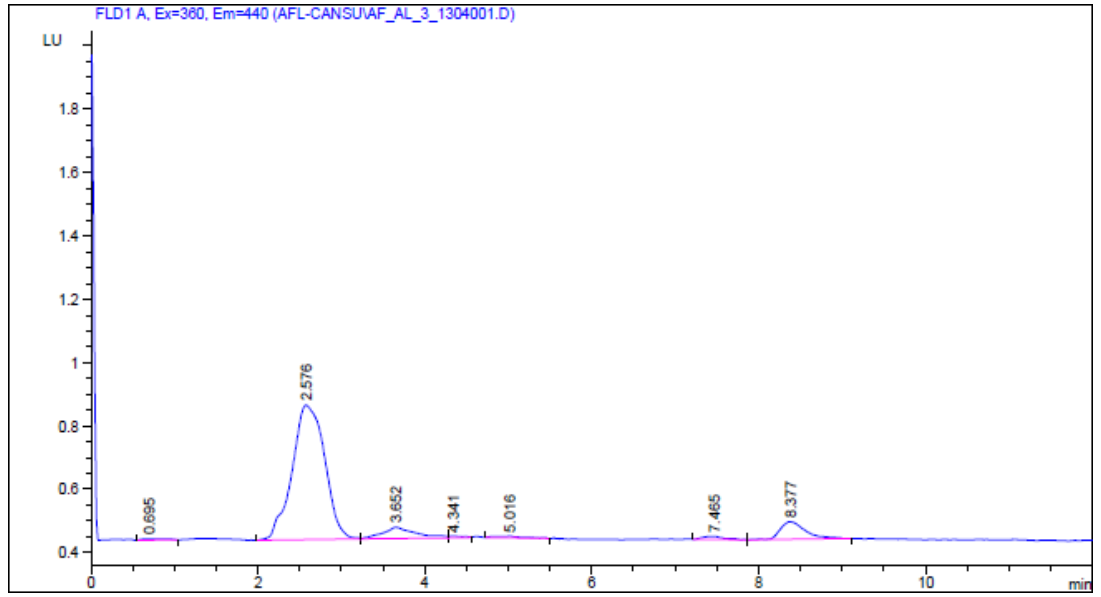
EK B : Aflatoksin saptanan örneklere ait HPLC Sonuç Kromatogramları



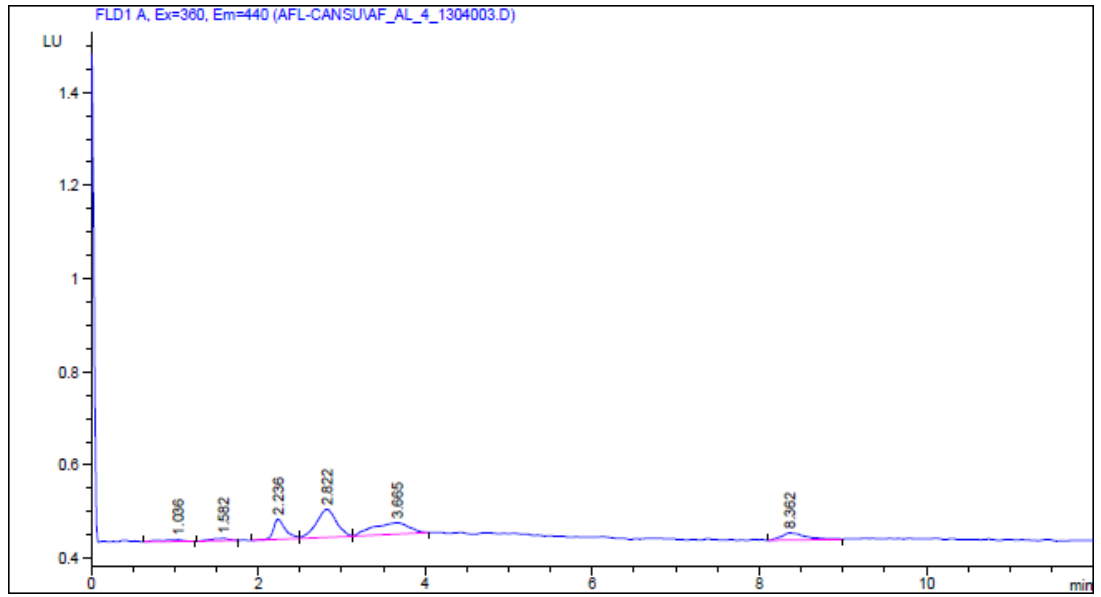
Şekil B.1 : AF_AL_1_1104001 nolu örneğe ait kromatogram.



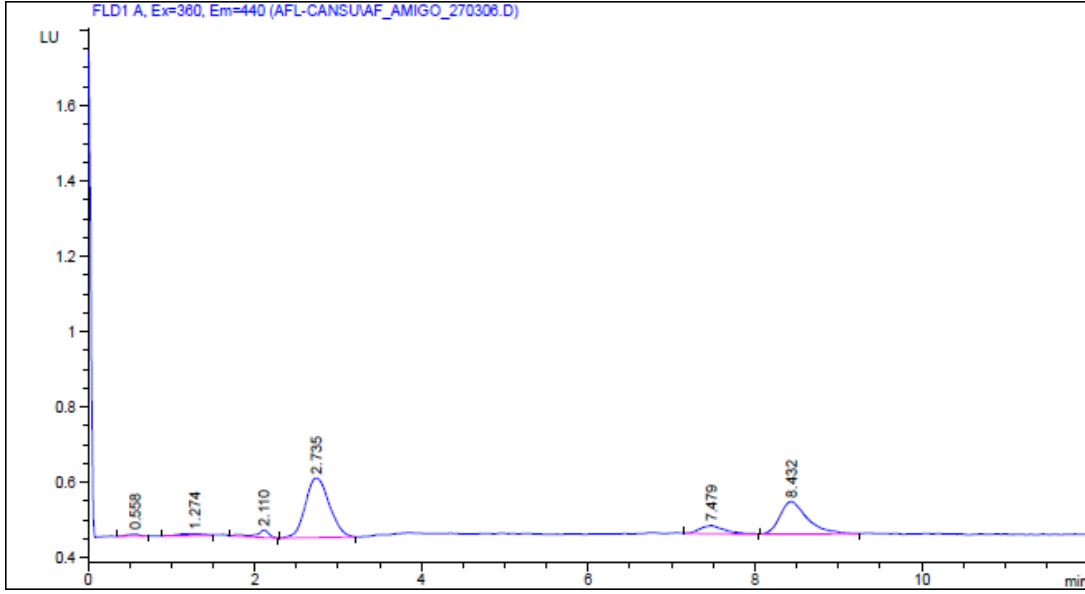
Şekil B.2 : AF_AL_2_1104003 nolu örneğe ait kromatogram.



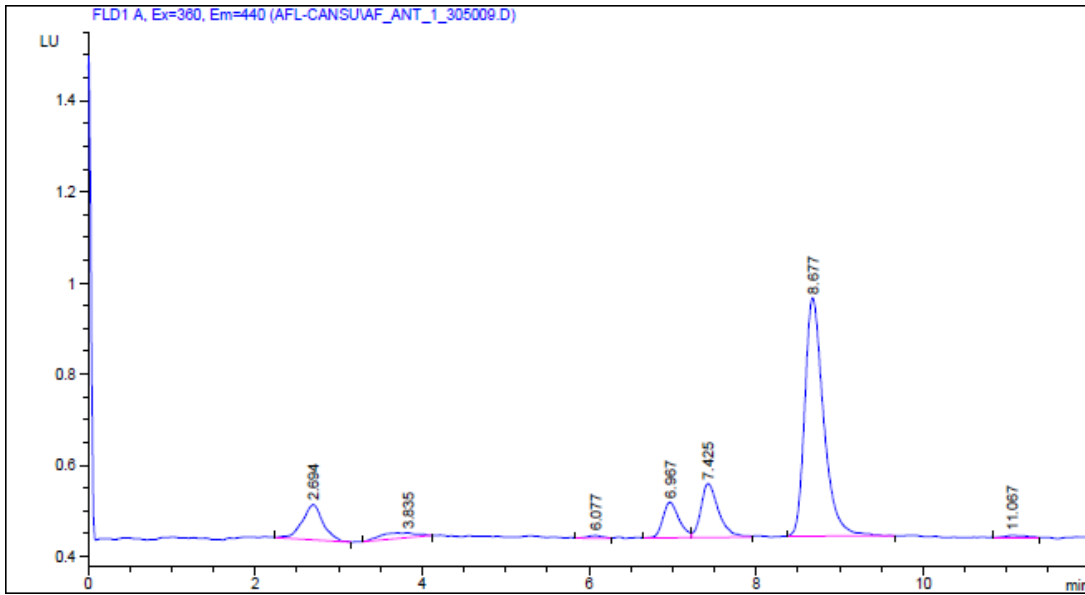
Şekil B.3 : AF_AL_3_1304001 nolu örneğe ait kromatogram.



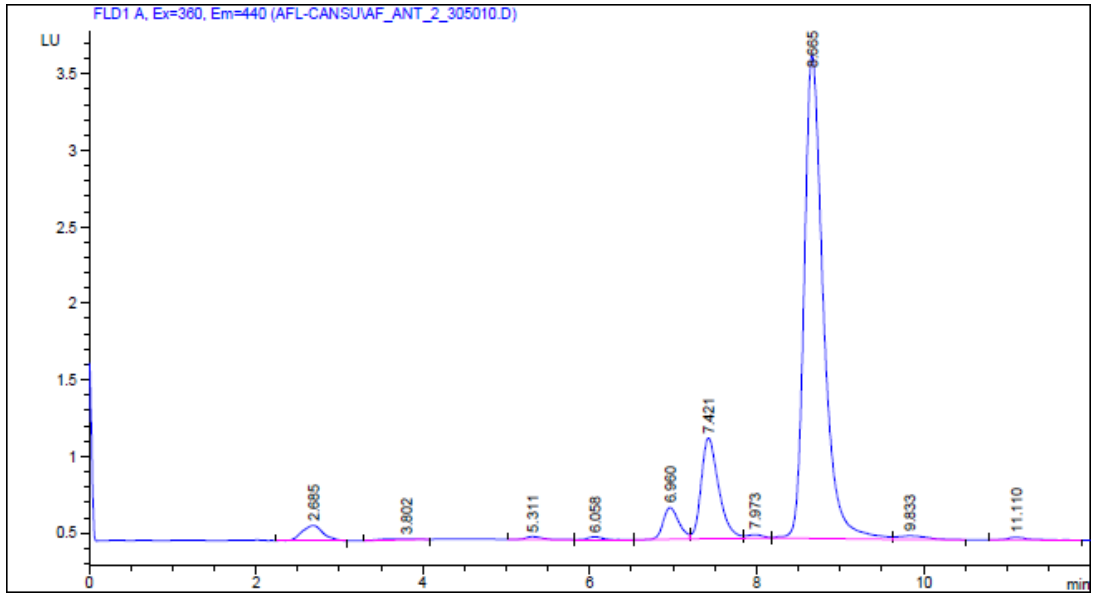
Şekil B.4 : AF_AL_4_1304003 nolu örneğe ait kromatogram.



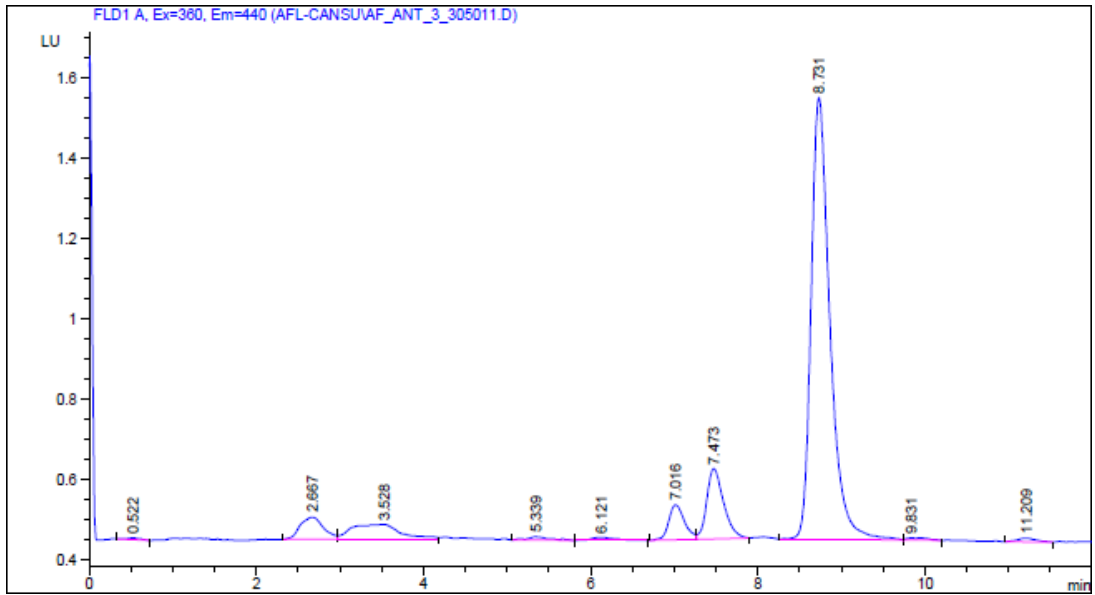
Şekil B.5 : AF_AMIGO_270306 nolu örneğe ait kromatogram.



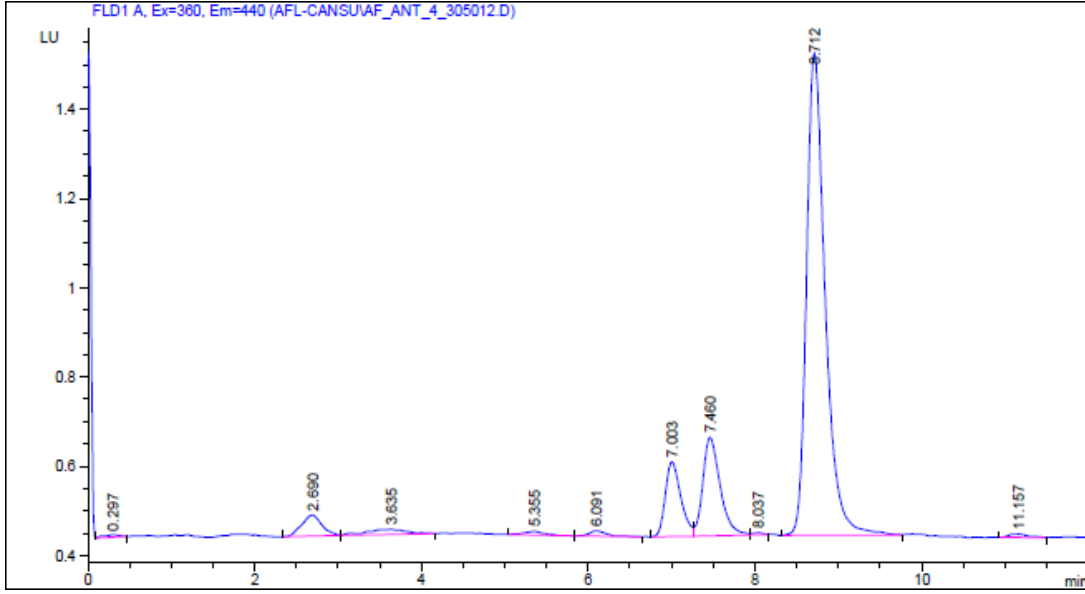
Şekil B.6 : AF_ANT_1_305009 nolu örneğe ait kromatogram.



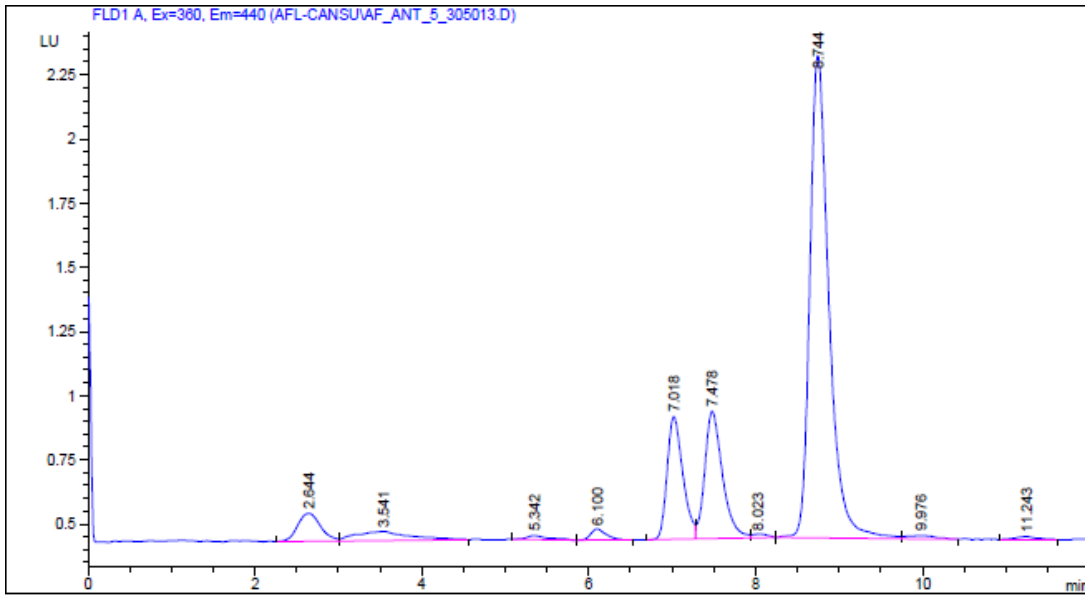
Şekil B.7 : AF_ANT_2_305010 nolu örneğe ait kromatogram.



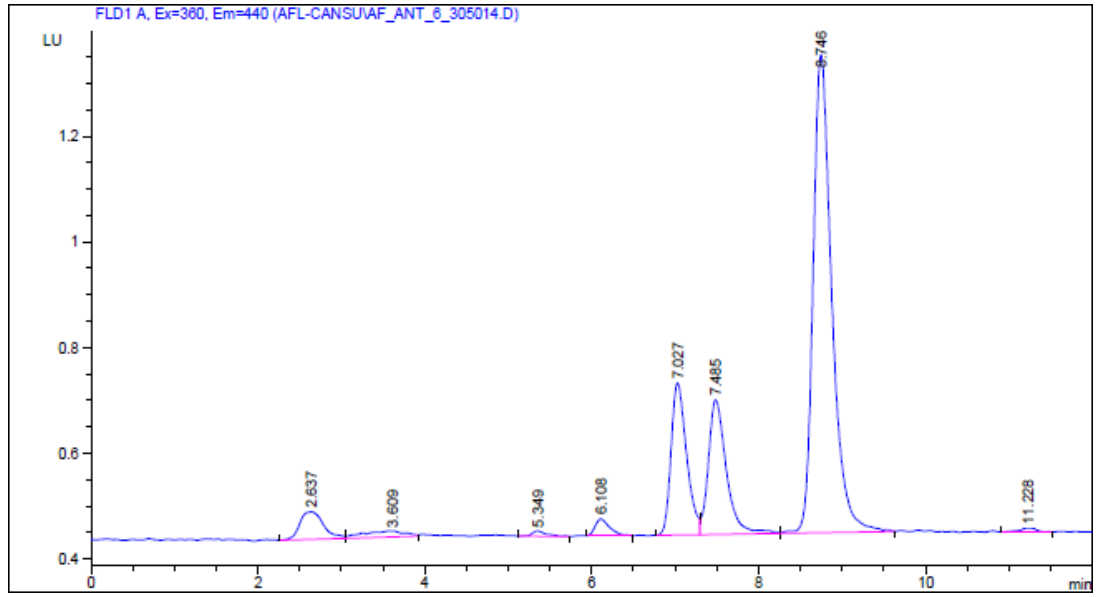
Şekil B.8 : AF_ANT_3_305011 nolu örneğe ait kromatogram.



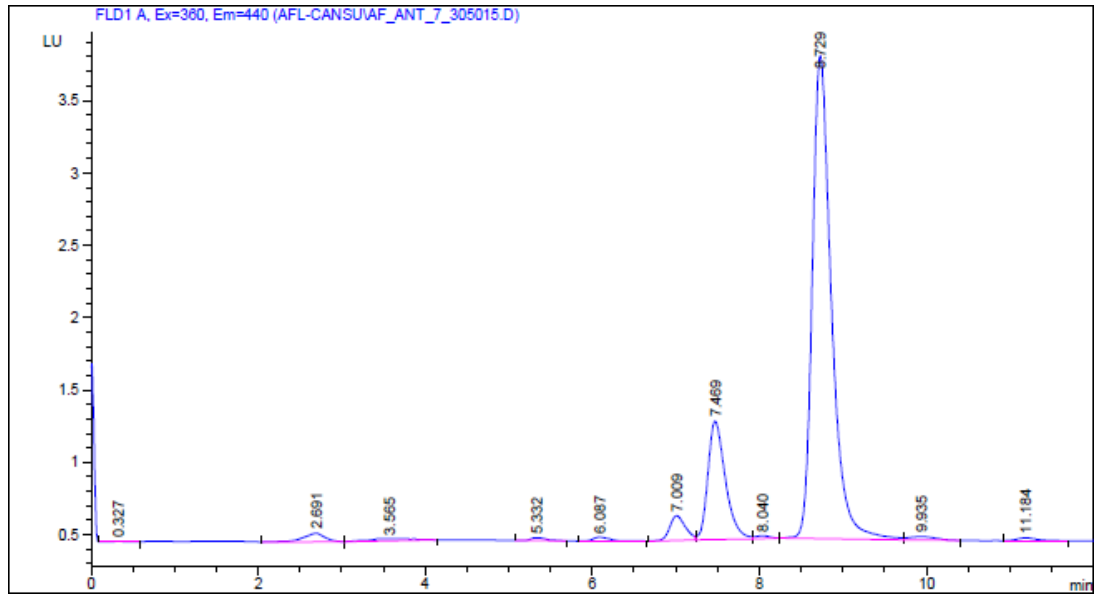
Şekil B.9 : AF_ ANT_4_305012 nolu örneğe ait kromatogram.



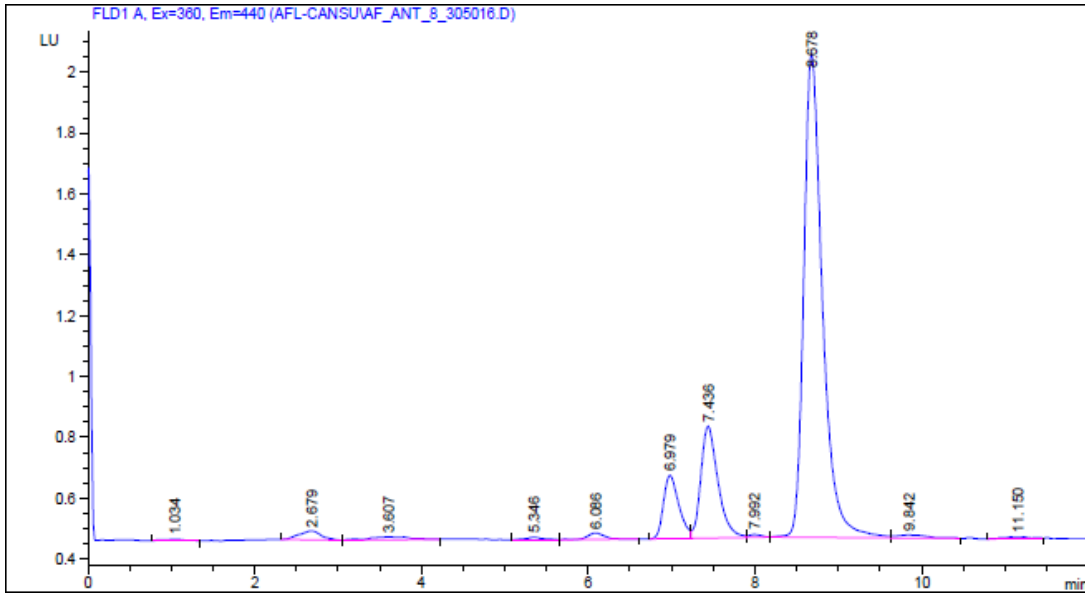
Şekil B.10 : AF_ ANT_5_305013 nolu örneğe ait kromatogram.



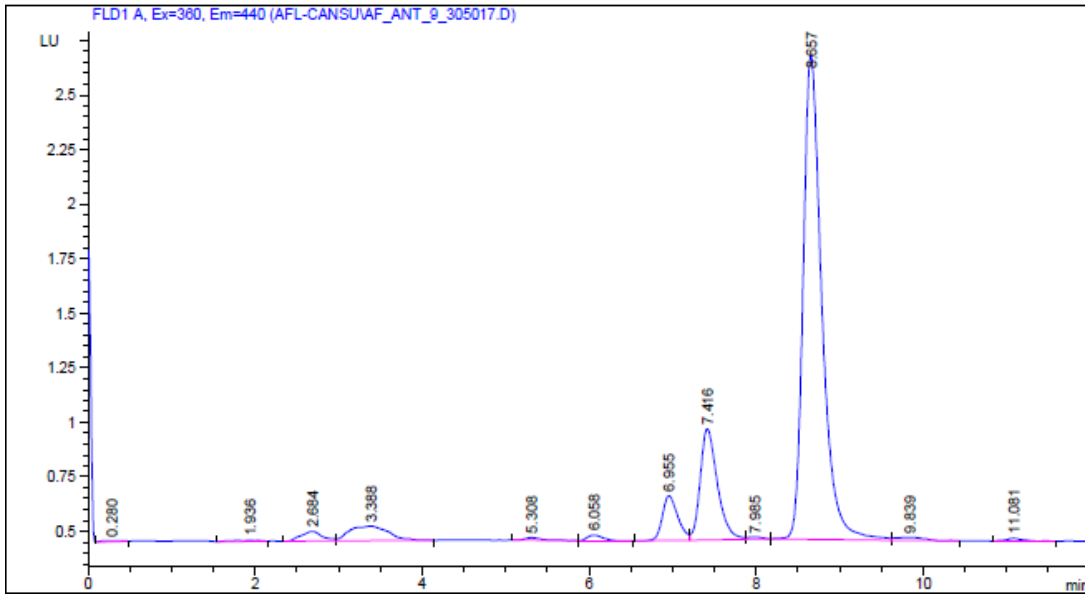
Şekil B.11 : AF_ ANT_6_305014 nolu örneğe ait kromatogram.



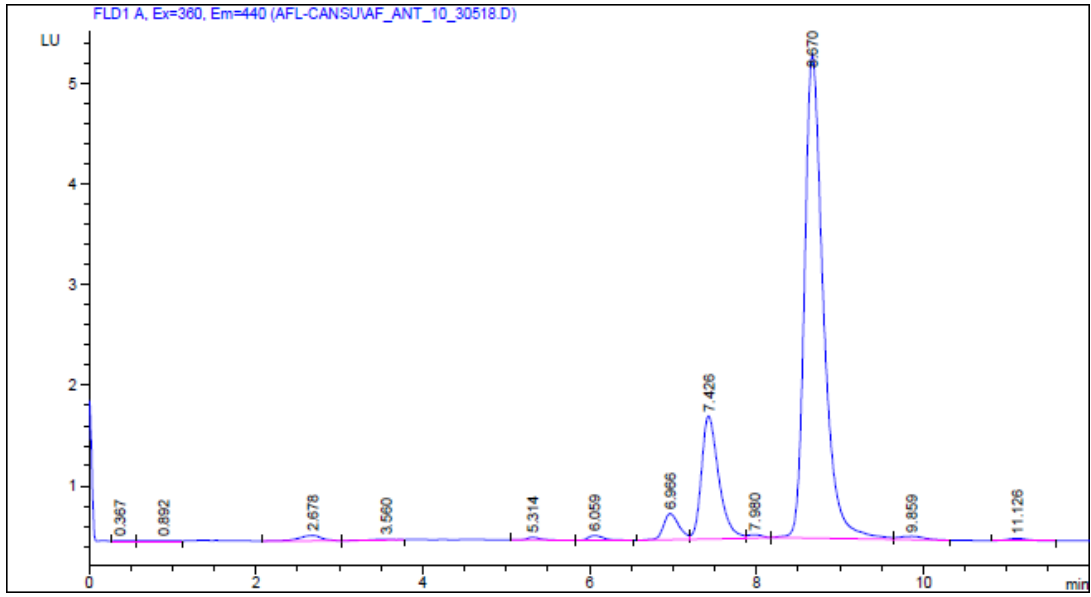
Şekil B.12 : AF_ ANT_7_305015 nolu örneğe ait kromatogram.



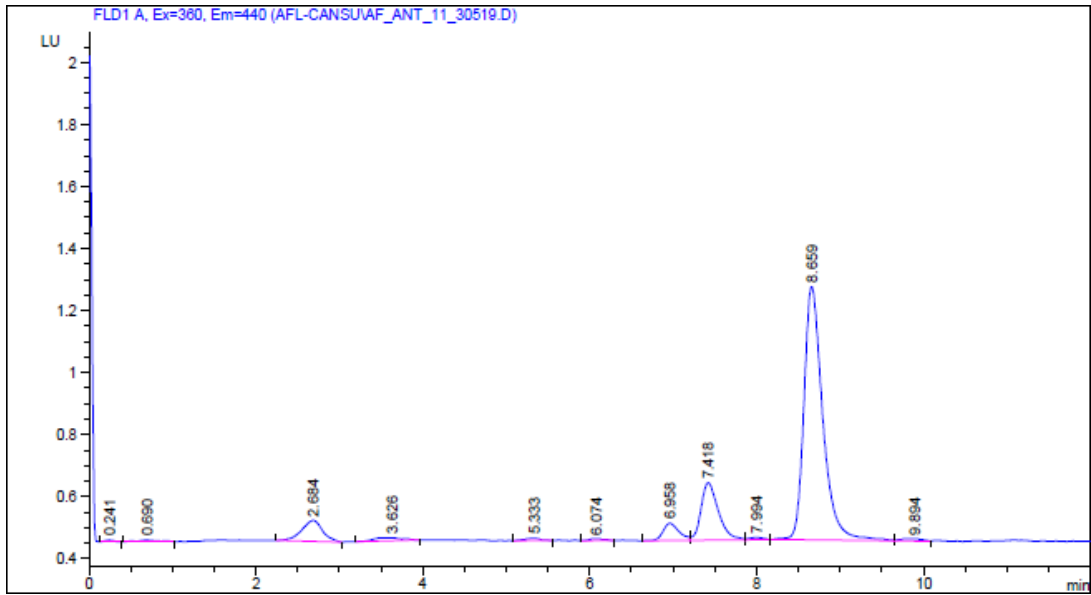
Şekil B.13 : AF_ ANT_8_305016 nolu örneğe ait kromatogram.



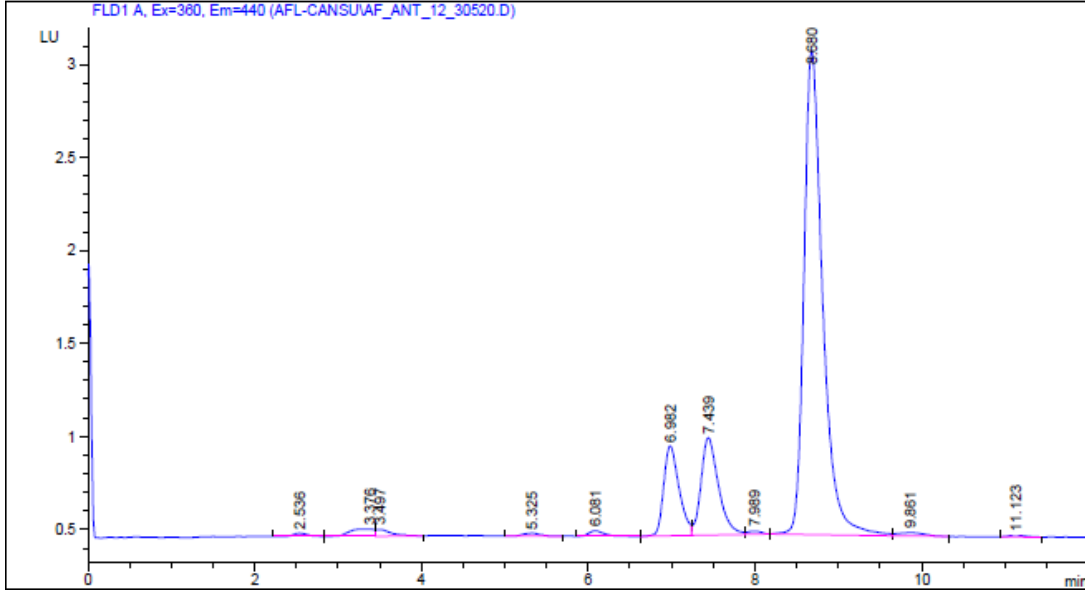
Şekil B.14 : AF_ ANT_9_305017 nolu örneğe ait kromatogram.



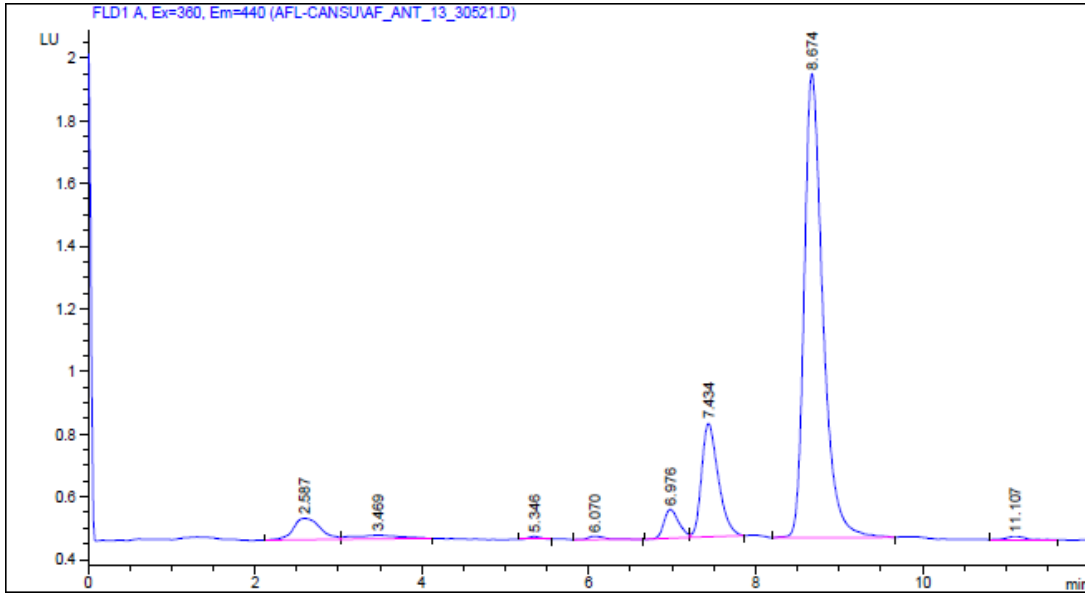
Şekil B.15 : AF_ ANT_10_30518 nolu örneğe ait kromatogram.



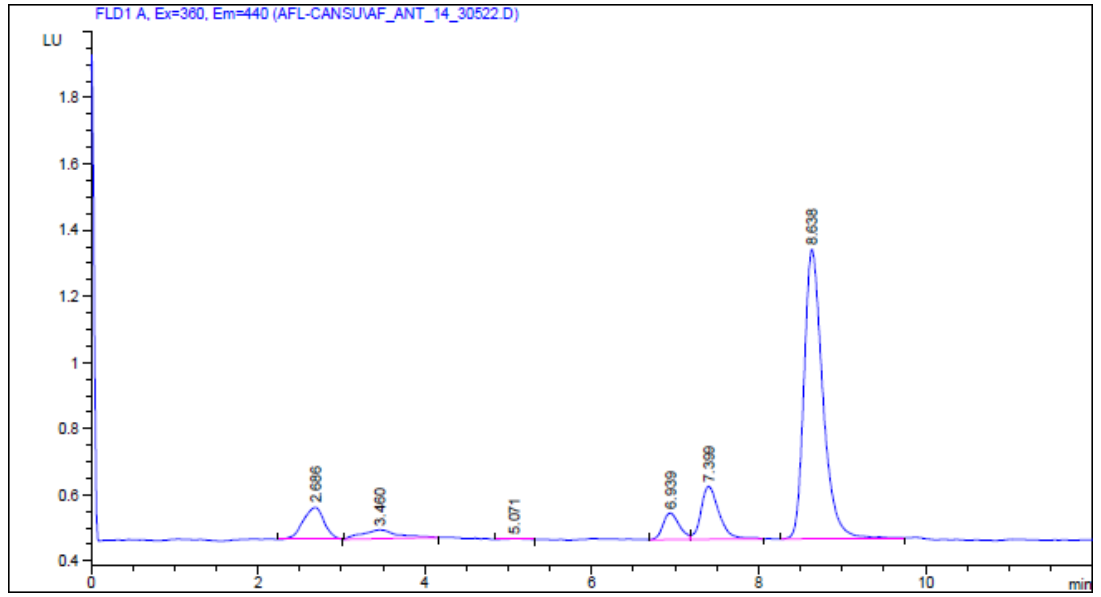
Şekil B.16 : AF_ ANT_11_30519 nolu örneğe ait kromatogram.



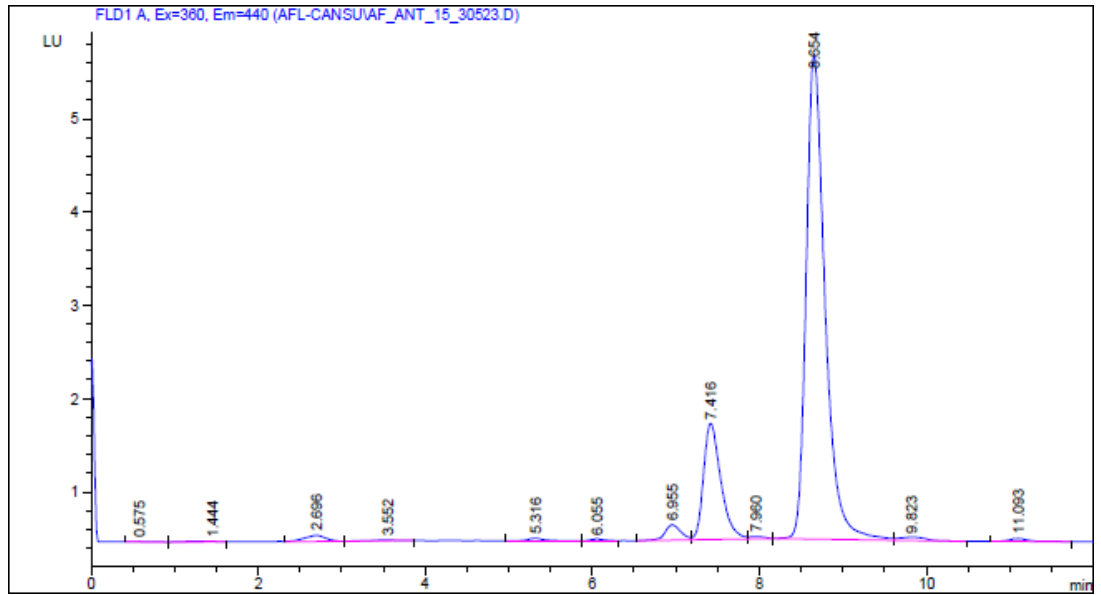
Şekil B.17 : AF_ ANT_12_30520 nolu örneğe ait kromatogram.



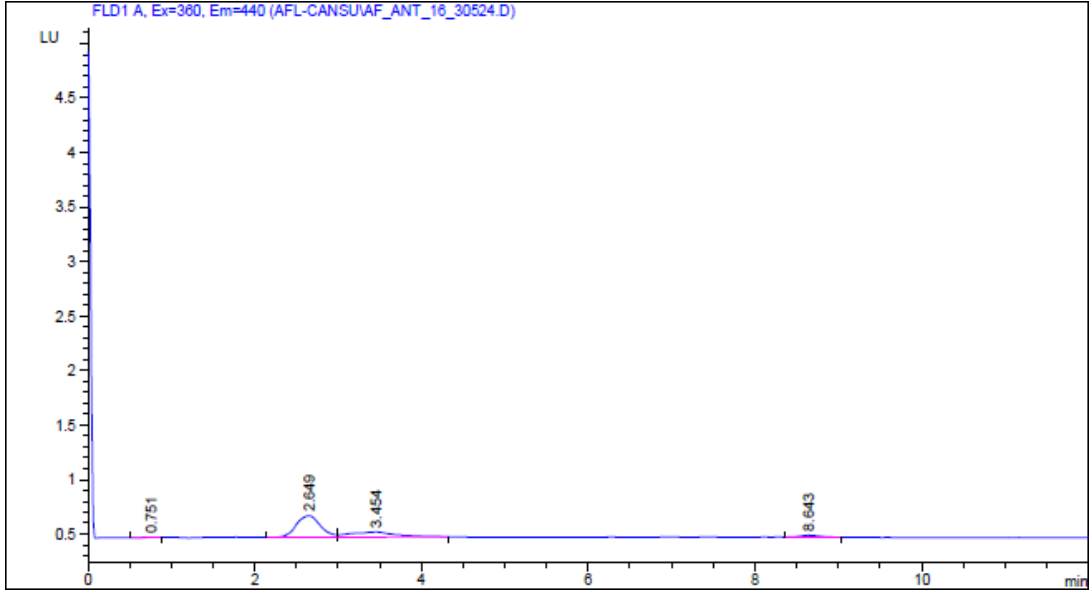
Şekil B.18 : AF_ ANT_13_30521 nolu örneğe ait kromatogram.



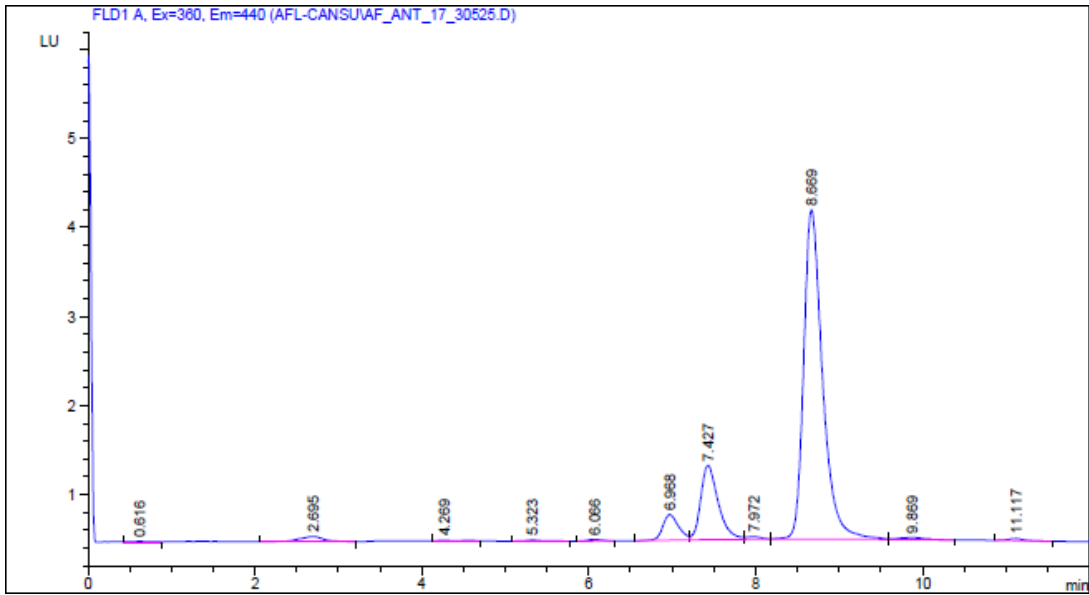
Şekil B.19 : AF_ ANT_14_30522 nolu örneğe ait kromatogram.



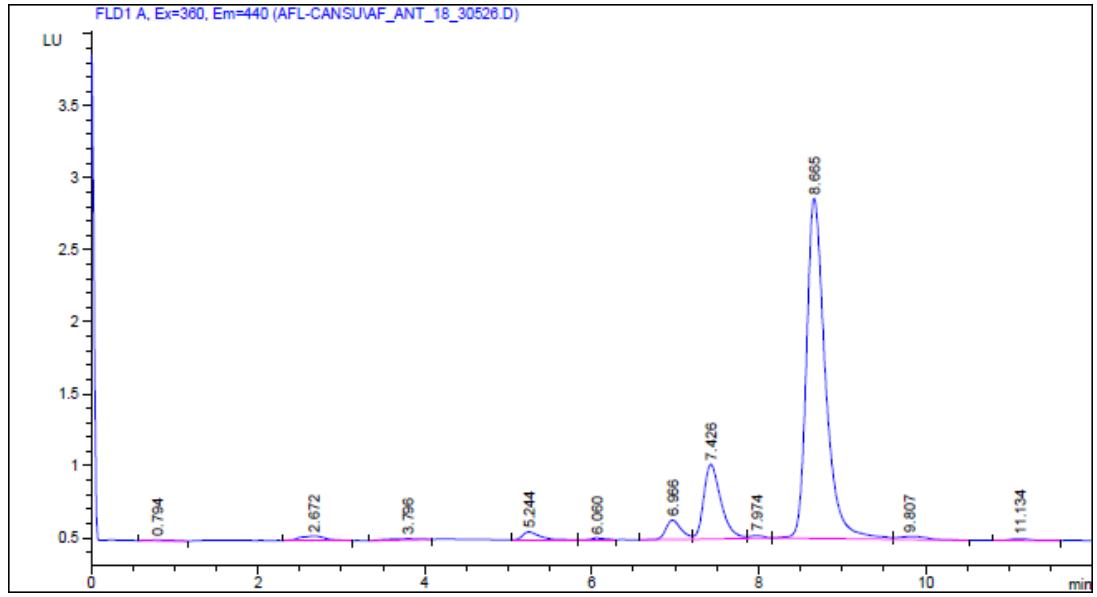
Şekil B.20 : AF_ ANT_15_30523 nolu örneğe ait kromatogram.



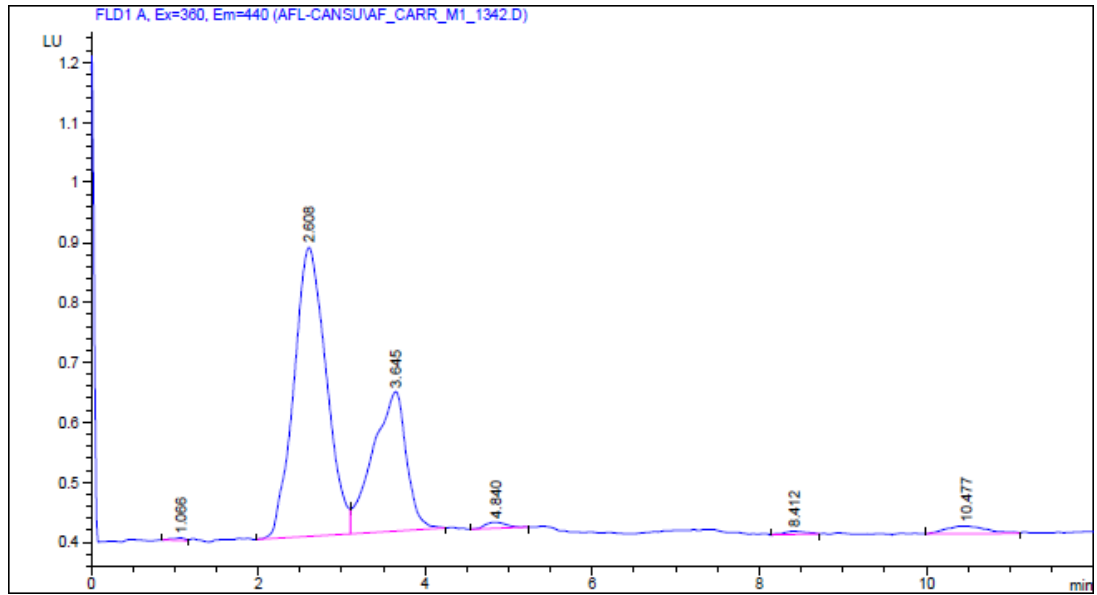
Şekil B.21 : AF_ ANT_16_30524 nolu örneğe ait kromatogram.



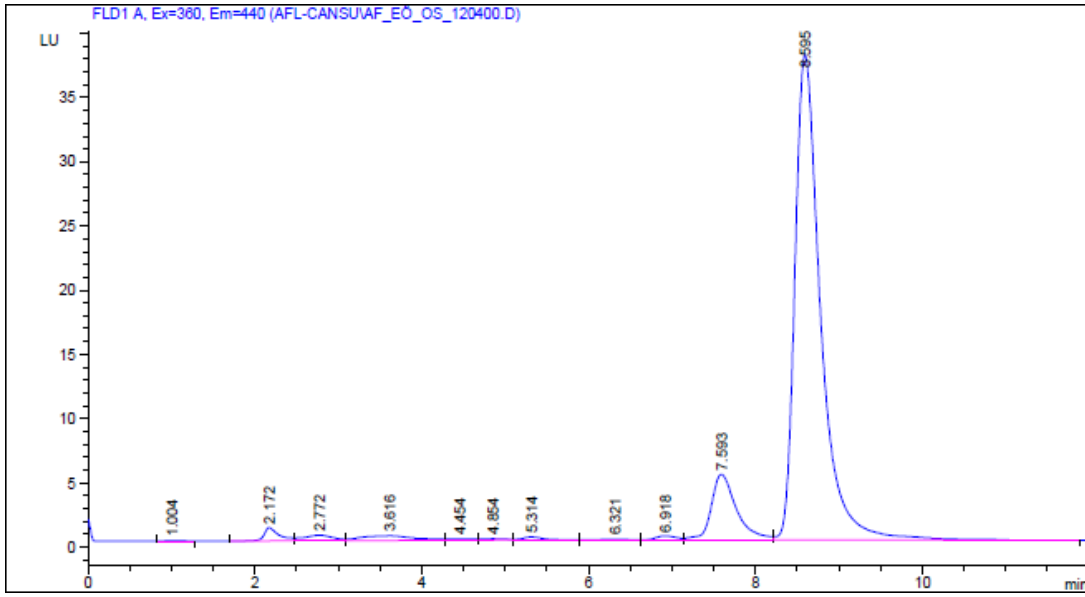
Şekil B.22 : AF_ ANT_17_30525 nolu örneğe ait kromatogram.



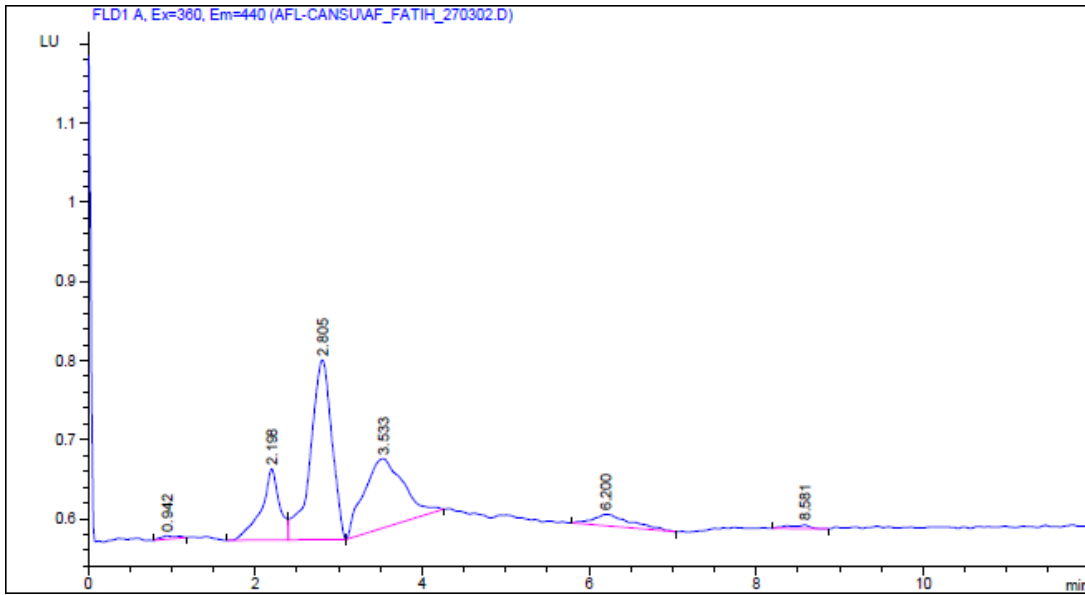
Şekil B.23 : AF_ ANT_18_30526 nolu örneğe ait kromatogram.



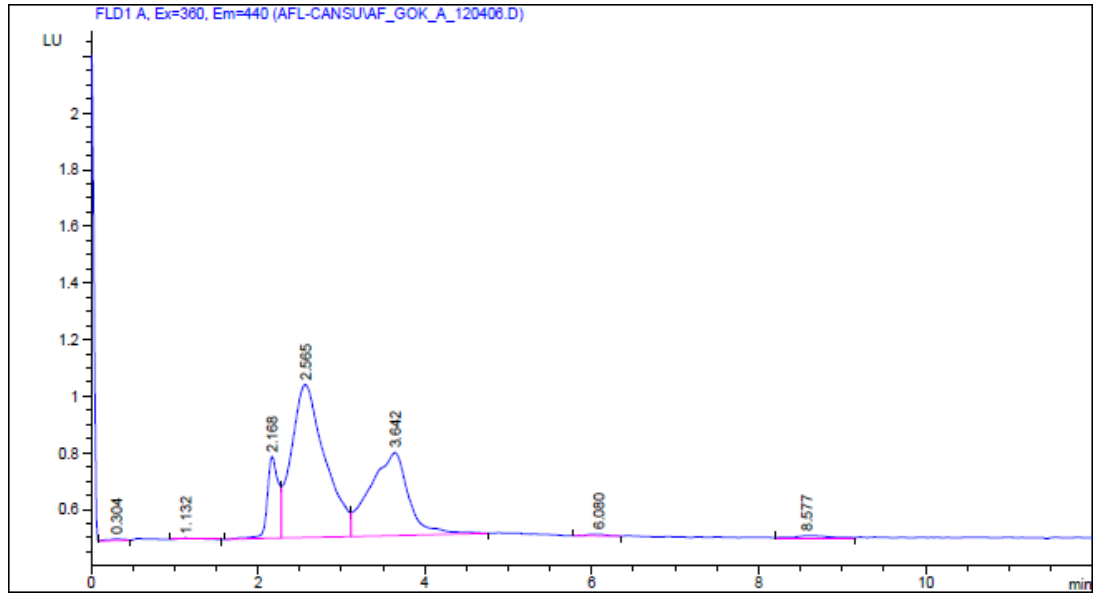
Şekil B.24 : AF_ CARR_M1_1342 nolu örneğe ait kromatogram.



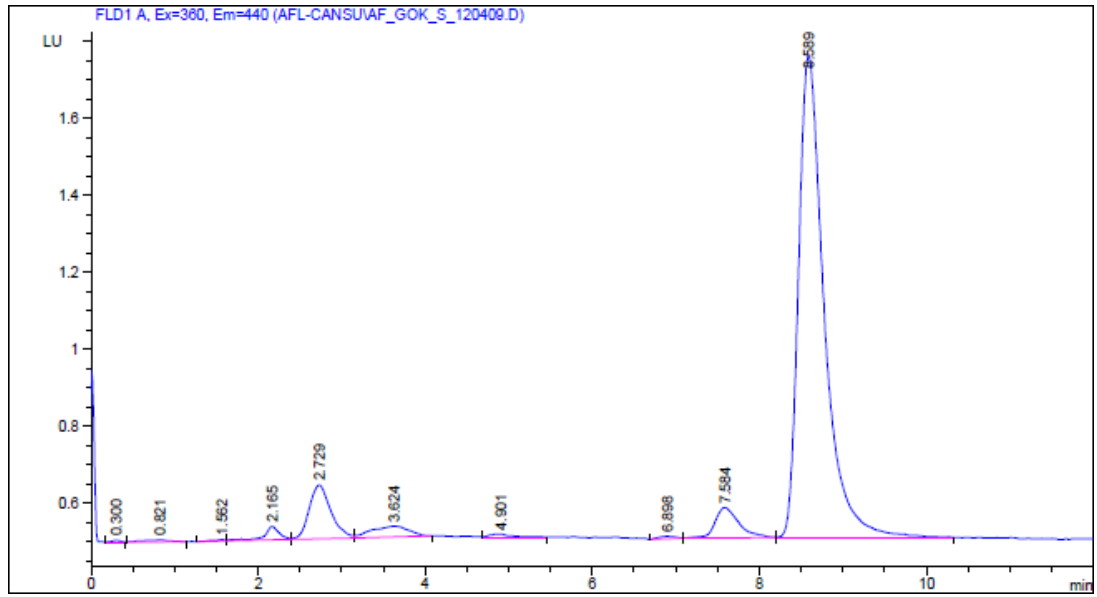
Şekil B.25 : AF_ EÖ_ OS_ 120400 nolu örneğe ait kromatogram.



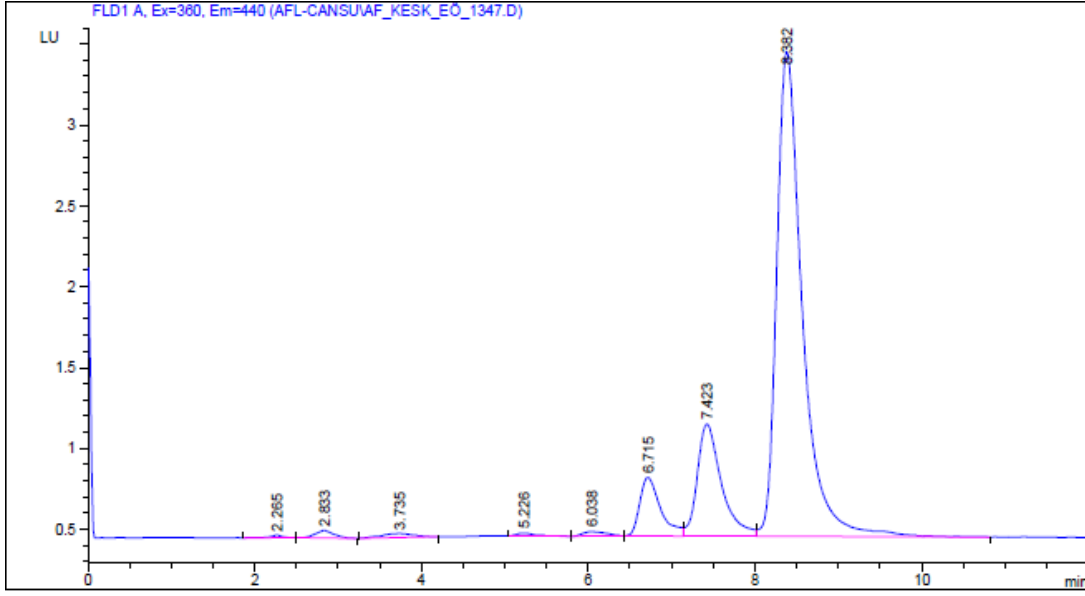
Şekil B.26 : AF_ FATİH_ 270302 nolu örneğe ait kromatogram.



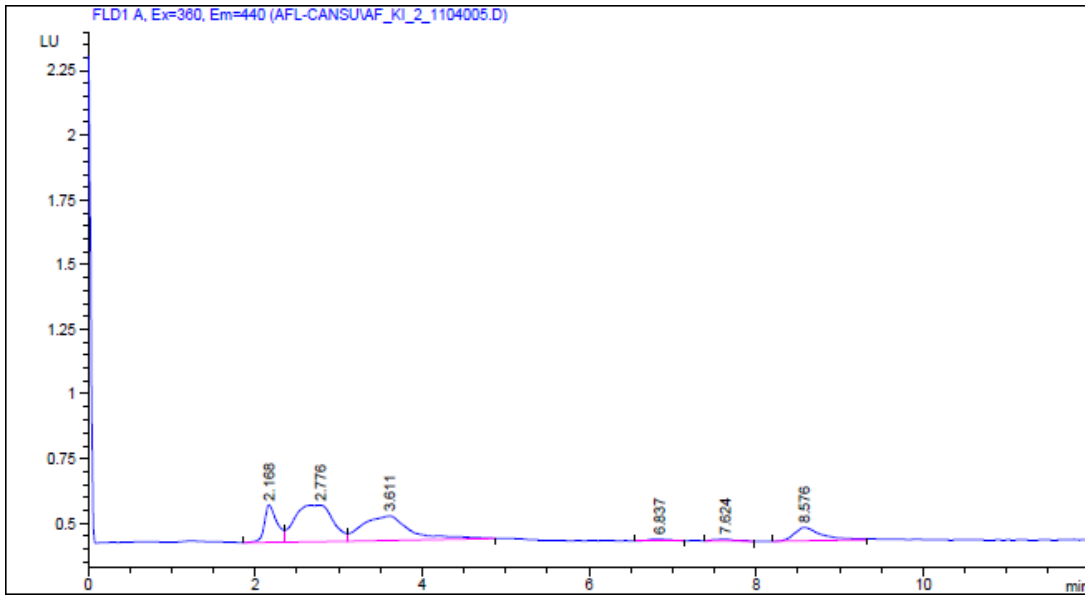
Şekil B.27 : AF_ GOK_A_120406 nolu örneğe ait kromatogram.



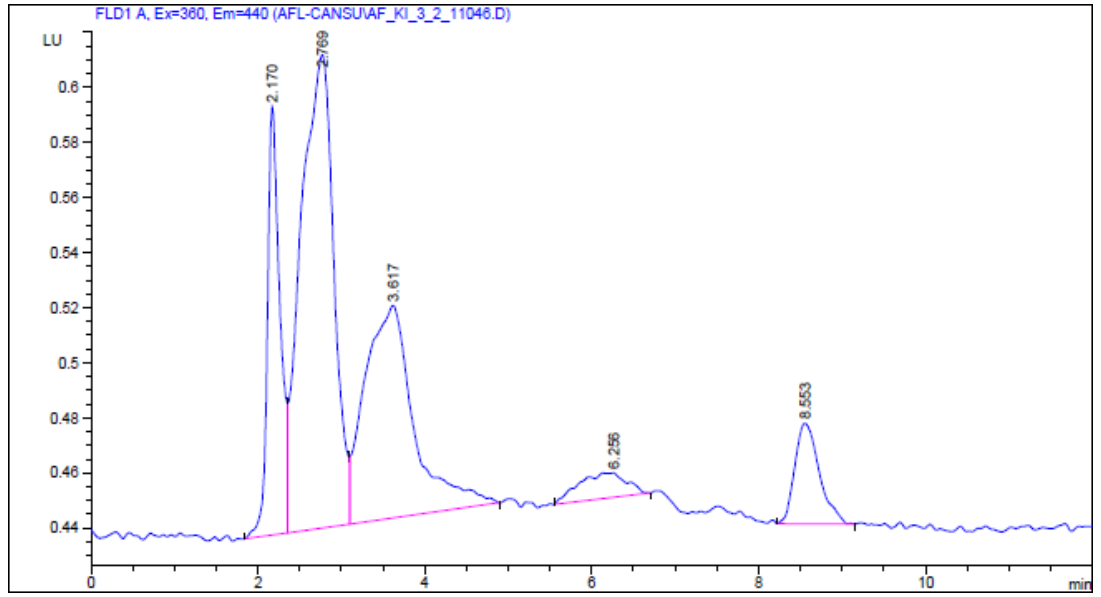
Şekil B.28 : AF_ GOK_S_120409 nolu örneğe ait kromatogram.



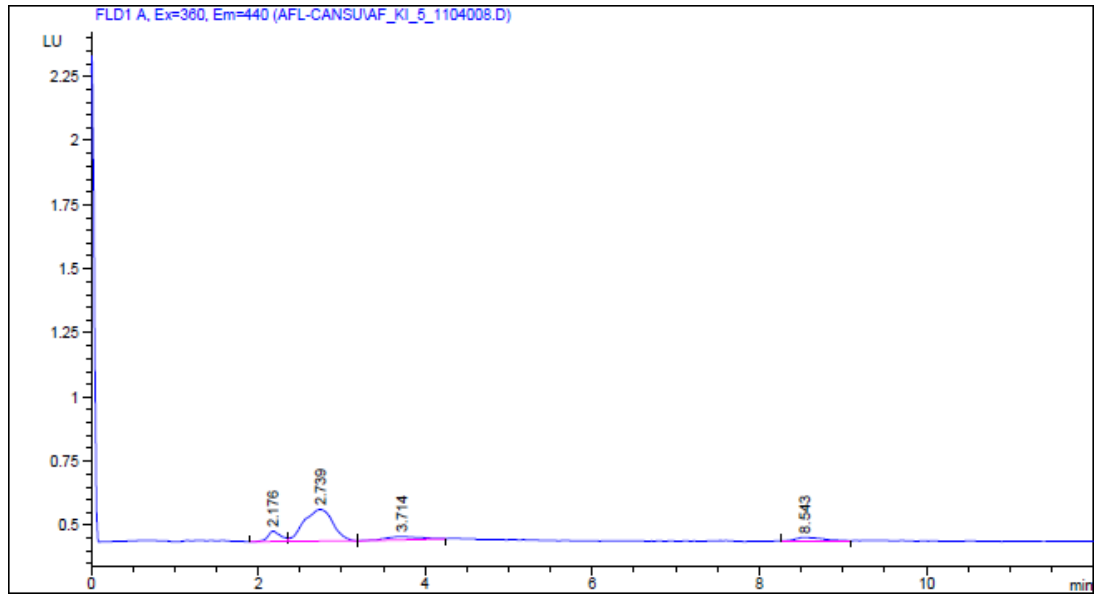
Şekil B.29 : AF_KESK_EÖ_1347 nolu örneğe ait kromatogram.



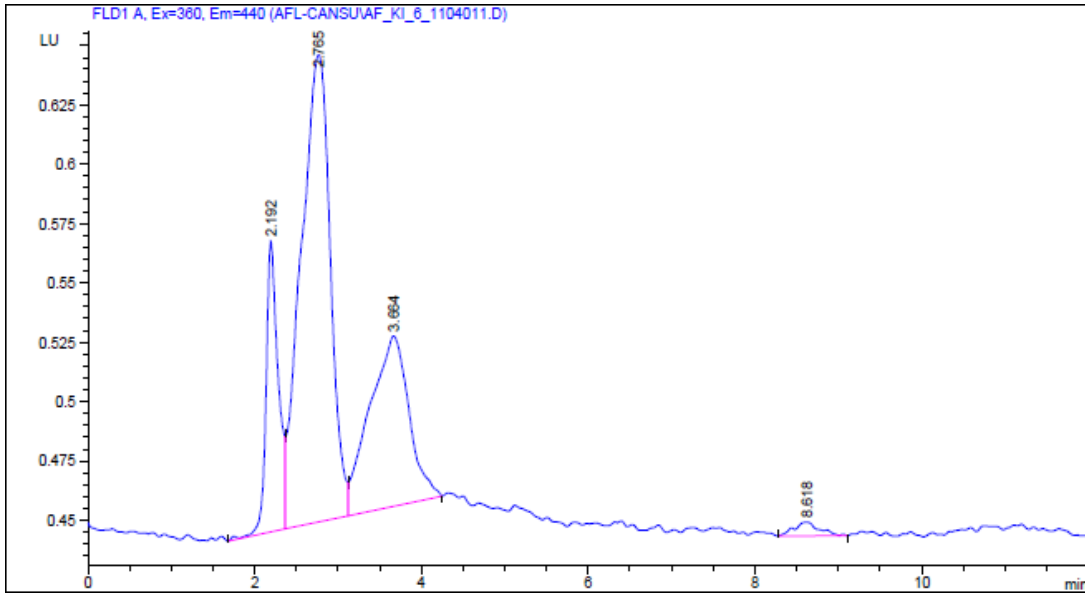
Şekil B.30 : AF_KI_2_1104005 nolu örneğe ait kromatogram.



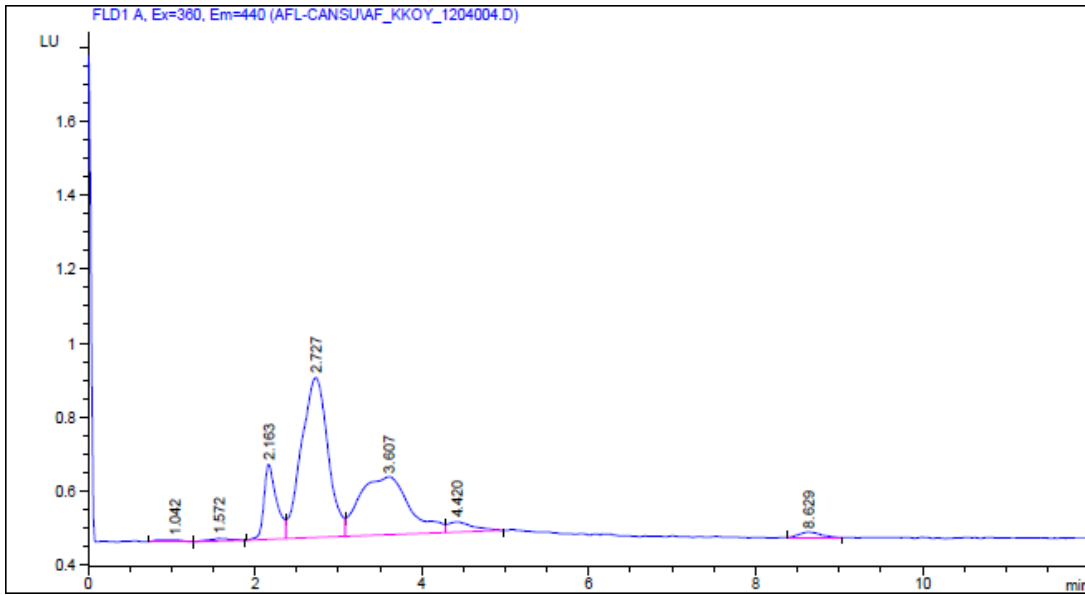
Şekil B.31 : AF_KI_3_2_11046 nolu örneğe ait kromatogram.



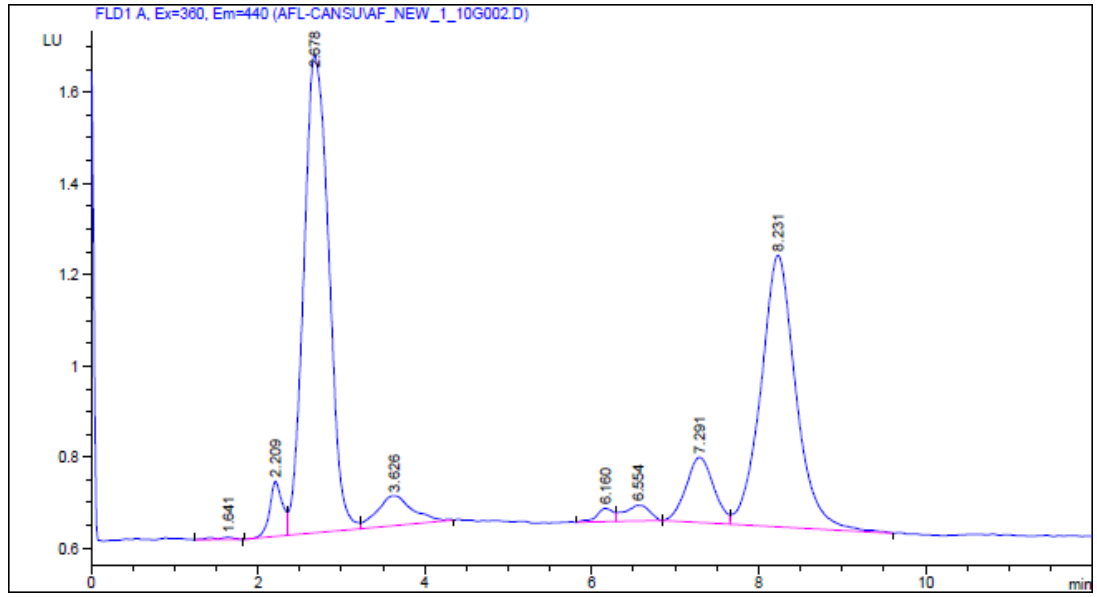
Şekil B.32 : AF_KI_5_1104008 nolu örneğe ait kromatogram.



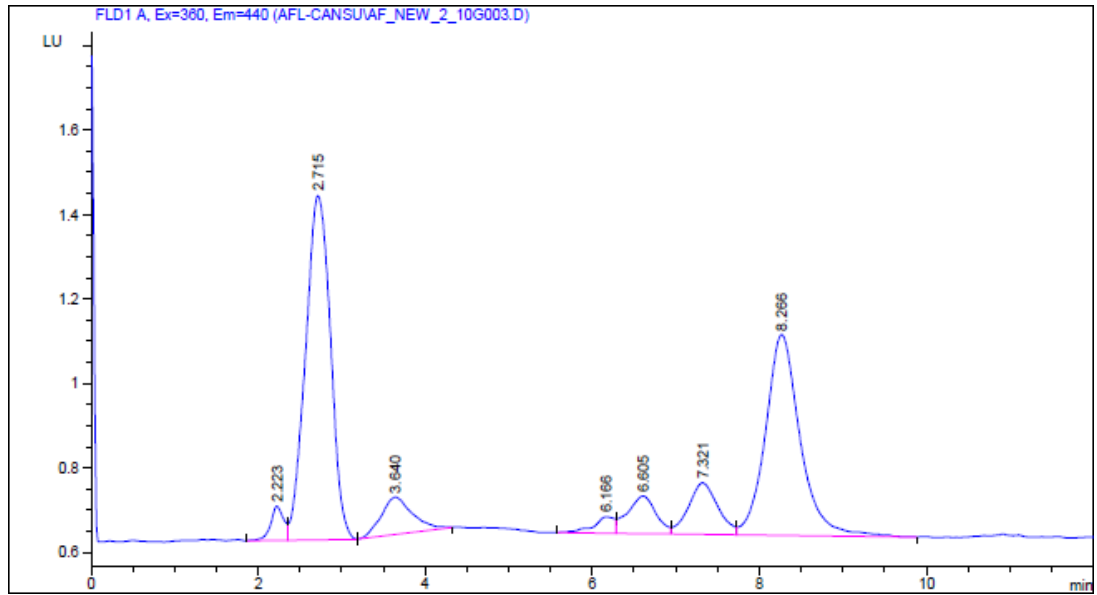
Şekil B.33 : AF_KI_6_1104011 nolu örneğe ait kromatogram.



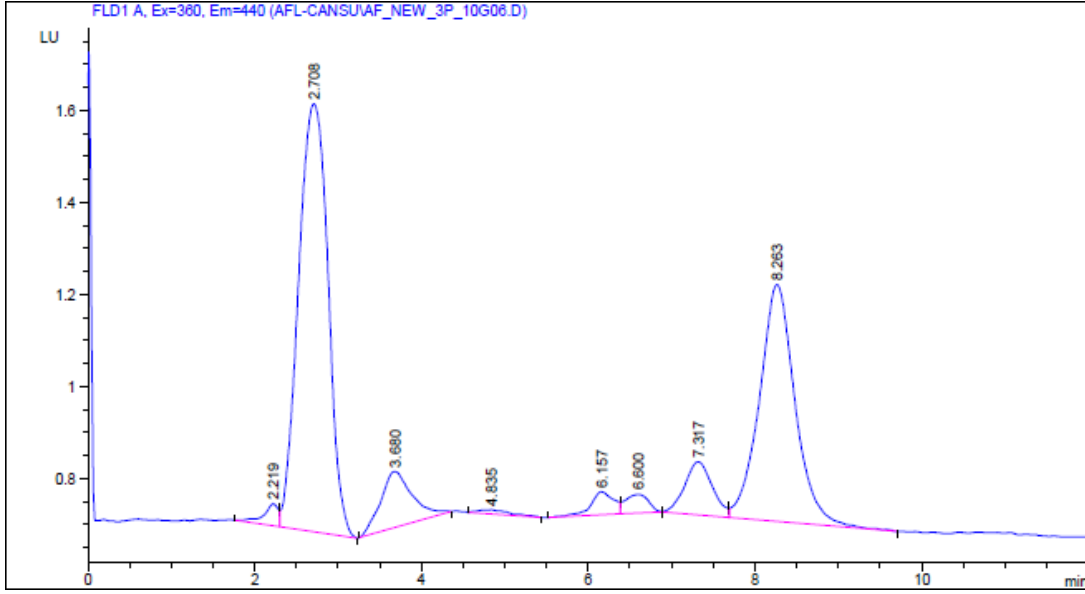
Şekil B.34 : AF_KKOY_1204004 nolu örneğe ait kromatogram.



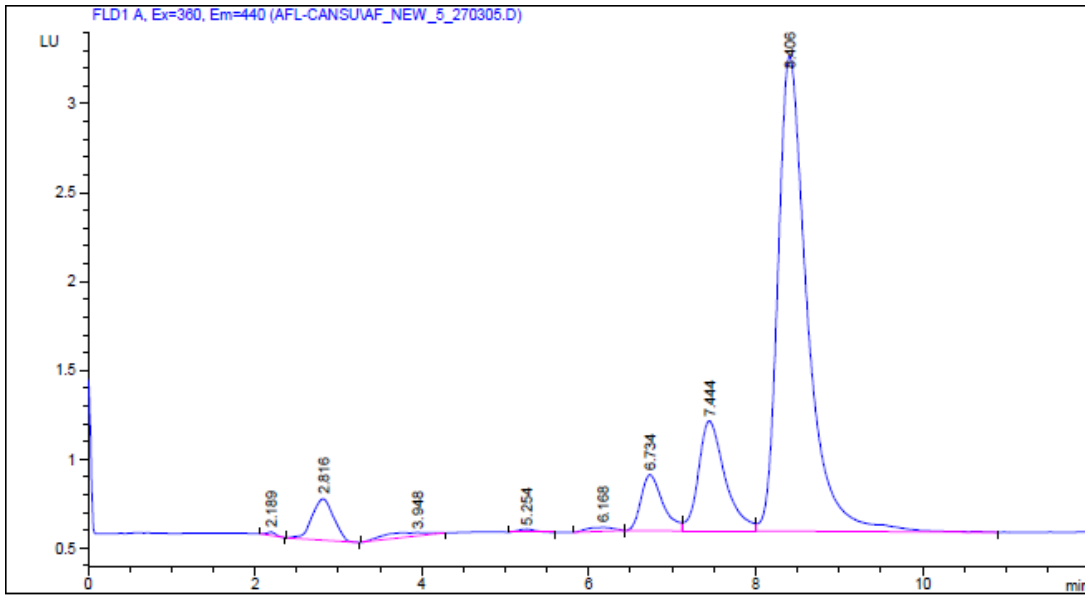
Şekil B.35 : AF_NEW_1_10G002 nolu örneğe ait kromatogram.



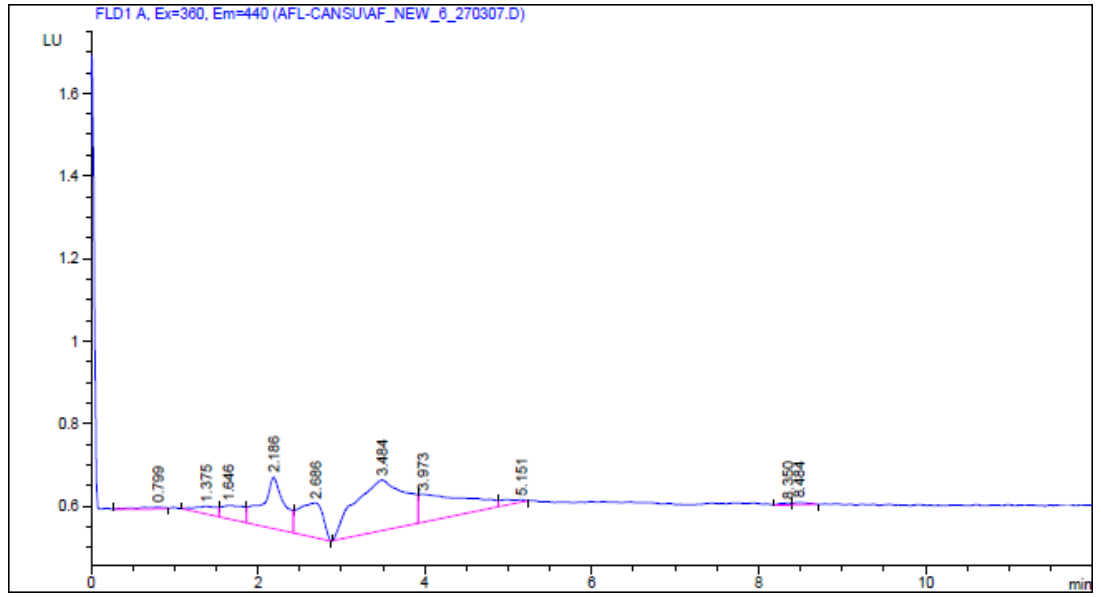
Şekil B.36 : AF_NEW_2_10G003 nolu örneğe ait kromatogram.



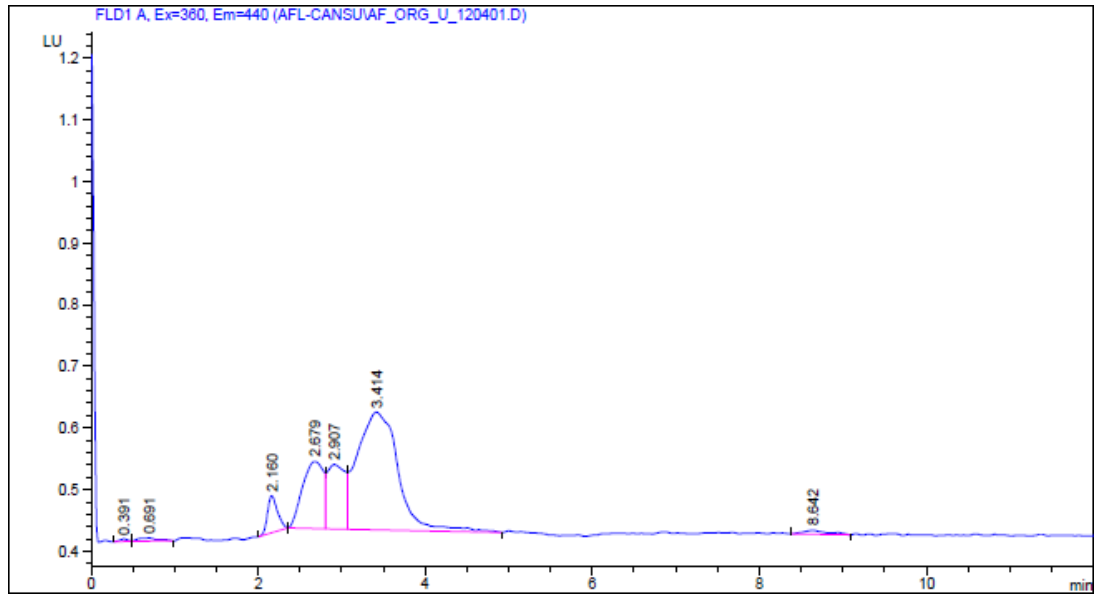
Şekil B.37 : AF_NEW_3P_10G06 nolu örneğe ait kromatogram.



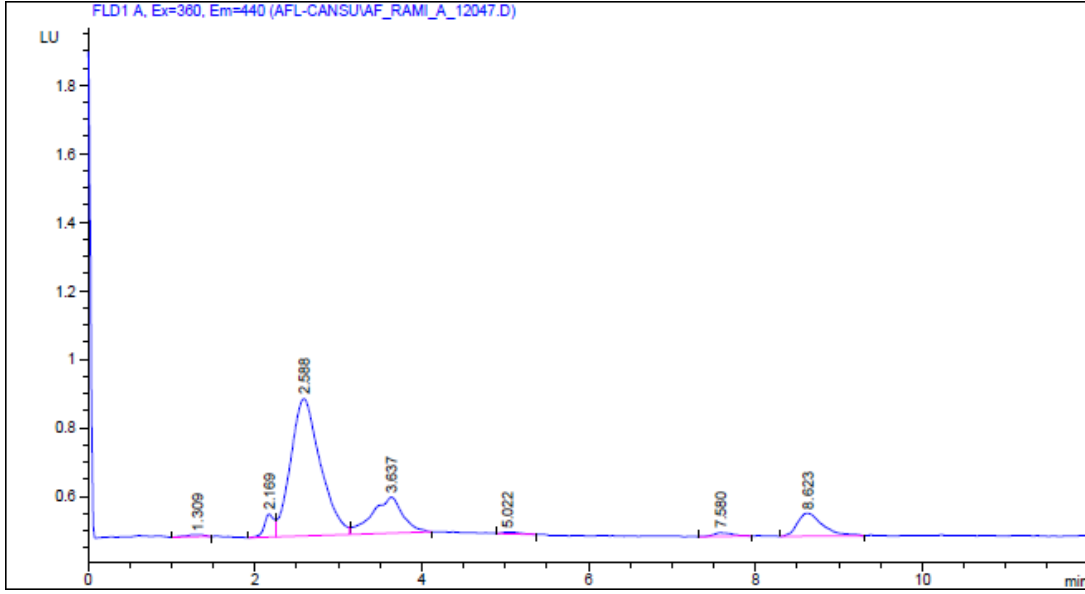
Şekil B.38 : AF_NEW_5_270305 nolu örneğe ait kromatogram.



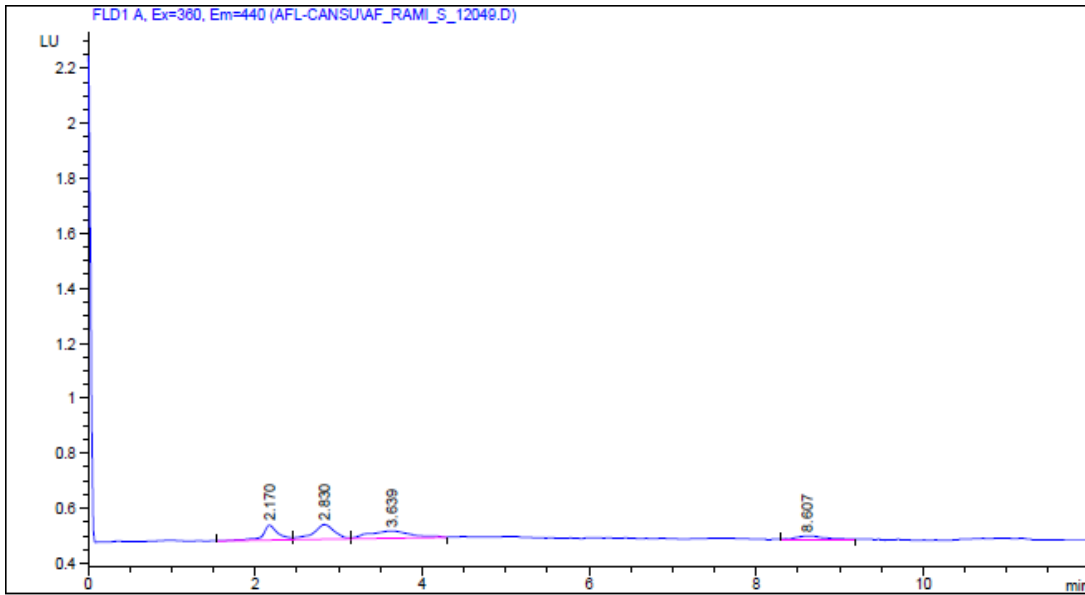
Şekil B.39 : AF_NEW_6_270307 nolu örneğe ait kromatogram.



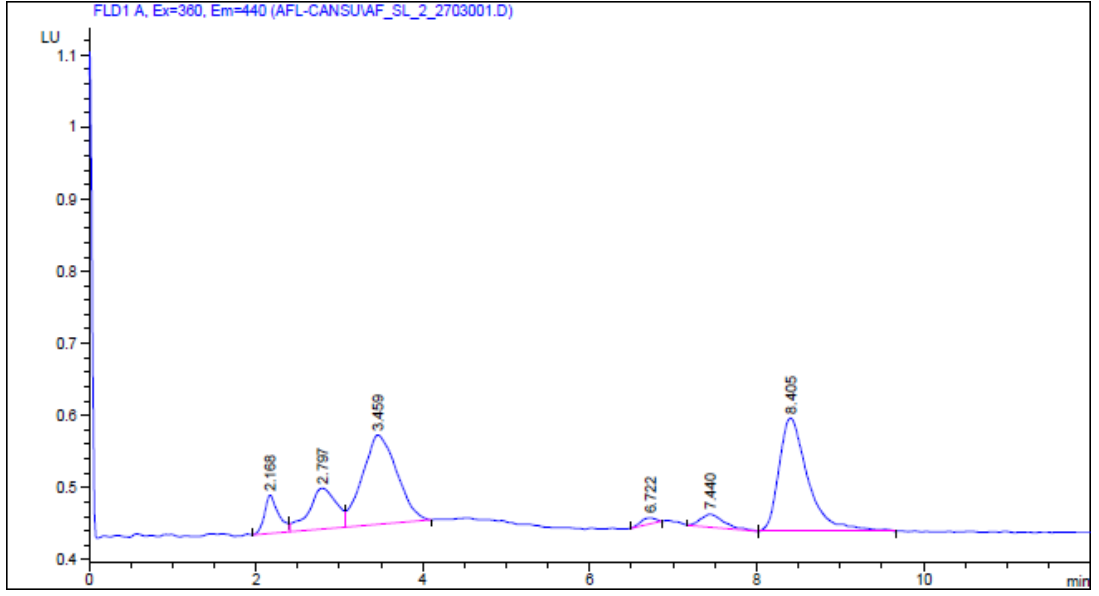
Şekil B.40 : AF_ORG_U_120401 nolu örneğe ait kromatogram.



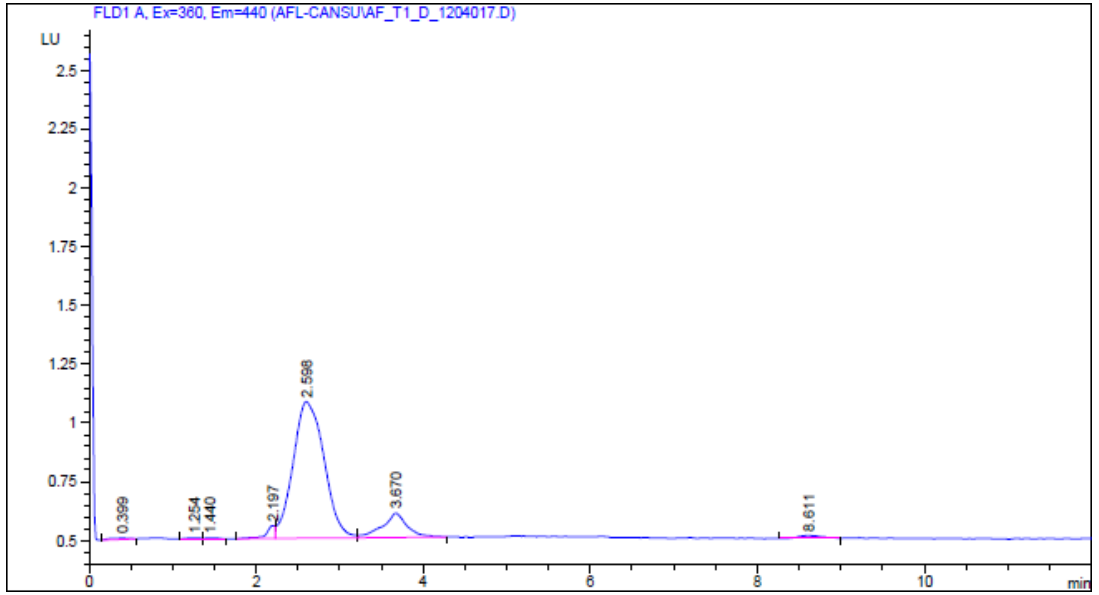
Şekil B.41 : AF_ RAMI_A_12047 nolu örneğe ait kromatogram.



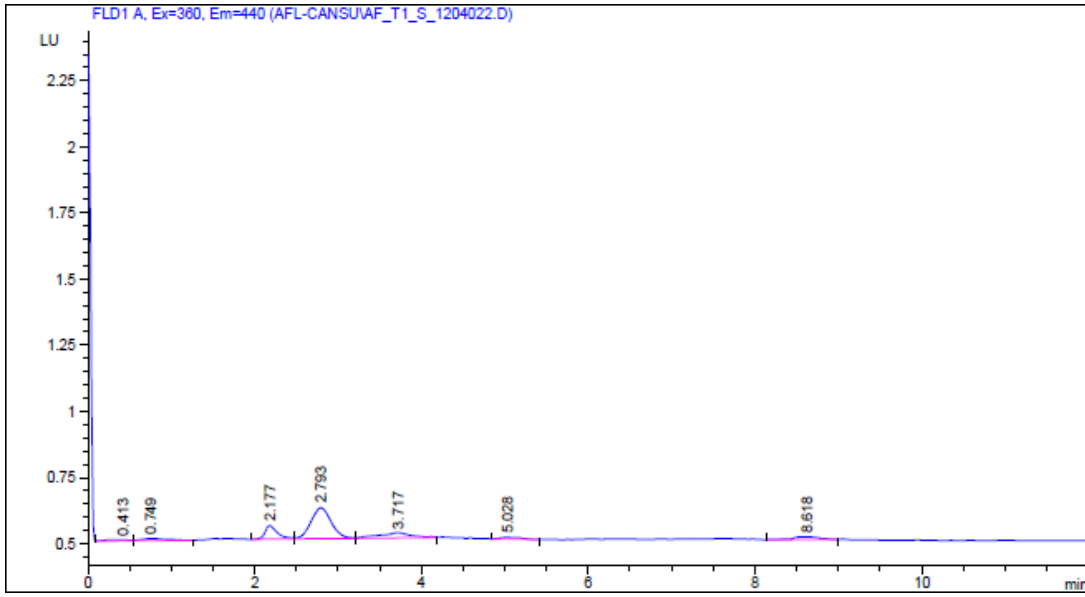
Şekil B.42 : AF_ RAMI_S_12049 nolu örneğe ait kromatogram.



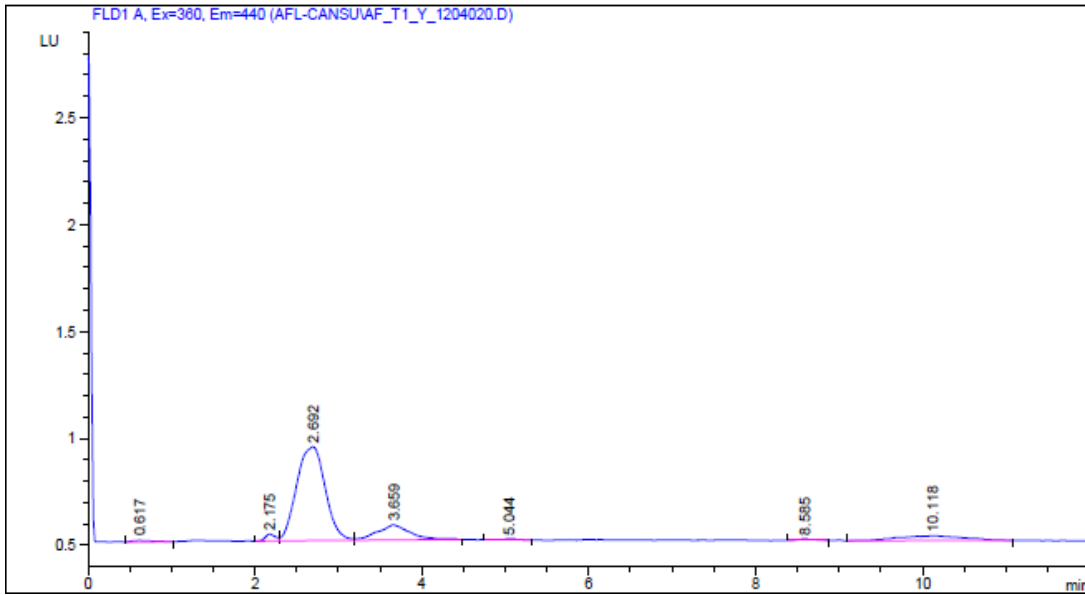
Şekil B.43 : AF_ SL_2_2703001 nolu örneğe ait kromatogram.



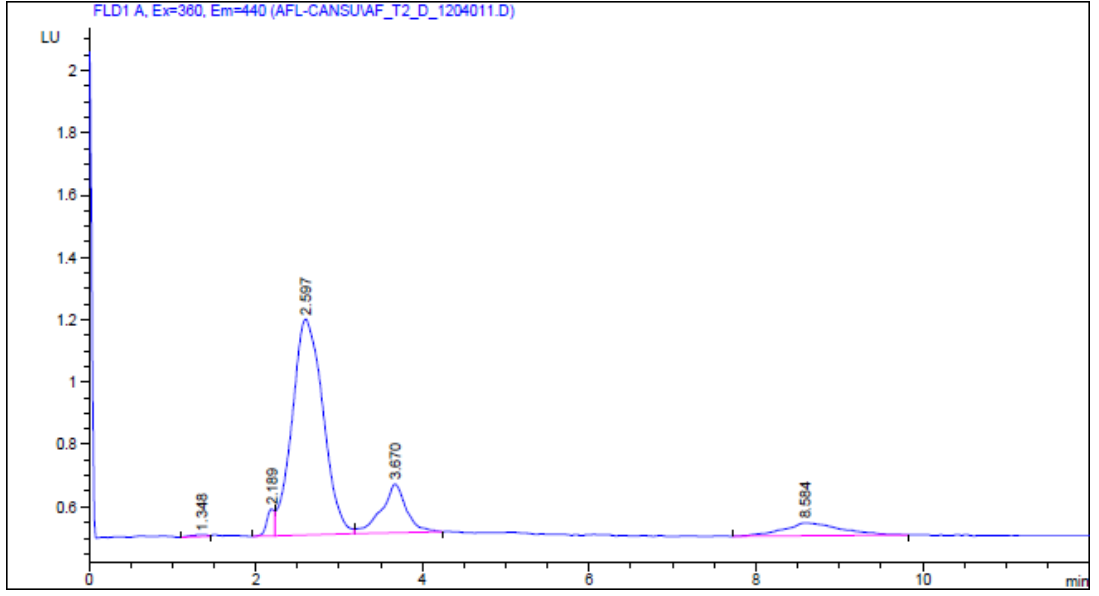
Şekil B.44 : AF_ T1_D_1204017 nolu örneğe ait kromatogram.



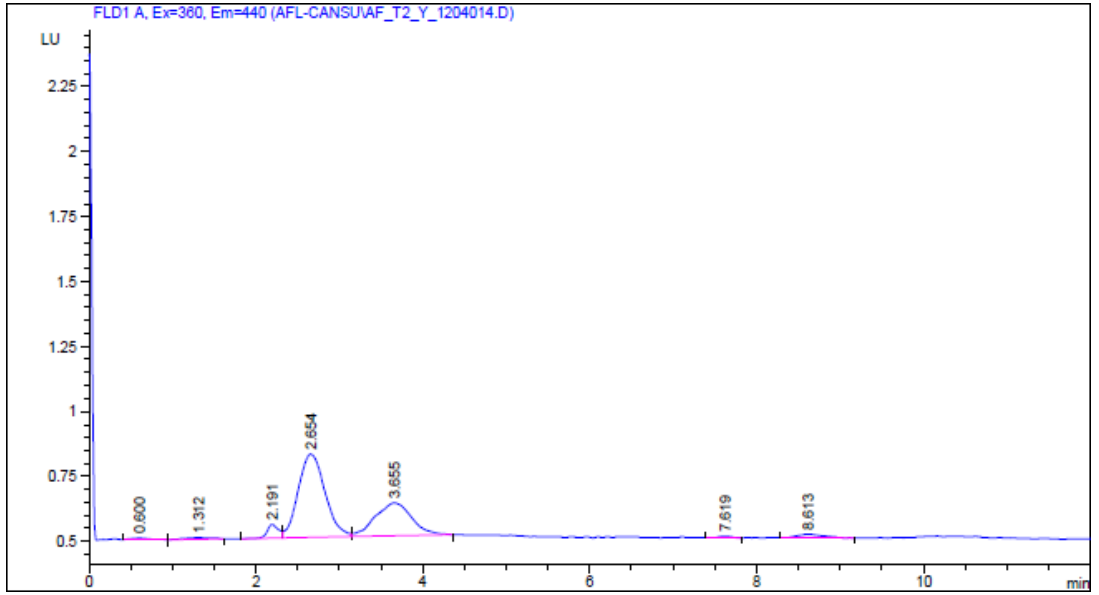
Şekil B.45 : AF_ T1_S_1204022 nolu örneğe ait kromatogram.



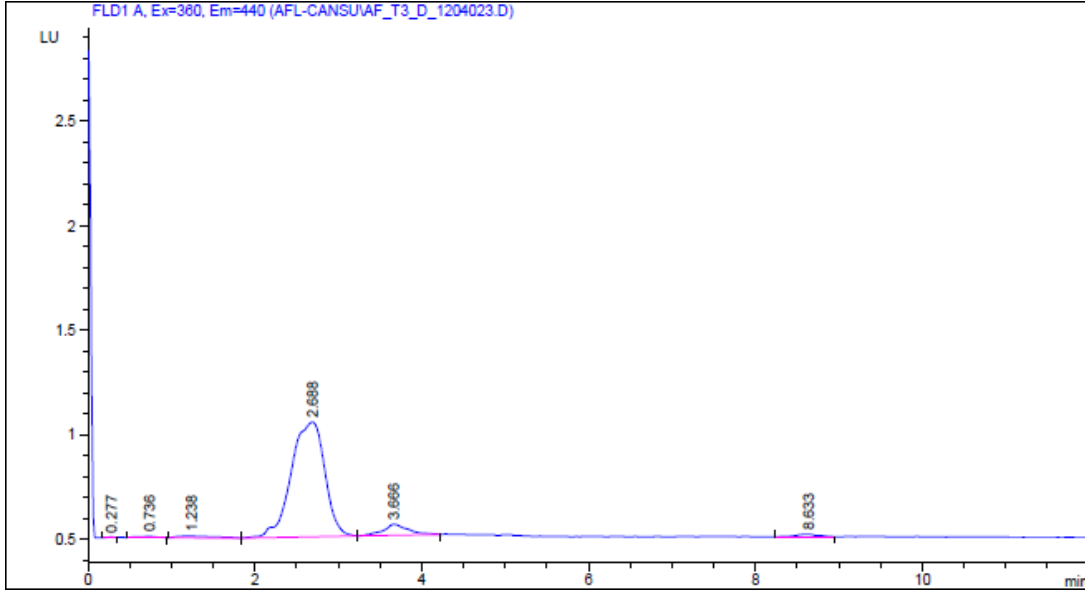
Şekil B.46 : AF_ T1_Y_1204020 nolu örneğe ait kromatogram.



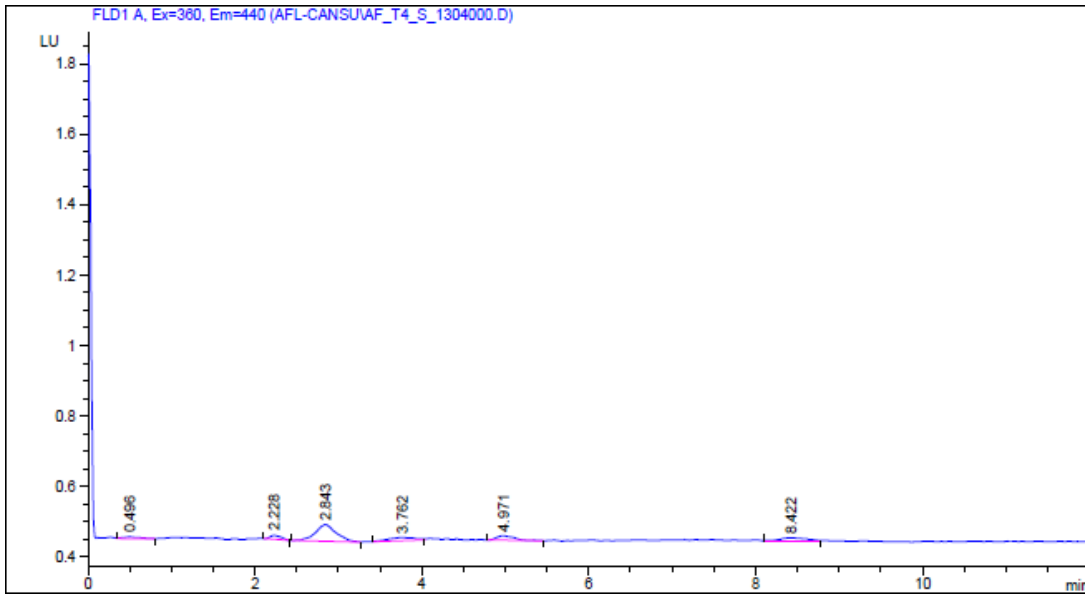
Şekil B.47 : AF_ T2_D_1204011 nolu örneğe ait kromatogram.



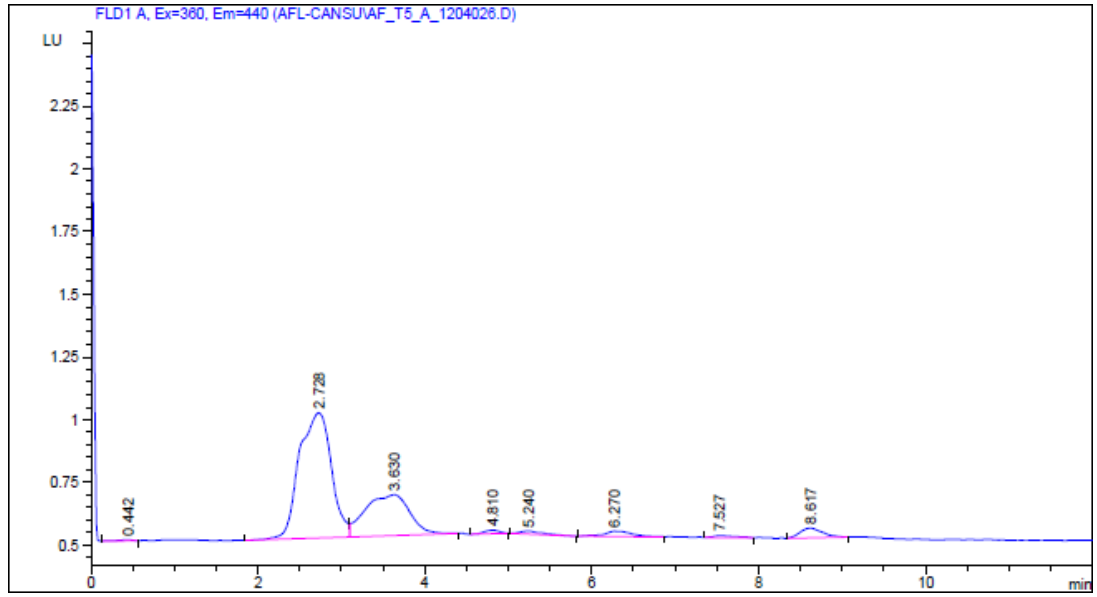
Şekil B.48 : AF_ T2_Y_1204014 nolu örneğe ait kromatogram.



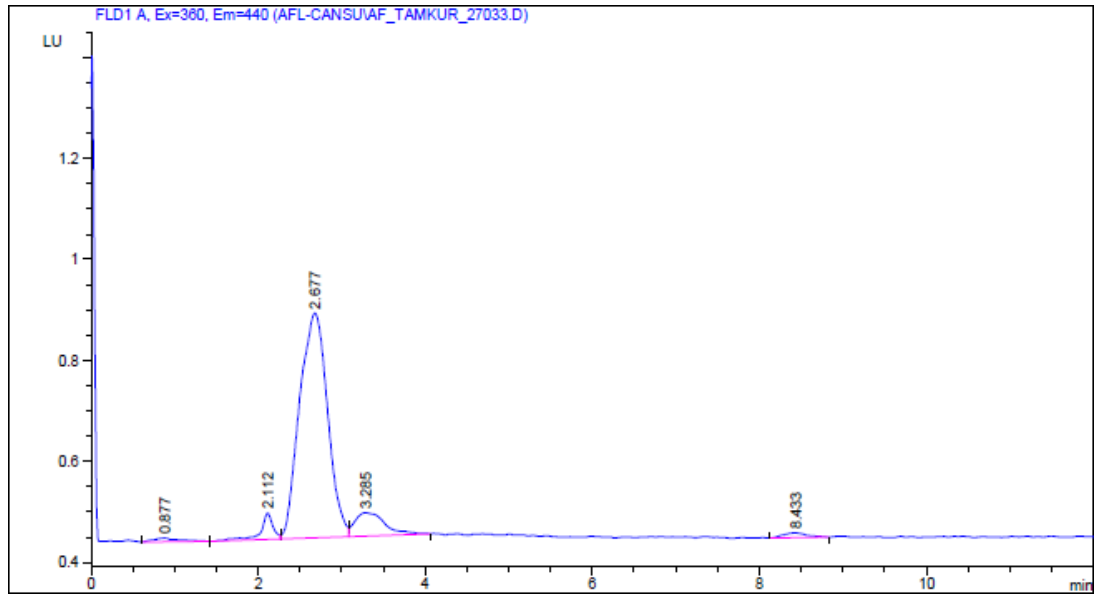
Şekil B.49 : AF_ T3_D_1204023 nolu örneğe ait kromatogram.



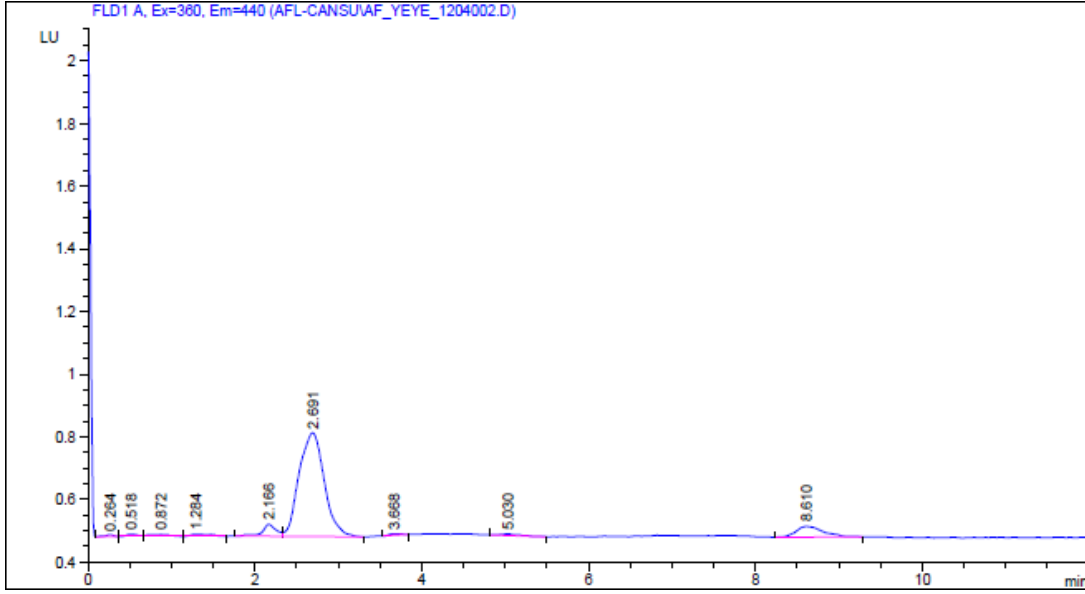
Şekil B.50 : AF_ T4_S_1304000 nolu örneğe ait kromatogram.



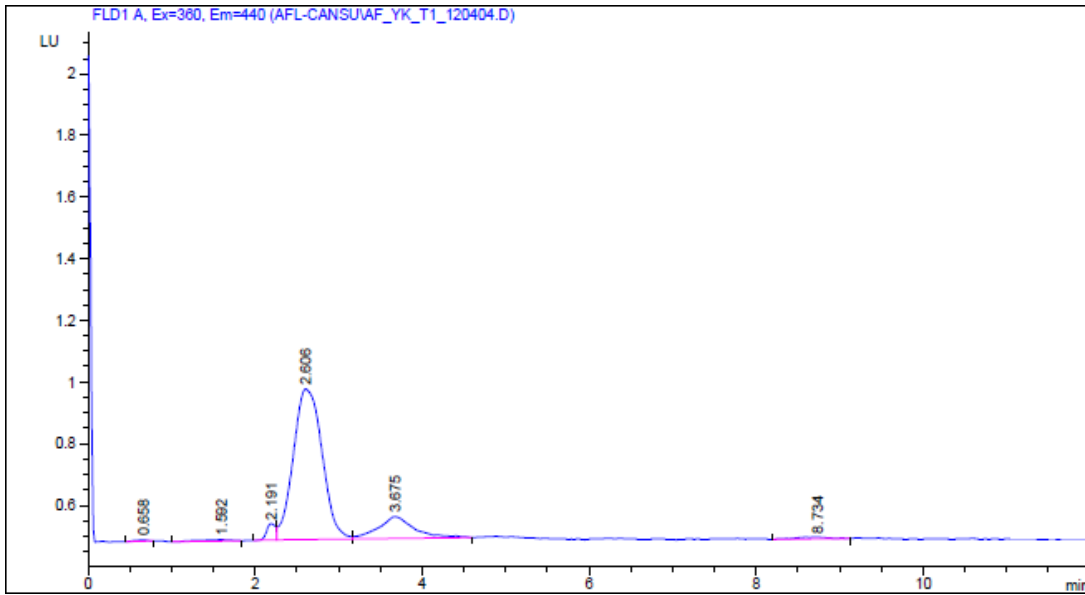
Şekil B.51 : AF_ T5_A_1204026 nolu örneğe ait kromatogram.



Şekil B.52 : AF_ TAMKUR_27033 nolu örneğe ait kromatogram.



Şekil B.53 : AF_ YEYE_1204002 nolu örneğe ait kromatogram.



Şekil B.54 : AF_ YK_T1_120404 nolu örneğe ait kromatogram.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Cansu Sedefoglu

Doğum Yeri ve Tarihi: İskenderun, 08.03.1988

Adres: Yeni Uyum Sitesi B3 Blok Daire:11 34450 Sarıyer/İstanbul

E-Posta: cansusedefoglu@hotmail.com

Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Mesleki Deneyim ve Ödüller: The Coca-Cola Company Kalite Güvence Departmanı Uzun Dönem Staj (Şubat-Kasım 2012)

Yayın ve Patent Listesi:

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- Sedefoglu C., Heperkan H., 2013 : The 5th International Scientific Meeting Mycology, Mycotoxicology And Mycoses, *International Congress –Determination Of Ochratoxin A In Turkish Pistachio Nuts*, April 17-19, 2013, Novi Sad, Serbia.