

özET

ANTEPFİSTİĞİ'NDA AFLATOKSİN SAPTANMASINDA ELİSA TESTİNİN UYGULANMASI

ÇALIŞKAN, İlker

Yüksek Lisans Tezi

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Mehmet Özaslan

Eylül, 2003

Güneydoğu Anadolu Bölgesi kendine özgü ekolojik özellikleri nedeniyle, Antepfıstığı'nın başarılı bir şekilde yetişmesine ve yayılmasına olanak sağlamıştır. Antepfıstığı'nın iç ve dış piyasada çok iyi fiyat bulması üreticiler için önemli bir gelir kaynağı olmuştur. Bu ürünün ihracatında önemli kriterlerden biri de Aflatoksin miktarıdır. Antepfıstığı Aflatoksin değerlerinin saptanması için bir çok metod kullanılmaktadır. Ancak bu metodlar donanımlı laboratuvara , teknik elemana ihtiyaç duymakta ve yüksek maliyet gerektirmektedir.

Bu çalışmada son yıllarda hızlı, ucuz ve güvenilir tanı tekniği olarak oldukça geniş uygulama alanı bulan ELİSA testinin Aflatoksin teşhisinde de kullanılabilirliği araştırılmıştır. Ayrıca elde edilen bulgular aynı örneklere ELISA testlerine paralel olarak uygulanan HPLC analizleriyle kontrol edilerek her iki teknik karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılmış olan bitkisel materyal, 38 farklı Antepfıstığı deposu ve toptan satış yerlerinden temin edilmiştir. Yapılan ELİSA testi sonucunda 16 üründe 2 ppb'nin üzerinde Aflatoksin B1'e saptanmıştır. Aflatoksin Total'de ise herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Yapılan HPLC yöntemi sonucunda ise Aflatoksin B1 ve Aflatoksin Total'de herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

Bu sonuçlar bize proteine dayalı moleküler bir tanılama testi olan ELISA testinin HPLC'den çok daha hassas ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

ELISA testi Antepfıstıklarında Aflatoksin saptanmasında ülkemizde ilk defa bu çalışmada kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antepfıstığı, Aflatoksin, ELISA, HPLC

ABSTRACT

APPLICATION OF THE ELISA TEST IN THE IDENTIFICATION OF AFLATOXIN IN PISTACHIO

ÇALIŞKAN, İlker

M Sc. İn Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

September 2003,

Pistacia vera L. was enabled successfully to grow and spread in south-eastern Anatolia due to its own ecological properties. Because of a high price of *Pistacia vera* L. in domestic and exterior markets it has become a good source of income for the producers. In its exportation the most faced problem is ‘aflatoxin’. In this respect the calculation of the values of aflatoxin is of special importance. In this study investigations were done for the identification of aflatoxin content by using ELISA test which is used as a rapid, cheap and safe diagnosis technique in last decades. Thus, using ELISA test that depends upon protein content and does not need detailed laboratory conditions was rapid and safely determined the aflatoxin values.. Vegetable materials used in this study were taken from *Pistacia vera* L. depots and wholesale trade stores with 38 different sources *Pistacia vera* L. samples. ELISA test and HPLC method were used to identify the aflatoxin content in *Pistacia vera* L. It was encountered aflatoxin B1 over 2 ppb in 16 samples at the end of the ELISA test. But there were no evidence about the aflatoxin total. In HPLC method there were not encountered any of the aflatoxin B1 and aflatoxin total. These results show that the ELISA test to be more reliable than HPLC method. In this study ELISA test was used for the first time in the determination of aflatoxin content in *Pistacia vera* L.

Key Words : *Pistacia vera* L., aflatoxin, ELISA

1.GİRİŞ

Pistacia cinsine bağlı Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Anacardiaceae familyası içinde yer almaktadır (21). Antepfıstığı'nın anavatanı ilk olarak Mezopotamya ve Suriye olarak düşünölmüş, ancak bu cinsin, Orta Asya'da da yabancı bitkiler halinde yetiştiği Popov, Morozov ve Tsherniakovskaya gibi araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (5). Zohary'e (5) göre, *Pistacia* cinsine giren türlerin yayılış alanı İran ve Afganistan'dan başlamakta ve Türkmenistan, Özbekistan'a kadar devam etmektedir. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin iki anavatanı vardır. Bunlardan birisi Ülkemizin de içinde bulunduğu Anadolu, İran, Kafkasya ve Türkmenistan'ı içine alan Yakın Doğu Gen Merkezi, diğeri ise Orta Asya Gen Merkezidir (20). Ülkümen ve Özbek'e göre Antepfıstığı'nın anavatanı ve kültür merkezi Anadolu, İran ve Afganistan'dır (26). Antepfıstığı, miladi I.yy'da Roma'ya, oradan İspanya'ya daha sonra da Fransa'ya yayılmıştır. Antepfıstığı'nın Amerika'ya geçişi ise 1853-54 yıllarına rastlamaktadır (18).

Ayfer'e göre ise Güney Doğu Anadolu Bölgesi Antepfıstığı'nın ilk kez kültüre alındığı yerdir ve bu meyve türünün başarılı bir şekilde yetişmesine ve yayılmasına olanak sağlamıştır (5).

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) gerek taze gerekse kurutulmuş olarak tüketilen, besin değeri yüksek ve ihracatımız içerisinde önemli yeri olan bir bitki türüdür ve *Pistacia* cinsine bağlı 11 tür meyve ağacı ya da süs bitkisi olarak ülkemizde yetiştirilmektedir (21). Ülkemizde Antepfıstığı kültür ve yabancı türlerinin bulunduğu bölgeler Tablo 1'de verilmiştir (8).

Tablo 1. Ülkemizdeki Antepfıstığı kültür ve yabancı türlerinin bulunduğu bölgeler (8)

GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ	AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU EGE BÖLGESİ	GEÇİT BÖLGELER (KUZEYAKDENİZ,ORTA ANADOLU,İÇ EGE)
<i>Pistacia vera</i> L.(Antepfıstığı)	<i>Pistacia vera</i> L (az miktarda)	<i>Pistacia vera</i> L (Az miktarda)
<i>Pistacia terebinthus</i> (Melengiç)	<i>Pistacia terebinthus</i> L.	<i>Pistacia terebinthus</i> L.
<i>Pistacia khinjuk</i> Stocks(Buttum)	-	<i>Pistacia khinjuk</i> Stocks
-	<i>Pistacia mutica</i>	<i>Pistacia mutica</i>
-	<i>Pistacia atlantica</i> Desf(ATlantik Sakızı)	-
-	<i>Pistacia lentiscus</i> (Mezdeki Sakızı)	-
<i>Pistacia palaestina</i> Boiss(Filistin Sakızı)	<i>Pistacia palaestina</i> Boiss(Filistin Sakızı)	-
<i>Pistacia</i> Hibritleri	-	-

Pistacia vera L. Sistematik açıdan;

Alem : Plantae

Bölüm : Phanerogamae

Sınıf : Magnoliopsida

Takım : Sapindales

Familya : Anacardiaceae

Cins : Pistacia

olarak sınıflandırılmaktadır.

Antepfıstığı lezzeti ve besleyici özelliğiyle meyveler içerisinde çok önemli bir yere sahiptir. Özellikle son yıllarda gelişmiş ülkelerde protein eksikliğinin bitkisel üretimle karşılandığı göz önüne alınırsa Antepfıstığı'nın dünya piyasalarındaki yerinin çok daha önemli olduğu görülür. Antepfıstığı, proteinin yanı sıra vitamin ve diğer mineral maddeler bakımından da zengindir. 100 gram Antepfıstığı bileşiminin, bazı sert kabuklu meyve türleri ve sığır eti ile besin değerinin karşılaştırılması Tablo 2'de verilmiştir (28).

Tablo 2. Antepfıstığı'nın bazı sert kabuklu meyve türleri ve sığır eti ile besin değerleri yönünden karşılaştırılması (100 gr. kuru meyvede)

	Antepfıstığı	Badem	Fındık	Ceviz	Sığır eti
Protein(%)	23,5	19,0	12,6	14,8	13,6
Yağ(%)	56,4	54,0	62,4	64,0	41,0
Karbonhidrat(%)	19,0	20,0	16,7	16,8	-
Ca (mg)	131	234	209	99	8
P (mg)	500	504	337	380	124
Fe (mg)	7,3	4,7	3,4	3,1	2,0
Na (mg)	-	4,0	2,0	2,0	65,0
K (mg)	972	773	704	450	355
Vitamin A(mg)	230	0	-	30	80
Vitamin B1(mg)	0,67	0,24	0,46	0,33	0,06
Vitamin B2(mg)	-	0,92	-	0,13	0,12
Vitamin B6(mg)	1,4	3,5	0,9	0,90	3,3
Vitamin C(mg)	30	-	-	2	-
Vitamin E(mg)	5,2	-	-	-	-
Kalori	594	598	634	651	428
Nem (%)	5,3	4,7	5,8	3,5	44,8

Antepfıstığı içeriğinin %56.4'ünü yağ oluşturmaktadır ve bu yağın %90'ı doymamış yağ asitlerinden meydana gelmektedir. Doymamış yağ asitlerinin insan vücudunda doyumluk hissi oluşturması aşırı beslenmeyi engellemesi, fazla kilo sorunlarından kurtarması, kalp ve damar hastalıklarına yakalanma riskini azaltması yapılan tıbbi çalışmalarda tespit edilmiştir (9). Antepfıstığı bünyesinde bulunan fitosterolün, göğüs ve prostat kanserine yakalanma riskini azalttığı, kanser hücre çoğalmasını engellediği, kötü kolesterolün oksitlenmesini engelleyerek kalp hastalıklarına yakalanma riskini azalttığı, hücre zarını koruduğu bildirilmiştir (2, 3).

Dünyada Antepfıstığı üretimi, özellikle A.B.D.'den kaynaklanan artışlarla son 30 yıl içinde büyük gelişmeler göstermiştir. Dünya Antepfıstığı üretimi Tablo 3'de verilmiştir (16).

Tablo 3. Dünya Antepfıstığı üretimi (Ton)

ÜLKELER	YILLAR				
	1997	1998	1999	2000	2001
Dünya(Top)	341,788	510,341	299,411	552,264	321,431
Çin	30,000	26,000	29,000	22,000	26,000
Afganistan	2,600	4,000	2,800		
Kıbrıs	32	30	18	18	20
Yunanistan	9,137	8,066	6,000	6,500	6,200
İran	111,916	313,957	131,166	303,957	120,000
İtalya	5,000	512	2,649	100	1,500
Madagaskar	270	260	270	160	160
Meksika	52	59	36	31	60
Fas	60	50	50	50	30
Pakistan	238	238	194	200	200
Suriye	29,428	35,684	30,133	39,923	37,436
Tunus	1,150	1,200	1,300	1,300	1,300
Türkiye	70,000	35,000	40,000	65,000	35,000
ABD	81,900	85,280	55,790	11,220	90,720

Ülkemizde Antepfıstığı üretimi Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yoğunlaşmış, son 10 yıl içerisinde özellikle Ege Bölgesinde de yaygınlaşmışsa da geniş bir üretim alanı bulamamıştır. Antepfıstığı üretimi yönünden illeri sıraladığımızda (Tablo 4), Şanlıurfa'nın birinci sırada yer aldığı görülmektedir. Bunu Gaziantep, Adıyaman, Kahramanmaraş ve Siirt takip etmektedir (DİE, 1996).

Tablo 4. Türkiye’de Antepfıstığı ağacı sayısı ve üretimi (Ton)

Şehirler	Verimli	Verimsiz	Toplam	Ton Olarak
Şanlıurfa	8,125,210	6,720,450	14,845,660	30,399
Gaziantep	9,162,500	5,676,300	14,838,800	13,844
Adıyaman	3,305,000	2,185,300	5,490,300	4,822
Kahramanmaraş	799,000	616,000	1,415,000	3,680
Siirt	558,700	581,400	1,140,100	1,655
Çanakkale	280,040	59,670	339,710	735
Batman	56,300	118,070	174,370	663
Mardin	156,150	442,846	598,996	564
Manisa	409,211	387,300	796,511	551
İzmir	160,290	152,030	312,320	516
Diyarbakır	83,575	112,325	195,900	464
Aydın	144,180	219,609	363,789	448
Diğer	1,239,844	2,328,700	3,568,544	1,719
TOPLAM	24,480,000	19,600,000	44,080,000	60,060

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde üretilen fıstıkların ihracatı Gaziantep ilinden gerçekleştirilmektedir. Güneydoğu Anadolu İhracatçı Birlikleri tarafından bildirilen Antepfıstığı ihracat değerleri Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Antepfıstığı ihracat değerleri

YILLAR	MİKTAR(KG)	DEĞER(\$)
1993	626,000	2,369,000
1994	1,364,000	4,513,000
1995	2,273,000	8,309,000
1996	548,000	2,434,000
1997	2,760,000	11,213,000
1998	625,000	2,944,000
1999	531,000	2,668,000
2000	380,000	1,808,000
2001	3,601,000	12,469,000
2002	1,861,000	7,949,000

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ülke ekonomisine önemli bir gelir sağlamaktadır ve Gaziantep ve çevre illerin temel geçim kaynaklarının başında yer almaktadır.

Son yıllarda Antepfıstığı ihracatında önemli düşüşler yaşanmaktadır (Tablo 5). Bu düşüşlerin en önemli nedenlerinden birisi de *Aspergillus* cinsi mantarların metabolit ürünü olan Aflatoksinlerdir. İlk olarak *Aspergillus flavus* türü mantarda tespit edilen Aflatoksin insanlarda karaciğer kanserine neden olmaktadır (4). Kurutma tekniklerindeki yanlışlıklar, depolama koşullarının elverişsiz olması gibi faktörlerden dolayı oluşan Aflatoksinler Antepfıstığı verimini ve ihracatını önemli ölçüde düşürmektedir.

Antepfıstığı'nda olası Aflatoksinlerin analizinde ELİSA yönteminin kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla ele alınan bu çalışmada Ülkemizde ilk kez ELISA testi Antepfıstığı'nda Aflatoksin analizi için kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında ayrıca ELİSA testi ile elde edilen sonuçların HPLC yöntemi ile kontrolü yapılmış ve iki yöntemin sonuçları karşılaştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Antepfıstığı'nda olası Aflatoksin saptanmasında ELİSA testinin uygulanması Ülkemizde ilk kez bu çalışmayla yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalara baktığımızda Antepfıstığı'nda olası Aflatoksin tayininde daha çok HPLC analiz yönteminin kullanıldığı görülmüştür. Yine Ülkemizde kırmızı biber, fındık, incir ve kuş yemlerinde de Aflatoksinler ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda da değişik yöntemler kullanılmıştır.

Bu çalışmalardan birinde Giresun Bölgesi'nden alınmış ve özel olarak seçilmiş zedelenmemiş kabuksuz Tombul çeşidi fındık, Aflatoksin oluşumu üzerine farklı depolama şartlarının etkisini incelemek amacıyla farklı sıcaklık ve farklı nispi rutubetlerde aşılı (*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999) ve aşısız (kontrol) olarak 30 gün süreyle depolanmış ve belirli aralıklarla (10, 20°, 30° g,n) Aflatoksin (B1,B2,G1,G2) analizi yapılmıştır. Aflatoksin analizinde ince tabaka kromatografisi (ıTK) yöntemi kullanılmıştır. Araştırmada, başlangıçta numunelerin hiçbirisinde Aflatoksine rastlanmamıştır. Kontrol grubu olarak depolanan örneklerde 30 gün boyunca Aflatoksin tespit edilememiştir. Buna karşın, aşılı numunelerde, Aflatoksin miktarında zamanla artma ve azalmalar gözlenmiştir. Fındık örneklerindeki toplam Aflatoksin (B+G) miktarının 0 (g/kg) ile 13092 (g/kg) arasında değiştiği tespit edilmiştir. 30 günlük depolama sonucunda toplam Aflatoksin (B+G) miktarı, 20°C sıcaklıkta, % 85 ve % 95 nispi rutubette sırasıyla; 325 (g/kg)ve 13092 (g/kg) olarak bulunmuştur. 30°C sıcaklıkta ise % 85 ve % 95 nispi rutubette sırasıyla; 6246 (g/kg) ve 12980 (g/kg) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, küf kontaminasyonu yanında depolama sıcaklığı ve nispi nem değerlerindeki değişimin, fındıkta Aflatoksin oluşumunu önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Antepfıstığı'nda da depolama sıcaklığı ve depolardaki nem değerlerindeki değişme Aflatoksin oluşumunu teşvik etmektedir.

Yine Sütçü İmam Üniversitesinde Türkiye’de mevcut imalathanelerin çiftçiden satın almış oldukları biberler üzerinde yapılan testler sonucunda minimum 8 ppb Aflatoksin çıkmıştır. Çiftçiden alınan ürünlerin imalatı ve diğer illerde bulunan tüccarların depo şartlarında beklemesi sonucu tüketiciye ortalama 13 ppb miktarda aflatoksin ihtiva eden ürünler satılmaktadır. Bu olumsuz durumun önüne geçebilmek amacıyla T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının ilgili birimleri Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi ve Kahramanmaraş Kırmızı Biberçiler Derneği çeşitli araştırmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar 5 yıldan bu yana devam etmektedir. Bu çalışmalardan belirli neticeler elde edilmiş, bu konuda oldukça ciddi bir bilgi birikimi sağlanmıştır.(41).

1993'te Almanya'ya Kahramanmaraş'tan gönderilen 500 ton kırmızıbiberin, yapılan bir analiz sonucu Aflatoksin içerdiği anlaşıncı, biberler imha edilmiştir. Bununla da kalmayarak, biberin imha masrafları da firmaya ödetilmiştir. Bu tarihten günümüze yaklaşık 9 yıl geçmiş olmasına karşın, Türkiye kırmızıbiberini dışsatıma sokmayı başaramamıştır. Oysa Türkiye, kırmızıbiber üretiminde Çin ve Meksika'nın ardından dünyada üçüncü sırayı alırken, dışsatımı Aflatoksin zehri sayesinde sıfırlanmıştır. Antepfıstığı'nın ihracatında da Aflatoksin kaynaklı ciddi sorunlar yaşanmaktadır.

Yine Uludağ Üniversitesinde yapılan bir çalışmada Bursa'daki pet ve kuş dükkanları, süpermarketler ve Bursa Hayvanat Bahçesi'nden, 2000 yılı Aralık ayında toplanan 22 kuş yeminde Total Aflatoksin düzeyleri ELİSA yöntemine göre belirlenmiştir. Total Aflatoksin miktarı 0.0-9.2 µg/kg arasında bulunmuştur. Kuş yemlerinde Total Aflatoksinin rastlantı oranı %72.72 olarak hesaplanmış ve sonuç olarak yem numunelerindeki Total Aflatoksinin kuşların sağlığı açısından bir risk oluşturamayacağı kanısına varılmıştır (25).

Uludağ Üniversitesinde yapılan diğer bir çalışmada Bursa'daki süpermarket ve sokak sütçülerinden, 2000 yılı Ağustos ayında toplanan 57 peynir ve 10 süt numunesinde, aflatoksin M₁ (AFM₁) düzeyleri ELISA tekniğiyle belirlenmiştir. En yüksek AFM₁ konsantrasyonu tam yağlı beyaz peynirde 810 ng/kg olarak bulunmuştur. Analizi yapılan peynirlerde AFM₁'in bulunma oranının yüksek (%89.47), süt numunelerinde

ise düşük olduğu (%10) görülmüş ve peynir örneklerinden yedi tanesindeki (%12.28) AFM₁ miktarları Türk Gıda Kodeksi limiti olan 250 ng/kg'ın üzerinde belirlenmiş, ancak süt numunelerindeki AFM₁ düzeylerinden hiçbiri FAO/WHO, Avrupa Birliği ve Türk Gıda Kodeksi limiti olan 50 ng/L'yi aşmamıştır (25).

Bu ve buna benzer çalışmaların hepsinde ortak olan nokta Aflatoksinin bütün ürünlerde verimi azalttığı, ihracatta problemlere yol açtığı ve üreticileri zor durumda bıraktığıdır.

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler değerlendirilerek şu sonuçlara ulaşılmıştır: Aflatoksin, mevcut kurutma şekli, üretim tekniği ve uygun olmayan depolama şartlarından kaynaklanmaktadır. Bunların önüne geçilmesi için hızlı kurutma teknikleri, depolama koşulları, üretim teknikleri, ambalajlama ve satış koşullarının iyileştirilmesi gerekmektedir.

3. AFLATOKSİN VE ASPERGİLLUS CİNSİ İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

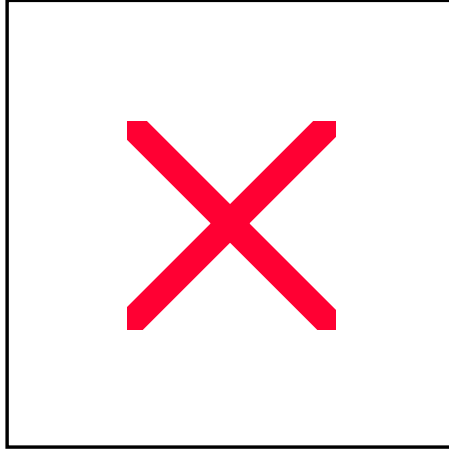
İlk olarak 1960 yılında İngiltere de 100.000'i aşkın hindi ve ördek yavrusunun ölüm nedeni olarak dünyaya adını duyuran Aflatoksin bitkisel kökenli ürünlerde tahıllar, yağlı tohumlar, kuru ve sert kabuklu meyveler ve baharatlarda zaman zaman insan hayatını da tehdit eden önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (23). Olaya Türkiye açısından bakıldığında ise Antepfıstığı, kuru incir ve son olarak da kırmızı biber önemli bir tarım ülkesi olan ülkemizin ihraç ürünlerinde ilk kez 1967 yılında iç fındık da Kanada'ya ihraç edilen partilerde yaşanmıştır (29).

Aflatoksinler doğada yaygın olarak bulunan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* küfleri tarafından üretilen mikotoksindir. Yunanca **Mykes**: Fungus ve Latince **Toxicon**: zehir kelimelerinden oluşan Mikotoksinler, insan ve hayvanlarda patolojik değişikliklere neden olan fungal metabolitlerdir (11).

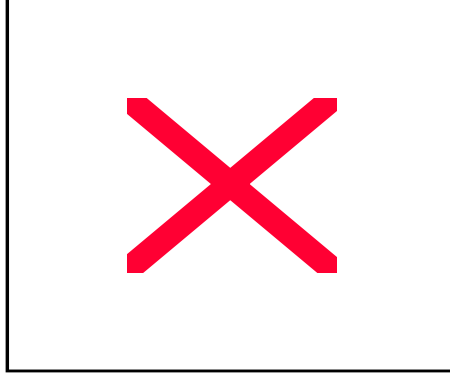
Küfler hava ve toprakta doğal olarak bulunan, tarımsal ürünlerde de sık sık rastlanan mikro organizmalardır. Bu küfler, uygun sıcaklık ve nem koşullarında bazı yiyecek ve yem maddelerinde ürer ve aflatoksin oluşmasına neden olurlar (24). *Aspergillus* türleri mantarlar aleminin Moniliaceae ailesi, Hyphomycetes sınıfında yer alırlar. Doğada, toprakta ve çürümüş bitkiler üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Raper ve Fennel adlı araştırmacılar *Aspergillus* cinsi mantarların 200'e yakın tür ve bir çok varyeteden oluştuğunu söylemişlerdir (38). *Aspergilli* birçok enzim üretmesi nedeniyle besin için muazzam miktarda çeşitli substansları kullanma kapasitesindedirler. *Aspergilli*'nin birçok türü ekseri açıkta besin maddelerinde bulunur ve onların bozulmalarını sağlar. Bu açıdan bazı türler mikotoksin olarak bilinen toksik substanslar üretirler. Bu toksik maddelerin en önemlisi de Aflatoksindir (7).

Aspergillus türleri genellikle laboratuarlarda bulaşmalara neden olurlar. Klinik örneklerden patojen olarak en sık soyutlanan *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*dir. Bu türler insan ve hayvanlarda **aspergillosis** olarak bilinen hastalıklara neden olurlar. Akciğer aspergillosisi bu hastalıkların muhtemelen en ciddisidir ve kuşlarda ve insanları içeren memelilerde oldukça yaygındır (7).

Aspergillinin miselyumu diğer bir çok funguslarınkine benzerdir. Hif iyi gelişmiştir, bol olarak dallanır. Konidiyumları tek hücreli, kuru ve hidrofobiktir. Hücreleri çok hücrelidir. Mikroskopik görünümde; Aspergillus türlerinin hifleri bölmeli, bir taban hücresi üzerine oturmuş düzgün kenarlı ve dik konidiyoforları apikalde genişleme (vezikül) yaparak hemen ayırt edilir. Konidi taşıyan hücrelerine fialid denir. Fialidler olgunlaştığında uçları biri diğerinin altında olacak şekilde zincir halinde konidiler oluşturmaya başlarlar (38). Konidiler tipik olarak küreseldir ve dıştan çıkıntıları olan duvarlara sahip tek hücreli yapılardır (7).



Şekil 1. *Aspergillus flavus*'un mikroskopik görüntüsü



Şekil.2 *Aspergillus flavus*'un PDA ortamındaki görüntüsü

Aspergillus kolonileri türe ve fungusun büyütüldüğü ortama bağlı olarak siyah, kahverengi, sarı, yeşil ve bunun gibi görülür. Koloni rengi tanım için kriterlerden biri olduğundan standart bir büyüme ortamı ve standart büyüme koşulları bu bakımdan çok önemlidir (7).

Aspergillus'ün büyük bir çoğunluğu aseksüel olarak üreme yaparlar. Miselyum henüz gençken bol miktarda konidiyoforlar üretir. Bunlar herhangi bir şekilde organize olmuş değildir, fakat somatik hifden tek olarak çıkarlar. *Aspergillus*'ün ekseri türlerinin perfekt dönemleri keşfedilmemiştir ve böyle türlerin seksüel olarak üreme yeteneklerini kaybettikleri muhtemeldir. *Aspergillus*'ün farklı türlerinde seksüel üreme birçok biçimlerde olur ve en azından beş farklı tipte askokarp sonuçlar. Bu açıdan *Eurotium*, *Sartorya* ve *Emericella* gibi üç askomisetik cins belirlenmiş olup bunlar *Aspergillus* tipte konidiler üretirler (7).

Funguslar, enerji ihtiyaçları ve makro moleküllerini (protein, DNA gibi) yapmak için çeşitli besin elementlerine gereksinim duyarlar. Karbonhidratları sentezleyemedikleri için ortamda karbonhidrat bulunmalıdır. Ancak proteince zengin ortamlarda C kaynağı olarak amino asitleri de kullanabilirler. Organik azot bileşikleri bütün funguslar tarafından asimile edilebilir, inorganik bileşikleri ise az sayıda fungus kullanabilir (22) Tablo 6'da bazı *Aspergillus* türleri gösterilmiştir (38).

Tablo 6. Bazı Aspergillus türleri (38)

<i>A.fumigatus</i>	<i>A.parasiticus</i>
<i>A.flavus</i>	<i>A.ochraceus</i>
<i>A.niger</i>	<i>A.famarii</i>
<i>A.terreus</i>	<i>A.chevalieri</i>
<i>A.amstelodami</i>	<i>A.fisheri</i>
<i>A.oryzae</i>	<i>A.penicilloides</i>
<i>A.candidus</i>	<i>A.ssydowi</i>
<i>A.nidulans</i>	<i>A.ustus</i>
<i>A.glaucus</i>	<i>A.tetrictus</i>
<i>A.clavatus</i>	<i>A.flavipes</i>

Aspergillus türü mantarlar içerisinde Aflatoksin ilk defa *Aspergillus flavus*'ta saptandığından bu mantarın adının ilk harfleri kullanılmış ve bu mikotoksine Aflatoksin adı verilmiştir.

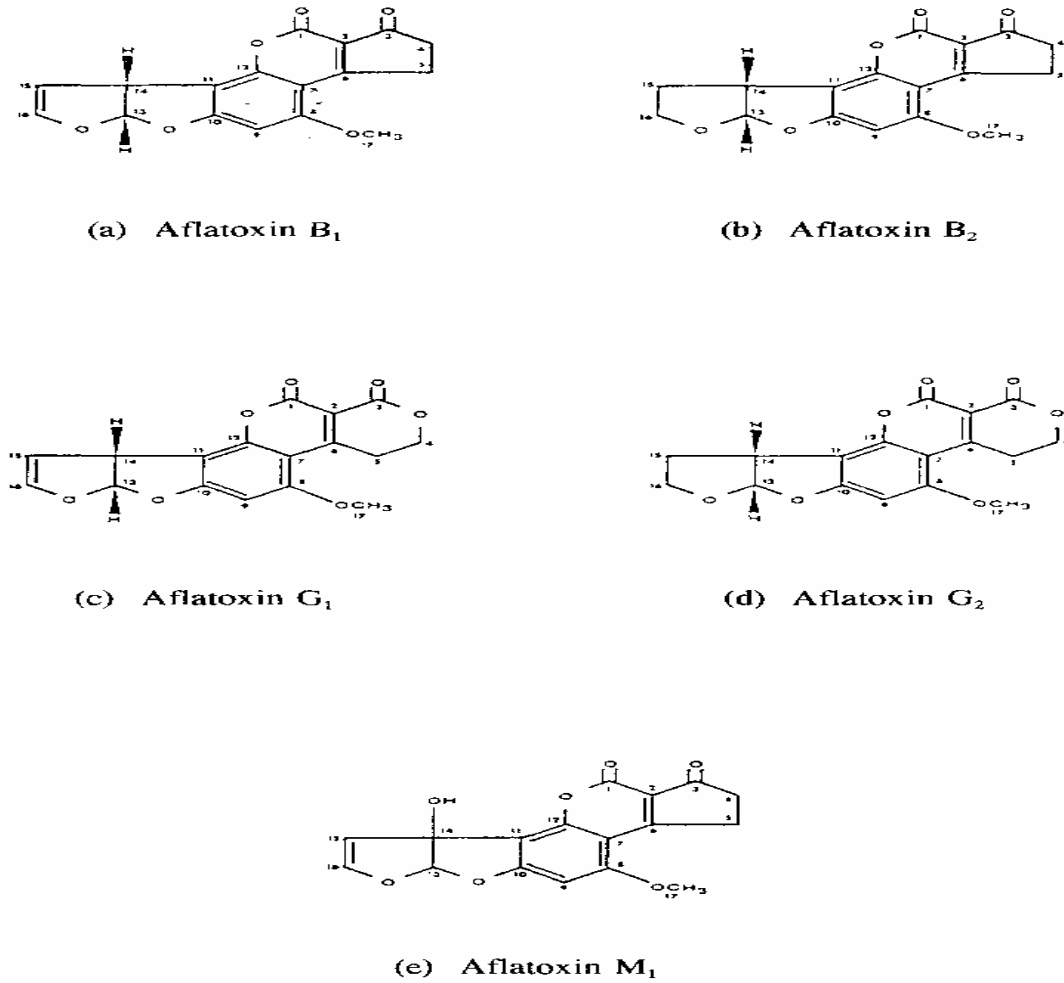
Aspergillus **flavus** + **toksin**— Aflatoksin

Mikotoksin oluşturan fungusların doğada yaygın olarak bulunması nedeni ile uygun koşullar olduğunda, mikotoksin oluşumu hatta birkaç mikotoksinin birlikte görülmesi de söz konusu olabilir. Mikotoksinlerin etkileri çok çeşitlidir. Ölümle sonuçlanan toksisitelerin yanında kanserojen, mutajen, DNA, RNA ve protein sentezini engelleyici, anormal gelişmelere, deri lezyonlarına yol açıcı, bağışıklık sistemini bastırıcı etkilerinden söz etmek mümkündür (34).

On sekiz değişik Aflatoksin tipi tanımlanmış olup, B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 en yaygın olanlardır. Aflatoksinler arasında ise Aflatoksin B1 en yüksek toksik aktiviteye sahiptir (30).

İnce tabaka kromatografi yöntemi kullanıldığında Aflatoksinler yukarıdaki sırada ayrışırlar; morötesi ışıkta bakıldığında B1 ve B2 mavi, G1 ve G2 yeşil görünür. Aflatoksin M ise hayvanlarda Aflatoksin B1'in oluşturduğu bir metabolik üründür ve Aflatoksin bulaşmış yiyecek ya da yem tüketmiş memelilerin süt ve idrarında bulunur (15). Şekil 3'de Bazı Aflatoksinlerin Formülleri verilmiştir (32).

Şekil 3. Bazı Aflatoksin Formülleri



Gıdaların çoğu üretim, işleme, nakliyat ve depolama aşamalarında Aflatoksin üreten küflere bulaşmaktadır. Gıda maddesine toksijenik fungusun bulaşması toksin oluşumu için yeterli değildir. Yani gıda maddesinde fungusu rastlandığında mutlaka toksin vardır demek yanlıştır. Fungusun varlığının yanında fungusun gelişmesi ve mikotoksin üretebilmesi için uygun koşulların da bulunması gerekir. Bu koşullar O₂, Sıcaklık ve Su aktivitesidir (22).

O₂(Oksijen): Toksikjenik fungusların hepsi aerobiktir. Bu nedenle yeterince Oksijen bulunmayan ortamlarda küf gelişemez ve toksin oluşturamaz.

Sıcaklık: Fungusların sıcaklık aralığı çok değişkendir. Bazı türler 0 °C'de gelişebilirken, bazıları için minimum sıcaklık 10 °C olmalıdır. Aspergillusların gelişme sıcaklıkları 15-25 °C'dir.

Su Aktivitesi(aw): Mikotoksin oluşumunu önlemek yönünden ele alındığında belki de en önemli etmendir. Su aktivitesi çok çeşitli şekillerde tanımlanabilir.

Su aktivitesi, mikroorganizmaların yararlanabileceği suyun ifadesidir. Gıdanın nemi bu açıdan çok önemli değildir. Çünkü %90'ların üzerinde nem içeren reçel, turşu gibi gıdalarda küflerin gelişmemesi ancak bu gıdalardaki su aktivitesinin düşüklüğü ile açıklanabilir. Fungusların toksin oluşumu için ihtiyaç duyduğu su aktivitesi, genelde gelişim için duyduklarından daha yüksektir. Genelde 0,85 olan su aktivitesinin üzerinde toksinler oluşabilmektedir. Bazı küfler 0,65 su aktivitesinde gelişebilseler de 0,70'in altında gelişebilen toksijenik fungus bilinmemektedir. Bu nedenle de toksin gelişimi için 0,70 su aktivitesi güvenli bir sınır olarak kabul edilmektedir (15).

Gıdalarda küf gelişmesi ve Aflatoksin oluşumunda rol oynayan en önemli faktörler, gıdayı çevreleyen hava bağıl nemi ve depolama sıcaklığıdır.

Aflatoksin birçok üründe meydana gelebiliyor olmasına karşılık yer fıstığı, Antep fıstığı gibi kabuklu kuru meyveler, mısır gibi hububat, pamuk tohumu, ayçiçeği tohumu gibi yağlı tohumlar ve incir gibi kurutulmuş meyveler, hayvan yemleri, kırmızı biber ve diğer baharatlarda Aflatoksin oluşumu daha hassas görünmektedir (30).

Mikotoksinlerin toksik etkisi, hayvanlar üzerinde yapılan denemelerle ortaya koyulmaktadır. İnsanlar üzerine etkisi ise, etiyolojik çalışmalarla anlaşılmaya çalışılmıştır. Mikotoksin alan hayvanlarda, alınan toksinin dozuna bağlı olarak, verim düşüklüğünden başlayıp ölüme kadar giden mikotoksikozis olayları da önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yapılan toksisite denemeleri ve epidemiyolojik çalışmalar, mikotoksinlerin akut ve kronik toksik etkilerinin olduğunu göstermiştir. Tablo 7 (6,10)'de görüldüğü gibi deney hayvanının cinsi,cinsiyeti, oksinin hayvana verilmiş yolu LD50 değerini etkilemektedir.

Tablo 7. Bazı hayvan türlerine göre Aflatoksin LD50 miktarları (6,10)

Aflatoksinler	Hayvan türü	Toksinin veriliş şekli	LD50(mg/kg vüc.ağ)
B1	Rat(erkek)	Oral	5.5-7.2
B1	Rat(dişi)	Oral	17.9
B1	Ördek palazı	Oral	0.36
B2	Ördek palazı	Oral	1.7
G1	Ördek palazı	Oral	0.78
G2	Ördek palazı	Oral	3.45
M1	Ördek palazı	Oral	0.32

Aflatoksinler çeşitli hayvan türlerinde akut nekroz, siroz ve karaciğer kanserine neden olur. Hiçbir hayvan türü Aflatoksinlerin akut toksik etkilerine dirençli değildir, dolayısıyla insanların da benzer şekilde etkileneceği varsayılabilir. Tek doz Aflatoksin verilen hayvan türlerinde LD50 değerleri çok geniş bir dağılım göstermiştir. Türlerin çoğunda LD50 değeri 0.5-10 mg/kg arasında değişmiştir (35).

Aflatoksinler, biyolojik olarak aktif moleküllerdir. Vücuda alındıktan sonra birincil etkileri, hücrede ve moleküler düzeyde olmaktadır. Bu nedenle bazı toksikologlar tarafından en fazla affinite gösterdikleri organeller yönünden sınıflandırılmıştır (1, 22).

Enerji üretimi inhibitörleri: Citreoviridin, luteoskyrin ve benzeri anthroquinler, xanthomegnin, secalonic acid D, moniliformin

Protein sentezi inhibitörleri: trikotesenler, okratoksin A

Sitoskeleton modifiyerleri(cytoskeleton modifiers):griseofulvin, sitokalazin, chloropeptid

Östrojenik mikotoksinler: zeralenon

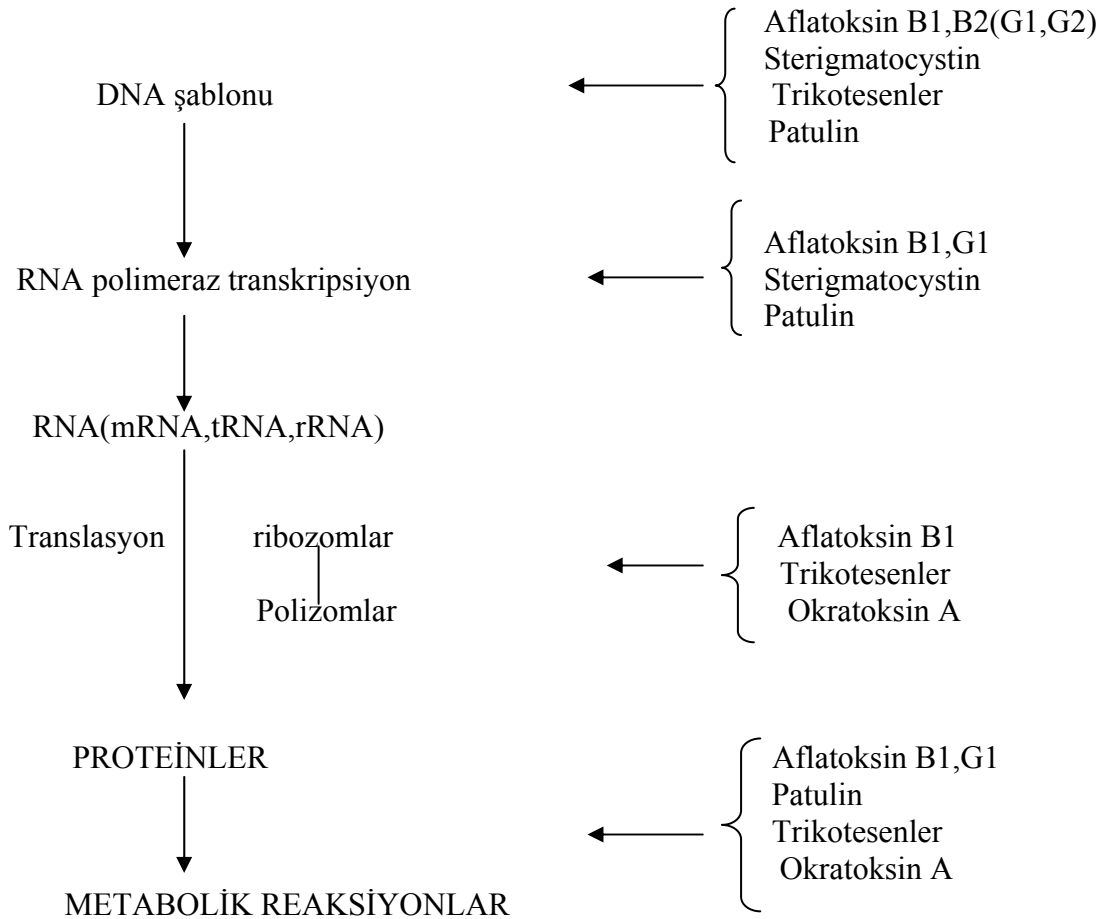
Tremorjenler: penitrem A, paxilline, verruculogen, fumitremorgen

Karsinojenik mikotoksinler: Aflatoksinler, sterigmatosistin, patulin

Şekil 4’de mikotoksinlerin hücrede etkili olduğu alanlar görülmektedir. Bir mikotoksinin ilk etki mekanizmasının DNA’yı modifiye etmek, transkripsiyon prosesini bozmak veya protein sentezini inhibe etmek şeklinde olabileceği ileri sürülmektedir. Bazı durumlarda da mikotoksin, enzim proteini veya koenzim ile direk olarak ikincil etkiler ortaya çıkmakta ve metabolik aktivite ve regülasyon değişmektedir.

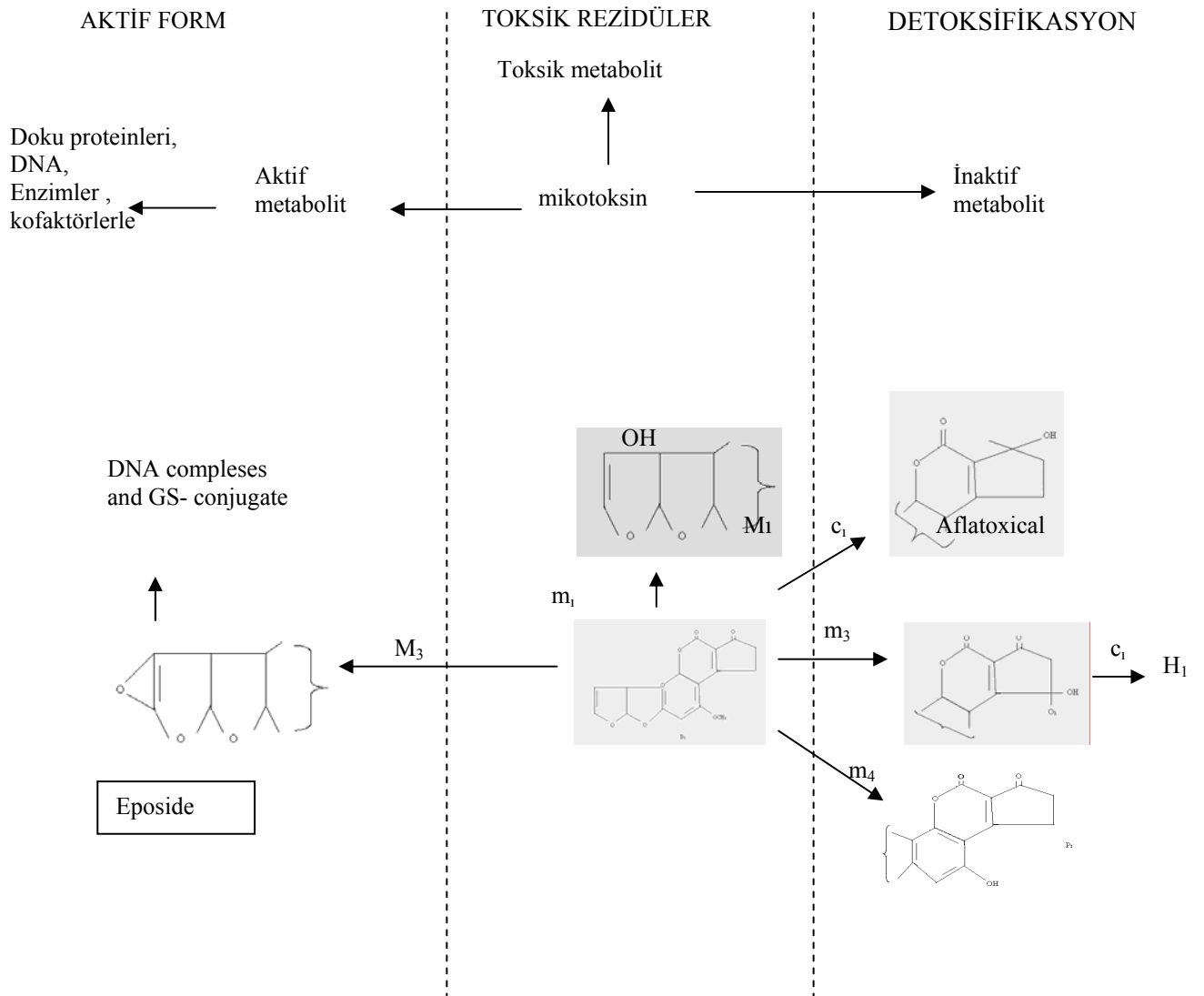
Şekil 4’de görüldüğü gibi bir mikotoksinin ilk etki mekanizmasının DNA’yı modifiye etmek, transkripsiyon (kopyalama) prosesini bozmak veya protein sentezini inhibe etmek şeklinde olabileceği ileri sürülmektedir (6).

Şekil 4. Mikotoksin etki mekanizmasının başlıca hedefleri



Aflatoksinin karsinojenite ve mutajenitesini asıl olarak vücuttaki biyotransformasyonu açıklamaktadır. Şekil 5’de Aflatoksin B1’in karaciğer mikrozomal enzim sistemi ve sitoplazmik redüktaz enzim sistemi ile çeşitli metabolitlere biyotransformasyonu görülmektedir. Bu metabolitlerden Aflatoksin M1, Aflatoksin B1’in hidroksillenmiş metabolitlerinden biridir ve Aflatoksin B1’e göre mutajenik ve karsinojenik potansiyeli daha düşüktür. Mikrozomal hidroksilasyon ve demetilasyon reaksiyonları sonucunda bu kez Aflatoksin B1’den çok daha az aktif olan Q1 ve P1 metabolitleri oluşmaktadır. Bu yüzden bu reaksiyonlar bir detoksifikasyon prosesi olarak kabul edilmektedirler (6).

Şek 5. Karaciğerde Aflatoksin B1 metabolizması ve bunun detoksifikasyon, toksik rezidü birikimi ve metabolik aktivasyon yönünden mikotoksinler için genelleştirilmiş şeması(6, 37).



Ancak bu biyotransformasyon olaylarında esas önemli proses, yine bu enzim sistemleriyle meydana gelen, Aflatoksin B1'in epoksidasyonu prosesidir. Bu epoksi form DNA ile, AFB1-N7-Gua kompleksini oluşturur. Bu kompleks, Kenya'nın Aflatoksin B1 alımı ile karaciğer kanseri arasında pozitif ilişki bulunan bir bölgesinde toplanan idrarlarda saptanmıştır. Aflatoksin biyotransformasyon mekanizmasının Şekil 5'de görüldüğü gibi 3 boyutu söz konusudur (37).

Detoksifikasyon: Aflatoksin B1, karaciğerde 3 hidroksillenmiş metabolite (aflatoksikol, aflatoksin Q1, Aflatoksin P1) dönüşebilir. Bu metabolitler, en azından teorik olarak vücuttan hızla atılabilecek polar bileşiklerle birleşme yeteneğindedirler ve akut toksisite testleri, aflatoksinde çok daha az toksik olduklarını göstermektedir.

Toksik rezidüler: Aflatoksin B1'in mikrozomal enzimlerle Aflatoksin M1'e biyotransformasyonu, bir yandan bu metabolitin safrada ve idrarda konjuge olarak bulunması nedeniyle bir detoksifikasyon olarak görülmekte ancak diğer yandan hemen hemen Aflatoksin B1 kadar toksik olan konjuge olmamış Aflatoksin M1 ise sütte bulunması nedeniyle tehlikeli bir toksik kalıntı olarak kabul edilmektedir (4).

Metabolik aktivasyon: Bu aşamada, Aflatoksin B1 aktif 2, 3-epoksid forma dönüşerek kuvvetli toksik bir özellik kazanmakta ve karaciğer kanserine neden olmaktadır (22).

Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri, birdenbire ortaya çıkan belirtiler ve kalıcı olabilen belirtiler olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Kalıcı zararlar Aflatoksin içeren gıdaların tüketilmesinden sonra genellikle zehirlenme belirtileri ile ortaya çıkmakta, ancak bu vakaların çok sıklıkla görülmediği belirtilirken, söz konusu ani rahatsızlıklar sonucunda literatürlere geçmiş ölüm vakalarının da bulunduğu ifade edilmektedir. Bunun yanında A.B.D.'de kalın bağırsak ve karaciğer kanseri olan bir erkek hastanın karaciğerinden 0.52 µg/kg düzeyinde Aflatoksin B1 izole edildiği bildirilmektedir. Fransa'da ise, ölen kişilerden elde edilen 50 karaciğer örneğinin 3 adedinde, Aflatoksin B1 izole edildiğini bildiren raporlar da söz konusudur. Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerinde meydana getirdiği kalıcı zararlar ile ilgili araştırmalarda ise özellikle ılıman bölgelerde yaşayan insanlarda bu tip rahatsızlıkların görüldüğü saptanmış ve araştırmacılar söz konusu kalıcı zararları

sınıflandırmışlardır. Bunlar şu başlıklar altında toplanmaktadır: Birincil karaciğer kanserleri, akciğer kanserleri, Reye's sendromu (küçük çocuklarda görülen ve karaciğerin aşırı yağlanması olarak ifade edilen bir hastalık) (4, 10, 24).

Aflatoksinlerin çok genel olarak iki tür etkisinden söz edilebilir.

A- Akut aflatoksikoz, orta düzeyin üstünde Aflatoksin alımıyla ortaya çıkar. Kanama, akut karaciğer hasarı, ödem, gıda sindirimi, emilim ve/veya metabolizmasında değişiklik ve ölüm gibi sonuçları olabilir.

B- Kronik aflatoksikoz, düşük ve orta düzeyde Aflatoksin alımıyla ortaya çıkar ve teşhisi zordur. Ortak belirtiler arasında gıdaların sindiriminde sıkıntı ve düşük büyüme hızı yer alır. Bunlara ek olarak bilinen Aflatoksin sendromları da görülebilmektedir (36).

İnsanlarda bildirilen aflatoksikoz vakası çok fazla değildir, ancak çoğu durumda teşhis konamamış olması ihtimaline dikkat edilmelidir. Bir vakada şu özellikler görülürse aflatoksikozdan kuşkulandırılabileceği söylenmektedir.

- Hastalığın nedeninin saptanamaması
- Hastalığın temasla geçmemesi
- Sendromlarla belli yiyecek kargoları arasında ilişki kurulabilmesi
- Antibiyotiklerin ve başka ilaçların etkisiz kalması
- Vaka sıklığının mevsimlerle bağlantılı olması (hava koşulları küflenme hızını etkileyebilir) (27).

İnsanlarda bilinen iki büyük aflatoksikoz vakası vardır. Birincisi 1974 sonbaharında kuzeybatı Hindistan'ın 150 köyünde 397 kişiyi etkilemiş, 108 kişinin ölümüne yol açmıştır. Aflatoksin kaynağının mısır olduğu saptanmış, 0.25-15 mg/kg düzeylerinde Aflatoksin bulgulanmıştır. Hastalarda yüksek ateş, hızla ilerleyen sarılık, el ve ayaklarda ödem, ağrı, kusma ve karaciğer büyümesi gözlenmiştir. 1982'de ise Kenya'da 20 kişi hastaneye yatmış, ölüm oranı % 60 olmuştur (30).

Yine Tayvan'da küflü pirinç tüketen 26 kişi hastalanmış ve bunların arasında 3 çocuk, ayaklarda ödem, karın ağrısı, kusma, karaciğerde büyüme gibi belirtilerden sonra ölmüştür. İncelenen pirinç örneklerinde 200 ppb Aflatoksin B1 bulunmuştur.

Uganda'da 15 yaşında bir çocuk Tayvan'daki çocuklarinkine çok benzer belirtilerle ölmüş ve bu çocuğun da 1.7 mg/kg Aflatoksin içeren cassava yediği belirlenmiştir. Patolojik bulgu olarak akciğerde ödem, kalp yetmezliği, karaciğerde nekroz ve yağlanma görülmüştür. Aynı aileden iki çocuk daha hastalanmış ancak daha az yedikleri için kurtulabilmişlerdir. Tayland'da da 3 yaşındaki bir çocuk Reye's sendromu sonucu ölmüş ve çocuğun 2 gün önce yediği pirincin 10 mg/kg Aflatoksin içerdiği saptanmıştır (30).

Aflatoksinler sub-letal dozlarda da kronik etki göstermektedir. Sub-letal dozlarda Aflatoksin uygulanan hayvanlarda karaciğerde siroz görülmüştür.

Uzun süre düşük düzeyde Aflatoksin alımı ise birçok deney hayvanında karaciğer kanseri ile sonuçlanmıştır (1). Asya ve Afrika'nın çeşitli bölgelerinde (Tablo 8) karaciğer kanserine rastlanma sıklığı ile Aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketim düzeyi arasında sıkı bir ilişki gözlenmektedir (22).

Tablo 8. Bazı Ülkelerde Aflatoksinli gıdaların tüketim oranı ile karaciğer kanseri görülme sıklığı (22)

ÜLKE	Günlük tüketilen tahmini aflatoksin miktarı (yetişkinlerde mg/kg vüç.ağ.günde)	Karaciğer Kanseri	
		Kaydedilmiş vaka sayısı	Yüzbin kişide bir yılda gör.sıklığı
Kenya	3.5	4	1.2
Kenya	5.9	33	2.5
Kenya	10	49	4
Tayland	5	2	2
Tayland	4.5	6	6
Swaziland	5.1	11	2.2
Swaziland	8.9	29	3.8
Swaziland	15.4	4	4.3
Swaziland	43.1	42	9.2
Mozambik	222.1	100	13

2.1. Türkiye’de aflatoksin bulguları

Türkiye’de 1990-1994 yılları arasında çeşitli gıdalarda saptanan toplam aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG1, AFG2) sıklığı Tablo 9’da gösterilmiştir (30).

Tablo 9. Türkiye’de 1990-1994 yılları arasında çeşitli gıdalarda saptanan toplam aflatoksin sıklığı

GIDA	Kontaminasyon sıklığı (%)	Sınır değer üzerindeki (%) *	Örnek sayısı (n)
	Aflatoksin		
Yer fıstığı ve mamulleri	19.8	15.4	514
Fındık ve mamulleri	0.3	0	334
Antep fıstığı	6.1	3.5	198
Susam ve tahin	2.3	0.	175
İncir	17.4	9.8	92
Kırmızı biber	66.7	46.7	60
Mısır ve mamulleri	0	0	41
Toplam örnek sayısı			1414
* Türkiye’nin kullandığı sınır değer.			

2.2. Gıda ve Yemlerde Sınır Değerler

Aflatoksin içeren gıdaların detoksifikasyonunda çok başarılı yöntemlerin bulunamaması, gıdaların ve yemlerin kontrol edilmesini gerekli kılmıştır. İlk olarak WHO, FAO gibi organizasyonlar, gıdalarda tolere edilebilecek Aflatoksin miktarını 30 µg/kg olarak belirlemişler ve bu miktardan fazla Aflatoksin içeren gıdaların ithal edilmemesi kararını almışlardır. Bu sınır değerler zaman içerisinde düşürülmüştür. Aynı tarihlerde bazı Avrupa ülkeleri daha düşük miktarları benimsemiş, UNICEF gibi kuruluşların da çocuklar tarafından tüketilecek gıda maddelerinde daha düşük sınır değerlerin saptanmasında katkısı olmuştur. Günümüzde 60 kadar ülke Aflatoksin, okratoksin A, deoksinivalenol gibi mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek en yüksek düzeylerini yasal olarak belirtmiştir (30).

Avrupa Birliği'ne üye ülkelerin saptadıkları Aflatoksin sınır değerleri bile büyük farklılıklar göstermektedir. Bu ülkelerin bir kısmı sınır değerleri tüm gıdalar için verirken, bir kısmı da gıdaları gruplandırarak veya süt ürünlerini kendi içlerinde ayırarak sınır değerleri belirlemişlerdir. Sınır değerleri en düşük olan ülkelerin başında Almanya, Avusturya, İsviçre, İngiltere gelmektedir.

Türkiye'de Aflatoksin limitleri 16 Kasım 1997 tarihli Resmi Gazete sayfa 124'te belirtildiğine göre, baharatlar + kuru gıdalarda Aflatoksin (B1+B2+G1+G2) =10 ppb, Aflatoksin B1'de ise 5 ppb olarak belirlenmiştir. Avrupa'da Aflatoksin limitleri 01.01.1999 tarihi itibarıyla şöyledir; Aflatoksin B1=2 ppb, Toplam Aflatoksin (B1+B2+G1+G2) =4 ppb şeklinde belirlenmiştir. Tablo 10'da Ülkemizde kabul edilen Aflatoksin limitleri gösterilmiştir (19).

Tablo 10. Ülkemizde kabul edilen Aflatoksin Limitleri

BESİNLER	ÇEŞİT	MİKTAR(ppb)
BAHARATLAR	AFLATOKSİN B1	5
HUBUBATLAR	AFLATOKSİN B1	2
HUBUBAT UNLARI	AFLATOKSİN B1	2
TÜM GIDA MADDELERİ	AFLATOKSİN B1	5
PEYNİR	AFLATOKSİN M1	0.25
SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİ	AFLATOKSİN M1	0.05
BEBEK MAMALARI	AFLATOKSİN M1	0.02
TÜM GIDA MADDELERİ	HEPSİ	10

Avrupa'nın bazı ülkelerinde kabul edilen Aflatoksin limitleri ülkemizden daha düşüktür. Tablo 11'de Avrupa Ülkelerinde kabul edilen Aflatoksin limitleri görülmektedir (39).

Tablo 11. Avrupa'da Kabul Edilen Aflatoksin Limitleri

ÜLKE	AFLATOKSİN	MİKTAR(ppb)
Fransa	B ₁	1
Yunanistan	B ₁	5
	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	10
Ürdün	B ₁	15
	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	30
Avustralya	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15
Kanada	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15
Kıbrıs	B ₁	5
	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	10
İsrail	B ₁	5
	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15
Yeni Zelanda	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15
Filipinler	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	20
İngiltere	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	4

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1 Bitki Materyali

Araştırma materyalini oluşturan Antepfıstığı örnekleri Gaziantep ili Nizip, Oğuzeli, Araban, İslahiye ilçelerinden, bu ilçelere bağlı Antepfıstığı üretiminin yoğun olarak yapıldığı köylerden ve Gaziantep'te Antepfıstığı kurutma, kavlatma ve çılatma işletmeciliği yapan tesislerden olmak üzere 37 farklı kaynaktan alınmıştır. Ayrıca 2001 mahsulü İran üretimi 1 adet Antepfıstığı örneği de denemelere alınmıştır. Alınan örneklerin 3 tanesi Nizip ilçesinin Barak beldesinden, 11 örnek Nizip İlçesi merkezinden, 2 örnek İslahiye ilçesinden, 4 örnek Araban ilçesinden, 1 örnek Araban ilçesi Hisar köyünden, 1 Örnek Araban İlçesi Elif köyünden, 3 örnek Oğuzeli ilçesinden, 12 örnek te Gaziantep merkezden toplanmıştır. Alınan örneklerin yerleri ve üretim tarihleri Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Antepfıstığı'nın alındığı yerler, yetiştirildiği bölgeler ve üretim tarihi

NUMUNE NO	ALINDIĞI YER	YETİŞTİRİLDİĞİ BÖLGE	ÜRETİM TARİHİ
1	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	BARAK	2002
2	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	BARAK	2002
3	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	NİZİP	2002
4	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	NİZİP	2002
5	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	NİZİP	2000
6	İŞLETME(DEPO)	NİZİP	2000
7	İŞLETME(DEPO)	-	2000
8	NİZİP	NİZİP	2000
9	İŞLETME(DEPO)	GAZİANTEP	2000
10	İŞLETME(DEPO)	GAZİANTEP	2000
11	İŞLETME(DEPO)	GAZİANTEP	2002
12	İŞLETME(DEPO)	GAZİANTEP	2001
13	İŞLETME(DEPO)	GAZİANTEP	2001
14	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	NİZİP	2002
15	BARAK	BARAK	2002
16	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	NİZİP	2001
17	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	GAZİANTEP	2001
18	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	NİZİP	2002
19	NİZİP	NİZİP	2001
20	İSLAHİYE	İSLAHİYE	2001
21	İSLAHİYE	İSLAHİYE	2002
22	ARABAN-HİSAR KÖYÜ	HİSAR KÖYÜ	2001
23	ARABAN-ELİF KÖYÜ	ELİF KÖYÜ	2000
24	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	OĞUZELİ	2001
25	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	NİZİP	2001
26	ARABAN	ARABAN	2001
27	ARABAN	ARABAN	2001
28	ARABAN	ARABAN	2001
29	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	OĞUZELİ	2001
30	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	OĞUZELİ	2001
31	NİZİP	NİZİP	2001
32	GAZİANTEP	GAZİANTEP	2000
33	GAZİANTEP	GAZİANTEP	2001
34	GAZİANTEP	GAZİANTEP	2001
35	GAZİANTEP	GAZİANTEP	2001
36	GAZİANTEP	GAZİANTEP	2001
37	ARABAN	ARABAN	2001
38	İŞLETME(FİSTİKÇILAR SİTESİ)	İRAN	2001

3.1.2. ELİSA ve HPLC Testinde Kullanılan Materyaller

ELİSA testi çalışmasında kullanılan bitkisel materyali yukarıda detayları verilen Antepfıstığı örneklerinin iç kısmı olarak belirlenmiştir. Aflatoksin analizi, R-Biopharm firmasına ait, duyarlılık limitleri 0-45 ppb olan Ridascreen® Fast Aflatoxin kitleri (Aflatoksin Total, Aflatoksin B1, Aflatoksin Kolon) kullanılarak yapılmıştır.

HPLC testi çalışmasında da araştırma yapılan yerlerden toplanan Antepfıstığının iç kısımları kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasal Materyaller

ELİSA testi için gerekli olan %100'lük ve %70'lik Metanol Merck firmasından temin edilmiştir.

HPLC testinde ayrıca NaOH, %70 ve %100'lük teknik metanol, HPLC saflıkta metanol ve HPLC saflıkta Asetonitril kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. ELİSA Testinde Kullanılan Örneklerin Hazırlanması

Araştırma materyali olan Antepfıstıkları Gaziantep ve çevresindeki bazı ilçelerden 38 adet toplanmıştır. Toplama işlemi örnekleme yöntemine göre yapılmış olup alınan örnekler üzeri etiketli delikli plastik torbalara yerleştirilmiştir. Örnekler analiz yapılıncaya kadar tahta dolaplarda karanlık bir ortamda bekletilmiştir ve oda sıcaklığı normal seviyede tutulmuştur (25 °C).

3.2.2. Örnekleme Yöntemi

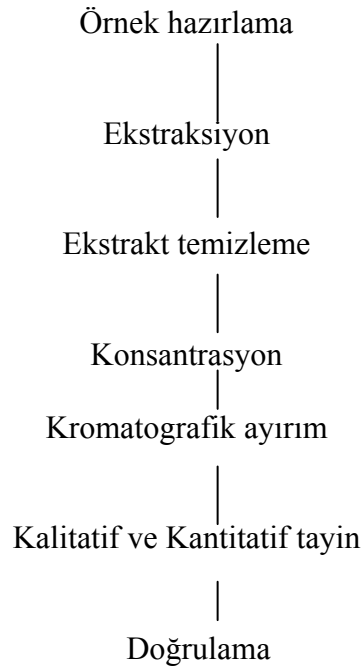
Mikotoksin analizinde hata kaynaklarının başında örnekleme yer almaktadır. Bu yüzden örneklemede numunenin alınış şekline dikkat edilmiştir. Depodaki nem hareketleri, depolama süresi, sızıntı, böcek faaliyeti, dış ortam sıcaklığı, havalandırmadaki aksaklıklar gibi faktörler depolama döneminde toksin gelişimine neden olmaktadır ve bu gelişim tüm depoda üniform değildir. Bu noktalara ulaşmadan yapılan numune alma işlemi depodaki tüm ürünün gerçek mikotoksin konsantrasyonunu yansıtmadığından bu çalışmada Antepfıstığı örnekleri hareket halindeki partilerden alınmıştır. Antepfıstığı işletmeciliği yapan depolardaki

harmanların her birinden 10'ar örnek alınmış ve bu örnekler birleştirilerek ELİSA ve HPLC'de kullanılmak üzere 50'şer gram delikli poşetlere konulmuştur (13, 22).

3.2.3. Aflatoksin Analizleri

Aflatoksinin varlığı ile ilgili olan analiz yöntemi Şekil 6'da verildiği gibi yapılmıştır (17).

Şekil 6. Aflatoksin Belirlemede Kullanılan Analitik İşlem



Elisa testinde kullanılan Antepfıstığı örneklerinin iç kısımları çıkarılmış ve öğütücüde irmik tanesi büyüklüğünde öğütülmüştür (33). Öğütülen Antepfıstığı numunelerinden 5'er gr hassas terazi aracılığıyla alınmış ve 25 ml. %70'lik metanol ile karıştırılmıştır (Methanol 75-25 distile su oranında ayarlanmıştır). Karışım 10 dakika çalkalanmış ve beherin ağzı parafilmle sarılmıştır. Homojen olarak karışan içerik Whatman No 1 kağıdından geçirilerek süzölmüş ve süzölen içerikten 5 ml alınarak 15 ml distile su ile karıştırılmıştır. Toplam 20 ml.lik solüsyon enjektörle kolona yüklenmiştir (33).

3.2.3.1. Kolonun Hazırlanması

Elisa testinde İmmuno affinitiy colon (IAC) kullanılmıştır. Kolonun çalışma prensibi antijen-antikor reaksiyonuna dayanmaktadır. Kolon, kovalent olarak monoklonal antikorlar bağlanmış jel süspansiyonu içermektedir ve bu antikorlar aflatoksin B1,B2,G1,G2 ve M1'e spesifiktir (31).

Kolonlar kullanılmadan önce kolonun üzerindeki tıpa alttan kesilmiş ve kesilen tıpa tekrar kolona takılmıştır. Kolon yarıya kadar distile su ile doldurulmuş ve bu su basınçlı hava ile sn.de 1 damla akacak şekilde boşaltılmıştır. Kolona yüklenen distile suyun tam olarak kolondan boşalmamasına dikkat edilmiştir.

Elde edilen solüsyondan (20 ml) yarıya kadar kolona enjektörle doldurulmuş ve sn. de 1 damla akacak şekilde boşaltılmıştır. Örneğin tamamı bu şekilde kolondan geçirilmiştir. Örneğin tam olarak kolondan geçmesini sağlamak için enjektörle kolona yine hava verilmiştir. Ayırıcı olarak metanol kullanımı olası aflatoksini antijen-antikor kompleksinden ayırdığından %100'lük methanolden 0.5 ml alınmış ve kolondan çok yavaş bir şekilde geçirilmiştir. Kolondan çıkan içerik kapaklı cam tüplere aktarılmış ve bu tüpler numaralandırılmıştır.

Kolondan çıkan içerikten ELİSA testinde kullanılmak üzere 50 mikrolitre alınmıştır.

3.2.3.2. Aflatoksin Total İçin Standartların Hazırlanması

Standartlar kullanılmadan 1 saat önce dolaptan çıkarılmış, oda sıcaklığında bekletilmiş ve birkaç defa çalkalanmıştır. Standartlardan (toplam 6 tane) 50 şer mikrolitre, tampon çözeltiden 450 mikrolitre salınmış ve sulandırma yapılmıştır. Standartlar için 6 tane kapaklı cam tüp alınmış ve sulandırılan standartlar bu cam tüplere konulmuştur. Herbir standart için tüplerin üzerine numaraları yazılmıştır. Antepfıstığı örneklerinden elde edilen solüsyonların bulunduğu cam kapaklı tüplere de tampon çözeltiden 450 mikro litre konulmuştur. Standartlar ve bütün örnekler 500 mikrolitreye tamamlanmıştır.

Sulandırılan standartlardan 50'şer mikrolitre ilk stripin 6 çukuruna ve ikinci stripin 6 çukuruna konmuş ve örneklerden de 50 şer mikrolitre diğer çukurlara konulmuştur. Plate hafif vurularak karışımı sağlanmıştır.

Konjugat ve antibody de sulandırılmış ve 50 şer mikrolitre bütün çukurlara konulmuştur. Konjugat ve antibody'nin sulandırılmasında 2 strip için 1000 mikrolitre tampon çözelti ile 100 mikrolitre antibody, 1000 mikrolitre tampon çözelti ile 100

mikrolitre konjugat karıştırılmıştır. Antibody eklemesi hızlı bir şekilde yapılmıştır. Her ekleden sonra plate vurulmuş, eklenen kimyasalların karışması sağlanmıştır. Plate'in üzeri siyah bir kapak ile kapatılmış ve karanlık bir ortamda yarım saat inkübasyon yapılmıştır.

İnkübasyondan sonra 3 kez distile su ile ELİSA Washer aletinde yıkama yapılmıştır. Yıkamadan sonra kromojen ve substrattan 50 şer mikrolitre alınmış ve her çukura konulmuştur. Plate'in üzeri yine siyah bir kapakla kapatılmış ve yarım saat inkübasyon yapılmıştır. Son olarak her bir çukura reaksiyonu durdurmak için 100 mikrolitre stop eklenmiştir. Stop ilavesinden sonra ELİSA Reader aleti ile 450 nm de okutma işlemi yapılmıştır. Testler iki tekrarlı yapılmıştır.

3.2.3.3. Aflatoksin B1 İçin Standartların Hazırlanması

Standartlar kullanılmadan 1 saat önce dolaptan çıkarılmış, oda sıcaklığında bekletilmiş ve standartlar birkaç defa çalkalanmıştır. Standartlardan (toplam 6 tane) 50 şer mikrolitre, tampon çözeltilerden 450 mikrolitre alınmış ve sulandırma yapılmıştır. Sulandırma yapılırken tampon çözelti ile standartların iyice karıştırılmasına dikkat edilmiştir. Standartlar için 6 tane kapaklı cam tüp alınmıştır. Sulandırılan içerik bunlara konulmuş ve her standart için tüplerin üzerine numaraları yazılmıştır. Antepfıstığı örneklerinin bulunduğu cam kapaklı tüplere de tampon çözeltilerden 450 mikrolitre konulmuştur. Standartlar ve bütün örnekler 500 mikrolitreye tamamlanmıştır.

Sulandırılan standartlardan 50 şer mikrolitre yukarıdan aşağıya olmak üzere ilk 6 çukura ve ikinci stripin 6 çukuruna konmuş ve örneklerden de 50 şer mikrolitre diğer çukurlara konulmuştur. Plate hafif vurularak karışımı sağlanmıştır. Her kuyucuğa 50 mikrolitre enzim konjugat konulmuş ve tekrar karıştırılmıştır. Plate siyah bir kapak ile kapatılmış ve karanlık bir ortamda iki saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyondan sonra 3 yıkama yapılmıştır. Yıkama ELİSA Washer aleti ile yapılmış ve yıkama suyu olarak distile su kullanılmıştır. Yıkamadan sonra kromojen ve substrattan 50 şer mikrolitre alınmış ve her çukura konulmuştur. Plate yine siyah

kapakla kapatılmış ve yarım saat inkübasyon yapılmıştır. Son olarak reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 mikrolitre stop eklenmiştir.

Stop ilavesinden sonra ELİSA Reader aleti ile 450 nm de okuma işlemi yapılmıştır. Okuma işleminden elde edilen veriler, RIDASOFT WIN programına girilmiş ve sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen rakamsal sonuçlar 5 ppb sınırına göre değerlendirilmiştir. Testler iki tekrarlı yapılmıştır.

3.2.2. HPLC Çalışmaları

3.2.2.1. HPLC testinde kullanılan örneklerin hazırlanması

HPLC testinde kullanılacak Antepfıstığı örneklerinin iç kısımları çıkarılmış ve öğütücüde irmik tanesi büyüklüğünde öğütülmüştür. Öğütülen Antepfıstığı numunesinden 25 gr hassas terazi aracılığıyla alınmıştır. Alınan 25 gr numunenin içerisine 5 gr NaOH konulmuştur. %100'lük methanolden 50 ml alınmış ve ufalanan numune ile beher içinde karıştırılmıştır ve üzerine 75 ml. distile su ilave edilmiştir. Karışım 30 dakika karıştırıcıda çalkalanmış ve beherin ağzı parafilmlemlenmiştir. Karıştırılan içerik Whatman No 1 kağıdından geçirilerek süzölmüştür. Süzöntüden 25 ml alınmış ve bir kez daha cam süzgeçten geçirilmiştir. Elde edilen 20 ml.lik karışımın tamamı kolondan geçirilmek üzere enjektöre çekilmiştir.

3.2.2.2. Kolonun Hazırlanması

HPLC testinde VİCAM Aflatoksin kolonlar kullanılmıştır (IAC). Elimizdeki örnekten (20 ml) yarıya kadar kolona enjektörle doldurulmuş ve sn de 1 damla akacak şekilde boşaltılmıştır. Örneğin tamamı bu şekilde kolondan geçirilmiştir. Son kısımda örneğin tam olarak kolondan geçmesini sağlamak için enjektörle kolona yine hava verilmiştir. Ayırıcı olarak metanol kullanımı aflatoksini antijen-antikor kompleksinden ayıracağından %100'lük methanolden 0.5 ml alınmış ve kolondan çok yavaş bir şekilde geçirilmiştir. Kolondan çıkan içerik, kapaklı cam tüplere aktarılmış ve kapaklı cam tüplerine her bir örnek için bir numara verilmiştir. Kolondan çıkan içerikten HPLC testinde kullanılmak üzere 50 mikrolitre alınmıştır.

HPLC cihazında her bir numunenin analizi 18 dakika sürmüş ve Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 sonuçları grafiksel ve rakamsal olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Türk gıda ürünlerinin zaman zaman gümrük kapılarından dönmesine neden olan Aflatoksinin Antepfıstığı'nda verimi önemli ölçüde düşürmektedir. Antepfıstığı'nın ihracatını da önemli ölçüde etkileyen Aflatoksinin son yıllarda Avrupa ülkeleri tarafından çok sıkı takip edilmesi ve ihracat için gerekli olan Aflatoksin limitlerinin gün geçtikçe düşürülmesi Aflatoksinin daha da ciddi etkilerinin olduğunu göstermektedir. Gaziantep ve Türkiye'nin gıda ürünleri içerisinde ihracatta ve ülke ekonomisinde büyük bir yeri olan Antepfıstığının her yıl üretiminin arttığı göz önüne alındığında Aflatoksinlerle ilgili bilgilendirme çalışmalarının da ne kadar önemli olduğu anlaşılır. Onun için Aflatoksinle mücadele etmenin ilk ve gerekli koşulu Aflatoksin oluşumu ile ilgili halkı ve özellikle çiftçileri bilgilendirmektir. Ayrıca Aflatoksin analizlerinin ne kadar sağlıklı olduğu da gündemi oluşturan sorular arasındadır. Birçok Antepfıstığı ürününün Aflatoksin analizlerinin yapılması ve Aflatoksin yok raporuna rağmen gümrük kapılarından dönmesi Antepfıstığı yetiştiricilerini çelişkiye düşürmektedir.

Bu çalışmada 37 adet Antepfıstığı ve 1 adet İran mahsulü 2001 yılında üretilen Antepfıstığı örneğinin hem ELİSA hem de HPLC yöntemleri ile Aflatoksin analizleri yapılmıştır. Ve analizlerde iki tekrarlı yöntem kullanılmıştır. Aflatoksin Total'de ELİSA ve HPLC ile yapılan analizlerde herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Aflatoksin B1'de ise HPLC testinde herhangi bir bulguya rastlanmamasına rağmen, ELİSA yöntemi ile yapılan analizlerde 38 Antepfıstığı numunesinin 16'sında Avrupa standardı olan 2 ppb'den daha fazla oranda Aflatoksin bulunduğu tespit edilmiştir. Tablo 13'de Aflatoksin Total, Tablo 14'de Aflatoksin B1'in ELİSA ve HPLC analiz sonuçları verilmiştir.

Tablo 13. Aflatoksin Total ELİSA ve HPLC analiz sonuçları

AFLATOKSİN TOTAL

NUMUNE NO	HPLC	AVRUPA STAND(PPB)	ELİSA	AVRUPA STAND(PPB)	SONUÇLAR	
					HPLC	ELİSA
1	-	4	0,001	4	-	-
2	-	4	0,0106	4	-	-
3	-	4	0,0262	4	-	-
4	-	4	0,1834	4	-	-
5	-	4	0,0253	4	-	-
6	-	4	0,312	4	-	-
7	-	4	0,0769	4	-	-
8	-	4	0,1927	4	-	-
9	-	4	0,127	4	-	-
10	-	4	0,1332	4	-	-
11	-	4	0,585	4	-	-
12	-	4	0,4276	4	-	-
13	-	4	0,369	4	-	-
14	-	4	0,959	4	-	-
15	-	4	0,5007	4	-	-
16	-	4	0,3411	4	-	-
17	-	4	0,2866	4	-	-
18	-	4	0,5108	4	-	-
19	-	4	1,6047	4	-	-
20	-	4	0,6549	4	-	-
21	-	4	0,4626	4	-	-
22	-	4	0,4983	4	-	-
23	-	4	0,6828	4	-	-
24	-	4	0,4861	4	-	-
25	-	4	0,7123	4	-	-
26	-	4	0,3745	4	-	-
27	-	4	1,3527	4	-	-
28	-	4	1,0377	4	-	-
29	-	4	1,0377	4	-	-
30	-	4	1,0032	4	-	-
31	-	4	0,9698	4	-	-
32	-	4	0,8384	4	-	-
33	-	4	1,7855	4	-	-
34	-	4	0,3105	4	-	-
35	-	4	1,8449	4	-	-
36	-	4	1,9836	4	-	-
37	-	4	1,2887	4	-	-
38	-	4	0,7123	4	-	-

Tablo 14. Aflatoksin B1 ELİSA ve HPLC analiz sonuçları

AFLATOKSİN B1

NUMUNE NO	HPLC	AVRUPA STD(ppb)	ELİSA	AVRUPA STD(ppb)	SONUÇLAR	
					HPLC	ELİSA
1	-	2	0,0938	2	-	-
2	-	2	0,0709	2	-	-
3	-	2	0,1157	2	-	-
4	-	2	0,1415	2	-	-
5	-	2	0,1568	2	-	-
6	-	2	0,2204	2	-	-
7	-	2	0,2026	2	-	-
8	-	2	0,1942	2	-	-
9	-	2	0,1695	2	-	-
10	-	2	0,1534	2	-	-
11	-	2	0,3072	2	-	-
12	-	2	0,2753	2	-	-
13	-	2	0,26	2	-	-
14	-	2	0,5832	2	-	-
15	-	2	0,4121	2	-	-
16	-	2	0,6491	2	-	-
17	-	2	0,5361	2	-	-
18	-	2	0,5703	2	-	-
19	-	2	1,631	2	-	-
20	-	2	1,9409	2	-	-
21	-	2	1,3326	2	-	-
22	-	2	2,3554	2	-	+
23	-	2	2,5408	2	-	+
24	-	2	3,7242	2	-	++
25	-	2	2,5408	2	-	+
26	-	2	2,8505	2	-	+
27	-	2	3,1538	2	-	++
28	-	2	4,4507	2	-	+++
29	-	2	4,1022	2	-	+++
30	-	2	4,2725	2	-	+++
31	-	2	5,0385	2	-	++++
32	-	2	4,5618	2	-	+++
33	-	2	5,8141	2	-	++++
34	-	2	3,2544	2	-	++
35	-	2	1,7652	2	-	-
36	-	2	2,5798	2	-	+
37	-	2	2,3202	2	-	+
38	-	2	2,0897	2	-	+

Tablo 13’de görüldüğü gibi 38 adet Antepfıstığı numunesinde yapılan ELİSA testi ve HPLC yöntemi sonucunda Aflatoksin Total’e rastlanmamıştır.

Tablo 14’de ise 38 adet Antepfıstığı numunesinde yapılan ELİSA testi sonucunda 16 numunede Aflatoksin B1’de Avrupa Standardı olarak kabul edilen 2 ppb’nin üzerinde Aflatoksin B1’e rastlanmıştır. Tablo 14’de 2 ppb ile 3 ppb arasında çıkan ELİSA sonuçları (+) ile, 3 ppb ile 4 ppb arasında çıkan ELİSA sonuçları (++) ile, 4 ppb ile 5 ppb arasında çıkan ELİSA sonuçları (+++) ile ve 5 ppb’nin üzerinde olan ELİSA sonuçları ise (++++) ile gösterilmiştir. Böylece Avrupa’nın birçok ülkesinde (Tablo 11) Aflatoksin B1’de sınır değer olarak kabul edilen 2 ppb’nin üzerinde 16 numuneye rastlanmış ve bu sonuçlar büyüklük değerlerine göre (+) ile gösterilmiştir.

Tablo 14’de 38 adet Antepfıstığı numunesinde yapılan HPLC yöntemi sonucunda ise herhangi bir bulgu saptanmamıştır. Ve bu değerler (-) olarak gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aspergillus cinsi mantarlar tarafından üretilen ve Antepfıstığında olumsuz etkileri olan Aflatoksinler, hem kanserojen madde olması hem de Antepfıstığı verimini düşürmesi gibi faktörlerden dolayı mikotoksinler içerisinde en etkili metabolit ürün olarak bilinmektedir. Avrupa Birliği ve Batılı Ülkelerde gün geçtikçe Aflatoksin denetimlerinin sıklaştırılması ve Aflatoksin limitlerinin her yıl daha da düşük tutulması, gıda ürünlerinde Aflatoksinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Türkiye'nin değişik yerlerinden ve büyük bir oranı da Gaziantep'ten ihraç olarak giden Antepfıstığı'nın Dünya piyasasında büyük bir payının olduğu bilinmektedir. Ancak son yıllarda ihraç edilen Antepfıstıklarının gümrük kapılarında yapılan analiz sonuçları Antepfıstığı üreticilerini fazlasıyla üzmektedir. Ülkemizde HPLC ile yapılan Aflatoksin analizleri ile Antepfıstığı'nın İhraç edildiği Ülkelerdeki Aflatoksin analiz sonuçları arasında rakamsal farklılıklar görülmektedir.

Bu farklılığa yönelik olarak 2003 Ekim ayında Gaziantep Fıstık İşletme Tesislerinden, Gaziantep Merkez ve bazı ilçelerden alınan Antepfıstığı örneklerinde Aflatoksin varlığının saptanmasında önce ELİSA testi uygulanmış, aynı örnekler daha sonra HPLC testi ile kontrol edilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarında ELİSA ve HPLC' de Aflatoksin Total'de herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Aflatoksin B1'de ise HPLC'de herhangi bir bulguya rastlanmamasına rağmen, ELİSA testinde 16 örnekte bulguya rastlanmıştır. ELİSA testinde 16 örnekte Aflatoksin B1' in 2 ppb' den yüksek olması da dikkat çekmektedir. Avrupa birliği Aflatoksin B1 limitinin 2 ppb olması da bu bağlamda dikkat çekicidir.

Aflatoksin Totalde herhangi bir bulguya rastlanmamasına rağmen, Aflatoksin B1’de 16 üründe Aflatoksine rastlanması da şöyle açıklanmaktadır; Aflatoksin analizlerinde kullanılan kolonlar spesifik kolonlardır. Aflatoksin Totaldeki B1 oranı çok düşük olduğu için spesifik kolonlar tarafından yakalanmamıştır. Ama Aflatoksin B1’deki oran daha yüksek olduğu için spesifik kolonlar tarafından yakalanmış olabilir diye düşünülmektedir.

Bu çalışmada toplanan 37 adet Antepfıstığı örneklerinden 15 tanesinde Aflatoksin B1 miktarı 2 ppb’den yüksek çıkmıştır. Bulguya rastlanan 15 örneğin 9 tanesinde ise 3 ppb ve üzerinde Aflatoksin B1’e rastlanmıştır. 1 adet 2001 İran mahsulü Antepfıstığı’nda da Aflatoksin B1 miktarı 2 ppb’nin üzerinde çıkmıştır.

Antepfıstığı’nda ELİSA yöntemi ile Aflatoksin tespiti ilk kez bu çalışmada yapılmıştır. Diğer ürünlerde ise bu çalışmada kullanılan yöntemle benzer yöntemler kullanılmıştır. 2001 yılında kuş yemlerinde ELİSA yöntemi ile Aflatoksin tespiti yapılmış ve bu çalışmada, kuş yemlerinde Total Aflatoksinin rastlantı oranı %72.72 ve Aflatoksin düzeyleri 0.0-9.2 ppb arasında bulunmuştur (25). Bu sonuçlar da Aflatoksin tespitinin ELİSA yöntemi ile yapılmasının diğer yöntemlere göre daha güvenilir olduğunu göstermektedir.

Antepfıstığı’nda ELİSA yöntemi ile Aflatoksin tespiti çalışması sonucunda Aflatoksin konusunda Antepfıstığı üreticilerin bilinçlendirilmesinin ne kadar önemli olduğu anlaşılmıştır. Özellikle Antepfıstığı’nın kurutulması ve depolanmasının Aflatoksin oluşumunda çok önemli olduğunun üreticiler tarafından bilinmesi gerekmektedir. Aflatoksin oluşumunda aşağıdaki faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir:

Uygun olmayan, fazla ışık ve nem alan depolarda besinlerin saklanması

Mevcut kurutma şekillerinin yanlış olması. Özellikle Antepfıstığının hasat zamanında direk toprakla temasının sağlanması ve bu şekilde kurutulması

Üretim tekniklerinin yanlış olması, Antepfıstığı sulama tekniklerinin tam olarak bilinmemesi, hasat zamanının geciktirilmesi veya erken toplanması gibi faktörler Aflatoksin oluşumunu teşvik etmektedir.

Özellikle, insan gıdası olarak tüketilecek, ham ve işlenmiş tarım ürünlerinin miktarı kadar kaliteli ve güvenilir olması da gerekmektedir. Ülkemizin geleneksel ihraç ürünleri arasında yer alan ve büyük ekonomik değere sahip olan Antepfıstığı'nın ihracattaki değerini bulabilmesi , ihracatının sürdürülebilir olması, Antepfıstığı'nın kalitesinin ve itibarının zedelenmemesi için Antepfıstığı'nda Aflatoksin oluşumu mutlaka engellenmelidir.

6.ÖNERİLER

Antepfıstığı'nda Aflatoksin varlığının en aza indirilmesi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda Aflatoksin oluşumunun tüm aşamalarında Aflatoksin miktarının azaltılması ile ilgili yöntemler üzerinde odaklanılmıştır. Üretim sezonunda hava koşulları Aflatoksin oluşumunda çok önemli rol oynadığından, mikotoksin gelişiminde tüm kontrol edilebilir faktörlerin etkilerinin mümkün olduğunca en az düzeyde tutulması önerilmektedir. Üretim sırasında küflerin gelişimlerini ve bulaşma risklerini en az seviyeye indirebilmek için , su, besin maddeleri, oksijen ya da engelleyici ilavelerinin elimine edilmesinin gerekliliği üzerinde durulmalıdır.

Bu amaçla aşağıdaki hususlara dikkat edilmesi gerekmektedir;

1. Hasat mevsiminden en az 8-10 gün önce Antepfıstığı'nın üretildiği yerlerdeki yabancı otlar temizlenmelidir.
2. Hasat, yerden ve Antepfıstığı tam olgunlaştıktan sonra yapılmalıdır.
3. Kendiliğinden yere dökülen Antepfıstıkları yerde bekletilmeden toplanmalıdır.
4. Bahçelerden toplanan Antepfıstıkları bez çuvallar içerisinde, aynı gün harmana getirilmeli, kesinlikle naylon çuvallar içinde ve sıkışık bir vaziyette bahçede bekletilmemelidir. Çünkü bunun sonucunda küflenme ve çürüme başlamaktadır.
5. Toplanan Antepfıstıkları büyük yığınlar ve kalın tabaka oluşturacak şekilde yığılıp bekletilmemelidir.
6. Hasat edilen Antepfıstıkları toprakla temas ettirilmemeli ve yağmurdan korunmalıdır. Üzerine örtülen naylon örtü çardak şeklinde olmalıdır.
7. Toplanan Antepfıstıkları beton zeminlerde 10-15 cm kalınlığında serilerek güneşte 3-5 gün soldurulduktan sonra işletmelere verilmelidir.
8. Kabuğu çıkarılmış iç Antepfıstıkları; hafif meyilli ve temiz beton harmanda kurutulmalıdır. Eğer harman beton değilse Antepfıstığı'nın toprakla temasını önlemek için jüt tente veya bez kullanılmalıdır.
9. Beton veya jüt tente üzerine sererek kurumaya bıraktığımız Antepfıstığı'nı yağmurdan korumak için üzerine örteceğimiz naylon örtüyü direkt Antepfıstığı'nın üzerine değil, en az 30-40 cm yükseklikte çardak yaparak örtmelidir.

10. Tam olarak kuruyan (en fazla %12 nem) kabuklu Antepfistıklarının içindeki yabancı maddeler seçilmelidir. Çünkü bu maddelerin dayanıklılık süresi az olduğu için küflenerek Aflatoksin oluşturabilmektedir.
11. Kuruyan Antepfistıkları iyice soğuduktan sonra, sabah erken veya akşam geç saatte jüt çuvalara koyulmalıdır. Naylon çuvalarda havalandırma yapılamayacağı için küflenme oluşacağından jüt çuval kullanılmalıdır.
12. Kuruyan Antepfistıkları hemen pazara götürülmeyecekse, temiz , rutubetsiz ve havalandırma özelliğine sahip bir depoda muhafaza edilmelidir.

KAYNAKLAR

- (1) AKSOY, U., 1990. Aflatoksin, Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama Ve Araştırma Merkezi yayım Bülteni, Y 2, sayı: 1-4
- (2) Anonim, 1998. *The Turkish Pistachio*. Güneydoğu Anadolu İhracatçı Birlikleri Tanıtım Broşürü (8s.) Gaziantep
- (3) Anonim (2003). Antepfıstığının Besin Değeri İşleme ve Depolaması. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, **10**
- (4) ANONYMOUS, 1979. Environmental Health Criteria. Mycotoxins World Health Org., Geneva.
- (5) Ayfer, M., *Antepfıstığının Döllenme Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar*. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 148, Çalışmalar 93, 104 s., 1959
- (6) Betina V., 1989. *Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, 437 p.
- (7) Biçici, M., Ç.Ü. Zir. Fak. Yay. *Mikoloji Ders Kitabı*: 121, Adana., 1993
- (8) Bilgen, A.M. (1973). Antepfıstığı Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara
- (9) Bullerman L.B., 1986. *Mycotoxin and Food Safety: Food Technology*. A Scientific Status Summary by the IFT Expert Panel on Food Safety and Nutrition.
- (10) BULLERMAN, LB. 1979. *Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health*. Journal of Food Protection. 42.
- (11) CARNAGHAN, 1961. *Toxicity associated with certain samples of growel-nuts*. Nature 192:1301-1303
- (12) COKER, R.A. and B.A. JONES, 1998. *Determination of mycotoxins*, Mycotoxins Section, London.
- (13) ÇOKSÖYLER, N., 1991. *Gıda ve Yemlerde Mikotoksin Düzeyinin Tesbitinde Numune Alma ve Analiz Aşamalarının Analiz Sonucu Üzerine Etkileri*, T.K.B. Bursa II. Uluslar arası Gıda Sempozyumu, 284-295
- (14) FAO, 1979. Physical Separation Of Mycotoxins Food and Nutrition. Paper 10,40,44.
- (15) FAO of United Nations, 1990. Manules of quality control 10. Training in mycotoxins analysis. FAO Food and Nutrition Paper.
- (16) FAO, (2002), Production Yearbook, ROME
- (17) GILBERT, J. 1993. *Recent advances in analytical methods for mycotoxins*. Food Additives and Contaminants, 10:1, 37-48.
- (18) Lemaister, J. (1959). *Le pistacher* (Etude bibliographique). Fruits, **14** 57-77
- (19) Mikotoksin Laboratuvarı, Şubat 2001. "Aflatoksin Analizleri" Hizmet İçi Eğitim Kursu, İzmir.
- (20) Özbek, S., M, Ayfer. (1959). *Türkiye'de Antepfıstığı Anaçları ve Aşı Tekniği*. 1959 yılı fasikül 4, A.Ü.Z.F
- (21) Özbek, S. (1978). *Özel Meyvecilik* Ç.Ü. Zir. Fak. Yay., Adana
- (22) ÖZKAYA, Ş., 2000. "Gıda ve Yemlerde Aflatoksin Analizleri" Eğitim Programı, Ankara.
- (23) QUIST, C.F., BOUNOUS, D.I., KILBURN, J.V., NETTLES, V.F., WYATT, R.D.: *The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults*. Journal of Wildlife Diseases, 36(3): 436-444, 2000.
- (24) TOPAL, M. 1987. *Bazı Önemli Mikotoksinler ve Özellikleri*. Gıda Teknolojisi Derneği, Yıl:12, Sayı:5, Eylül-Ekim, s:283-291.

- (25) U.Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD. Bursa
- (26) Ülkümen, L. ve Özbek, S., *Modern Meyvecilik*. A.Ü. Basımevi, Ankara. 1-25, 54-100 s., 1950
- (27) Wilson B.J.,1978. *Hazard of Mycotoxins to Public Health*. J.Food Prot.,41(5).375-384.
- (28) Woodroof, J.G. (1982). *Tree Nuts Production, Processing, Product*, Avi Publishing company Inc. Westport, Connecticut pp., 572-603
- (29) <http://www.abc.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>
- (30) <http://www.aflon.net/aflatoksin.html>
- (31) <http://www.aflatoxin.info/elisa1.htm>
- (32) <http://aflatoxin.4mg.com>
- (33) <http://aflatoxin.info/health.asp>
- (34) <http://aflatoxin.4mg.com/ab1.htm>
- (35) <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>
- (36) <http://www.musan.com.tr/pepper/aflatoksin.html>
- (37) <http://www.vitalherapeutics.org/vtlafltx.htm>
- (38) Tümbay, E. (1999). E.Ü. Tıp Fak. *Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji*. İZMİR. 1099-1100 s.
- (39) http://www.recete.org/mised/haberler_3/7.php
- (40) **GÜRSES** Mustafa, Yüksek Lisans Tezi, Yönetici: Prof.Dr.Selahattin **SERT**, 38 s., Eylül 1997
- (41) www.focusdergisi.com.tr/bilim_insanlari/soylesiler/00251