



**KÜF DEKONTAMİNASYONU İÇİN AKIŞKAN YATAK  
ATMOSFERİK BASINÇ PLAZMA REAKTÖRÜ TASARIMI**

**THE DESIGN OF A FLUIDIZED BED ATMOSPHERIC  
PRESSURE PLASMA REACTOR FOR MOLD  
DECONTAMINATION**

**BEYHAN GÜNAYDIN DAŞAN**

**PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

**BEYHAN GÜNAYDIN DAŞAN**'ın hazırladığı “**Küf Dekontaminasyonu İçin Akışkan Yatak Atmosferik Basınç Plazma Reaktörü Tasarımı**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Başkan

.....

Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Danışman

.....

Prof. Dr. Faruk BOZOĞLU

Üye

.....

Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canım Annem ve Abim'e,*

*Sevgili eşim Emre'ye,*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24/12/2015

BEYHAN GÜNAYDIN DAŞAN

## ÖZET

# KÜF DEKONTAMİNASYONU İÇİN AKIŞKAN YATAK ATMOSFERİK BASINÇ PLAZMA REAKTÖRÜ TASARIMI

**Beyhan GÜNAYDIN DAŞAN**

**Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI**

**Aralık 2015, 144 sayfa**

Bu tez çalışmasında, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sistemi tasarlanmış ve model gıda örnekleri olarak seçilen fındık ve mısır örneklerinin yüzeylerinde aflatoksijenik küfler (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) üzerindeki dekontaminasyon etkisi incelenmiştir. Model gıda örnekleri kontrollü bir şekilde *A. flavus* ve *A. parasiticus* ile kontamine edilerek, farklı çaplara sahip akışkan yatak reaktörlerde, değişen plazma parametrelerinde, proses gazları olarak kuru hava ve azot kullanılarak, 1-5 dk süresince plazma dekontaminasyon işlemine tabi tutulmuştur. Fungal yükteki azalma takip edilerek parametreler optimize edilmiştir. Atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde, fındık örneklerinde, optimum plazma parametresinde [655 W (% 100 V- 25 kHz)] uygulanan “hava” plazması ile 5 dk sonunda *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında  $D_1$ : 49 mm reaktörde, 4.50 ve 4.19 log (kob/g);  $D_2$ : 65 mm reaktörde ise 3.82 ve 3.75 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir. Mısır örneğinde aynı parametrelerde “hava” plazması uygulandığında ise *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında  $D_1$ : 49 mm reaktörde 5.48 ve 5.20 log (kob/g);  $D_2$ : 65 mm reaktörde ise 5.08 ve 4.99 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir. Plazmanın *Aspergillus* türleri üzerindeki inaktivasyon

etkisinin, yüzey topoğrafyasından dolayı mısır örneklerinde fındığa göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Plazma proses gazı olarak “azot” kullanıldığı durumda, fındık örneklerine uygulanan optimum plazma parametresinde (655 W), 5 dk sonunda *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında  $D_1$ : 49 mm reaktörde 4.17 ve 4.09 log (kob/g);  $D_2$ : 65 mm reaktörde ise 3.70 ve 3.57 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir. Mısır örneğinde aynı parametrelerde “azot” plazması uygulandığında ise *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında  $D_1$ : 49 mm reaktörde 4.62 ve 4.68 log (kob/g) birimlik ;  $D_2$ : 65 mm reaktörde ise 4.54 ve 4.63 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir. Atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminin *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporları üzerindeki öldürücü etkisi, uygulanan referans voltaj ve frekans değerleri artırıldığında artarken, reaktör çapı artırıldığında azalmıştır. Bununla birlikte, plazma proses gazı olarak kullanılan kuru havanın azota göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, optimum plazma parametresinde uygulanan dekontaminasyon işlemiyle 2 dk sonunda fındık örneğinin doğal florasında bulunan küf ve mayalarda 3.45 log (kob/g) ve TAMB’lerde 3.27 log (kob/g) birimlik sağlanmış ve örnek yüzeyinde canlı hücre saptanamamıştır. Mısır örneğinde ise doğal florasında bulunan küf ve mayalarda 3.84 log (kob/g) ve TAMB’lerde 3.07 log (kob/g) birimlik indirgenme aynı parametrelerde 3 dk plazma dekontaminasyon işlemi sonunda elde edilmiş ve örnek yüzeyinde canlı hücre saptanamamıştır.

En çok indirgenmenin gözleendiği optimum parametrede (655 W),  $D_1$ : 49 mm reaktörde proses gazı olarak kuru hava kullanıldığı durumda elde edilen  $D$ -değerleri, fındık örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* için 1.11 dk ve 1.19 dk iken, mısır örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* için 0.91 dk ve 0.96 dk olmuştur.

Plazma işlemi uygulanan model gıda örneklerinin fungal yüklerinde, depolama sonrasında (25°C’de 30 gün) herhangi bir artış gözlenmemiş aksine fındık örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sayılarında % 5 ve % 10 azalma gözlenirken, mısır örneklerinde ise % 10 ve % 33 azalma gözlenmiştir. Buna karşın, kontrol örnek yüzeylerindeki küf sporları aynı depolama koşullarında gelişmeye devam etmiştir. Depolama sonrasında kontrol fındık örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sayılarında % 115 ve % 76 artış gözlenirken, kontrol mısır örneklerinde ise sırasıyla % 193 ve % 116 artış gözlenmiştir. Plazma işlemi sonrasında örneklerin yüzeyinde kalan *Aspergillus* sporlarının da hasarlı olduğu ve

bu nedenle depolama süresince örnek yüzeyinde gelişemediği, potasyum sorbat ile modifiye edilen besiyerlerinde inhibitör etkisiyle üreyememeleriyle ortaya konmuştur.

Plazma jetinin önünden geçişleri sırasında fındık örneklerinin yüzeyinde oluşan sıcaklık, plazma dekontaminasyon prosesi süresince (300 s) uygulanan tüm plazma parametrelerinde bir termal kamera ile görüntülenmiş ve proses boyunca ortalama 35-90°C aralığında değiştiği gözlenmiştir. Ancak, dekontaminasyon prosesinin gerçekleştiği akışkan yatak plazma reaktöründe, plazma işlemi süresince sıcaklık 45°C'nin altında kalmıştır. Bununla birlikte, plazma uygulaması sırasında oluşan sıcaklık artışının *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporları üzerinde öldürücü etkisi olmadığı ortaya konmuştur.

Atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde uygulanan dekontaminasyon işlemi sonrasında, *A. flavus* ve *A. parasiticus* küflerinin morfolojik yapılarında meydana gelen değişiklikler Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** atmosferik basınç plazma, akışkan yatak reaktör, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, dekontaminasyon, fındık, mısır.



## ABSTRACT

### THE DESIGN OF A FLUIDIZED BED ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA REACTOR FOR MOLD DECONTAMINATION

**Beyhan GÜNAYDIN DAŞAN**

**Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI**

**December 2015, 144 pages**

In this thesis study, an atmospheric pressure fluidized bed plasma system was designed and its decontamination effect on aflatoxigenic fungi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) on the surfaces of hazelnut and maize samples, which were selected as model food samples, was investigated. Samples were artificially contaminated with *A. flavus* and *A. parasiticus* in a controlled manner and subjected to plasma decontamination process within 1-5 min in two fluidized bed reactors with different diameters, at varying plasma parameters, with using dry air and nitrogen as plasma forming gases. Parameters were optimized by tracking the decrease in fungal load.

Significant reductions of 4.50 log (cfu/g) and 4.19 log (cfu/g) at D<sub>1</sub>: 49 mm reactor; 3.82 log (cfu/g) and 3.75 log (cfu/g) at D<sub>2</sub>: 65 mm reactor in *A. flavus* and *A. parasiticus* spores on hazelnut samples were achieved after 5 min treatment of “air” plasma applied at optimum plasma parameter [655 W (100 % V -25 kHz)]. In the case of maize samples, 5.48 log (cfu/g) and 5.20 log (cfu/g) reductions at D<sub>1</sub>: 49 mm reactor; 5.08 log (cfu/g) and 4.99 log (cfu/g) reductions at D<sub>2</sub>: 65 mm reactor were achieved in *A. flavus* and *A. parasiticus* spores by “air” plasma

applied at the same parameters. It was observed that plasma inactivation efficiency on *Aspergillus* spp. was higher on maize samples than hazelnuts due to their surface topography. When “nitrogen” was used as the plasma forming gas, reductions of 4.17 log (cfu/g) and 4.09 log (cfu/g) at D<sub>1</sub>: 49 mm reactor; 3.70 log (cfu/g) and 3.57 log (cfu/g) at D<sub>2</sub>: 65 mm reactor were achieved in *A. flavus* and *A. parasiticus* spores on hazelnut samples after 5 min treatment of plasma process applied at optimum plasma parameter (655 W). In the case of maize samples treated with “nitrogen” plasma at the same parameters, 4.62 log (cfu/g) and 4.68 log (cfu/g) reductions at D<sub>1</sub>: 49 mm reactor, 4.54 log (cfu/g) and 4.63 log (cfu/g) reductions at D<sub>2</sub>: 65 mm reactor were achieved in *A. flavus* and *A. parasiticus* spores. The killing effect of atmospheric pressure fluidized bed plasma system on *A. flavus* and *A. parasiticus* spores were increased with the applied reference voltage and the frequency while decreased with the reactor diameter. In addition to this, it was observed that dry air used as plasma forming gas was more effective than nitrogen. Also, a 3.45 log (cfu/g) reduction in natural mold-yeast flora and a 3.27 log (cfu/g) reduction in natural TAMB flora of hazelnut samples were achieved after 2 min of decontamination treatment applied at optimum plasma parameter. Reductions of 3.84 log (cfu/g) and 3.07 log (cfu/g) were achieved in natural mold-yeast flora and TAMB flora of maize samples after 3 min of plasma decontamination treatment applied at the same parameters. No viable cells were determined on both sample surfaces.

D-values obtained at the optimum parameter at which the maximum reduction was obtained (655 W) were 1.11 min and 1.19 min for *A. flavus* and *A. parasiticus* on hazelnut samples; 0.91 min and 0.96 min for *A. flavus* and *A. parasiticus* on maize samples when dry air was used as process gas at D<sub>1</sub>: 49 mm reactor.

The viable spore load of plasma treated model food samples did not increase after storage (30 days at 25 °C), contrarily 5% and 10% decreases were observed in *A. flavus* and *A. parasiticus* counts on hazelnut samples, while 10% and 33% decreases were observed in *A. flavus* and *A. parasiticus* counts on maize samples. Nonetheless, fungal spores on control sample surfaces continued to grow at the same storage conditions. While increases of 115% and 76% were observed in *A. flavus* and *A. parasiticus* counts on control hazelnut samples, 193% and 116% increases were observed on control maize samples after storage. The *Aspergillus* spp. spores that remained on the food samples surfaces after plasma

process were proved to be also damaged cells that they could not continue growing on sample surfaces during storage by following their growing ability on media modified with potassium sorbate used as an inhibitor agent.

The temperature change on the surface of hazelnuts while passing too close to the plasma jet in the course of the plasma decontamination process (300 s) was monitored with a thermal camera at all plasma parameters for the same conditions and it was observed that the temperature varied between 35 and 90 °C on average during the whole plasma process. However, the temperature inside the fluidized bed reactor in which the decontamination process took place during the atmospheric plasma process stayed below 45 °C. In addition to this, it was demonstrated that the temperature increase taking place during plasma treatment did not have a lethal effect on *A. flavus* and *A. parasiticus* spores. The alterations on morphological structures of *A. flavus* and *A. parasiticus* spores taken place after the decontamination process applied in atmospheric pressure fluidized bed plasma system was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM).

**Keywords:** atmospheric pressure plasma, fluidized bed reactor, decontamination, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, hazelnut, maize.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu çalışmanın başlangıcından itibaren ilgi, destek, yardım ve bilgisini esirgemeyen ve söz konusu çalışmanın gerçekleştirilmesini mümkün kılan, beni her zaman cesaretlendirerek engin tecrübesi, akıl hocalığı ve teşviğiyle iyi bir araştırmacı olmaktan önce insan olmayı öğreten değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Mutlu'ya,

Tez çalışması boyunca göstermiş olduğu hoşgörü ile bilgi ve desteğini esirgemeyen, değerli önerileri, yol göstericiliği, bana kattığı araştırma ve çalışma deneyimi için tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya,

Tez çalışması süresince engin bilgi ve tecrübesi ile değerli katkılarından dolayı tez izleme komitesi üyesi değerli hocam sayın Prof. Dr. Faruk Bozoğlu'na,

Hem bilimsel hem de manevi açıdan her zaman sabırla yanımda olan, en umutsuz zamanlarımda bile benimle birlikte çıkış yolu arayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Tuğba Bulat ve Nazife Nur Karaçağlar'a ve canım hocam Yelda Zencir'e,

Bu tez çalışmasını Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Tarım ve Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma (TOVAG) destek grubu 1130779 nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Tez çalışması süresince desteklerini esirgemeyen Plazma Destekli Biyoteknoloji ve Biyomühendislik (PABB) Araştırma Grubu'ndaki değerli arkadaşlarıma,

Sağladıkları maddi ve manevi destekten ötürü Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünün tüm öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine,

Her anımda yanımda olan, sonsuz desteği, sabrı, koşulsuz sevgisi ve anlayışıyla beni ayakta tutan ve onunla geçirdiğim her dakikayı anlamlı kılan sevgili eşim İlhan Emre Daşan'a,

Hayatım boyunca attığım her adımda destekleriyle sorgusuzca yanımda olan, şefkat ve anlayışlarını hiç eksik etmeyen, en zor şartlarda bile her türlü fedakarlığı göstererek büyük emeklerle beni bugünlere getiren, onların sabır ve sevgisi olmadan asla başaramayacağım sevgili aileme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER.....	xi
ŞEKİLLER.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1 GİRİŞ .....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 <i>Aspergillus</i> Cinsi Küfler .....	4
2.1.1 <i>Aspergillus flavus</i> .....	5
2.1.2 <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	7
2.2 Mikotoksinler .....	9
2.3 Gıdalardan Küf Dekontaminasyonu ve Mikotoksin Detoksifikasyonu .....	14
2.3.1 Mikotoksin Kontaminasyonunun Engellenmesi.....	16
2.3.1.1 Hasat Öncesi Kontrol Stratejileri .....	16
2.3.1.2 Hasat Yönetimi.....	19
2.3.1.3 Hasat Sonrası Kontrol Stratejileri.....	19
2.3.2 Gıda ve Yemlerdeki Mikotoksinlerin Detoksifikasyonu .....	24
2.3.2.1 Mikotoksinlerin Kontamine Ürünlerden Ayrılması .....	25
2.3.2.2 Mikotoksinlerin Kontamine Ürünlerde İnaktivasyonu .....	27
2.3.3 Gastrointestinal Kanalda Mikotoksin Absorpsiyonunun Engellenmesi .....	32
2.4 Plazma .....	33
2.4.1 Plazmanın Tanımı .....	33
2.4.2 Plazmanın Uygulama Alanları.....	35
2.4.3 Plazma ile Dekontaminasyon / Sterilizasyon .....	37
2.5 Akışkan Yatak Reaktörler .....	41
3 MATERYAL ve YÖNTEM .....	44
3.1 Model Gıda Örnekleri.....	44
3.2 Saf Küf Kültürlerinin Temini ve Geliştirilmesi .....	44

3.3	Gıda Örneklerinin Küf Sporları ile Kontaminasyon Yöntemleri .....	44
3.3.1	Spor Solüsyonu Eldesi.....	45
3.3.2	Doğrudan Kontaminasyon .....	46
3.3.3	Gıda Örneklerinin Küf Kültürü ile Kontaminasyonu .....	47
3.4	Akışkan Yatak Reaktör Tasarımı .....	48
3.5	Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Sisteminde Dekontaminasyon Uygulaması.....	50
3.6	Gıda Örneklerinin Doğal Florası Üzerinde Plazma Dekontaminasyon Etkisinin Belirlenmesi.....	51
3.7	Mikroorganizmalara Ait D-değerlerinin Belirlenmesi .....	52
3.8	Depolama Etkisinin Belirlenmesi.....	52
3.9	Termal Görüntüleme .....	53
3.10	Fındık Örneklerine Termal Proses Uygulaması .....	54
3.11	Plazma Dekontaminasyon İşleminin Küf Sporlarının Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....	54
4	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	55
4.1	Küf Sporlarının Gıda Örneklerine Kontaminasyonunun Gerçekleştirilmesi ..	55
4.1.1	Spor Solüsyonu Hazırlanması .....	55
4.1.2	Doğrudan Kontaminasyon .....	55
4.1.3	Gıda Örneklerinin Küf Kültürü ile Kontaminasyonu.....	56
4.2	Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Sisteminin Model Gıda Örnekleri Üzerindeki Dekontaminasyon Etkisi .....	57
4.2.1	Fındık Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Kuru Hava .....	58
4.2.1.1	1. Akışkan Yatak Reaktör- $D_1$ : 49 mm $L_1$ : 165 mm .....	58
4.2.1.2	2. Akışkan Yatak Reaktör- $D_2$ : 65 mm $L_2$ : 195 mm .....	65
4.2.2	Mısır Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Kuru hava.....	69
4.2.3	Fındık Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Azot.....	74
4.2.4	Mısır Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Azot.....	77
4.3	Gıda Örneklerinin Doğal Florası Üzerinde Plazma Dekontaminasyon Etkisinin Belirlenmesi.....	80

4.4	Mikroorganizmalara Ait D-değerlerinin Belirlenmesi .....	82
4.5	Depolama İşleminin <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> Sporları Üzerine Etkisi.....	83
4.6	Termal Görüntüleme .....	91
4.7	Termal Prosesin <i>Aspergillus</i> Sporları Üzerine Etkisi.....	92
4.8	Plazma Dekontaminasyon İşleminin Küf Sporlarının Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi- Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri (SEM) .....	94
5	YORUM.....	97
	KAYNAKLAR .....	104
	EK 1. GIDALARDAKİ (1) BULAŞANLARIN MAKSIMUM LİMİTLERİ .....	125
	EK 2. FOTOĞRAFLAR.....	131
	ÖZGEÇMİŞ .....	143

## ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Avrupa Birliği tarafından izin verilen bazı gıdalardaki aflatoksin limitleri .....	13
Çizelge 4.1. Spor solüsyonu hazırlanması ile elde edilen <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> başlangıç konsantrasyonları .....	55
Çizelge 4.2. Doğrudan kontaminasyon ile elde edilen <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> başlangıç konsantrasyonları .....	56
Çizelge 4.3. Gıda örneklerinin yüzeyindeki başlangıç <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sayıları .....	57
Çizelge 4.4. Atmosferik basınç plazma parametrelerinde plazma oluşumu .....	57
Çizelge 4.5. D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. flavus</i> sporları .....	61
Çizelge 4.6. D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. flavus</i> sporları .....	62
Çizelge 4.7. D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. parasiticus</i> sporları .....	63
Çizelge 4.8. D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. parasiticus</i> sporları .....	64
Çizelge 4.9. D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. flavus</i> sporları .....	66
Çizelge 4.10. D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. flavus</i> sporları .....	67
Çizelge 4.11. D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. parasiticus</i> sporları .....	68
Çizelge 4.12. D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki <i>A. parasiticus</i> sporları .....	69
Çizelge 4.13. D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları.....	70
Çizelge 4.14. D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları.....	72
Çizelge 4.15. D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası fındık örneğinde canlı kalan küf sporları.....	75



Çizelge 4.16. D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası fındık örneğinde canlı kalan küf sporları.....	76
Çizelge 4.17. D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları .....	78
Çizelge 4.18. D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları .....	79
Çizelge 4.19. Gıda örneklerinin doğal florasında bulunan mikroorganizma konsantrasyonları .....	80
Çizelge 4.20. Fındık örneğine uygulanan farklı proses parametrelerinde <i>A.flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> türlerine ait D-değerleri.....	82
Çizelge 4.21. Mısır örneklerine uygulanan optimum plazma parametresinde <i>A.flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> türlerine ait D-değerleri.....	83
Çizelge 4.22. Kontrol ve plazma işlemi uygulanmış gıda örneklerinde 25°C-30 gün depolama öncesi ve sonrası <i>Aspergillus</i> sporlarının konsantrasyonları.....	85
Çizelge 4.23. Modifiye YGC agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin kontrol YGC agar besiyerine göre 25-28°C 7 gün inkübasyon sonunda koloni çaplarındaki azalma .....	87
Çizelge 4.24. Besiyerlerinin pH ölçümleri .....	89

## ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Aspergillus</i> cinsi küflerin morfolojik yapısı .....	4
Şekil 2.2. <i>Aspergillus flavus</i> (a) YGC agarda kolonileri, 7 gün, 25-28°C; (b, c) kafa yapıları, bar=20 µm; (d) konidiyumlar, bar=5 µm (b,c,d [7]) .....	6
Şekil 2.3. <i>Aspergillus parasiticus</i> (a) YGC agarda kolonileri, 7 gün, 25-28°C; (b,c) kafa yapıları, bar=10 µm; (d) konidiyumlar, bar=5 µm (b,c,d [7]) .....	8
Şekil 2.4. Plazma teknolojisi- endüstriyel uygulama alanları .....	35
Şekil 2.5. Materyal yüzeyi ile plazma-kimyasal interaksiyonlarının temel türleri ...	36
Şekil 2.6. Akışkan yatak türleri .....	42
Şekil 3.1. Spor solüsyonu eldesinde mikrobiyolojik sayım yöntemi şematik gösterimi .....	46
Şekil 3.2. Doğrudan kontaminasyonda mikrobiyolojik sayım yöntemi şematik gösterimi .....	47
Şekil 3.3. Akışkan yatak reaktör tasarımı .....	48
Şekil 3.4. Atmosferik basınç akışkan yatak plazma sistemi (A) ve atmosferik plazma probu (B) .....	49
Şekil 3.5. Deney prosedürü şematik gösterimi .....	51
Şekil 4.1. Fındık yüzeyinde <i>A. flavus</i> 'un D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	59
Şekil 4.2. Fındık yüzeyinde <i>A. flavus</i> 'un D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	61
Şekil 4.3. Fındık yüzeyinde <i>A. parasiticus</i> 'un D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	62
Şekil 4.4. Fındık yüzeyinde <i>A. parasiticus</i> 'un D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	64
Şekil 4.5. Fındık yüzeyinde <i>A. flavus</i> 'un D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	65
Şekil 4.6. Fındık yüzeyinde <i>A. flavus</i> 'un D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	66
Şekil 4.7. Fındık yüzeyinde <i>A. parasiticus</i> 'un D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	67

Şekil 4.8. Fındık yüzeyinde <i>A. parasiticus</i> 'un D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi.....	68
Şekil 4.9. Mısır örneğinde <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sporlarının D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	70
Şekil 4.10. Model gıda örnekleri (a) fındık (b) mısır.....	71
Şekil 4.11. Mısır örneğinde <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sporlarının D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	72
Şekil 4.12. Fındık örneğinde <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sporlarının D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	75
Şekil 4.13. Fındık örneğinde <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sporlarının D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	76
Şekil 4.14. Mısır örneğinde <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sporlarının D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25k Hz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	78
Şekil 4.15. Mısır örneğinde <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sporlarının D <sub>2</sub> : 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	79
Şekil 4.16. Fındık örneğinin doğal florasındaki mikroorganizmaların D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	81
Şekil 4.17. Mısır örneğinin doğal florasındaki mikroorganizmaların D <sub>1</sub> : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi .....	81
Şekil 4.18. Kontrol ve plazma işlemi uygulanmış fındık örneklerinde <i>Aspergillus</i> sporlarının 25°C-30 gün depolama sonrası canlılıkları.....	84
Şekil 4.19. Kontrol ve plazma işlemi uygulanmış mısır örneklerinde <i>Aspergillus</i> spp. sporlarının 25°C-30 gün depolama sonrası canlılıkları.....	84
Şekil 4.20. Kontrol ve modifiye YGC agar besiyerlerinde 25-28°C 7 gün inkübasyon sonunda koloni gelişimleri (a) <i>A. flavus</i> (b) <i>A. parasiticus</i> .....	87

Şekil 4.21. Plazma işlemi uygulanmamış <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> 'un kontrol ve PS ile modifiye edilmiş YGC agar besiyerlerindeki gelişimleri.....	88
Şekil 4.22. Kontrol ve PS ile modifiye edilmiş YGC agar besiyerlerinde 25-28°C 7 gün inkübasyon sonunda işlem görmemiş (a) <i>A. flavus</i> (b) <i>A. parasiticus</i> gelişimleri .....	89
Şekil 4.23. Plazma işlemi sonrası fındık ve mısır örnekleri yüzeyinde kalan <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> 'un kontrol ve PS ile modifiye edilmiş YGC agar besiyerlerinde gelişimi .....	90
Şekil 4.24. Farklı plazma parametrelerinde elde edilen sıcaklık profilleri .....	92
Şekil 4.25. 100°C (kuru sıcak hava) -5 dk uygulanan termal proses öncesi ve sonrası canlı <i>Aspergillus</i> türlerinin canlı spor sayıları.....	93
Şekil 4.26. Taramalı elektron mikrografileri (a) kontrol <i>A. flavus</i> (plazma işlemi uygulanmamış), (b)(c)(d) Plazma uygulaması sonrası <i>A. flavus</i> ve sporları .....	95
Şekil 4.27. Taramalı elektron mikrografileri (a) kontrol <i>A. parasiticus</i> (plazma işlemi uygulanmamış), (b)(c)(d) Plazma uygulaması sonrası <i>A. parasiticus</i> sporları .....	96

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	Aktif Karbon
ABPJ	Atmosferik Basınç Plazma Jetleri
AFB <sub>1</sub>	Aflatoksin B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoksin B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoksin G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoksin G <sub>2</sub>
a <sub>w</sub>	Su Aktivitesi
DBD	Dielektrik Bariyer Boşalım (Dielectric Barrier Discharge)
DON	Deoksinivalenol
GRAS	Genellikle Güvenli Kabul Edilen (Generally Recognized As Safe)
FAO	Dünya Sağlık Örgütü (Food and Agriculture Organisation)
FPA	Odak Düzlemi Dizilişi (Focal Plane Arrays)
HBV	Hepatit B Virüsü
HSCAS	Hidrate sodyum kalsiyum alüminosilikat
IAEA	Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (International Atomic Energy Agency)
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer)
IR	İyonize Işın
JECFI	Gıda İşinlama Uzman Komitesi (Joint Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food)
N <sub>2</sub>	Nitrojen
NIR	İyonize olmayan ışın
NO	Nitrik oksit
NO•	Nitrik oksit radikali
NO <sub>2</sub>	Nitrojen dioksit
O	Atomik oksijen

O <sub>2</sub>	Oksijen
O <sub>3</sub>	Ozon
OH•	Hidroksil radikali
OTA	Okratoksin A
PS	Potasyum sorbat
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
RONs	Reaktif Oksijen Nitrojen Türleri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
SF <sub>6</sub>	Sülfür hekzaflorid
SB	Sodyum benzoat
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
TSA	Tryptic Soy Agar
TAEK	Türkiye Atom Enerjisi Kurumu
TÜBİTAK MAM	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
ZEN	Zearalenon

# 1 GİRİŞ

Günümüzde gıda tedarik zincirinin etkinliği ve sürdürülebilirliğinin geliştirilmesi için daha fazla çaba sarfedilmektedir. Gıda atığı ve enerji tüketiminin azaltılması için gelişen yaklaşımların yanında, tüketiciler yüksek kalitede ve ucuz ürün talep etmektedir. Bu sorunlar, gıda bilimi ve teknolojisi için geleneksel gıda proseslerine alternatiflerin geliştirmesini teşvik etmektedir. Bu kapsamda, ısı olmayan gıda muhafaza yöntemlerinin geliştirilmesi ilgi çekmektedir. Üretimde gıdanın güvenliği sağlanırken ve raf ömrü uzatılırken önemli gıda kalite özelliklerinin korumak amaçlanmaktadır. En yeni teknolojilerden biri ısı olmayan atmosferik basınç plazma teknolojisidir. Genellikle “soğuk” plazma olarak tanımlanmakta ve yüksek antimikrobiyel etkisi ile sıcaklığa duyarlı gıda uygulamalarında oldukça ilgi çekmektedir.

Düşük basınç plazma teknolojisinin sterilizasyon ve dekontaminasyon çalışmalarına uygunluğu hem literatürde tıp ve biyomedikal alanlarda gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konmuştur. Ancak plazma teknolojisinin gıda alanında kullanımı yeni bir uygulamadır ve yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Düşük basınç plazma teknolojisinin gıda alanında kullanıldığı yöntemlerin büyük ölçekteki uygulamalarda ekonomik açıdan uygun olmaması nedeni ile, bu tez kapsamında “akışkan yatak atmosferik plazma reaktör” sisteminin dekontaminasyon üzerine etkileri incelenmiştir.

Dengede olmayan (nonequilibrium) atmosferik basınç plazma prosesleri düşük işlem sıcaklığı ve yüksek antimikrobiyel aktivite gibi avantajlarıyla gıda kalitesinde istenmeyen değişikliklere sebep olan geleneksel gıda muhafaza yöntemlerine muhtemel bir alternatif olarak gösterilmektedir.

Türkiye toplam dünya fındık üretiminin % 75'ini, ihracatının ise % 70-75'ini gerçekleştirmektedir. Dünya'nın fındık üretimi için gerekli uygun hava koşullarına sahip bir kaç ülkesinden biri olan Türkiye lider üretici ve ihracatçı konumundadır. 1970'li yıllarda fındık ihracatının % 90'ı kabuklu ve natürel iç fındık olarak gerçekleştirilirken, fındık işleme sanayisindeki olumlu ve hızlı gelişmeler sonucunda işlenmiş fındık ihracatının toplam Türkiye ihracatındaki payı 2000 yılında % 30'un üzerine çıkmıştır. Karadeniz Fındık ve Mamülleri İhracatçıları Birliği verilerine göre 2014 yılında % 85'i Avrupa olmak üzere ekonomik değeri yaklaşık 2.5 milyar doları

bulan toplamda 252.000 ton fındık ihraç edilmiştir.

Fındıklar gelişimleri sırasında tarlada, transfer veya depolama süresince toksijenik küflerle kontamine olabilirler ve bu mikotoksin oluşumuna sebep olabilir. En önemli dört aflatoksin türü (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub>) difuranokumarin bileşiklerinden oluşmakta, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* başta olmak üzere bir kaç toksijenik küf türü tarafından üretilmektedir. Gıda ve yemlerin aflatoksinlerle kontaminasyonu, farklı çeşitte akut ve kronik toksisiteler oluşturabildiğinden insan ve hayvan sağlığı açısından önemli sorunlar oluşturmaktadır.

Fındıkların yanı sıra bir çok tarım ürünü tarladan tüketime kadar ki aşamalarda toksijenik küf türleriyle kontamine olabilmekte ve ürünlerde mikotoksin sorunu oluşturabilmektedirler. Hem insani tüketimde hem de yemlerde sıklıkla kullanılan mısırdada da mikotoksin kontaminasyonu sorunuyla sıklıkla karşılaşılmaktadır.

Türkiye'de aflatoksin sorunu ilk defa 1967 yılında gündeme gelmiş, Kanada'ya ihraç edilen 10 ton iç fındık aflatoksin içerdiği gerekçesi ile geri çevrilmiştir. 1971 yılında Amerika'ya ihraç edilen Antep fıstıklarında, 1972 yılında da Danimarka'ya ihraç edilen kuru incirlerde aflatoksin bulunmuştur. 1987'de kuru incir ve 1994 yılında kuru kırmızı pul biber ihracatında aflatoksin varlığıyla ilgi uyarılar zaman zaman Türkiye gündemine gelmiştir

Tarım ürünleri yılın belirli zamanlarında hasat edilmekte ve tüm yıla yetecek şekilde planlanarak depolanmaktadır. Hasat ve sonrasında depolama süresince aflatoksijenik küf türleri ile kontaminasyonu ve bu küflerin gıdalarda gelişmesi hem ekonomik hem de sağlık açısından önemli sorunlara sebep olmaktadır. Depolama stabilitesini artırmak amacıyla üreticiler sıklıkla 15-20 gün süreyle güneş altında kurutma yöntemini uygulamaktadır. Bu yöntemde kurutma süresi oldukça uzun olduğu gibi, aynı zamanda özellikle toksijenik küf türleri üzerinde etkili olmamaktadır.

Bugüne kadar akışkan yatak atmosferik plazma reaktörleri ile ölçek büyüterek endüstride kullanılacak sistemlerde dekontaminasyon çalışmaları yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında, atmosferik plazma teknolojisini endüstriye kolaylıkla adapte edilebilecek akışkan yatak sistemi ile güçlendirerek günümüzde kullanılan gıda muhafaza yöntemlerine katkıda bulunmak üzere bir alternatif sunmak hedeflenmiştir.

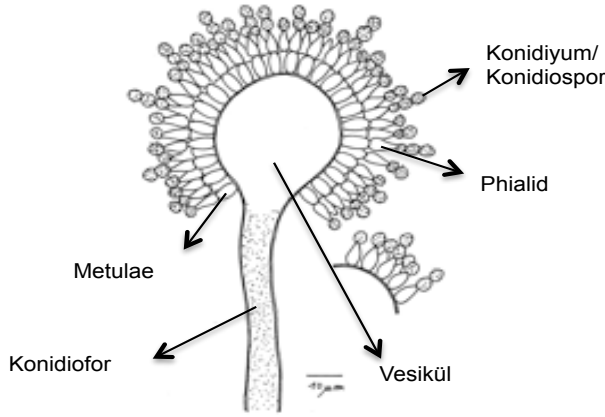


Bu tez çalışmasının amacı, düşük maliyetli ve çevre dostu bir teknoloji olan atmosferik basınç plazma sistemi kullanarak bir akışkan yatak atmosferik basınç plazma reaktörü tasarlamak ve bu sistem ile daha hızlı ve etkin bir şekilde gıdalarda bozulma etmeni olan ve aflatoxin oluşturan küflerin dekontaminasyon işleminin yapılabilirliğini ortaya koymaktır. Plazma teknolojisinin en büyük avantajı gıda bileşenlerinin renk, tat, koku ve aroma gibi duyuşal özelliklerini etkilemeyecek düzeyde düşük çalışma sıcaklıklarına sahip olması ve herhangi bir toksik kimyasal kullanılmamasının yanı sıra işlem sonunda herhangi bir toksik bileşen açığa çıkmamasıdır. Bu çerçevede, Türkiye'nin ihracatında önemli bir yer tutan ve pazar payı yüksek fındık ile küf kontaminasyonu ve mikotoksin sorunun sıklıkla yaşandığı hububat ürünlerinden mısır "model gıdalar" olarak seçilmiştir. Tez çalışmasının hedefleri doğrultusunda, atmosferik basınç plazma teknolojisinin kullanıldığı bir akışkan yatak reaktör tasarlanarak, model olarak seçilen gıda örnekleri üzerinde küf dekontaminasyonuna etkisi incelenmiştir. Tasarlanan bu sistem, reaktör çapı, proses gazı, plazma gücü ve işlem süresi, örnek türü ve toksijenik küf suşları temellerinde incelenerek, dekontaminasyon etkinliği ortaya konmuştur. Fungal yük seviyesi plazma işlemi öncesi ve sonrasında karşılaştırılarak yukarıdaki parametreler optimize edilmiş ve reaktörün performansı belirlenmiştir.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 *Aspergillus* Cinsi Küfler

*Aspergillus* cinsi Deuteromycetes (fungi imperfecti) bölümünde Hypomycetes sınıfında bulunan ve cinsel üreme varlığı (eşeyli sporu) saptanamayan küflerdendir. Sadece eşeysiz spor konidiyum ile çoğalırlar. Konidiofor bir ayak hücresinden yukarı dik uzantı şeklinde çıkar ve uç kısmında küresel veya klavet vesikülden phialidler (sterigmata) çıkar. Sürahi şeklinde phialidler konidiospor zincirlerini meydana getirir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. *Aspergillus* cinsi küflerin morfolojik yapısı

*Aspergillus* Hyphomycetes sınıfında bulunan ve genel olarak geniş, kalın duvarlı konidiofor ve şişkin vesiküller oluşturan bir cinistir. Vesiküllerin üzerinde konidiosporları taşıyan phialidler ya da metulae ve phialidler birlikte bulunabilirler. Genellikle konidioforlar ayak hücresi adı verilen kısa bir hücreden oluşurlar ve bu hücreler septasız olduğundan, vesikül, konidiofor ve ayak hücresi çok büyük tek bir hücre oluştururlar. *Aspergillus* cinsinin alt türlere sınıflandırılması başlıca dört özelliğe dayandırılmaktadır: telemorf varlığı ve özellikleri, metulae varlığı, vesikül üzerinde metulae ya da phialidlerin dizilimi ve koloni renkleri. Telemorfu olmayan türlerde *Aspergillus* koloni rengini konidiofor rengi belirlemektedir. Koloni çapları da ayırt edici önemli bir özellikleridir. *A. flavus* türlerinde, daha ince duvarlı, düzgün ya da az pürüzlü konidiyumlar, 50 µm'ye kadar yuvarlak ya da elips şeklinde vesiküller ve genellikle metulae var iken, *A. parasiticus* türlerinde, pürüzlü ve kalın duvarlı konidiyumlar, 30 µm çapında vesiküller vardır ve genellikle metulae içermeye oranları düşüktür.

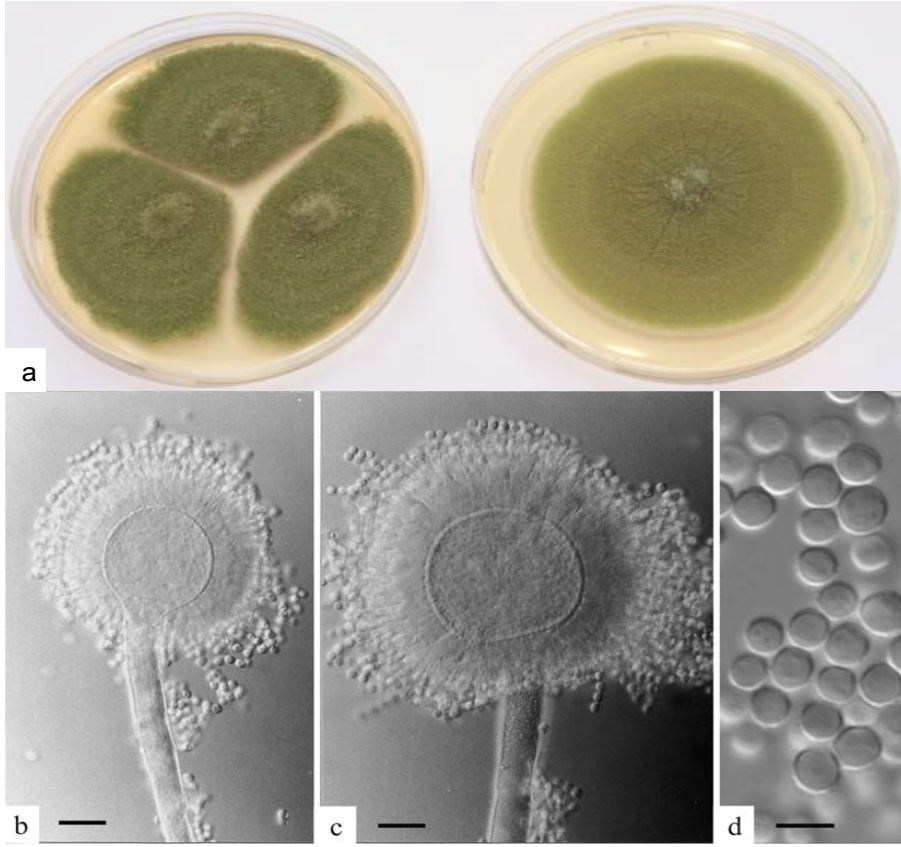
*Aspergillus* 260 [1, 2] ile 837 [3] arasında farklı tür içeren anamorf bir cinistir. Bu türler yaklaşık olarak 10 farklı telemorf cins içerisinde tanımlanmaktadır [4]. Dünya üzerindeki en yaygın türler olarak bilinmektedir. Abiyotik büyüme koşullarında çok seçici değillerdir. Örneğin, çok geniş bir sıcaklık aralığında (6-55°C) ve kısmen düşük nem içeriğinde gelişebilmektedirler. Bununla birlikte, *Aspergillus* türleri hayvan dışkısı ve insan dokusu dahil çok farklı substratlardan beslenebilmektedir. Ayrıca baskın olarak kompleks bitki yapılarında bulunmakta [5] ve genellikle gıdada bozulma etmeni küf olarak değerlendirilmektedir [6]. *Aspergillus* sporları havada hem kısa hem de uzun mesafelere dağılmış halde bulunan en baskın küf yapılarıdır [5]. *Aspergillus* türleri pozitif açıdan bakıldığında kimyasalların sentezinde, biyosentetik dönüşümlerde ve enzim üretiminde yaygın olarak kullanıldığından, negatif açıdan ise gıdalarda bozulma etmeni olmaları ve mikotoksinler içerisinde en önemlisi olan aflatoksin üretmeleri nedeniyle ekonomik açıdan en önemli küflerdir [7].

Bazı *Aspergillus* türleri insan ve hayvanlar için fırsatçı patojenlerdir. Sağlıklı bireylerde etki etmezken, bağışıklık sistemi bastırılmış bireylerde yayılarak hastalığa sebep olmaktadır [8, 9]. Aspergilli (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*) invazif aspergillozis, akciğer aspergillomu, ve alerjik bronşit aspergillozise sebep olmaktadır [10, 11]. *Aspergillus* türleri hayvan ve insanlar için toksik olan mikotoksinleri oluşturabilmektedir. *A. flavus* ve *A. parasiticus* bilinen en karsinojenik molekül olan aflatoksini üretmektedirler [12].

### **2.1.1 *Aspergillus flavus***

Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) agarda 60-70 mm çapta, düz, sıkı yapıda, karakteristik bir yeşil renkte, ortası hifli, en dışta beyaz halkalı, arkadan sarımsı renkte koloniler oluşturmaktadır.

Konidioforları yüzey hifinden başlamakta ve 400 µm'den 1 mm'ye kadar farklı uzunlukta, renksiz ya da açık kahverengi, pürüzlü duvarlı olabilmektedir. Vesikülleri yuvarlak, 20-50 µm çaplı, tipik olarak hem metulae hem de phialidler taşımakta, ancak bazı izolatlarda sadece phialidler varken, bazılarında metulae ve phialidler aynı boyutta (7-10 µm) olabilmektedir. Konidiyumlar yuvarlak ya da küresel, genellikle 3.5- 5 µm çapında, kısmen ince duvarlı, pürüzlü ya da çok nadiren düz olabilmektedir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. *Aspergillus flavus* (a) YGC agarda kolonileri, 7 gün, 25-28°C; (b, c) kafa yapıları, bar=20 µm; (d) konidyumlar, bar=5 µm (b,c,d [7])

*A. flavus* ve *A. parasiticus* 25 ve 37°C'de hızlı büyümeleri ve açık sarı yeşil konidyum renkleriyle ayrılmaktadırlar. Bu iki tür arasında en belirgin farklılık *A. flavus* değişen şekil ve büyüklükte, nispeten ince duvarlı ve kısmen daha pürüzlü konidyumlar üretirken, aksine *A. parasiticus* konidyumları yuvarlak ve kısmen kalın ve pürüzlü duvarları vardır. Buna ek olarak, *A. flavus* vesikülleri daha geniş ve 50 µm'ye kadar çapa sahip ve genellikle metulae taşırken, *A. parasiticus* vesiküllerinin çapı nadiren 30 µm'yi geçmekte ve metulae nadir görülmektedir.

Bunlara ek olarak, *A. flavus* izolatlarının bazıları aflatoksin B ve bazıları siklopiazonik asit üretirken, *A. parasiticus* izolatlarının hepsi aflatoksin B ve G üretir ve siklopiazonik asit oluşturmaz. Bu farklılıklar hem bilimsel hem de ticari açıdan oldukça önemlidir. Ayrıca *A. parasiticus*'un coğrafi dağılımı *A. flavus*'a göre sınırlıdır. *A. flavus* bütün dünyada yaygın olarak bulunurken, *A. parasiticus* daha çok tropik iklim zonlarında görülmektedir.

*A. flavus* için bildirilen büyüme sıcaklıkları bazı farklılıklar gösterse de minimum 10-12°C, maksimum 43-48°C ve optimum 33°C en sık ifade edilen aralıklardır [7].

Büyümeye izin veren su aktivitesi değerleri de farklılıklar göstermektedir: 33°C 'de 0.78  $a_w$  [13], 25°C'de 0.82  $a_w$ , 30°C'de 0.81  $a_w$ , 37°C'de 0.80  $a_w$  [14] olarak bildirilmiştir. *A. flavus*'un gelişebildiği optimum pH aralığı 3.4-10 arası iken, 25, 30 ve 37°C'lerde 2.1-11.2 aralığında da gelişebildiği [15] ve pH 7.5'ta pik yaptığı gözlenmiştir [16]. Besiyeri pH değerini 4.5 'a ayarlamak için eklenen asetik asidin *A. flavus* konidiyumlarının çimlenmesini azaltırken, laktik asit ve hidroklorik asidin herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir [17].

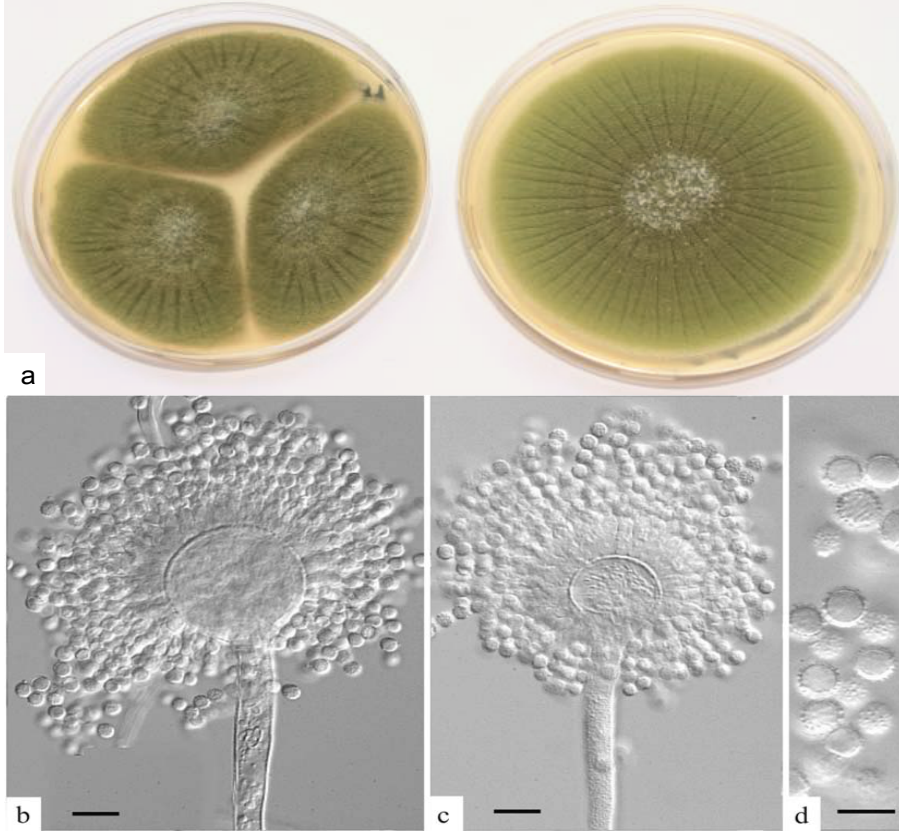
*A. flavus*'un sıcaklık dirençleri farklı koşullarda bir kaç araştırmacı tarafından çalışılmıştır. *A. flavus* sporlarının nötral pH ve yüksek  $a_w$ ' de  $D_{45}$  değeri 160 saatten fazla,  $D_{50}$  değeri 16 saat ve  $D_{52}$  değeri 40-45 dk olarak verilmiştir [18, 19].

### **2.1.2 *Aspergillus parasiticus***

YGC Agarda 50-70 mm çapta, düz, sıkı tabakalı, damarlı ve kadifemsi yapıda, yeşil renkte, en dışta beyaz halkalı, arkadan sarımsı renkte koloniler oluşturmaktadır.

Konidioforları yüzey hifinden başlamakta ve 250-500  $\mu\text{m}$  uzunlukta, renksiz ya da açık kahverengi, düz duvarlı olabilmektedir. Vesikülleri yuvarlak, 20-35  $\mu\text{m}$  çaplı, çoğunlukla sadece phialidler taşımakta, ancak bazı izolatların kafa yapısında (yaklaşık % 20) hem metulae hem de phialidler bulunmaktadır; phialidler 7-11  $\mu\text{m}$  uzunlukta olabilirken, konidiyumlar yuvarlak, genellikle 4- 6  $\mu\text{m}$  çapında, belirgin bir şekilde pürüzlü olabilmektedir (Şekil 2.3.).

*A. parasiticus* da *A. flavus* gibi 25 ve 37°C'lerde hızlı büyümekte ve konidiyumları ayırt edilebilir açık sarı yeşil renktedir. *A. parasiticus* yoğun, duvarları pürüzlü yuvarlak konidiyumlar üretirken, *A. flavus* konidiyumları şekilleri farklılık gösterebilir ve genellikle daha ince ve duvarları az pürüzlüdür.



Şekil 2.3. *Aspergillus parasiticus* (a) YGC agarda kolonileri, 7 gün, 25-28°C; (b,c) kafa yapıları, bar=10 µm; (d) konidiyumlar, bar=5 µm (b,c,d [7])

Kurtzman vd. (1986) *A. parasiticus* türünü *A. flavus* subsp. *parasiticus* statüsüne indirgemişir ancak, *A. flavus* altında değerlendirildiğinde iki ayrı tür ismi olarak devam ettirmek için ikna edici nedenler bulunmaktadır [20]. Bu iki tür, fizyolojik olarak çok benzediğinden *A. flavus* için yapılan çalışmalar büyük bir olasılıkla eşit bir şekilde *A. parasiticus* için de kabul edilebilir. *A. parasiticus* için büyüme sıcaklık aralığı 12-42°C ve optimum 32°C olarak bildirilmiştir [21]. Büyüme için gerekli minimum su aktivitesi, *A. flavus* ile aynı değerler olan 25°C'de 0.82  $a_w$ , 30°C'de 0.81  $a_w$ , 37°C'de 0.80  $a_w$  olarak bildirilmiştir [14]. *A. parasiticus*'un 25, 30 ve 37°C'lerde gelişebildiği pH aralığı 2.4-10.5 iken, 25°C'de pH 2.2 'de gelişmemektedir [15]. *A. parasiticus* gelişimini sentetik besiyerlerinde pH 5'te inhibe etmek için yüksek miktarlarda sorbik asit (1,000 mg/kg) gereklidir [22]. *A. parasiticus* konidiyumlarının sıcaklık dirençleri,  $D_{55}$  değeri % 16 NaCl ortamında (0.90  $a_w$ ) 230 dk, ortamda % 60 glukoz bulunduğu durumda (0.85  $a_w$ ) 210 dk ve % 60 sakaroz ortamında (0.90  $a_w$ ) ise 200 dk olarak verilmiş ve su aktivitesi azaldıkça D değerlerinin yükseldiği bildirilmiştir [23].

## 2.2 Mikotoksinler

Mikotoksinler, bazı küf türleri tarafından üretilen, bir çok işlenmiş ve işlenmemiş gıdada ve yemlerde bulunabilen, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden metabolitlerdir. Küfler gıdalarda gelişirken istenmeyen değişiklikler meydana getirerek bozulmaya sebep olabilirler. Bazı küf türleri yüksek sıcaklık ve bağıl nem gibi belirli koşullarda mikotoksin üretebilmektedirler. Mikotoksin üreten küfler toksijenik olarak tanımlanmaktadır. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* küflerinin bazı toksijenik türleri çok yaygın olmakla birlikte ciddi sağlık ve ekonomik problemlere sebep olmaktadır. Mikotoksinler akut, subakut ve kronik toksisite özelliklerini taşımakta ve karsinojenik (hassas organizmalarda mutasyona sebep olabileme), teratojenik (gelişen embriyolarda deformasyona neden olabileme), halüsinojenik, emetik ve östrojenik olabilmektedirler [24, 25]. Küfler tarafından çok çeşitli mikotoksinler üretilse de bunlardan aflatoksinler, okratoksinler, patulin, fumonisinler, zearalenon ve trikotesenler, sıklıkla gıdalarda karşılaşılan çeşitleridir [26].

Mikotoksinlerin çoğunluğu aromatik yapıda iken daha az bir kısmı ise alifatik bileşiklerden oluşmaktadır. Genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler, mikotoksin çeşidine, sıcaklık derecelerinde ve uygulama saatlerine göre farklı stabilite göstermektedirler. Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülmektedir.

Mikotoksinler içerisinde oluşum, toksisite ve ekonomik açılarından dünya üzerindeki en tehlikeli mikotoksin olan aflatoksinin temel kaynağı *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un toksijenik suşlarıdır. Doğada üretilen başlıca aflatoksinler B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> aflatoksinleridir. "B" ve "G" hafleri ince tabaka kromatografisinde UV ışığı altında verdikleri mavi (blue) ve yeşil (green) renkleri, 1 ve 2 alt indisleri ise major ve minor bileşikleri ifade etmektedir. Aflatoksinlerin kimyasal olarak bifuran halkası ve lakton bağı içeren kumarin derivatlarıdır.

Mikotoksin üretiminde *A. parasiticus*'un *A. flavus*'tan farkı, hem G hem de B aflatoksinlerini üretmekte ve hatta *A. parasiticus* genellikle aflatoksinleri daha yüksek konsantrasyonda üretmektedir [27] ve toksijenik olmayan *A. parasiticus* suşları çok nadir görülmektedir [28]. *A. parasiticus* siklopiazonik asit üretmez ancak günümüzde tıp ve kozmetikte geniş kullanım alanı olan kojik asit üretmektedir

[29]. *A. parasiticus*'un en iyi aflatoksin ürettiği koşullar 12-40°C ve pH 3-8 aralığı, 0.86 a<sub>w</sub>'ye kadar olarak verilmektedir [21].

Aflatoksinler hem akut hem de kronik olarak hayvan ve insanlar için toksiktir. Uzun zamandır bilinen oluşturduğu dört ayrı etkisi akut karaciğer hasarı, karaciğer sirozu, tümör ve tratojenik etki indüksiyonu olarak sıralanmaktadır [30]. Ancak, daha güncel araştırmalar, bağışıklık sistemini baskılayıcı ve protein alımına karışımı gibi uzun süre aflatoksine maruz kalmanın getirdiği sonuçların daha yaygın olduğunu göstermektedir [31].

Akut aflatoksin zehirlenmeleri çok yaygın olmasa da, yinelenen bir toplum sağlığı problemidir. 1974'te meydana gelen bir hepatit salgınına 15 mg/kg aflatoksin içeren *A. flavus* ile kontamine olmuş mısırın sebep olduğu ve 400 hintli etkilenirken 100 kişinin ölümüyle sonuçlandığı rapor edilmiştir [32]. Etkilenen yetişkenlerin günde 2-6 mg toksin tükettiği hesaplanmıştır. Yetişkin insanlarda akut ölümcül dozun 10 mg olduğu bildirilmiştir.

En geniş etki alanı ve şiddetli aflatoksikozis salgınlardan biri 2004'te doğu Kenya'da gerçekleşmiş ve 317 kişi etkilenirken 125 kişi ölmüştür. Bunu takiben 2005 yılında gerçekleşen ikinci bir salgında 25 kişi hayatını kaybetmiştir [33]. İlk salgından sonra yürütülen çalışmalarda, aflatoksin kaynağının küf ile kontamine olmuş mısırın sebep olduğu ortaya konmuştur [34]. Aflatoksin B<sub>1</sub>'in (AFB<sub>1</sub>) farklı hayvan türlerinde bilinen en kuvvetli karaciğer karsinojeni olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından Grup 1A insan karsinojeni olarak tanımlanmıştır [35].

Karaciğer kanseri etiyolojisinde aflatoksin ve hepatit B (HBV) virüsünün arasında güçlü bir sinerji olduğu gözlenmiştir [31]. HBV antijeni pozitif hastaların bağıl kanser riski aflatoksine maruziyeti ile birleştiğinde 5'ten 60'a yükselmiştir. HBV ve aflatoksinin birlikte olduğu bazı alanlarda, karaciğer tümörü olarak bilinen hepatoma baskın kanser ve hatta birincil ölüm sebebi olabilmektedir. Bilinen bu karsinojenite çok yüksek olduğundan gıdalarda miktarının belirlenmesi ve olabildiğince indirgenmesi için araştırmacıların elinden gelen herşeyi yapmaları gerekmektedir. Aflatoksin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> süt veren inekler tarafından alındığında, bir kısmı hidroksillenerek sütte ana bileşiklerden daha az toksisiteye sahip olan aflatoksin M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> olarak salgılanmaktadır. Birçok ülkede yürütülen çalışmalarda sütteki



aflatoksin varlığı analizlerinden pozitif sonuç elde edilmiştir ve bu nedenle süt veren hayvanların yemlerindeki aflatoksin miktarları ile ilgili katı limitler getirilmiştir [36].

Hayvanlarda akut seyreden aflatoksikozis vücutun direk etkilenen bölgesi karaciğerdir. Karaciğer paraneoplastik hücrelerinin hasar görmesi yanında, karaciğer ve safra kanallarında proliferasyon başlar, kanamalar görülür, sinir sistemi etkilenerek fonksiyonlarını yerine getiremez. Kramplar, felçler, denge bozuklukları meydana gelebilir. Özellikle genç hayvanların yemden yararlanmaları azalır, gelişme durur ve hızlı bir kilo kaybının ardından toksik hastalık ölümüyle sonuçlanır.

Kronik toksisite uzun sürede çok daha düşük dozlarda AFB<sub>1</sub>'in yemlerle tüketilmesi sonucunda karaciğer kanseri ve deformasyonları şeklinde ortaya çıkmaktadır. Gökkuşluğu alabalığında karaciğer kanserine neden olan günlük doz 0.5- 2.0 µg/kg, farelerde tümörün ortaya çıkmasına kadar günlük olan doz 10-15 µg/kg'dır. İnsanlarda AFB<sub>1</sub>'in akut toksik etkisinden ziyade kronik dozlarla ortaya çıkan karaciğer kanserlerinde önemli olduğu düşünülmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalar aflatoksin içeren gıdalarla beslenen kişilerde primer karaciğer kanserlerine ve karaciğer sirozlarına rastlanma olasılığının daha yüksek oranda olduğunu göstermiştir. Danimarka'da primer karaciğer kanseri % 0.18, Amerika Birleşik Devletlerinde beyaz Amerikalılarda % 1.7 iken, çoğunlukla yer fıstığı ile beslenen Bantus (Sudan) toplumunda % 14'tür [37].

Kwashiorkor, genellikle çocuklarda görülen protein eksikliğine bağlı gelişen bir hastalık olup Kuzey Afrika'da 5 yaş altı çocuklarda hastalık ve ölüm sebeplerinin başını çekmektedir. Hendrickse vd. (1982) ilk defa bu hastalığın aflatoksin alımı ile ilgili olabileceğini bildirmiştir [38]. Tanzanyadaki bir pediatrik servise göre, Kwashiorkor, AIDS ve septisemiden sonra en yüksek 3. ölüm oranına (% 43) sahiptir [39]. Aflatoksinlere kronik maruziyetin bu hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir [40, 41]. Hatem et al. (2005), kwashiorkor hastası olan çocukların % 80'inin serumunda aflatoksin varlığını bildirmiştir [42].

Okratoksinler üç ana küf türü tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir; *A. ochraceus*, *P. verrucosum*, ve *A. carbonarius* [43]. Okratoksin A ve B gıda ve yemlerde bulunan okratoksin türleridir. Okratoksin A, fenilalanine bağlanmış bir amid halkasına sahip klorlu bir izokumarin türevidir. IARC (1993) okratoksin A'yı insanlarda potansiyel karsinojenik ajan olarak tanımlamıştır [35].

Patulin akut toksik, teratojenik ve potansiyel karsinojenik etkileri olan bir başka mikotoksindir. Kimyasal yapıları oldukça reaktif ve doymamış beş karbonlu lakton halkası içermektedir. Patulin kontaminasyonu en çok elma suyunda görülmektedir [44].

Gıda ve yemlerdeki mikotoksin düzeyleri bir çok ülkede yasal olarak kısıtlanmıştır. Yasal limitler gıdanın çeşidine ve prosese göre değişiklik göstermektedir. Avrupa Birliği yasal düzenlemelerine göre bazı gıdalardaki aflatoksin limitleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir [45, 46]. Türkiye'de uygulanan yasal limitler benzerlik gösterse de bazı ürünlerde izin verilen aflatoksin miktarı daha yüksek tutulmuştur (Ek-1).

Çizelge 2.1. Avrupa Birliği tarafından izin verilen bazı gıdalardaki aflatoksin limitleri

Aflatoksin	Maksimum düzey ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	B <sub>1</sub>	Toplam (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> ve G <sub>2</sub> )	M <sub>1</sub>
Doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan			
Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar	8	15	-
Badem, fıstık ve kayısı çekirdeği içi	12	15	-
Fındık, Brezilya cevizi	8	15	-
Diğer sert kabuklu meyveler	5	10	-
Kurutulmuş meyveler	5	10	-
Mısır ve pirinç	5	10	-
Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan			
Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar	2	4	-
Badem, fıstık ve kayısı çekirdeği içi	8	10	-
Fındık, Brezilya cevizi	5	10	-
Diğer sert kabuklu meyveler	2	4	-
Kurutulmuş meyveler	2	4	-
Diğerleri			
Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0.050
Diğer tahıllar ve bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	2	4	-
Baharatlar; - Kırmızı biber ( <i>Capsicum spp.</i> ) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) - Karabiber ( <i>Piper spp.</i> ) (bunların meyveleri, ak biber, karabiber dahil) - Hindistan cevizi/Muskat ( <i>Myristica fragrans</i> ) - Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ) - Zerdeçal ( <i>Curcuma longa</i> ) - Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5	10	-
İşlenmiş tahıl bazlı bebek ve küçük çocuklar ek gıdaları	0.10	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0.025
Bebeklere için tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0.10	-	0.025
Kurutulmuş incir	6	10	-

Mikotoksin probleminden kaçınmak için en doğru yol fungal kontaminasyon ve toksin üretimini engellemek olsa da ürün bir kez kontamine olduğunda dekontaminasyon prosedürleri kaçınılmazdır. Mikotoksinlerin degradasyonu için bir kaç metot test edilmiştir ancak spesifik dezavantajlarından dolayı çoğu pratikte uygulanabilir değildir. Bu nedenle gıda endüstrisi mikotoksin degradasyonunda etkili ve prosese uygulanabilir uygulamaların arayışı içindedir.

1960'larda yüz bin hindinin ölümüyle sonuçlanan *A. flavus*'un ürettiği aflatoksinle kontamine olmuş yemlerin sebep olduğu salgından bu yana bir çok çeşitli ürün potansiyel mikotoksin kontaminasyonu açısından test edilmiştir [26]. 2007 yılında Avrupa Birliği'nin Gıda ve Yemlerde Hızlı Alarm Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed-RASFF) 705'l aflatoksinler ve 30'u okratoksin A ile ilgili olmak üzere toplamda 754 mikotoksin ihbarı almıştır. Aflatoksin ihbarları çoğunlukla fıstık, yer fıstığı, fındık, badem, kuru incir ve baharatlar ile ilgili gelmiştir. Okratoksin A kontaminasyonları ise kırmızı toz biber, kuru incir ve kuru üzümde rapor edilmiştir [47].

Gıdalarda mikotoksin kontaminasyonu insan ve hayvan sağlığının yanı sıra uluslararası ticarete de tehdit oluşturmaktadır. İnsanların bu tehlikeli maddelere maruz kalmasını en aza indirmek için gıda ürünlerinin mikotoksinlerle kontaminasyonu makul bir seviyeye indirgenebilmelidir. Ancak, tarım ürünlerinin üretim alanlarındaki yüksek nem ve sıcaklık, ani gelen yağmurlar gibi doğal koşullardan dolayı bu hedefe ulaşmak kolay değildir [48]. Bu nedenle gözetim programları sürekli olarak gerçekleştirilmelidir. Kontaminasyonu önlemek ve toksinli ürünleri dekontamine etmek için yeni metotlar üzerinde çalışılmakta ve mevcut yöntemleri daha etkili ve güvenli hale getirerek optimizasyonu yapılmaktadır. Mikotoksinlerle kontamine olan ürün hacmi ve pazar payı göz önünde bulundurulduğunda etkili ve güvenli dekontaminasyon metotlarına acilen ihtiyaç duyulduğu açıkça görülmektedir.

### **2.3 Gıdalardan Küf Dekontaminasyonu ve Mikotoksin Detoksifikasyonu**

Mikotoksinler, başlıca *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* cinsi küflerin salgıladıkları sekonder metabolik ürünlerdir [49, 50]. Tahıl ve kuru yemişlerin mikotoksin ile kontaminasyonu tarlada filamentöz (lif şeklinde) küflerle başlayabilmekte, hasat ve hatalı kurutma işlemleri ile artabilmekte, depolama ve nakliyat sırasında da birikmeye devam edebilmektedir [24]. *Aspergillus* ve

*Penicillium* türleri genellikle kurutma ve depolama sırasında gıdada kontaminant olarak bulunurken, *Fusarium* ve *Alternaria* türleri hasattan önce ve hemen sonra mikotoksin üretebilmektedir [51]. Bugüne kadar 100'den fazla küfün ürettiği yaklaşık olarak 400 adet toksijenik potansiyeli olan sekonder metabolit varlığı tespit edilmiş ve Gıda ve Tarım Örgütü'nün (Food and Agriculture Organization (FAO)) tahminine göre dünyanın tarım ürünlerinin % 25'i kadarında küf kontaminasyonunun önemli ekonomik kayıplara yol açtığı bildirilmiştir [52-55]. Mikotoksinler toksijenik küflerin öncelikle miselyumlarında oluşur ve sporlarında da bulunabilir [56] ve tüketildiklerinde yüksek yapılı omurgalılarda ve diğer hayvanlarda mikotoksikozis adı verilen toksijenik tepki verir [57]. Bu sekonder metabolitler büyümenin üssel (exponential) fazının sonunda sentezlenmektedirler [56, 58].

Mikotoksin alınımının insan ve hayvanlardaki toksik etkisi alım düzeyi, maruz kalma süresi, toksin türleri, etki mekanizması, metabolizma ve savunma mekanizması gibi birkaç faktöre dayanmaktadır [54, 58]. Mikotoksinle kontamine olmuş gıda veya yemlerin tüketimi ise insan ve hayvanlarda teratojenik, kanserojen, östrojenik, nörotoksik ve immunosupresif etkileri başlatır [59]. Mikotoksinler içerisinde hem toplum sağlığı hem de agronomi açısından en önemlileri aflatoksinler, trikotesen, fumonisins, okratoksin A, patulin, tremorjenik toksinler ve ergot alkaloidlerini kapsamaktadır [54, 58, 59].

Yabani fındık çeşitleri, *Corylus* cinsi, kuzey yarım kürenin çoğu bölgesine dağılmış olsa da, başlıca fındık üreticisi ülkeler Türkiye, İtalya, İspanya ve Amerika Birleşik Devletleri'dir [60]. Türkiye dünya fındık üretiminin % 75'ini gerçekleştirmekte (250,000 - 300,000 ton/yıl) ve üretiminin % 75'ini ihraç ettiğinden, lider üretici ve ihracatçı konumundadır [61]. Fındıkların % 80'i çikolata yapımında, % 15'i pastacılık, şekerleme ve bisküvi üretiminde, kalan %5 ise herhangi bir işlem yapılmadan direk tüketilmektedir. Fındıklar, % 78-81 bağıl nem ve 20-30°C'lerde depolandıklarında *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri tarafından aflatoksin ve ergosterol üretiminde iyi bir substat görevi görmektedirler [62]. Yapılan bir araştırmada Türkiye'den ihraç edilen fındıklarda, 142 örneğin % 8'i 2-100 µg/kg aralığında ortalama 33 µg/kg aflatoksin pozitif çıktığı rapor edilmiştir [63]. Üreticilerden elde edilen mısırdada da benzer sonuçlar alınmıştır [25]. Bu sonuçlar

fındıklarda aflatoksin miktarını azaltmak için daha sıkı denetimlerin yapılması gerektiğini göstermektedir.

Bu mikotoksinlerin hasar verici etkilerinden dolayı mikotoksijenik küflerin gelişimini engellemenin yanı sıra dekontaminasyonu ve/veya kontamine gıdalarda mikotoksinlerin detoksifikasyonu için bazı stratejiler geliştirilmiştir [64]. Bunlar üç başlık altında toplanabilir:

- Mikotoksin kontaminasyonunun engellenmesi
- Gıda ve yemlerdeki mikotoksinlerin detoksifikasyonu
- Gastrointestinal kanalda mikotoksin absorpsiyonunun engellenmesi

### **2.3.1 Mikotoksin Kontaminasyonunun Engellenmesi**

Mikotoksin kontaminasyonu hasat öncesi, hasat sırasında ve depolama ya da işleme sırasında gerçekleşebilir [50, 65]. Bu nedenle mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesi için uygulanan metodlar hasat öncesi, hasat ve hasat sonrası olarak üç başlık altında incelenebilir. Belirli uygulamaların spesifik mikotoksinlerin kontaminasyonunu azalttığı belirlense de mikotoksin kontaminasyonunun tamamen ortadan kaldırılması şu anda gerçekte mümkün değildir.

Mikotoksinlerin belirli gıdalarda önlenmesi ve azaltılması için Kodeks Alimentarius tarafından birkaç uygulama geliştirilmiştir. Bu uygulamaların etkili olabilmesi için her ülkedeki üreticilerin yerel ürünlerini, iklim koşullarını ve agronomik uygulamaları göz önünde bulundurarak genel prensipleri değerlendirmelidir. Tahıllarda belirli mikotoksinlerin azaltılması için öneriler iki bölüme ayrılmıştır: İyi Tarım Uygulamaları (Good Agricultural Practice- GAP) ve İyi Üretim Uygulamaları'na (Good Manufacturing Practice- GMP) dayanan önerilen uygulamalar Kritik Kontrol Noktalarında Risk Analizinde (Hazard Analysis Critical Control Point –HACCP) faydalanılan tamamlayıcı bir yönetim sistemidir [66].

#### **2.3.1.1 Hasat Öncesi Kontrol Stratejileri**

Tarım ürünlerinin depolamada olduğu kadar tarlada da mikotoksin ile kontamine olabileceği ortaya konmuştur [67, 68]. *Fusarium* ve *Alternaria* gibi fitopatojenik küfler hasattan önce veya hemen sonrasında mikotoksin üretebileceğinden, biyolojik ve kültürel kontrol uygulamalarını da içeren birkaç strateji geliştirmiştir.

Hasat öncesi kontrol stratejileri mikotoksinleri önleme ve indirgemedede farklı ürünlerde kullanımlarına göre (hububat, fındık, meyve, vd.) değişiklik gösterebilir.

Hububatlarda farklı türlerin mikotoksin kontaminasyonuna karşı hassasiyetleri değişebilmektedir [69]. Bir ülkenin belirli bir alanında kullanımı önerilen tohum çeşitleri bu spesifik alanda kullanılmalıdır [66]. 1970'lerin başından itibaren, aflatoksijenik küf gelişimi ve aflatoksin biyosentezini kontrol altına alabilmek için, hem laboratuvar hem de saha çalışmalarıyla genetik olarak dayanıklı ürün genotipi araştırmaları yapılmaktadır [68, 70, 71]. Bu çalışmalar *Aspergillus flavus* enfeksiyonuna ve mikotoksin üretimine karşı dayanıklı iyi karakterize edilmiş kaynakların tanımlanmalarına yol açmıştır [72]. Ürün rotasyonu, toprak işleme, sulama ve gübreleme yaklaşımları gibi uygun saha yönetimi uygulamalarının mikotoksin oluşumunu etkilediği bilinmektedir. Örneğin sulama için kullanılan suyun ülkedeki yasal düzenlemelere uygun kalitede olması gerekmektedir. Bağıl nem ve sıcaklık gibi çevresel koşulların küflerin bitkilerde oluşturduğu hastalıkları başlatmada önemli etkileri vardır. Ayrıca çevredeki arazilerde *A. flavus/parasiticus* ile kolaylıkla enfekte olabilen ürünler yetiştirilmemelidir, çünkü rüzgar ve böcek gibi faktörlerle bu sporlar kolayca çevreye taşınıp enfeksiyon sebebi olmaktadır. Mikotoksin kontaminasyonunu önlemek için, tahılların hasadının düşük nem içeriği ve tam olgunluk zamanına göre planlamak önemli bir kontrol noktası olabilir, aksi halde tahılın olgunlaşmaya devam etmesine izin verilirse aşırı derecede ısı, yağmur veya kuraklık koşullarına maruz kalacaktır. Hasadı ertelenen tahıl hali hazırda *Fusarium* türleri tarafından enfekte olmasının tanelerdeki mikotoksin içeriğinde büyük artışlara sebep olduğu bilinmektedir [66].

Tarım ürünlerinin toksijenik küf invazyonuna duyarlılığını artırdığı bilinen bir başka faktör de böcek, kuş veya kemirgenlerin yol açtığı hasarlardır [73]. Böcek hasarı ve küf enfeksiyonu, izin verilen insektisidler, fungusitler ve diğer uygun uygulamaların doğru bir şekilde kullanılmasıyla kontrol edilmelidir. Avrupa Birliği'nde, fungusitlerin kullanımına izin verilmeden önce çevre ve insanlara karşı toksik olmadığı gösterilmesi gerekmektedir. Fungusit uygulamalarının doğal olarak enfekte olmuş tarlalarda toksin sentezini önleme veya azaltmada etkili olduğu açıkça gösterilmiştir [74].

Alternatif olarak, *Fusarium* enfeksiyonlarının kontrolünde belirli sayıda biyokompetitif mikroorganizmalarının kullanımı gösterilmiştir. Antagonistik bakteriler ve mayalar hasat öncesi mikotoksin kontaminasyonunda azalmaya sebep olabilmektedir. Örneğin, *Bacillus subtilis*'in endofitik büyüme fazında *F. verticilloides*'in sebep olduğu mikotoksin kontaminasyonunu azalttığı ortaya konmuştur. *Cryptococcus nodaensis* gibi antagonistik mayaların da bazı *Fusarium* türlerini inhibe ettiği gösterilmiştir [68]. Diamond ve Coke (2003) sera çalışmalarında buğday başaklarının antezi (tozlanma) sırasında *Phoma betae* ve *Pythium ultimum* ile ön inokülasyonunun *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* ve *M. nivale* türlerinin neden olduğu hastalık gelişimini ve şiddetini indirgediğini ortaya koymuştur [75].

Tarım ürünlerinde aflatoksin kontrolü hasat öncesinde başlamalıdır [76]. Kurallara uygun ekim ekin, yağlı tohum ve fındıkların özellikle kabuk ve tomurcuklarında bulunan fitik asit yardımıyla bitkileri fungal invazyona karşı korumaktadır [77]. Mikotoksin üretimini engelleyen ve böcek hasarına karşı dirençli (küf üretimini de durduran) bitki çeşitleri yardımcı olmaktadır [78]. Uygun sulama ve haşereyle mücadele ile kuraklık ve böcek hasarı gibi çevresel stresler minimize edilmelidir. Ürün rotasyonu, nadasa bırakılmış toprağın kullanılması, yüzeydeki ölü örtünün derine gömülmesi ve düzgün hasat etkili bir şekilde aflatoksinin tekrar oranını azaltmaktadır [79, 80]. Ürünün toprağa ekiminden önce toprak üzerindeki kirlilik daha önce mikotoksin üreten küflerin gelişimi için substrat görevi görmüş olabileceğinden dolayı uzaklaştırılmalıdır. Yer fıstığına yetiştirme sırasında alçıtaşı formunda kalsiyum uygulaması aflatoksin kontaminasyonunu azaltan, kalite, verim ve çimlenme özelliklerini artıran ekonomik bir metot olabileceği kısıtlı alan uygulamalarıyla kanıtlanmıştır [80].

Alternatif bir yaklaşım olarak toprağa toksijenik olmayan ve oldukça kompetitif bir *A. parasiticus* (biyokompetitif ajan) suşu eklenerek biyolojik rekabet ile kontaminasyonun biyolojik kontrolü gerçekleştirilmektedir. Böylelikle aflatoksin oluşturan, saf *A. flavus* ve *A. parasiticus* suşlarının gelişmesi engellenmektedir [81, 82].



### **2.3.1.2 Hasat Yönetimi**

Mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesi için bitkilerin ideal olgunlukta hasatının yapılması ve bu sırada tarım ürünlerine zarar vermekten kaçınılması gerekmektedir [83]. Fungal kontaminasyon ve böcek istilasının sebep olduğu hastalıkları en aza indirmek için fındıkların olgunlaştığında olabildiğince pratik bir şekilde yapılmalıdır. Bazı fındık türleri hala ağaçta iken böcek istilası ve kabuk ayrılması gibi sebeplerden dolayı aflatoksinle kontamine olmaktadır. Bu nedenle hasadın erken yapılması, dış kabuk ürünü böceklerden ve küf sporlarından koruduğu için kontaminasyon riskini azaltmaktadır [84]. Fiziksel olarak hasar görmüş taneler fungal üremeye oldukça hassas olduğundan, hasat sırasında tarım ürünlerine fiziksel zarar vermekten mümkün olduğunca kaçınılmalıdır [85]. Fındıkların hasadı ağaçlar sallanarak yapılıyorsa, ürünlerin yere düşerek fiziksel zarar görmesi ve eğer hayvanların otlatılması için kullanılıyorsa fekal kontaminasyonu önlemek amacıyla ağaçların altına koruyucu bir örtü serilmeli ve sonrasında ürün elle toplanmalıdır. Ürün toplandıktan sonra hasar görmüş, kemirilmiş, boş, çürümüş veya acılaştırmış fındıklar, yabancı materyaller ayrılmalıdır. Yağmur sonrası mevsimde ve kuraklık stresi altında yetiştirilmiş olsa da, zarar görmemiş yer fıstığı tohumlarında daha düşük aflatoksin kontaminasyonu riski taşıdığı belirtilmiştir [86]. Kuru havalarda hasat gerçekleştirildiğinde, genellikle mikotoksin kontaminasyonu problemi olmamaktadır. Ancak, hasat nemli bir havada yapılırsa oldukça problem oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde, yetersiz kurutma ekipmanı ve nemli atmosferik koşullar birleştiğinde hasat edilen yer fıstıklarında, fındıklarında ve diğer gıdalarda kabul edilemez düzeylere ulaşmaktadır [87]. Antep fıstıklarında kabuğun yarıma seviyesine bağlı olarak hasat zamanı önemli olabilmekte ve aflatoksin üreten küf ile kontaminasyonu en aza indirgenebilmektedir [88]. Türkiye’de fındıkların hasatı sırasında kullanılan sıırıklar tanelere hasar verebileceğinden, aflatoksijenik küf invazyonuna daha yatkın olmaktadır [89].

### **2.3.1.3 Hasat Sonrası Kontrol Stratejileri**

Mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesinde hasat sonrası stratejileri ışınlama, doğal ve kimyasal ajanların kullanımı ile birlikte geliştirilmiş kurutma ve depolama koşullarını içermektedir.

Depolama sırasında aflatoksinin önlenmesinde birincil hedef üründe küf gelişimini engellemektir. Depolama süresince nem içeriği ve sıcaklığa bağlı olarak değişen ürünün su aktivitesi dikkatlice kontrol edilmelidir. Yüksek nem ve sıcaklığın aflatoksin kontaminasyonu olasılığını artırdığı belirtilmiştir [90]. Depolama ve transfer sırasında aflatoksin kontaminasyonundaki artışı önlemek için nem içeriği, çevre sıcaklığı ve hijyenik koşulların kontrolü önem taşımaktadır. Aflatoksin üreten *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri su aktivitesi 0.70'in altında, bağıl nem % 70'in altında ve sıcaklık değeri 10°C'nin altında gelişmemekte ve aflatoksin üretememektedir. Kuraklık veya böcek hasarı gibi stres koşullarında ise aflatoksin kontaminasyonun daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Genellikle sıcak ve nemli depolama koşulları gıdalarda küf gelişimine ve yüksek düzeylerde aflatoksin kontaminasyonuna sebep olmaktadır [84]. Yer fıstıklarında *A. flavus* gelişimi için minimum nem içeriği % 8-10 ve bağıl nem % 82 iken, aflatoksin üretimi optimum % 15-35 nem içeriğinde gerçekleşmektedir [91]. Stabilitiyi artırmak ve Aspergilli kontaminasyonundan kaçınmak için, yer fıstıkları kabuklarından ayrılmalı ve hasattan sonra mümkün olduğunca kısa sürede, genellikle 48 sa içerisinde, 25°C'de 0.70 a<sub>w</sub> değerine denk gelen % 5-7 nem içeriğine kurutulmalıdır [92].

Depolama sırasında ürünün hızlıca kurutulmasının aflatoksin kontaminasyonunu kontrol etmede yardımcı olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca depolanan ürünlerin nem içeriğinin artmasının küf invazyonunu kolaylaştırdığı da bildirilmiştir [93]. Asya, Afrika ülkeleri ve Türkiye gibi Avrupa ülkelerinde hasat edilen çok düşük nem içerikli ürünlerde bile aralıklı yağmur ve çığ sonucu nem zararı oluşabilmektedir [94]. Buna bir örnek olarak, Türkiye'deki Antep fıstıkları hasat sonrası güneşte kurutulsalar da yüksek nem koşullarında silolarda depolanmaları sonucu bazen aflatoksijenik küf ile kontamine olabilmektedir [89]. Göz önünde bulundurulması gereken bir başka faktör ise depolama sırasında küf gelişimi gerçekleşirse, metabolik aktivite sırasında nem açığa çıkacağından başka küf türlerinin de gelişimine ve dolayısıyla OTA gibi başka mikotoksinlerin de üretimine neden olacaktır [95].

Kontamine partilerin ayrılması ve gerekli depolama metotları ile olası kontaminasyonların önlenmesi aflatoksin kontrolünü geliştirmede yardımcı olabilir [96]. Aflatoksin riski hasat sonrası uygulamalarla kısmen azaltılabilir. Elektronik renk ayırma ile aflatoksinle kontamine olmuş partilerin % 72'sini uzaklaştırabilirken, elle ayırma daha seçici olsa da oldukça zaman alıcıdır. Kontamine mısırların

yoğunluğa dayalı yöntemle ayrılması mümkündür ancak ek olarak bir kurutma işlemi gerektirmektedir [97]. Pnömatik ayırma ve hava ile sınıflandırma sadece fındıklar için pratik olarak kullanılabilir [98].

Mikotoksin üreten küfler zorunlu aerob olduklarından, mikotoksin üretimi depolama silolarında karbondioksit, azot, karbon monoksit ve sülfür oksit gibi modifiye atmosfer gazlarla önlenmektedir ya da en azından azaltılabilmektedir. Yer fıstıklarında yapılan bir çalışmada silolarda depolama sırasında karbon dioksit konsantrasyonu artırıldığında aflatoksin üretimini önemli azalmalara sebep olduğu bildirilmiştir [99].

### *Doğal ve Kimyasal Ajanların Kullanımı*

Çeşitli doğal ve kimyasal ajanların hem mikotoksijenik küf gelişimini hem de mikotoksin oluşumunu engellediği bilinmektedir. Örneğin, hidrojenfosfid (fosfin), hububatları böcek ve küf invazyonuna karşı korumak için kullanılan oldukça toksik bir gazdır ve 1000-2000 mg/kg konsantrasyonlarının *A. flavus/parasiticus* gelişiminin inhibisyonu ve mikotoksin biyosentezini önlenmesinde etkilidir [100, 101]. Küf gelişimi ve mikotoksin biyosentezi üzerinde fungusitlerin etkisi kimyasal türü, uygulama süresi, ürün çeşidi, fungal türler ve depolama koşulları gibi birkaç faktöre bağlıdır [65]. Diklorvos, landrin, malatyon ve diazinon gibi diğer fungusitler de AFB<sub>1</sub> oluşumunu engellemede etkilidirler [70, 102]. Fungusitlere ek olarak iprodione (3-(3,5-diklorofenil)-N-(1-metiletil)-2,4-dioksa-1-imidazolidin karboksiamid) tarımsal ürünlerde çeşitli *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Botrytis*, *Didymella*, *Rhizoctonia* ve *Sclerotinia* küf türlerinin gelişimini önlemede etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak, besiyerinde 5 µg/g iprodione konsantrasyonunun, *A. parasiticus* gelişimini baskıladığı ve *A. flavus* ile *A. ochraceus*'un aflatoksin ve OTA üretimini % 50 oranında azalttığı bildirilmiştir [103, 104].

Herbisit uygulamalarının da mikotoksijenik küf gelişimini ve takiben mikotoksin üretimini etkilediği gösterilmiştir. Glufosinat amonyumun (butanoik asit, 2-amino-4-(hidroksimetilfosfil)-amonyum tuzu) 2000 µg/mL konsantrasyonunda *A. flavus* gelişimini engellediği ve AFB<sub>1</sub> oluşumunu % 90 azalttığı gözlenmiştir [105].

Sorbik asit ile sodyum ve potasyum tuzları, sodyum benzoat aflatoksijenik küf gelişimini ve aflatoksin üretimini engellediği bir çok çalışmada kanıtlanmıştır [22, 106-108]. Sodyum benzoatın % 0.4 konsantrasyonunda kullanıldığında *A. parasiticus* tarafından AFB<sub>1</sub> üretimini % 25 azalttığı ortaya konmuştur [108]. Etil veya metil benzoatın % 0.02 konsantrasyonunda aflatoksin biyosentezini % 78, *A. flavus* gelişimini ise % 61 oranında azalttığı bildirilmiştir [109].

Lipofilik ve hidrofilik etkileri olan yüzey aktif moleküllerin aflatoksijenik küf gelişimi ve aflatoksin biyosentezini etkilediği gösterilmiştir. Triton X-100, Tergitol NP-7, Tergitol NP-10, polioksietilen 10 lauriler, Latron AG-98 (% 1 w/v) aflatoksin üretimini % 96-99 oranlarında azalttığı bildirilmiştir [110]. Ağır metal iyonlarının sodyum selenit ve potasyum tellürit formunda (% 0.05-4) aynı etkileri gösterdiği bildirilirken, bu yaklaşımın gıda ve yemlerde olası ağır metal kontaminasyonu sebebiyle kullanımı mümkün değildir [111]. Özellikle hasat sonrası mikotoksin oluşumunu engellemek için antagonistik bakteriler, küfler ve mayaların kullanımı umut verici alternatif bir metottur. Antagonistik mayalardan *Pichia anomala* ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanımının buğdaylarda OTA birikimini azalttığı hem in vitro hem de model depolama koşullarında ortaya konulmuştur [112]. Başka bir çalışmada ise, *Phoma* spp., *Mucor* spp., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma* spp. 639, *Rhizopus* spp. 663, *Rhizopus* spp. 710, *Rhizopus* spp. 668, *Alternaria* spp. gibi küf türlerinin aflatoksin biyosentezini % 90 azalttığı bildirilmiştir [113]. *Bacillus pumilis* izolatlarından elde edilen ekstraselüler metabolitlerin *A. parasiticus*'un aflatoksin üretimini % 98-99 oranında engellediği bildirilmiştir [114].

Son yıllarda alternatif olarak laktik asit bakterilerinin ve antifungal metabolitlerinin mikotoksijenik küf gelişimini ve mikotoksin üretimini engelleyen doğal koruyucular olduğu ortaya konmuştur [115, 116]. Laktik asit bakterileri, yıllardır gıdalarda kullanıldığından ve genellikle güvenli kabul edilen (GRAS) olarak tanımlandığından özellikle koruyucu organizmalar olarak ilgi çekmektedir. Laktokok türlerinden izole edilen herhangi bir bileşik gıdaları bozulmaya sebep olan küflerin gelişimine ve mikotoksin kontaminasyonuna karşı koruyucu olarak kullanılabilir. Laktik asit bakterilerinin pek çok durumda antifungal ve antimikotoksijenik potansiyelleri tam açıklanamasa da, mikotoksin sentezi inhibisyonunun mikrobiyel rekabet, besin maddelerin tüketimi, düşük pH ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen düşük

molekül ağırlıklı, termostabil metabolit üretimi ile gerçekleştiği düşünülmektedir [117, 118].

Yapılan ilk çalışmalarda, *Lactobacillus casei* suşunun *A. parasiticus*'un hem gelişimini hem de aflatoksin üretimini inhibe edici antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [119]. Bir başka çalışmada, *A. flavus*'un aflatoksin üretiminin belirgin bir şekilde *Streptococcus lactis* tarafından azaltıldığı ortaya konmuştur [120]. *Lb. casei pseudopiantarum* 371 suşunun AFB<sub>1</sub> ve AFG<sub>1</sub> üretimini % 80 ve % 92 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir [121]. Corsetti vd. (1998) *Lb. sanfrancisco* CBI suşunun kaproik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumu sonucu bozulmaya sebep olan küflerden *Monilia*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine karşı antifungal etkisi olduğu ortaya koymuştur [122]. Yapılan başka bir çalışmada, *Lactobacillus plantarum*'un zeytinlerin yüzeyine tutunarak bir biyofilm oluşturduğu ve oksijen rekabeti ile maya ve küflerin gelişimini engellediği taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile ortaya konmuş ve AFB<sub>1</sub> üretimini % 46, küf gelişimini % 86 azalttığını bildirilmiştir [123].

Doğal bitki ekstraktlarının da küf gelişimini ve mikotoksin üretimini önlediği bilinmektedir. Özellikle Mısır'a özgü bitkilerden *Lupinus albus* (baklagiller), *Ammi visnaga* (maydanozgiller) ve *Xanthium pungens* (Compositae) ekstraktlarının doza bağlı olarak *A. flavus*'un ürettiği aflatoksini inhibe ettiği gösterilmiştir [124]. Yapılan bir çalışmada *Ocimum basilicum* (fesleğen), *Syzygium aromaticum* (karanfil), *Thymus vulgaris* (kekik) ve *Cinnamomum zeylanicum* (tarçın) türlerinin yağlarının mısır çekirdekleri üzerinde *A. flavus* gelişimini engellediği [125], benzer bir çalışmada ise tarçın, keklikotu, hindistan cevizi, muskat ve zerdeçal yağlarının *A. parasiticus* ve *F. moniliforme* türlerine karşı antifungal aktivite gösterdiği ve bu inhibisyon etkisinin kumarin ve flavonoidler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir [126]. *A. parasiticus*'un AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> ve AFG<sub>2</sub> üretiminin 0.1 µg/mL karanfil yağı konsantrasyonunda tamamen inhibi edildiği, 0.2 µg/mL ile muamele edildiğinde ise AFG<sub>1</sub> üretiminin % 66 ve *F. moniliforme* tarafından üretilen fumoisin B<sub>1</sub>'in % 78 azaltıldığı ortaya konmuştur [127].

Gıdalarda küf gelişimini ve mikotoksin üretimini engelleyen toksik kimyasal ajanların kullanımına izin verilmemekle birlikte biyolojik ajanların da kullanımı pratikte mümkün değildir. Yapılan çalışmalar genellikle model ortamlarda ya da sulu

çözümlerde uzun inkübasyon periyodları sonucunda gerçekleştirilmiştir ve herhangi bir gıda örneğinden mikotoksinlerin uzaklaştırılmasında kullanımının etkisi araştırılmamıştır. Ayrıca, güvenli gıda eldesi birincil hedef iken, ürünü başka bir mikrobiyolojik tehlike ile karşı karşıya getirmek ve bu durumun ürünün duyu özelliklerine olan etkileri pratikte problemler oluşturabilmektedir.

### *Işınlama*

Radyasyon tipik olarak iyonize (IR) veya iyonize olmayan (NIR) olarak kategorize edilmekte ve IR kendi içerisinde X-ışını, gama ışınları ( $\gamma$ ) ve NIR ise UV ışınları, mikrodalga ışınları, infrared ışınları ve radyo dalgalarını içermektedir. Işınlanmış gıdaların güvenliği konusunda tartışmalar devam etse de çeşitli gıdaların sterilizasyonunda daha sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [128]. 1980 yılında Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)/ Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA)/ Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Gıda Işınlama Uzman Komitesi (JECFI), ortalama 10 kGy'e kadar ışınlanmış gıda ürünlerinin tüketilmesinde herhangi bir toksikolojik tehlike, mikrobiyolojik veya besinsel problem olmadığını bildirmişlerdir [129]. Bu nedenle, bir çok çalışmada depolama sırasında küf gelişimi ve mikotoksin biyosentezini engellemek için gama ( $\gamma$ ) ışınları kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, tavuk yemlerinde *A. ochraceus*'ün gelişimi ve okratoksin üretiminin 4 kGy ışınlama dozuyla inhibisyonu [130], 3 kGy ışınlama dozunun 45 gün depolama süresince *A. flavus* tarafından üretilen AFB<sub>1</sub>'in inhibisyonu için yeterli olduğu ancak daha düşük dozlarda (2 kGy), aynı depolama süresinde 52.2  $\mu$ g/kg AFB<sub>1</sub>'in üretildiği bildirilmiştir [131]. Ancak her küf türüne karşı ışınlamanın aynı etkiyi göstermediği, UV ışınlarının *A. flavus* EP-63 ve *A. ochraceus* P-153 suşlarının AFB<sub>1</sub> ve OTA sentezini teşvik ettiği Aziz ve Smyk (2002) tarafından ortaya konmuş [132] ve ışınlamanın küf gelişimi ve mikotoksin biyosentezini engelleme etkisinin hem suşa hem de doza bağlı olduğu kadar nem ve depolama koşullarından da etkilendiği bildirilmiştir [55].

### **2.3.2 Gıda ve Yemlerdeki Mikotoksinlerin Detoksifikasyonu**

Gıda ve yem amaçlı kullanılacak ürünlerde, hasat sırasında ya da hasat sonrası ve depolama sırasında mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesi her zaman mümkün olmayabilir [133]. Bu nedenle mikotoksinlerin toksik ve karsinojenik etkilerini önlemede çeşitli detoksifikasyon prosesleri önemli rol oynamaktadır. Mikotoksinlerin

detoksifikasyonu kontamine ürünlerin ayrılması ya da ürünlerdeki toksinlerin fiziksel, kimyasal ya da biyolojik metotlarla inaktive edilmesi ile gerçekleştirilmektedir [134]. Bunun yanısıra, ürünlerin kimyasal yöntemlerle detoksifikasyonuna Avrupa Birliği'nde izin verilmemektedir. Kontamine ürünlerin daha iyi kalitede ürünlerle karıştırılması işlemi de yasaklanmıştır [135].

Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre mikotoksinlerin toksik ve ekonomik etkilerinin azaltılması için uygulanacak herhangi bir dekontaminasyon prosesinin aşağıdaki özellikleri taşıması zorunludur [54, 133, 136]:

- Mikotoksinleri imha etmek, inaktive etmek ya da uzaklaştırmak zorundadır;
- Son üründe toksik, karsinojenik, mutajenik kalıntılar bırakmamalıdır;
- Ürünün istenen fiziksel ve duyuşsal özelliklerini olumsuz bir şekilde etkilememelidir;
- Uygun ortam koşullarında mikotoksin oluşumundan kaçınmak için fungal sporları ve miselyumları imha etmelidir;
- Teknik ve ekonomik olarak uygulanabilir olmalıdır.

### **2.3.2.1 Mikotoksinlerin Kontamine Ürünlerden Ayrılması**

#### *Fiziksel ayırma*

Mikotoksinlerin kimyasal yöntemlerle detoksifikasyonu bazı bölgelerde kabul edilmediğinden, kontamine mahsüllerin fiziksel olarak ayrılması üreticiler için önemli bir seçenektir.

*Ayıklama:* Tohum ya da çekirdeklerin nispeten daha küçük miktarlarında çoğunlukla mikotoksin kontaminasyonu gerçekleştiğinden, hasar görmüş, rengi solmuş, gözle görülür küf üremesi içeren mahsüllerin sınıflandırması ya da ayrılması önemli miktarlarda mikotoksinin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır [99, 137].

Mahsüllerin ayrılması elle, mekanik olarak ve elektronik metotlar kullanılarak yapılabilmektedir. Elle ayırım büyüklük, şekil, renk farklılıkları ve gözle görülür küf gelişimi olan hasar görmüş mahsüllerin seçilmesine dayanmaktadır. Elle ayırım kontamine ürünlerin fiziksel ayırımı için en basit yol olsa da, oldukça zaman alıcıdır ve çoğu durumda uygulanabilir değildir [133]. Bunun yanısıra, aflatoksinin uzun dalga boylu (365 nm) UV ışığı altında parlak yeşilimsi floresans verdiği bilindiğinden, mısır, pamuk tohumu ve kurutulmuş incir gibi ürünlerde. kontamine

bölgelerin UV ışığında floresans vermesiyle aflatoksin kısmi olarak ayrılabilir [99, 138].

Kontamine tohumların elektronik olarak ayrılması kullanışlı bir yöntem olsa da ekonomik etkenlerden dolayı büyük ölçeklerde endüstride kullanımı mümkün değildir. Ancak, Amerika Birleşik Devletlerinde, yer fıstığı endüstrisinde insani tüketime sunulan ürünlerdeki aflatoksin seviyelerini azaltmak için elektronik ve elle ayıklamanın birlikte kullanıldığı sistemler kullanılmaktadır.

*Yoğunluk bazlı ayırma:* Mahsüllerdeki mikotoksin düzeylerini ,özellikle mısır tanelerindeki aflatoksin miktarını, önemli derecede azaltan, bir başka yöntem ise yüzdürme ve yoğunluğa göre ayırma işlemidir [139, 140]. Küf hasarına uğramış, mikotoksinle kontamine olmuş çekirdekler hasar görmemişlere göre farklı fiziksel özelliklere sahiptir ve belirli sınıflarda yoğunluk ayırımına göre veya özel yer çekimi tablolarında sınıflandırma ile ayrılabilir. Su veya doymuş sodyum klorit çözeltisinde batmayan veya yüzen danelerin ayrılmasıyla tahıllardaki DON, ZEN ve aflatoksin seviyelerinin azaltıldığı bilinmektedir.

*Yıkama:* Su ve sodyum karbonat çözeltileri ile yıkanan danelerde veya mısırlarda DON, ZEN ve fumonisinler gibi *Fusarium* toksinlerinin azaltıldığı ortaya konmuştur. Damıtık su ile üç kere yıkanan arpa ve mısırdaki DON seviyesinin % 65-59 oranlarında azaltıldığı belirtilmiştir [141]. Bu nedenle yıkama işlemi yaş öğütme işlemi veya etanol fermentasyonu öncesinde kullanışlı bir uygulama olsa da, aksi halde danelerin kurutma maliyeti çok yüksek olabilir.

*Öğütme:* Kontamine danelerde öğütme sırasında belirli dane bileşenlerinin ayrılması, toksin seviyelerinde azalmaya sebep olabilmektedir. Tahıllarda mikotoksinin danelerdeki dağılımı homojen değildir ve küfün endosperme penetrasyonuna bağlıdır ancak, öğütme sırasında danelerin dış kısımlarının ayrıldığı durumlarda elde edilen unda mikotoksin seviyesi azalmaktadır.

#### *Çözücülerle ekstraksiyon*

Birkaç çözücü, yer fıstığı tohumu, çığıt gibi bazı kontamine gıdalardan mikotoksinlerin ekstraksiyonunu gerçekleştirilebilmektedir. Yoğunlukla kullanılan çözücüler arasında % 95'lik etanol, % 90 sulu aseton, sulu izopropanol, % 80 izopropanol, hekzan-metanol, metanol-su, asetonitril-su, hekzan-etanol-su ve aseton-hekzan-su sıralanabilir. Yağlı tohum küspelerinden çözücü ekstraksiyonu ile



mikotoksinler, toksik yan ürün oluşturmadan ve besinsel özelliklere veya kaliteye zarar vermeden etkili bir şekilde uzaklaştırılırsa da, yüksek maliyet ve toksik ekstraktın imha edilmesi gibi problemler nedeniyle bu tekniğin büyük ölçekte uygulaması kısıtlanmaktadır [64]. Metanol ve etanol gibi bazı polar çözücüler kontamine ürünlerde aflatoksinin azaltılmasında etkili olsalar bile, ek olarak bu materyallerden katıların tekrar ekstraksiyonuyla ilgili problemleri vardır. Örneğin, % 80 izopropanol ile ekstraksiyonun çığıt ve yer fıstığından aflatoksinleri tamamen uzaklaştırdığı, ama başka katı bileşenleri de % 9.5 oranında uzaklaştırdığı bildirilmiştir [142].

#### *Adsorpsiyon*

Bazı adsorbanlar mikotoksinleri sulu çözeltilerden bağlayabilmekte ve uzaklaştırmaktadır [64, 143]. Mikotoksin bağlayıcı ajan olarak tavsiye edilen iki ajan aktif kömür ve bentonittir. Adsorbanın partikül büyüklüğü ve ısı uygulamasının mikotoksinlerin degradasyon seviyelerini etkilediği bildirilmiştir [144].

### **2.3.2.2 Mikotoksinlerin Kontamine Ürünlerde İnaktivasyonu**

#### *Fiziksel Metotlar*

Mikotoksinlerin dekontaminasyonu için birçok fiziksel strateji uygulanmaktadır. Bunlar, termal inaktivasyon ve ışınlama yöntemlerini içermektedir.

*Isıl işlem:* Mikotoksinlerin çoğu geleneksel gıda işleme sıcaklık aralıklarında (80-121°C) nispeten dayanıklıdır, bu nedenle kaynatma, kızartma veya pastörizasyon gibi normal pişirme sıcaklıklarında ya hiç değişiklik gerçekleşmez ya da çok az bozunma gerçekleşir [73, 145]. Mikotoksinlerin ısı işlemine duyarlılıkları nem içeriği, pH ve iyonik kuvvet gibi bir çok faktörden etkilenmektedir [144, 146]. Kavrma veya kızartma işlemi 150-200°C aralığında 30 dakikaya kadar uygulandığında % 20-60 aralığında azalma gözlenmiştir [73]. Isıl işlemle parçalanma mikotoksin türüne ve konsantrasyonuna, gıda bileşenleriyle mikotoksinin bağlanma miktarına, ısı penetrasyonu derecesine, ısı işlem ve süresine bağlıdır [64].

Aflatoksinlerin dekompozisyon sıcaklıkları 237-306°C aralığında değişmektedir. Katı AFB<sub>1</sub> kuru sıcaklığa termal dekompozisyon sıcaklığı olan 237°C'ye kadar dayanıklıdır [146]. Gıdaların nem içeriği arttıkça aflatoksinlerin parçalanmasının

arttığı gözlenmiştir [99]. Yer fıstıklarının 150°C'de 30 dk boyunca kavrulmasıyla aflatoksinlerde % 30 azalma gözlenirken, işlem süresi 90 dakikaya çıkarıldığında % 60 azalma elde edilmiştir [147]. Başka bir çalışmada, 150°C'de 30 dk boyunca geleneksel kavurma işlemi ile tuzsuz, % 2 ve % 5 tuzlu yer fıstıklarındaki AFB<sub>1</sub> miktarında sırasıyla % 38, % 41.5 ve % 47.6 parçalanma elde edilmiştir [148].

*Işınlama:* Daha önce de belirtildiği gibi, ışınlama depolama sırasında mikotoksinlerin hasat sonrası kontrolünde kullanıldığı belirtilmiştir, buna ek olarak x-ışınları ve gamma ışınlarının mikotoksinlerin parçalanmasında kullanımı kapsamlı olarak araştırılmaktadır. Işınlama ürün sıcaklığını artırmadan gıda kaynaklı patojenleri elimine eden, termal olmayan bir metottur ve 10 kGy'e kadar uygulanan dozlar toksikolojik açıdan tehlike oluşturmamaktadır [129].

Gama ışınları ile mikotoksinlerin inaktivasyonu ışınlama dozuna, gıda ve mikotoksin türüne bağlıdır. Buna ek olarak, suyun ışınsal bozunumu (radyoliz) aflatoksin yıkımına sebep olan serbest radikal reaksiyonları başlattığından, aflatoksinlerin gama ışınları ile parçalanmasında su kritik bir rol oynamaktadır [146]. AFB<sub>1</sub> içeren yer fıstıklarında 1 ve 10 kGy dozlarında gama ışınlama ile toksisitede % 75 ve % 100 oranlarında azalma gözlenmiştir [64]. Başka bir çalışmada gama ve elektron demeti ışınlamanın *A. flavus* ile kontamine edilmiş Brezilya cevizi üzerindeki etkisi incelenmiş ve elektron demeti 5 ve 10 kGy dozlarında AFB<sub>1</sub> düzeyini % 53 ve % 65 oranında azaltırken, gama ışınlarının aynı dozlarda % 70 ve % 84 azalttığı gözlenmiştir. Ancak, 5 kGy dozunda ışınlama uygulanan örneklerin duyu özelliklerinin kabul edilebilir olduğu bildirilmiştir [149]. Hayvan yemlerinden aflatoksin ve okratoksin A detoksifikasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, 15 kGy gama ışınlaması sonucunda okratoksin A, AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> toksinlerinde sırasıyla % 23.9, % 18.2, % 11, % 21.1 ve % 13.6 azalma sağlanırken, test edilen yemlerde okratoksin A ve aflatoksinlerin 15 kGy dozunda bile tamamen ortadan kaldırılamadığı bildirilmiştir [150].

Işınlama ülkemizde özellikle tek kullanımlık medikal alet ekipmanların, ilaç ve kaplarının, sağlık bakım ürünlerinin sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Kasım 1999'da yayınlanan Gıda Işınlama Yönetmeliği doğrultusunda da gıdaların raf ömürlerinin artırılması, patojen mikroorganizmaların uzaklaştırılması gibi amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca 2003 yılında Codex Alimentarius, gıda

ışınlanmasında doz sınırlarını kaldırarak teknolojik doz uygulamasını kabul etmiş ve gıdalarda absorplanan dozun 10 kGy olarak belirlemiştir [151]. Toplam 55 ülkede gıda ışınlaması için yasal düzenleme yapılırken, dünyada 180'den fazla Gama Işınlama Tesisi bulunmaktadır ve bunlardan 70 kadarı gıda ışınlama yetkisi almıştır. Ülkemizde ise sadece iki adet gama ışınlama tesisi bulunmaktadır. Bunlardan biri Çerkezköy'de kurulu olan Gamma-Pak Sterilizasyon A.Ş.'ye ait ticari amaçlı Co-60 Gama Işınlama Tesisi, diğeri ise Ankara Sarayköy'de kurulu olan Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'na (TAEK) ait Co-60 Gama Işınlama Tesisidir. Işınlama işleminin getirdiği en büyük kısıtlamalar ışınlama işleminin kesikli gerçekleştirilmesi, prosesin yükleme ve boşaltma işlemlerinin uzun sürmesi, ürünlerin ambalajlı halde prosele tabi tutulmasından dolayı gama ışınlarının penetrasyon kısıtlamaları ve tabi ki bu tesislerin yatırım maliyetlerinin oldukça yüksek olması ve kalifiye eleman gerekliliği olarak sıralanmaktadır. Bu nedenlerle, Türkiye'de gıdaların yedi alt grupta ışınlanmasına izin verilse de, var olan tesislerin kapasitelerinin yeterli olmaması, tüketicinin proses sonrası yapılan denetimlerin sıklığı ve yeterliliğine güvenmemesi gibi sebeplerle raflarda ışınlanmış ürün olarak genellikle sadece baharatlara rastlanmaktadır.

Aflatoksinler UV ışınlarına da duyarlıdır ve 222, 265 ve 362 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon oluşturmaktadır. Kontamine süte uygulanan 365 nm'de 20 dk UV ışınlama ile AFM<sub>1</sub> miktarında % 56.2 (1ppb) azalma elde edilmiştir [152]. Kuru incirde 30 dk UV uygulamasıyla AFB<sub>1</sub> miktarında % 45.7 azalmayla sonuçlanmıştır [153].

#### *Kimyasal metotlar*

Çok sayıda kimyasalın mikotoksinleri azalttığı, parçaladığı veya inaktive ettiği ortaya konmuştur. Bu kimyasallar arasında asitler (hidroklorik asit), bazlar (amonyak, sodyum hidroksit), okside edici ajanlar (hidrojen peroksit, ozon), indirgeyici ajanlar (bisülfid), klorlama ajanları (sodyum hipoklorit, klorin dioksit) ve formaldehit gibi muhtelif ajanlar bulunmaktadır [141, 146].

Yukarıda belirtilen kimyasal uygulamaların çoğu bir çok gıda ve yemde bulunan mikotoksinleri parçalasa da, pek çok durumda gıdaların besinsel değerlerini önemli ölçüde azaltmaları veya toksik ürünler oluşturmaları veya istenmeyen etkileri olan başka ürünler oluşturmaları kullanımlarını sınırlamaktadır.

*Okside edici ajanlar:* Ozon veya triatomik oksijen ( $O_3$ ) güçlü bir oksidandır ve birçok kimyasal grupla reaksiyona girse de özellikle çift bağlara karşı etkilidir. Gıda endüstrisinde yakın zamanda dezenfektan olarak kabul gören ozon bir çok mikroorganizmaya karşı etkili bulunmuştur. Ticari uygulamalarda, bir çok ürünün sanitasyonunda ozon kullanımı araştırılmaktadır. Ozonlama, tehlikeli herhangi bir kalıntı bırakmadan kendiliğinden oksijene dekompozisyonu sebebiyle güvenli bir uygulama olarak kabul edilmektedir [48]. Ozon ( $O_3$ ) havadaki oksijen molekülünü ( $O_2$ ) yıkan bir yüksek enerji girişi ile oluşmaktadır. Singlet oksijen ( $O$ ) molekülleri, ozon oluşturmak için ortamdaki uygun  $O_2$  ile birleşir ( $3 O_2 \leftrightarrow 2 O_3 + \text{ısı ve ışık}$ ). Ticari olarak ozon oluşturmak için ultraviyole ışınlama veya daha sıklıkla kuvvetli elektrik boşalımı (korona boşalımı) metodu kullanılmaktadır. 1900'lü yıllardan beri çoğunlukla su arıtmada kullanılmakta olsa da, gıda uygulamalarında ozonun kullanımının farkındalığı yeni oluşmaktadır. 1997'de bir uzman panelinde, ozonun iyi üretim uygulamaları kapsamında kullanıldığında genellikle güvenli kabul edilen madde (GRAS) olduğu kabul edilmiştir [154]. 2001'de ise Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından antimikrobiyel gıda katkısı olarak kabul edilmiştir [155]. Son yıllarda, ozon uygulamasının mikotoksinle kontamine olmuş gıda ürünlerinde kullanımı dikkat çekmektedir. Mısır [156], yer fıstığı [157], fıstık [158], kırmızı biber [159] ve kuru incir [160] gibi bir çok gıda ürününde ozon uygulaması ile % 95 oranında mikotoksinlerin dekontaminasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikotoksinlerin farklı kimyasal yapılarına sahip olması nedeniyle ozonlama ile aynı grup mikotoksinlerde bile bileşiklerin reaksiyonları farklılık göstermektedir. Örneğin, % 2 ozon ile  $AFB_1$  ve  $AFG_1$  hızlıca degradasyona uğrarken,  $AFB_2$  ve  $AFG_2$ 'nin oksidasyona daha dayanıklı olduğu ve degradasyonları için daha yüksek konsantrasyonda ozon gerektiği bildirilmiştir. Degradasyon hızlarındaki bu fark  $AFB_1$  ve  $AFG_1$ 'in yapısında bulunan ancak  $AFB_2$  ve  $AFG_2$ 'nin yapısında bulunmayan C8-C9 çift bağdan kaynaklandığı düşünülmektedir [161].  $AFB_1$  ve  $AFG_1$  bileşiklerinin daha toksik olduğu bilindiğinden bu sonuç oldukça önemlidir.

Ozon gazı depolanamadığından kullanılacağı sırada üretilmelidir. Bu nedenle diğer oksidasyon/ dezenfeksiyon işlemleri ile karşılaştırıldığında ozon uygulamalarının yüksek yatırım maliyeti gerektirmektedir. Buna ek olarak, ticari olarak büyük miktarlarda ozon üretimi için kullanılan en ekonomik yöntem (elektrik boşalımı), korona boşalımı jeneratörüne gönderilen elektrik gücünün % 75'i ısı ve ışığa

dönüştüğü için elektriksel olarak etkili olmayan bir prostestir. Bu nedenle ozon üretmek için en büyük işletim maliyeti elektrik enerjisidir [162].

Şu anda mevcut fiziksel veya kimyasal detoksifikasyon metotlarından hiç birinin tek başına tüm gıda ve yemlerde kullanımı uygun değildir. Mikotoksinlerin detoksifikasyonunda kullanılan bir metotun etkinliği gıdanın yapısı, nem içeriği, sıcaklık, mikotoksin türü, konsantrasyonu ve gıda bileşenleri ile bağlanma dereceleri gibi çevre koşullarına bağlıdır. Çok sayıda kimyasal, mikotoksinlerin detoksifikasyonunda oldukça etkili olsa da, gıdaların besinsel değerlerinde önemli değişikliklere sebep olmakta ve uygulanan üründe istenmeyen duyuşal özelliklerle birlikte toksik yan ürünler oluşturmaktadırlar. Bu nedenle kullanımları ciddi bir şekilde sınırlanmıştır ve Avrupa Birliği'nde insani tüketime sunulan ürünlerde kimyasal uygulamalara izin verilmemektedir.

#### *Biyolojik metotlar*

Mikotoksinlerle kontamine olmuş tarımsal ürünlerin detoksifikasyonu için mevcut fiziksel ve kimyasal metotların kullanımı güvenlikle ilgili sorunlar, ürünlerde besinsel kalite kayıpları, kısıtlı etkinlik ve maliyet gibi nedenlerle sınırlandırılmıştır. Bu sebepler, biyolojik metotlar gibi alternatif stratejilerin araştırılmasına yol açmıştır. Bu alandaki ilerleme, moleküler biyoloji, genetik mühendisliği ve mikrobiyel genomik alanlarındaki gelişmelerle ve mikrobiyel dünyada var olan oldukça geniş katabolik potansiyelin keşfedilmesiyle desteklenmiştir [133, 163, 164].

*Trichoderma* sp. 639, *Phoma* sp., *Rhizopus* sp. 668, *Rhizopus* sp. 720, *Sporotrichum* sp. SF, *Sporotrichum* sp. ADA ve *Alternaria* sp. gibi küf türlerinin AFB<sub>1</sub>'i 28°C'de 5 günde % 65 ile % 99 düzeylerinde parçaladığı bildirilmiştir [113].

Bazı *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* suşlarının sütte fermentasyonla OTA ve AFB<sub>1</sub>'i parçaladığı ortaya konmuştur [54, 163]. Topcu vd. (2010), AFB<sub>1</sub> ve patulinin sulu çözeltiden probiyotik kültür olan *Enterococcus faecium* M74 ve ticari kültür olan *E. faecium* EF031 ile detoksifikasyonu üzerine yürüttükleri çalışmada, 48 sa inkübasyon periyodu sonunda M74 suşu AFB<sub>1</sub>'i % 30.5 ve patulini % 41.6 azaltırken, EF031 suşu sırasıyla % 37.5 ve % 45.3 azalma sağlamıştır [165]. *Pseudomonas aeruginosa* N17-1 suşunun aflatoksin degradasyonu üzerine etkisi incelendiğinde, Nutrient Broth ortamında 37°C'de 72 sa inkübasyon sonunda AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> ve AFM<sub>1</sub>'i sırasıyla % 82.8, % 46.8 ve % 31.9

azalttığı gözlenmiştir [166]. Fermente gıdalardan izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının zearalenon üzerine etkisi incelenmiş ve model ortamlardan zearalenonun ayrılmasının sürekli ve yavaş bir proses olduğu, 48 sa sonunda yaklaşık % 45 azaldığı bildirilmiştir [167].

*Flavobacterium aurantiacum* sıvı ortamdan ve süt, yer fıstığı, mısır gibi çeşitli gıdalardan herhangi bir toksik yan ürün bırakmadan AFB<sub>1</sub>'i önemli ölçüde uzaklaştırabilmektedir [168-170]. Yapılan bir çalışmada, *F. aurantiacum*'un NRRL-B-184 suşu fosfat tamponu, yer fıstığı ve kırmızı biberden sırasıyla % 19.9-98.9, % 92.6-99.8 ve % 88.7-100 oranlarında AFB<sub>1</sub>'i 48 sa içerisinde uzaklaştırmıştır [171]. Ancak, bu mikroorganizmanın açık turuncu pigmentasyonu gıda ve yem fermentasyonunda kullanımını sınırlandırmaktadır.

Son zamanlarda mikotoksinlerin toksik etkilerini azaltmak için bakteri, maya ve küflerin kullanımına ilgi artmaktadır. Mikroorganizmalarla mikotoksinlerin detoksifikasyonu üzerine yapılan çalışmalar bugüne kadar laboratuvar ortamında yürütülse de, *F. aurantiacum*'un çeşitli gıda ürünlerinden etkili bir şekilde AFB<sub>1</sub> detoksifikasyonu üzerine veriler elde edilmiştir. Ancak açık turuncu renkli pigmentasyonu gıdalarda kullanımını sınırlandırmaktadır.

### **2.3.3 Gastrointestinal Kanalda Mikotoksin Absorpsiyonunun Engellenmesi**

Hayvancılıkta mikotoksikozisin engellenmesi üzerine son zamanlarda getirilen yeni yaklaşımlardan biri de gastrointestinal kanalda mikotoksinleri bağlayabilecek ve biyoyararlanımını azaltabilen, besleyici özelliği olmayan adsorbanların diyeteye katılmasıdır.

Hayvan yemlerine adsorbanların katılması, hayvanları mikotoksinlerden korumanın en yaygın şekilde uygulanan yoludur. Aktif karbon (AC), hidrate sodyum kalsiyum alüminosilikat (HSCAS), zeolitler, bentonitler ve belirli killer mikotoksinlere yüksek affinite gösteren ve en çok çalışılan adsorbanlardır [172, 173].

Adsorban materyallerin mikotoksin bağlama başarısında adsorbanın fiziksel yapısı, dozu, toplam yükü ve yük dağılımı, por büyüklüğü ve yüzey alanı olduğu gibi mikotoksinin fizikokimyasal özellikleri de önemli rol oynamaktadır. Aflatoksinler gibi polar fonksiyonel gruplar içeren mikotoksinler, montmorillonit (aktif kil) ve zeolit-klinoptolit gibi bir çok etkili adsorban tarafından bağlanabilmektedir. Ancak, ZEN ve

OTA gibi apolar mikotoksinler negatif yüklü hidrofilik yüzeye sahip bu modifiye edilmemiş mineraller tarafından adsorplanamamaktadır [174].

AC, yüksek yüzey/kütle oranına sahip (500-3500 m<sup>2</sup>/g), toksik olmayan ve en etkili sorbentlerden biri olarak tanımlanmaktadır [173]. Su ve model gastrointestinal sıvısı içerisinde AC ve HSCAS'ın bağlamasının neredeyse % 100 olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, AC'nin adsorpsiyon kapasitesini OTA için % 0.80-99.8 ve DON için % 1.83-98.93 aralıklarında belirlemişlerdir [175].

Doğal zeolitten elde edilen HSCAS, aflatoksinlere karşı yüksek affinite göstermesi sebebiyle en çok araştırılan adsorbandır. Yapılan bir çalışmada, AC ve HSCAS'ın AFB<sub>1</sub>'in yemlerden süte taşınmasını % 50 ve % 36 oranlarında azalttığı doğrulanmıştır [176].

Son yıllarda, tüketilen gıdalarda absorpsiyonun gastrointestinal kanaldaki mikroorganizmalar tarafından inhibe edilebileceği hipotezi üzerine ilgi artmaktadır. Bazı araştırmacılar, laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerin bazı suşlarının aflatoksinler etkili bir şekilde bağlayabildiğini göstermiştir. Bu mikroorganizmaların aflatoksinleri bağlama mekanizması tam açıklanamasa da, mutajenlerin/karsinojenlerin ince bağırsakta absorpsiyonunu bakteriyel bağlama ile azalttığı öne sürülmektedir. AFB<sub>1</sub>'in laktik asit bakterileri tarafından bağlanmasının, bakteri hücre duvarı yapısı ile ilişkili olan fiziksel bir olay olduğu belirtilmektedir [177-180].

AC ve HSCAS, alüminosilikat, zeolit ve bentonitin hayvan yemlerinde aflatoksikozisin engellemek için kullanımı ortaya konulsa da, gelecekte in vivo araştırmaların diğer problem oluşturan mikotoksinler üzerine yönelmesi gerekmektedir. Laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerinin AFB<sub>1</sub>'i bağladığı bildirilmiştir, ancak açık bir şekilde bağlanma mekanizmasını ve bağlanan toksin moleküllerinin serbest kalmasını sağlayacak koşulları ortaya koyacak mekanik çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir [181].

## **2.4 Plazma**

### **2.4.1 Plazmanın Tanımı**

Fizik biliminde plazma katı, sıvı ve gazdan sonra maddenin dördüncü hali olarak tanımlanırken, tıp ve biyoloji alanlarında plazma, kanın nonselüler sıvı kısmı olarak bilinmektedir [182, 183]. Irving Langmuir 1928'de kuvvetlice iyonize olmuş gaz

kompozisyonu kan plazmasını çağrıştırdığı için plazma terimini ortaya koymuştur [184].

Genel olarak plazma, yüksek sıcaklıkta kuvvetli elektrik veya magnetik alanların etkisi ile oluşur. Güçlü bir elektriksel boşalım da plazma oluşturabilir. Plazma ortamında enerji kazanan serbest elektronlar, ortamdaki diğer atomlar ve moleküllere çarparak enerjilerini transfer ederler. Bunların da birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucu ortamda çok değişik tür ve sayıda yeni moleküller, atomlar, radikaller, iyonlar, vb. oluşur. Plazmalar farklı konsantrasyonlarda küçük moleküllü reaktif atomlar, iyonlar ve moleküller içeren ve infrared, görünür ve ultraviolet ışık dahil bir kaç çeşit elektromanyetik radyasyon yayan, nötr bir gaza enerji vererek oluşturulan uyarılmış iyonize gazlardan oluşmaktadır.

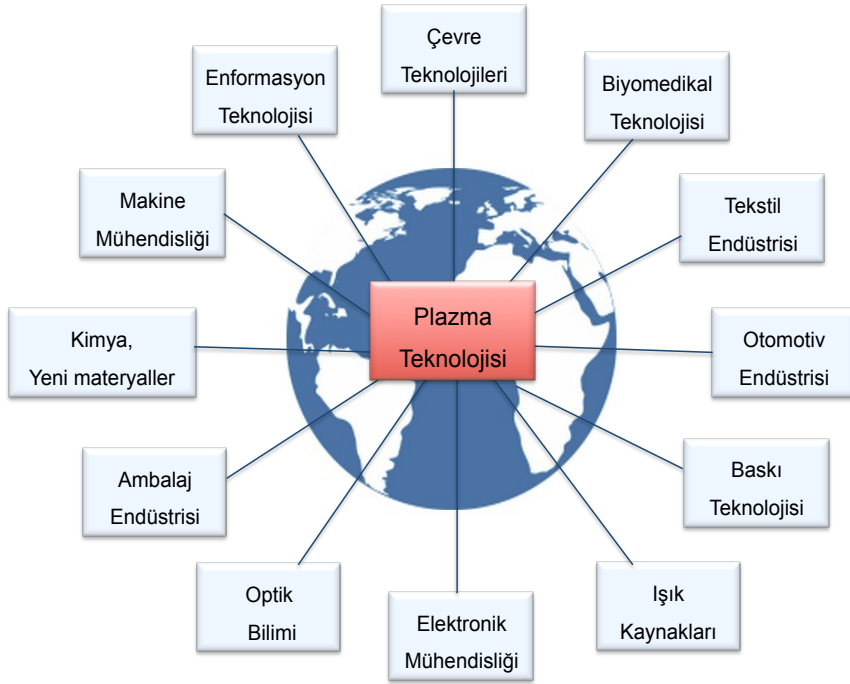
Farklı hallerde bulunabilen plazma, birçok şekilde sınıflandırılabilir. Görünen evrenin % 99'undan daha fazlası plazma fazındadır ve güneş, yıldızlar, güneş rüzgarı ve Dünya'da da iyi bilinen şimşek ve aurora borealis'i içermektedir. Temel olarak plazma iki ana başlık altında incelenebilir: denge (equilibrium) ve dengede olmayan (non-equilibrium) plazmalar. Bir başka sınıflandırmada ise plazmalar kendi içerisinde elektronlar, iyonlar ve nötrallerin sıcaklığına bağlı olarak termal ve termal olmayan (soğuk) plazmalar olarak sınıflandırılmaktadır [183, 185, 186]. Denge plazmaları termodinamik olarak denge halindedirler ve plazmada oluşan elektronlar ve iyonlar yaklaşık olarak aynı sıcaklık ve enerjiye sahiptirler ( $T_{iyon} \approx T_{toplam} \approx T_{elektron}$ ). Çarpışma frekansı yüksektir ve farklı partikül türlerinin termodinamik denge sıcaklığına termalizasyonunu sağlayarak elektronların enerji kaybetmesine izin verir. Bu plazmaların sıcaklıkları genellikle  $10^4$  K dolaylarındadır ve % 100'e yakın yüksek iyonlaşma derecelerine (iyon sayısı / toplam plazma türleri) sahiptirler. Bunun aksine, termodinamik dengede olmayan plazma halinde elektronlar ve iyonlar farklı sıcaklıklardadır. Elektron sıcaklıkları  $10^4$  K dolaylarında olsa da, iyonlar ve nötraller oda sıcaklığına yakın sıcaklıklardadır. Kütledeki fark çok büyük olduğundan, elektronlar binlerce ve hatta on binlerce dereceye kadar çıksa da plazmanın bütünü oda sıcaklığı seviyesinde kalmaktadır. Termal olmayan plazmaların bileşimi ve sıcaklığı çok çeşitli parametrelerle (enerji girişi, güç, gaz türü, gaz basıncı, vd.) ayarlanabilmektedir. Bu termal olmayan plazmalar düşük iyonlaşma derecelerine sahiptirler. Kompleks plazma kimyası elektronlar tarafından yürütülmektedir. Plazmanın devamlılığı için gerekli olan iyonlaşmayı yürütürler ve



atomik/moleküler uyarılmadan, disosiyasyon, radikal ve metastabil moleküllerden sorumludurlar. Sonuç, çevresindeki materyallere termal zarar vermeden güvenle kullanılabilen aktif gaz benzer ortamdır. Pek çok durumda, teknik uygulamalar için soğuk plazmalar nötr bir gaz ya da gaz karışımına bir elektrik alan uygulayarak oluşturulmaktadır [187, 188].

#### 2.4.2 Plazmanın Uygulama Alanları

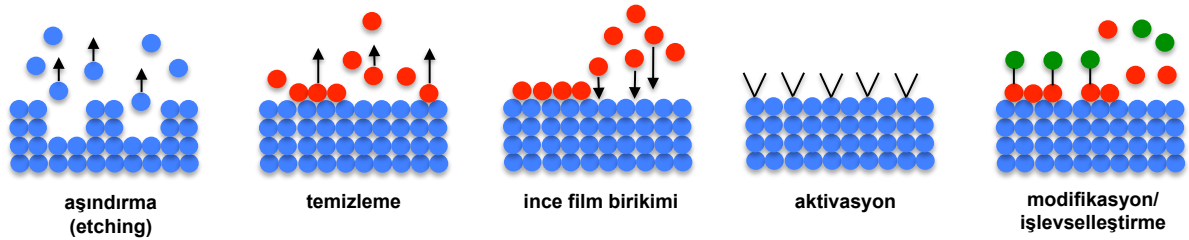
20. yüz yılın sonlarında, düşük sıcaklık plazmaları çok geniş bir yelpazede teknolojik uygulamalarda ortaya konmuştur. En önemli alanlar arasında düşük enerjili ampül, polimer materyallerin ön işlemleri- örneğin; boyama ve bağlanma, ambalaj materyallerinin geliştirilmesi, yüzey modifikasyonları, atık ve hava kirliliği yönetimi, mikroelettronikler, gösterde panelleri, vd. yer almaktadır (Şekil 2.5.) [189-192].



Şekil 2.4. Plazma teknolojisi- endüstriyel uygulama alanları

Plazma uygulamaları ile materyallerin çeşitli kimyasal-reaksiyon temelinde etkileşimleri enerji girişi, basınç, çalışma gaz kompozisyonu, primer madde eklenmesi, vb. gibi birkaç plazma parametresine ve bununla birlikte substratın yapısına bağlı olarak geliştirilebilmektedir. Bu etkileşimler aşındırma (etching), ince film birikimi (deposition), kimyasal ve/veya fiziksel yüzey modifikasyonu, aktivasyon ya da işlevselleştirme (Şekil 2.6.) gibi temel prosesler olup, yüzeylerin, medikal uygulamalar için tasarlanan materyaller veya cihazların işlenmesi de dahil bir çok endüstriyel uygulamalarda kullanılan temel proseslerdir [192]. 1960'ların sonunda

plazmalar biyolojik sistemlerle direkt kontakt halinde olacak materyallerin biyouyumluluk ve biyofonksiyonelliklerini geliştirmek için uygulanmıştır [191]. Medikal materyaller veya aletler, medikal implantlar, kateterler, canlı doku ile kısa süreli ya da kalıcı olarak direkt temas halinde olan ve kanın temizlenmesinde kullanılan materyallerden, hücre kültürasyonu için kullanılan laboratuvar malzemeleri, doku mühendisliğinde kullanılan teşhis araç-gereçlerine kadar değişmektedir. Bu malzemelerin çoğu sentetik polimerlerden yapıldığından, düşük sıcaklık plazmaları bu uygulamalar için tercih edilmektedir. Plazma prosesinin en önemli avantajlarından biri materyalin yığın (bulk) özelliklerinin etkilenmeden tüm modifikasyonların sadece yüzey ile sınırlı kalmasıdır. Plazma prosesi sonunda tamamen farklı özelliklere sahip yeni yüzeyler elde edilmektedir.



Şekil 2.5. Materyal yüzeyi ile plazma-kimyasal interaksiyonlarının temel türleri

Bugüne kadar bir çok plazma bazlı yüzey uygulama teknikleri geliştirilmiş ve bir kaç ticarileştirilmiştir. Bu uygulama teknikleri arasında plazma sputtering ve aşındırma, plazma püskürtme, plazma birikimi, plazma polimerizasyonu ve daha bir çoğu sıralanabilir. Bu prosesler ve teknikler hem düşük basınç hem de atmosferik basınç plazmalarında gerçekleştirilebilir. Vakum çemberlerinde oluşturulan homojen düşük basınç plazmalarının avantajı plazma ateşleme koşullarının atmosferik basınç koşullarına göre daha kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir olmasıdır. Bu avantajları, vakum gereksinimi ve kesikli proses kısıtlaması gibi düşük basınç plazmanın kullanımının uygulamada getirdiği zorlukları az da olsa telafi etmektedir.

Atmosferik basınç plazmalarda, ek olarak bir vakum ekipmanına ihtiyaç duyulmaması yüzeylere termal olmayan plazma uygulamasını sürekli proseslerde de mümkün kılmıştır. Ancak, düşük basınç plazmalarda genel olarak homojen bir plazma elde edilirken, atmosferik basınç plazmanın en büyük dezavantajı plazmanın aktivitesinin oldukça lokalize olmasıdır. Bu nedenle, daha büyük yüzeylere plazma uygulaması plazma kaynağına ve uygulama parametrelerine

fazlasıyla bağlıdır. Diğer taraftan atmosferik basınç plazmaların uygulamalarının lokalize olmasının avantajı ise pürüzlü yüzeyler, kateterlerin iç kısımları gibi ulaşılması zor bölgelere kolaylıkla plazma uygulanabilir olmasıdır [193-196].

Materyal yüzeylerinin plazma ile modifikasyonları yüzey morfolojisi ve tekstürdeki değişimlerden fiziksel ve/veya kimyasal olarak özel tasarlanmış yüzey özelliklerine kadar farklılık gösterebilmektedir. Bunlar yüzey ıslanabilirliğinin artırılması, yüzeyin farklı kimyasal gruplarla fonksiyonellik kazandırılması, amfoterik ya da bakteri, hücre veya protein gibi organik maddeleri tutmayan yüzey özellikleri kazandırılması olarak sıralanabilir [197-202].

### **2.4.3 Plazma ile Dekontaminasyon / Sterilizasyon**

Plazma uygulamalarının başka önemli bir alanı da plazmaların sterilizasyon veya biyodekontaminasyon amacıyla kullanılmasıdır. Endüstride (özellikle medikal alanda) cam ve çelik malzemelerin yerini polimerik materyallerin almasıyla sıcaklığa dayanmayan sterilizasyon prosedürlerine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacıyla kullanılan geleneksel metotların, kuru sıcak hava (Pastör fırını), nemli basınçlı hava (otoklav) veya etilen oksit, formaldehit ve glutraldehit gibi kimyasallar, iyonize radyasyon, bazı büyük dezavantajları vardır: (a) yüksek proses sıcaklıkları (ısıya duyarlı malzemelerin sterilizasyonunu imkansız kılar); (b) toksik kimyasalların kullanımı; ve (c) uzun proses süreleri (etilen oksit sterilizasyonunda yaklaşık 12 sa) (d) yüksek yatırım maliyetleri (e) her malzemeye uygun olmaması [203-206]. Geleneksel sterilizasyon yöntemlerinin bu kısıtlamaları alternatif olabilecek termal olmayan metotların geliştirilmesini motive etmiştir. Termal olmayan plazmalar toksik olmayan gazların kullanımı ile ılımlı sıcaklıklarda oluşturulabilir ve böylece malzemede oluşabilecek termal ve kimyasal hasarlar kısıtlanmaktadır [207, 208]. Ayrıca bu plazmalar bir kaç saniye içerisinde etkili dezenfeksiyon ve sterilizasyon sağlayabilmektedir [183]. Bakteriler üzerindeki öldürücü etkilerine ek olarak, termal olmayan plazmalar sterilize edilen yüzeyden ölü mikroorganizmaları da uzaklaştırabilmektedir [209].

Bir çok çalışmada düşük basınç plazmaların mikroorganizmaları, virüsleri ve hatta pirojen veya prionlar gibi organik maddeleri inaktive ettiği ya da uzaklaştırdığı kanıtlanmıştır [203, 204, 210-214]. Ayrıca bir kaç çalışmada, düşük basınç plazma sistemi kullanılarak farklı gıda örnekleri üzerinde *Aspergillus* spp. sporlarının

dekontaminasyonu sağlanmıştır. Fındık örnekleri üzerinde *A. parasiticus* sporlarının inaktivasyonu için düşük basınç soğuk plazma sisteminde sülfür hekzaflorit (SF<sub>6</sub>) gazı ve hava kullanılmıştır [215]. Ancak, plazma işlemi çok etkili olamamıştır, *A. parasiticus* sporlarında 5 dk hava ve 20 dk SF<sub>6</sub> plazması sonrası sırasıyla sadece 2 log ve 5 log birimlik indirgenme sağlanabilmiştir. Benzer bir çalışma tohumlarda *Aspergillus spp.* ve *Penicillium spp.* üzerinde gerçekleştirilmiş ve 15 dk SF<sub>6</sub> plazması sonrası her iki türde de 3 log birimlik indirgenme sağlanmıştır [216]. Düşük basınç plazması ile oksijen ve argon kullanılarak 30 dk sonunda selüloz asetat membranlar yüzeyinde *Aspergillus brasiliensis* konsantrasyonunda 3.45 log birimlik indirgenme sağlanırken, 150 W-5 dk, 300 W – 1dk ve 400 W- 15 s plazma uygulamalarında argon ve oksijen karışımı kullanılarak 5.4 log indirgenme elde edilmiştir. Buna karşın, doğal olarak küf ile kontamine olmuş fıstıklarda 300 W- 1 dk argon-oksijen karışımı kullanılarak oluşturulan düşük basınç plazması ile 2 log indirgenme elde edilmiş ve plazmanın etkinliğinin pürüzlü yüzeylerde azaldığı belirtilmiştir [217].

1990'larda atmosferik basınç plazmaların geliştirilmesiyle yeni bir dönem açılmıştır [193-196]. Bu gelişim atmosferik basınç plazma sterilizasyonu ve biyodekontaminasyonu araştırma alanlarının önünü açmıştır. Atmosferik basınçta termal olmayan genel plazma üretim kaynakları plazma jetleri, dielektrik bariyer boşalım plazmaları (DBD), korona boşalım plazmaları ve mikrodalga boşalım plazmalarıdır.

Termal olmayan atmosferik basınç plazma jetleri (ABPJ) tipik olarak radyofrekans aralığında oluşturulan küçük boyutlarda "plazma alevi" üretmektedirler. Plazma jetleri genel olarak iki elektrottan oluşsa da (iğne elektrot ve halka elektrot) tek elektrotlu konfigürasyonlar da mevcuttur (iğne elektrot ve asıl topraklanmış elektrot). Elektrot aralığı genellikle mm aralığındadır ve proses gazı (genellikle asil gazlar) 100 V civarlarında voltajlarla ateşlenmektedir. Plazma jetlerinin en önemli avantajları küçük boyutlarda olması, çoğunlukla lokalize olduklarından, plazma uygulanacak hedef noktaya çok iyi odaklanabilmeleri ve dar aralıklara dahi çok iyi penetre olabilmelidir [218].

Bütün plazma kaynakları direkt modda olduğu gibi indirekt modda da çalıştırılabilmektedir. Plazmanın direkt uygulaması genellikle çok kısa ömrü olan ve milisaniyeler içerisinde sönmülenen daha çok çeşitlilikte reaktif türler içerir. Ayrıca, aşındırma ve birikim gibi yüzey-plazma interaksiyonları da oluşabilir. İndirekt

plazmalar ise genellikle ayrı bir reaktörde oluşturulur ve sadece nitrik oksit, ozon gibi daha uzun süre dayanan reaktif türleri içeren “plazma egzozu” örnekle temas eder. Bu plazmaların avantajı daha yüksek iyonlaşma enerjileri uygulanabilir ve bu da daha yüksek iyonlaşmaya ve daha sıcak ve reaktif bir plazma oluşumuna yol açar [219].

Bugüne kadar bir kaç araştırma grubu sterilizasyon ve biyodekontaminasyonun farklı uygulamalarında atmosferik basınç plazma kaynaklarının antimikrobiyel etkileri ve optimizasyonu için çalışmaktadır [182, 220-226]. Özellikle sterilizasyon ve biyodekontaminasyon amacıyla kullanıldıklarında atmosferik basınç plazmalar homojen olmayan geometriye sahip malzemeler için (örneğin; endoskop ya da kateterlerde geleneksel sterilizasyon yöntemlerinin etkisi sınırlıdır) çok iyi sonuçlar vermektedirler [227, 228].

Atmosferik basınç plazma teknolojisinin en büyük avantajlarından biri sonunda mikrobiyolojik açıdan güvenli ürünler elde edilebilen sürekli üretim proseslerine entegre edilebilmesidir. Ancak, bu sterilizasyona yeni bir bakış açısı getirilmesini gerektirebilir, son ürüne tek bir uygulamadan ziyade, tüm üretim prosesini kapsayan ve prosesin farklı basamaklarına entegre edilebilen bir sistem olarak düşünülmelidir.

Atmosferik basınçta oluşturulan termal olmayan plazmalar elektronlar, atomlar ve moleküllerin çarpışmaları sonucu üretilen çok çeşitli reaktif türleri içermektedir. Bu nedenle, serbest yük taşıyıcıları bir elektrik ya da elektromagnetik alan uygulaması ile hızlandırılarak elastik ve elastik olmayan çarpışmalara yol açmaktadırlar. Elastik çarpışmalarına, transfer edilen enerji fraksiyonunun çok küçük olduğu kinetik enerjinin yeniden dağıtılması da eşlik etmektedir. Aksine, elastik olmayan çarpışmalar 15 eV'a kadar enerji transferini içermekte ve iyonlaşma, uyarılma ve disosiyasyona yol açmaktadır. İyonları ve nötralleri içeren reaksiyonlar da yük değişimlerine ya da oligomerizasyona yol açmaktadırlar. Bunun sonucunda, reaktif oksijen türleri, (ROS; örn. atomik oksijen (O), ozon (O<sub>3</sub>), hidroksil radikali (OH•)) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS; örn. N<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, nitrik oksit radikali (NO•)), yüklü parçacıklar, elektronların yanısıra önemli inaktivasyon ajanları olarak kabul edilen UV-A ve UV-B radyasyon kaynağı olduğu ve plazmanın başlattığı oksidatif stresin hücre zararı ve ölümüne sebep olduğu bilinmektedir [182, 192, 218, 220, 229]. Plazmada bulunan her bir bileşik ayrı ayrı mikroorganizmaları inaktive

edebilmektedir, ancak eş zamanlı olarak hareket ederek bakterisidal etkilerini sinerjetik olarak artırabilmektedirler. Elektronlar iyonlaşmayı başlattıklarından, uyarma frekansı, gaz akışı ve basınç gibi parametreler elektron yoğunluğunu ve sıcaklığı ve dolayısıyla reaktif türlerin konsantrasyonunu belirlemektedir [230].

Bu aktif türler, hücreler arası DNA kırılmasından protein dejenerasyonuna, dış membran oksitlenmesine kadar birçok biyolojik reaksiyondan sorumludur [203, 231]. Atomik oksijen ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri çok yüksek reaktivitelerinden dolayı neredeyse tüm hücre bileşenleri ile reaksiyona girebilirler. Özellikle atomik oksijen hidrojenle reaksiyona giren ve aşındırma prosesinde ve proteinlerin oksidasyonunda yer alan çok güçlü bir oksidasyon ajanıdır [218].

Genel olarak plazma aktif türleri penetrasyon özellikleri kısıtlı olduğundan substratların sadece yüzeyine etki etmekte ve mikrobiyel indirgenme dış yüzey ile sınırlı kalmaktadır. Buna karşılık yığın özellikleri etkilenmemektedir. Ek olarak, plazma uygulamasındaki inaktivasyon mekanizmalarının birden çok olması tek bir inaktivasyon mekanizması uygulanması durumunda zamanla ortaya çıkabilecek bakteriyel direnci etkisiz hale getirmektedir [232].

Bugünlerde, atmosferik basınçta çalışan çok sayıda farklı plazma kaynakları araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Genel kurulum (örneğin: plazma jet veya DBD; direkt veya indirekt), kullanılan proses gazı, uyarılma şekli ve gaz akış hızı gibi özelliklerle birbirinden ayrılmaktadırlar. Bu özellikler farklı karakterlerde plazma oluşumuna yol açmaktadırlar; örneğin, sıcaklık, iyonlaşma derecesi, elektron yoğunluğu, elektron sıcaklığı, ROS ve RNS konsantrasyonu, UV-A, UV-B ve UV-C oluşumu, vb. Bu özellikler plazmanın inaktivasyon etkisini büyük ölçüde etkilemektedir. Ayrıca, plazma kaynağının özellikleri verilirken, oluşturulan plazmanın spesifik karakterlerini olabildiğince doğru ifade etmek büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda, plazmanın potansiyel uygulamaları üzerine yapılan çalışmalar gıda mühendisliği ve gıda işleme alanlarında ilgi çekmeye başlamıştır. Özellikle oda sıcaklığına yakın seviyelerde plazma oluşumuna izin veren termal olmayan yeni plazma kaynaklarının geliştirilmesi ısıya duyarlı gıda yüzeyleri için uygun olabileceği düşünülmektedir. Plazma kaynağı, plazma besleme gazı ve uygulama modları inaktivasyon derecesini oldukça etkilemektedir. Shama vd. (2012) domuz

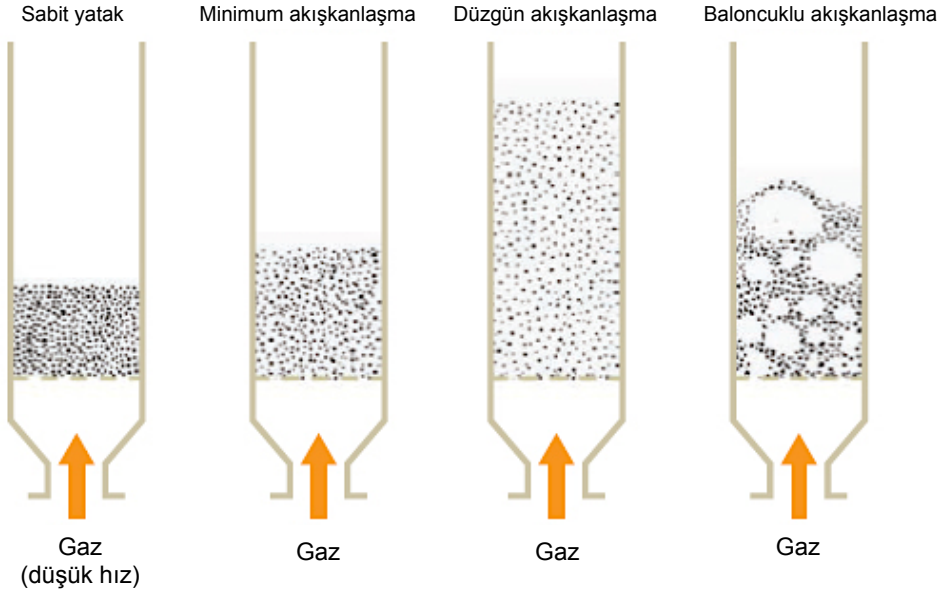
pastırması, domuz eti, jambon, elma, kavun, mango, kabak, peynir, yumurta ve fındık örneklerine uygulanan işlemlerin bildirildiği, gıdaların plazma dekontaminasyonu üzerine bir özet yayınlamıştır [232]. Buna ek olarak, yakın zamanda yapılan plazma dekontaminasyon çalışmaları arasında mısır salatası [233], taze meyve ve sebzeler [234], karabiber taneleri [235] ile otlar ve baharatlar [236] sıralanabilir. Ayrıca, bademler üzerinde *Escherichia coli* [214], peynir ve jambon üzerinde *Listeria monocytogenes* [237], elma suyunda gıda zehirlenmesi vakalarının % 90'ından sorumlu ve buzdolabı sıcaklığında ve olumsuz koşullarda bile canlılığını uzun süre sürdürebilen enterohemorajik *E. coli* O157:H7 [238] plazma ile başarılı bir şekilde inaktive edilmiştir.

Özellikle toksijenik küfler üzerinde plazmanın etkisinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır. Herceg vd. (2014) *Aspergillus ochraceus* üzerinde tek elektrotlu atmosferik plazma jeti ile 25 kHz'de 5 dk argon plazması uygulayarak 3.42 log azalma sağlamışlardır [239]. Başka bir çalışmada ise *A. flavus* ile kontamine edilmiş kırmızı pul biberlerde 900 W atmosferik azot plazması sonrası sadece 2.5 log spor/g indirgenme elde edilmiştir [240]. Suhem vd. (2013), tahıllı atıştırmalıklar üzerinde *A. flavus* sayımlarında 3.03 log kob/g azalmayı 5 dk atmosferik argon plazması uygulayarak sağlamışlardır [241].

## 2.5 Akışkan Yatak Reaktörler

Belirli boyuttaki katı partikülleri, gaz veya sıvı bir akışkan yardımı ile, akışkan özelliği kazandırma işlemine akışkanlaştırma adı verilmektedir. Bir kolon ya da reaktör içerisindeki katı partiküllerin bulunduğu ortama dağıtıcı görevi gören delikli plakanın üzerinden akışkan (basıncı gaz) gönderilir. Dağıtıcı elek adı da verilen bu plaka üzerinde akışkanın ortama homojen bir şekilde dağılmasını sağlayan çok sayıda açıklık bulunmaktadır. Bu açıklıkların çapları, tanecikleri geçirmeyecek kadar küçük ve gazın geçişini engelleyeci bir basınç düşüşüne sebep olmayacak kadar da büyük olmalıdır. Dağıtıcı elekten geçen gaz, yatak boyunca ilerleyerek, yer çekimine karşı partiküllere kuvvet uygular. Başlangıçta, gaz katı partiküllerin arasındaki boşluklardan geçerek yükselirken partiküller içerisinde herhangi bir hareket gözlenmez. Başka bir deyişle, yatağı oluşturan katı partiküllerin ağırlığından dolayı oluşan toplam yer çekimi, reaktöre verilen gaz hızının sağladığı itici kuvvete eşit oluncaya kadar, bu sisteme sabit yatak adı verilmektedir. Gaz hızının artırılmasıyla, bir noktada, gazın partiküllere uyguladığı kaldırma kuvveti, partiküllerin oluşturduğu

yer çekimi kuvvetine eşit hale gelir, akışkanlaşmanın başlangıcı noktasına gelir ve partiküller havada asılı kalırlar. Buradaki gazın hızına, “minimum akışkanlaştırma hızı” adı verilmektedir. Gaz hızı artırıldığında, katı partiküller de hareketlenerek bir akışkan görünümü kazanmaktadırlar. Bu sisteme akışkan yatak adı verilmektedir. Farklı akışkan yatak türleri Şekil 2.7.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Akışkan yatak türleri

Gaz hızı artırılmaya devam ettiği durumda, önce küçük daha sonra büyük partiküller yataktan dışarıya taşınır. Katı partiküllerin dışarı taşınmaya başladığı hıza, “terminal hız” adı verilmektedir. Yatak, terminal hızın üzerinde taşıma sistemi olarak kullanılabilir. Bunun dışındaki durumlarda, akışkan yatak minimum akışkanlaştırma hızı ile terminal hız arasında çalıştırılmaktadır.

İyi akışkanlaşmış bir yatak pek çok bakımdan sürekli karıştırmalı reaktör özelliklerini gösterebilmektedir. Herhangi bir katı partikülün, reaktörün herhangi bir yerinde olma ihtimali eşittir. Sistem içerisinde büyük sıcaklık farklılıklarının oluşmaması, gaz ve partiküllerin çok iyi temas halinde olmasından dolayı ısı ve kütle transferinin hızlı olması, gaz ve partiküllerin birlikte akışkan özelliği göstermelerinden dolayı sistemin fiziksel ve dinamik özelliklerinin proses süresince kontrol edilebilmesi gibi avantajları beraberinde getirmektedir. Bu özelliklerinden dolayı akışkan yatak sistemleri kimya endüstrisinde önemli bir yer tutmaktadırlar. Uygulama alanları arasında taşıma, adsorpsiyon, piroliz, kurutma, ısı transferi, sınıflandırma, yüzey kaplama, sentez reaksiyonları yürütme, kalsinasyon, gazlaştırma, yanma ve klinker yapma



sıralanabilir.

Gıda alanında akışkan yatak sistemlerinin kullanımı daha çok kurutma prosesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, özellikle tanecikli tarım ürünlerinin (fındık, mısır, buğday, vb.) akışkan yatak sistemlerde kurutma etkinliği incelenmiştir [242-245].

Plazma teknolojisi entegre edilerek tasarlanan akışkan yatak plazma reaktörleri ise genel olarak partikül boyutu partikül boyutu 300 µm'den küçük toz halindeki materyallerin film depozisyonu amacıyla kullanılmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı polietilen toz partiküllerine atmosferik basınç akışkan yatak sistemde plazma uygulaması [246]; polietilen (60 µm), polipropilen (90 µm) ve poliamid (60 µm) partiküllerinin atmosferik basınç akışkan yatak plazma reaktöründe hava kullanılarak fonksiyonelleştirilmesi [247], polistiren boncuk (207 µm) yüzeylerinin akışkan yatak reaktörde akrilik asidin plazma polimerizasyonu ile stabilitesinin artırılması [248], polistiren partiküllerin (250 µm) laboratuvar ölçekli akışkan yatak plazma sistemlerinde kaplanması [249], cam boncuk yüzeyine (125 µm) akışkan yatak reaktörde mikrodalga plazması ile silikon oksit kaplaması [250], silika jel partiküllerine (100 µm) akışkan yatak reaktör plazma sisteminde kimyasal buhar birikim yöntemi ile TiO<sub>2</sub> filmleri ile kaplanması [251], akışkan yatak mikrodalga plazma reaktörü ile gümüş oksit ve gümüş nitratın buharlaştırılmasıyla gümüş nanopartiküllerin (3-50 nm) hazırlanması [252], düşük basınç akışkan yatak plazma sisteminde düşük yoğunluklu polietilen partiküllerinin (350 µm) azot ve amonyak ile yüzey modifikasyonu [253], hekzametildisiloksan monomeri kullanılarak, nikel oksit manyetik nanopartiküllerinin (10-100 nm) atmosferik plazma akışkan yatak sisteminde yüzey modifikasyonu [254] yapılan çalışmalar arasındadır.

Akışkan yatak plazma sistemlerinin gıdalarda uygulamalarına bakıldığında, buğdayların yüzeyinde *Bacillus amyloliquefaciens* endosporlarının düşük basınç akışkan yatak plazma sistemiyle inaktivasyonu bugüne kadar yapılan tek çalışmadır [255]. Ancak, düşük basınç sisteminin getirdiği en büyük dezavantaj sistemde vakumun sağlanması ve gaz giderme işlemleri nedeniyle proses süresi oldukça uzamaktadır. Bu çalışmada da etkili plazma uygulama süresi 73.5 s olsa da, toplam proses süresi 111.1 dk olarak belirtilmiştir.

### 3 MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Model Gıda Örnekleri

Çalışma kapsamında kavrulmamış iç kabuklu fındık ve yemlik mısır model gıda örnekleri olarak seçilmiştir. Fındık örnekleri ortalama 9-11 mm çapında,  $0.59\pm 0.07$  g ağırlığında ve  $0.97\pm 0.06$  g/cm<sup>3</sup> yoğunluğunda olup, Karadeniz bölgesindeki yerel bir üreticiden temin edilmiştir. Mısır örnekleri ise ortalama 8-10 mm çapında ve  $0.32\pm 0.07$  g ağırlığında ve  $1.12\pm 0.03$  g/cm<sup>3</sup> yoğunluğunda olup İç Anadolu bölgesindeki bir yem tedarikçisinden temin edilmiştir. Örnekler 4°C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2 Saf Küf Kültürlerinin Temini ve Geliştirilmesi

Potansiyel aflatoksin üreten küf suşlarından *Aspergillus flavus* (327) ve *Aspergillus parasiticus* (1041) TÜBİTAK MAM Küf Kültür Koleksiyonundan yatık vasatta temin edilmiştir. *A. flavus* suşu fındık örneğinden (Adapazarı) izole edilmiş ve ürettiği toksinler aflatoksin B<sub>1</sub> ve aflatoksin B<sub>2</sub> iken, *A. parasiticus* suşu da fındık örneğinden (Giresun) izole edilmiş ve ürettiği toksinler aflatoksin B<sub>1</sub>, aflatoksin B<sub>2</sub> ve aflatoksin G<sub>1</sub> olarak bildirilmiştir. Bu saf kültürlerden önce Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) agar (Merck KGaA, Almanya) plakalarına sürme yapılmış ve burada saf olduğu görüldükten sonra, tek koloniden yeniden çok sayıda YGC agar yatık vasatlarına sürme ve YGC agar plakalarına üç nokta ekim tekniği ile deneylerde kullanılmak üzere kültürler hazırlanmıştır. Tüpler tekrar kullanılana kadar buzdolabı sıcaklığında (4°C) stoklanarak muhafaza edilmiştir. Kültürlerin kurumaması ve canlı kalması amacıyla her 2 ayda tekrar pasaj yapılmıştır.

#### 3.3 Gıda Örneklerinin Küf Sporları ile Kontaminasyon Yöntemleri

*A. flavus* ve *A. parasiticus* küflerinden spor solüsyonu eldesi ve model yüzeye inokülasyonu için 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Model gıda örneklerinin yüzeyine küf sporlarının kontaminasyon yönteminin belirlenmesinde ön denemelerde cam boncuklar (d<sub>p</sub>: 5 mm) kullanılmıştır. Spor sayımında hem kültürel (YGC agar yüzeye yayma (100 µL)) hem de mikroskopik sayım (Thoma lamı) yöntemleri kullanılmıştır. Deneyler üçer örnek üzerinden ikili paraleller halinde yürütülmüştür. Sonuçların istatistiksel analizinde önce paralellerin ortalaması alınmış, sonrasında ortalama ve standart sapma hesaplamaları üç örnekten elde edilen sonuçlardan gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.1 Spor Solüsyonu Eldesi

Bu yöntemde, öncelikle YGC agar besiyerine saf kültürlerden 3 nokta ekim yöntemi ile inokülasyonlar gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de 5 gün inkübasyon sonucunda kültürler elde edilmiştir.

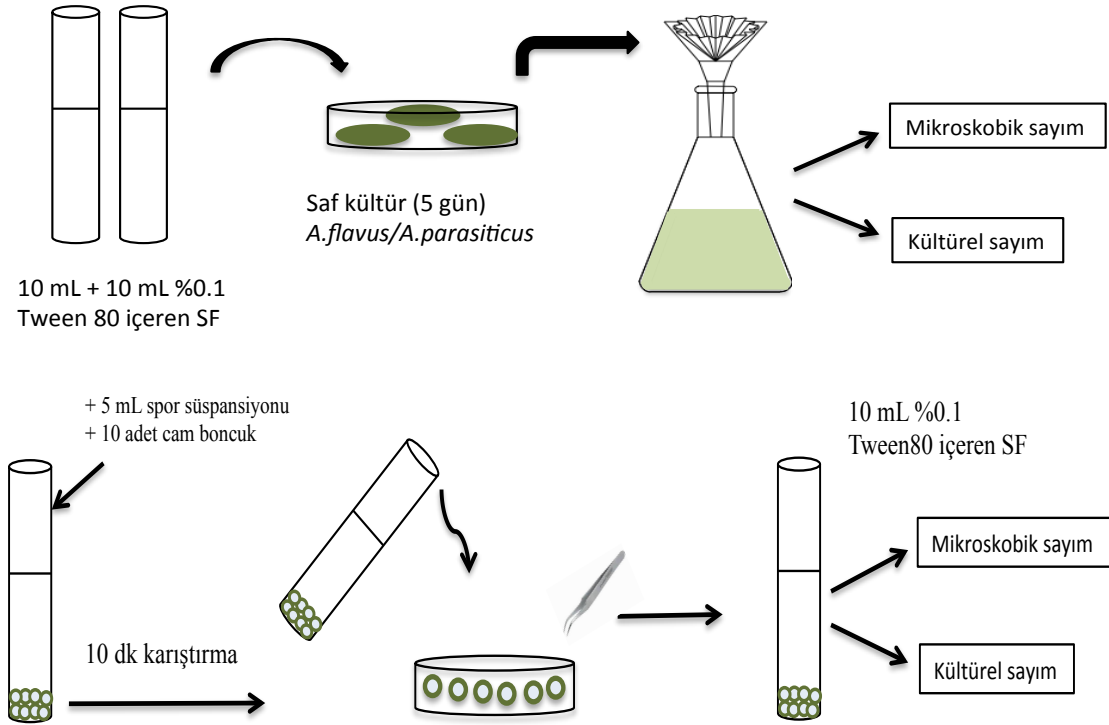
*Aspergillus* türleri hidrofobik olduğundan, kültür yüzeyinden sporların alınması sırasında kullanılan dilüsyon sıvısı % 0.1-1 oranlarında Tween 80 içermektedir [256].

Kültür yüzeyine, 20 mL % 0.1 Tween 80 içeren % 0.85'lik steril serum fizyolojik sıvısı iki aşamada (10 mL + 10 mL olacak şekilde) inoküle edilerek, steril cam bir baget yardımıyla nazikçe yüzeydeki küf sporları dilüsyon sıvısına geçirilmiştir. Dilüsyon sıvısına alınan küf sporları yüksek miktarda förtül hif içereceğinden ve mikroskopik sayımda küf sporlarının gözlenmesinde sorun teşkil edeceğinden, elde edilen küf sporu süspansiyonu 8-12 µm por çapına sahip membran ile filtre edilmiştir. *Aspergillus* türlerinin sporlarının ortalama çapının 2-5 µm olduğu bilinmektedir [257, 258].

Filtrasyon sonunda elde edilen spor solüsyonunun başlangıç konsantrasyonunu belirlemek için gerekli dilüsyonlar hazırlanarak YGC agar yüzeyine yayma ekimler gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar yüzeyindeki küf kolonilerinin sayımı gerçekleştirilerek spor solüsyonundaki başlangıç küf sporu sayısı kültürel yöntemle belirlenmiştir. Ayrıca, Thoma lamı kullanılarak aynı solüsyondaki küf sporu sayısı mikroskopik sayım yöntemi ile belirlenmiştir [257-260].

Başlangıç konsantrasyonu bilinen spor solüsyonundan 5 mL steril bir tüpe alınarak içerisine 10 adet cam boncuk (dp=0.5 mm) eklenmiş ve 10 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında tüp içeriği steril bir petri kutusuna aktarılmış ve spor solüsyonu ile kontamine edilmiş olan cam boncuklar, yüzeyine tutunmuş küf sporlarının sayısının belirlenmesi amacıyla steril bir pens ile 10 mL % 0.1 Tween 80 içeren % 0.85 'lik steril serum fizyolojik sıvısının içerisine alınmıştır. Cam boncuk yüzeyine tutunmuş küf sporlarının çözeltiye geçmesini sağlamak amacıyla tüp homojen bir şekilde 10 dk süre ile karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen bu solüsyondan seri dilüsyonlar hazırlanarak, YGC agar yüzeyine yayma ekimler gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon

sonunda agar yüzeyindeki küf kolonilerinin sayımı gerçekleştirilerek cam boncuk yüzeyine tutunan başlangıç küf sporu sayısı kültürel yöntemle belirlenmiştir. Ayrıca, Thoma lamı kullanılarak aynı solüsyondaki küf sporu sayısı mikroskobik sayım yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Spor solüsyonu eldesinde mikrobiyolojik sayım yöntemi şematik gösterimi

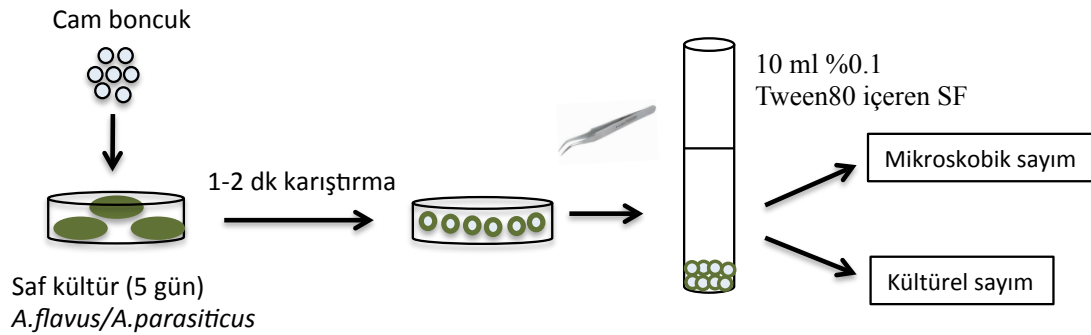
### 3.3.2 Doğrudan Kontaminasyon

Kullanılan ikinci yöntemde de, öncelikle YGC agar besiyerine saf kültürlerden 3 nokta ekim yöntemi ile inokülasyonlar gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de 5 gün inkübasyon sonucunda kültürler elde edilmiştir.

Kültür yüzeyine, 10 adet cam boncuk ( $d_p=0.5$  mm) konularak, yüzeyden küf sporlarını homojen bir şekilde cam boncuk yüzeyine geçirmek amacıyla nazikçe 1-2 dakika karıştırılmıştır [216]. Karıştırma işlemi sonrasında yüzeyine gözle görülür küf kontamine edilmiş cam boncuklar steril bir pens ile 10 mL % 0.1 Tween 80 içeren % 0.85'lik steril serum fizyolojik sıvısının içerisinde alınmıştır.

Cam boncuk yüzeyine tutunmuş küf sporlarının çözeltiliye geçmesini sağlamak amacıyla tüp homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen bu solüsyondan seri dilüsyonlar hazırlanarak, cam boncuk yüzeyine tutunan spor

sayısını belirlemek amacıyla hem kültürel (yüzeye yayma) hem de mikroskopik (Thoma lamı) yöntemle sayımlar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Doğrudan kontaminasyonda mikrobiyolojik sayım yöntemi şematik gösterimi

### 3.3.3 Gıda Örneklerinin Küf Kültürü ile Kontaminasyonu

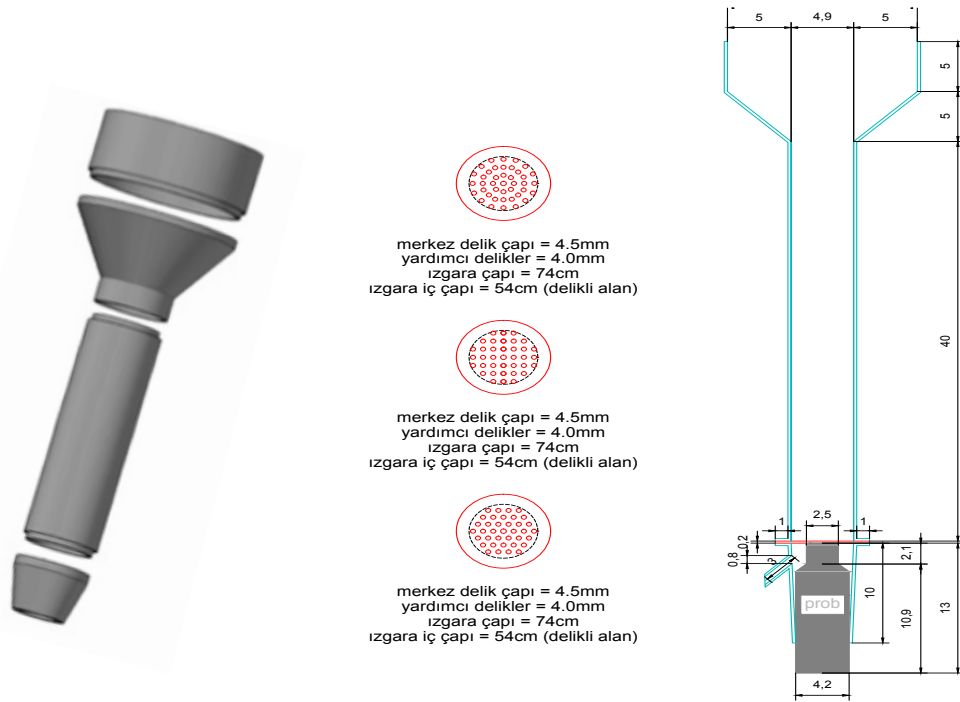
Gıda örneklerinin doğal florasında bulunan mikroorganizmaları uzaklaştırmak amacıyla, örnekler saf küf kültürü ile kontaminasyon işlemi öncesinde, ön dekontaminasyon işlemi için % 70 etanol çözeltisi ile 10 dk muamele edilmiş ve laminar akış kabini içinde 2 saat tutularak kurutulmuştur [215]. Böylece plazma dekontaminasyon işleminin etkisi sadece yapay olarak kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş saf küf kültürleri (*Aspergillus* spp.) üzerinde incelenmiştir.

YGC agar besiyerinde geliştirilmiş 5 günlük saf küf kültürlerinin (*A. flavus* ve *A. parasiticus*) yüzeyine 10 g gıda örneği (fındık ve mısır) konularak, yüzeyden küf sporlarını homojen bir şekilde materyal yüzeyine geçirmek amacıyla nazikçe 30 s süre ile karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında yüzeyine gözle görülür küf kontamine edilmiş örnekler steril bir petri kabına aktarılmış ve gıda materyalinin yüzeyine küf sporlarının tutunmasını sağlamak amacıyla 25-28°C'de 18-24 sa süre ile inkübasyona bırakılmıştır [215, 216]. İnkübasyon sonunda küf sporları ile kontamine edilmiş gıda örnekleri steril bir behere alınarak üzerine % 0.1 Tween 80 içeren steril serum fizyolojik solüsyonu aktarılmış ve 5 dk vorteksleme ve 10 dk çalkalama işlemi uygulanmıştır. Toplam 15 dk yüzey yıkama işlemi ile gıda örneklerinin yüzeyindeki küf sporları serum fizyolojik solüsyonuna aktarılmaya çalışılmıştır. Bu yüzey yıkama çözeltisinden gerekli dilüsyonlar yapılarak YGC agara yüzeye yayma yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar yüzeyindeki küf kolonilerinin

sayımı gerçekleştirilerek gıda örneklerinin yüzeyindeki başlangıç küf sporu sayısı hesaplanmıştır.

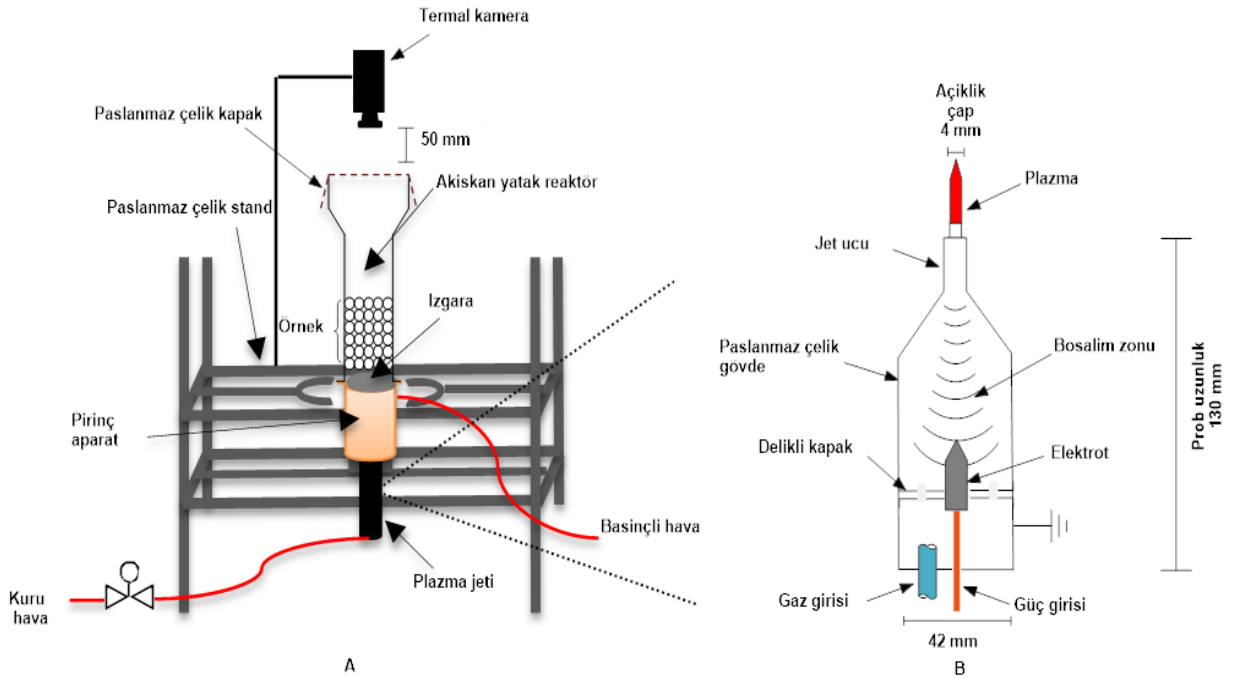
### 3.4 Akışkan Yatak Reaktör Tasarımı

Atmosferik basınç plazma sistemi (Plasmatreat GmbH, Almanya), 3x400V-16A güç jeneratörü, plazma jeti, yüksek voltaj dönüştürücü ve bir basınç kontrol ünitesinden oluşmaktadır. Atmosferik basınç plazma cihazı % 100-70 V referans voltaj, 15-25 kHz frekans ve 1000-5000 L/sa gaz akış hızı aralığında hava ve azot gazları ile çalışmaktadır. Atmosferik basınç plazma jetlerinde (ABPJ), bir ya da iki elektrotla donatılmış bir nozuldan plazma ateşlenmekte ve yüksek gaz akışıyla nozul dışına yayılmaktadır. ABPJlerin en büyük avantajı küçük boyutlarda olması ve dar aralıklara penetre edebilmeleridir [222]. Bu özellikleri ile APBJler, özellikle mikro yapıda boşluklar ya da kapillerler içeren kompleks geometrilerdeki uygulamalar için gelecek vaad etmektedir. Bu atmosferik basınç plazma sistemine entegre edilmek üzere, plazma jeti geometrisine uygun olacak şekilde iki adet akışkan yatak cam reaktör tasarlanmıştır (Şekil 3.3.). Reaktörlerden ilki 49 mm çap ve 147 mm uzunlukta ( $D_1$ : 49 mm) ve ikincisi 65 mm çap ve 195 mm uzunlukta ( $D_2$ : 65 mm) olup L/D oranları 3'tür.



Şekil 3.3. Akışkan yatak reaktör tasarımı

Akışkan yatak reaktörü plazma jetinin üzerinde sabitlemek üzere, cihaz geometrisine uygun paslanmaz çelikten bir stand tasarlanmış ve imal edilmiştir. Atmosferik plazma jeti akışkan yatak reaktörün alt kısmına yerleştirilmiştir. Örnekler plazma uygulama alanına sürekli bir biçimde kuru basınçlı hava sağlayan bir kompresör (Tamsan A.Ş., Türkiye) ile taşınarak, akışkanlaştırma işlemi kolaylaştırılmıştır. Kompresör, 900 L/dk hava verimi, 8 bar çalışma basıncı, 200 L tank hacmi ve 5.5 kW motor gücüne sahip olup, deneylerin yürütüldüğü Negatif Basıncı Biyogüvenlik Laboratuvarının fiziksel koşullarına uygun olacak şekilde yeniden tasarlanıp yaptırılmıştır. Kompresörden gelen havayı homojen bir şekilde dağıtmak için reaktörün alt kısmına yerleştirilmek üzere, paslanmaz çelikten 4 mm çapında 40 adet pora sahip bir ızgara tasarlanmıştır. Ayrıca hem plazma probunu sabitlemek hem de kompresörden gelen havayı reaktöre homojen bir şekilde iletmek üzere pirinçten bir aparat tasarlanarak sisteme dahil edilmiştir. Atmosferik Basıncı Akışkan Yatak Plazma sistemi ve atmosferik basınç plazma probunun ayrıntılı gösterimi Şekil 3.4.'te verilmiştir.

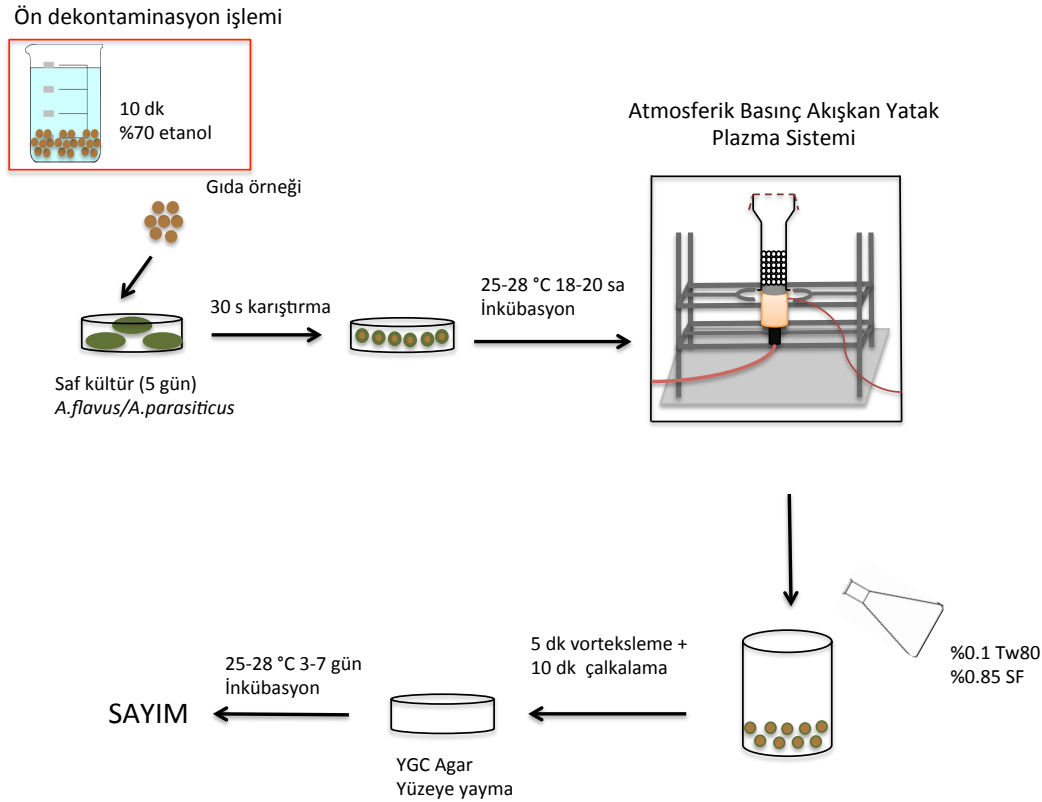


Şekil 3.4. Atmosferik basınç akışkan yatak plazma sistemi (A) ve atmosferik plazma probu (B)

### 3.5 Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Sisteminde Dekontaminasyon Uygulaması

Saf küf kültürleri (*A. flavus* ve *A. parasiticus*) ile kontamine edilmiş ve küf sporlarının yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla 25-28°C'de 18-24 sa süre ile inkübasyona bırakılmış gıda örnekleri, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde reaktör içerisine aktarılarak farklı plazma parametrelerinde (20 kHz- % 80 V (460 W), % 90 V (520 W), % 100 V (575 W) ve 25 kHz- % 80 V (525 W), % 90 V (590 W), % 100 V (655 W)) değişen sürelerde (1-5 dk), 3000 L/sa akış hızında kuru hava ve azot gazları kullanılarak plazma dekontaminasyon işlemine tabi tutulmuştur. Plazma dekontaminasyon işlemi sonunda örnekler steril bir behere alınarak üzerine % 0.1 Tween 80 içeren steril serum fizyolojik solüsyonu aktarılmış sonrasında 5 dk vorteksleme ve 10 dk çalkalama işlemi uygulanmıştır. Toplam 15 dk yüzey yıkama işlemi ile gıda örneklerinin yüzeyindeki küf sporları serum fizyolojik solüsyonuna aktarılmıştır. Bu yüzey yıkama çözeltisinden gerekli dilüsyonlar yapılarak YGC agara yüzeye yayma yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar yüzeyinde gelişen küf kolonilerinin sayımı gerçekleştirilerek gıda meteryalinin yüzeyinde plazma dekontaminasyon işlemi sonunda kalan küf sporu sayısı hesaplanmıştır. Akışkan yatak plazma sisteminde uygulanan hava akış hızının, model örnek yüzeyine tutunmuş küf sporlarına muhtemel etkisini incelenmek için aynı işlemler plazma oluşturulmadan sadece hava kullanılarak uygulanmıştır. Deneyler üçer örnek üzerinden ikili paraleller halinde yürütülmüştür. Sonuçların istatistiksel analizinde önce paralellerin ortalaması alınmış, sonrasında ortalama ve standart sapma hesaplamaları üç örnekten elde edilen sonuçlardan gerçekleştirilmiştir. Son olarak, plazma işlemi uygulanmış örnekler, başlangıç spor konsantrasyonunu temsil eden, yapay olarak kontamine edilmiş ancak plazma uygulanmamış altı adet kontrol örneğinin ortalaması ile karşılaştırılmıştır. Spor sayısındaki azalma kob/g ve logaritmik olarak log (kob/g) ile ifade edilmiştir. Deney prosedürü Şekil 3.5.'te şematik olarak gösterilmiştir.





Şekil 3.5. Deney prosedürü şematik gösterimi

### 3.6 Gıda Örneklerinin Doğal Florası Üzerinde Plazma Dekontaminasyon Etkisinin Belirlenmesi

Fındık ve mısır örneklerinin doğal florasında bulunan mikroorganizma yükünü belirlemek amacıyla kitleyi temsil edecek nitelikte homojen bir şekilde örnekleme yapılarak daha önce (Bölüm 3.5.) belirtildiği gibi yüzey yıkama yöntemi uygulanmıştır. Yıkama çözeltilerinden küf-maya florasını belirlemek amacıyla YGC agara, toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) yükünü belirlemek amacıyla Tryptic Soy Agara (TSA) yüzeğe yayma yöntemiyle ekimler gerçekleştirilmiştir. YGC agar 25-28°C'de 3-7 gün, TSA ise 35-37°C'de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda agar yüzeyinde gelişen kolonilerin sayımı yapılarak, gıda örneklerinin doğal florasında bulunan toplam küf-maya ve TAMB yükü hesaplanmıştır.

Başlangıç mikrobiyel yükü bilinen gıda örneklerine optimum parametrelerde plazma dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. Plazma dekontaminasyon işlemi sonrasında yüzeyde kalan mikroorganizma yükü Bölüm 3.5'te anlatılan yöntem uygulanarak belirlenmiştir. Deneyler üçer örnek üzerinden ikili paraleller halinde yürütülmüştür. Sonuçların istatistiksel analizinde önce paralellerin ortalaması alınmış, sonrasında

ortalama ve standart sapma hesaplamaları üç örnekten elde edilen sonuçlardan gerçekleştirilmiştir.

### 3.7 Mikroorganizmalara Ait D-değerlerinin Belirlenmesi

D-değeri; ortamdaki başlangıç mikroorganizma konsantrasyonunun % 90'ının indirgenmesi için gerekli olan süredir. D-değeri mikroorganizmalara ait logaritmik canlı kalma eğrisi (inaktivasyon eğrisi) verilerinden yararlanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\log N_0 - \log N = \frac{t}{D}$$

$N_0$ : Başlangıç mikroorganizma seviyesi (kob/g)

$N$ : Ulaşılan mikroorganizma seviyesi (kob/g)

$t$ : İşlem süresi (dk)

### 3.8 Depolama Etkisinin Belirlenmesi

Depolama işleminin plazma sonrası hasar gören *Aspergillus* türlerinin spor hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, *Aspergillus* sporları ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş fındık ve mısır örneklerine optimum plazma parametresinde ( $D_1$ : 49 mm, 655 W, hava) plazma dekontaminasyon işlemi uygulanarak 25°C'de 30 gün süresince depolanmıştır. Plazma işlemi öncesi, sonrası ve plazma işlemi uygulandıktan sonra 25°C'de 30 gün depolanan örneklerin yüzeyinde canlı kalan sporlar daha önce yukarıda verildiği gibi sayılmıştır. Ayrıca, kontrol grubu olarak başlangıç spor yükü  $\approx 10^2$  kob/g düzeyinde tutulan fındık ve mısır örnekleri de (optimum parametrede plazma işlemi sonrası örneklerin yüzeyinde kalan düzeyde) herhangi bir işleme tabi tutulmadan 25°C'de 30 gün süresince depolanmış ve depolama sonrası yüzeydeki canlı spor sayısı belirlenmiştir.

Zayıf asit tuzlarının farklı oranlarda bazı fırıncılık ürünlerinde koruyucu olarak küf gelişimini (*Aspergillus*, *Penicillium* ve *Eurotium* türleri) azalttığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [106, 261, 262]. Buradan yola çıkarak sodyum benzoat (SB) ve potasyum sorbat (PS) gibi küf gelişimini inhibe ettiği bilinen koruyucu bileşenlerin farklı konsantrasyonlarda kullanılmasıyla YGC agar besiyeri modifiye edilmiş ve hasarlı hücrelerle sağlıklı hücrelerin ayırt edilmesini sağlayacak bir ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. Başka bir deyişle, plazma işlemi sırasında hasar gören küf sporlarının gelişemediği ancak işlem görmemiş saf küf sporlarının gelişebildiği

bir ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, SB ve PS YGC agar bileşimine değişen oranlarda (% 0.05-2) otoklavlanmadan önce gerekli miktarlarda eklenmiştir. Besiyerlerinin pH ölçümleri sterilizasyondan sonra PHM210 (Radiometer, Danimarka) pH metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her bir izolat için, Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı gibi  $\approx 10^7$  spor/mL konsantrasyonunda hazırlanan işlem görmemiş spor süspansiyonlarından modifiye ve kontrol YGC agar besiyerlerine tek nokta ekim yöntemiyle inokulasyonlar gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar, koloni çapları ve görünür gelişme zamanları bazında takip edilmiştir. Petri kutuları her gün takip edilerek gelişen kolonilerin çapları ölçülerek kaydedilmiştir. *Aspergillus* türlerine karşı inhibisyon etkileri göz önünde bulundurularak koruyucu çeşidi ve konsantrasyonu optimize edilmiştir. Daha sonra, işlem görmemiş *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin spor süspansiyonları ( $\approx 10^7$  spor/mL) kontrol grubu olarak hazırlanmış ve hem kontrol hem de modifiye YGC agar besiyerlerine spor sayısını belirlemek amacıyla uygun dilüsyonlarından yüzeye yayma yöntemi (100 µL) kullanılarak inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda, optimum parametrede (655 W hava plazması, D<sub>1</sub>: 49 mm reaktör) plazma işlemi uygulanmış fındık ve mısır örnek yüzeylerinde canlı kalan *Aspergillus* türlerinin sayısını belirlemek amacıyla aynı kontrol ve modifiye YGC agar besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Petriler 25-28°C'de 7 gün süresince inkübe edilmiştir. Deneyler üçer örnek üzerinden ikili paraleller halinde yürütülmüştür. Sonuçların istatistiksel analizinde önce paralellerin ortalaması alınmış, sonrasında ortalama ve standart sapma hesaplamaları üç örnekten elde edilen sonuçlardan gerçekleştirilmiştir.

### **3.9 Termal Görüntüleme**

Atmosferik basınç akışkan yatak plazma uygulaması sırasında fındık örneklerinin plazma jetinin önünden geçişleri sırasında yüzeyinde oluşan sıcaklık bütün proses süresince Optris Plconnect (Optris GmbH, Almanya) yazılımını kullanan PI400 termal kamera ile görüntülenmiştir. Bu kompakt termal kamera 382x288 piksel çözünürlükte ve 0-250±2°C sıcaklık aralığında 80 Hz ölçüm hızıyla çalışmaktadır. Plazma prosesi süresince örneklerden 50 mm uzaklıkta sabitlenerek (Şekil 3.4.a) sıcaklık-zaman profilleri incelenmiştir.

### **3.10 Fındık Örneklerine Termal Proses Uygulaması**

Plazma prosesi boyunca örnek yüzeyinde oluşan sıcaklığın *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporları üzerindeki öldürücü etkisini incelemek amacıyla *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarıyla kontamine edilmiş fındık örneklerine 100°C'de 5 dk süresince kuru sıcak havada termal proses uygulanmıştır. Fındık örneklerinin plazma jetinin önünden geçişi sırasında oluşan en yüksek sıcaklıktan daha fazla olsa da, örnekler için olabilecek en şiddetli ve olumsuz koşullar oluşturulmuştur. Örnekler çevresel şartların stabilize edildiği durağan ortama sahip bir kurutma fırınına yerleştirilmiş ve yüzey sıcaklığı 100°C'ye ulaştığında 5 dk süresince termal proses uygulanmıştır. Termal proses öncesi ve sonrasında fındık örnekleri yüzeyindeki canlı spor sayısı karşılaştırılmıştır. Deneyler üçer örnek üzerinden ikili paraleller halinde yürütülmüştür.

### **3.11 Plazma Dekontaminasyon İşleminin Küf Sporlarının Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Kontrol ve optimum parametrelerde (% 100 V- 25 kHz 30 s) atmosferik plazma işlemi uygulanmış *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporları taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Fungal hif ve sporları içeren süspansiyonlar bir gece (18 sa) 4°C sıcaklıkta % 2.5 gluteraldehit çözeltisi ile sabitlenmiştir. Ardından gluteraldehiti uzaklaştırmak için 0.1 M sodyum fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler 0.1M PBS içerisinde % 1 osmium tetraoxide (OsO<sub>4</sub>) ile 30 dk ikinci bir fiksasyon amacıyla muamele edilmiştir. Ardından 0.1M PBS ile üç yıkama (her biri 10 dk) ve su ile iki yıkama (her biri 10 dk) işlemlerinden sonra, fikse edilmiş örnekler artan konsantrasyonlarda etanol (30 mL/100 mL den 100 mL/100 mL) içerisinde dehidre edilmiştir. Dehidrasyon işlemi 100 g/100 g etanol içerisinde üç kere 10 dk yıkama işlemi ile sonlandırılmıştır. 10 µL'lik örnekler SEM örnek tutucularının üzerine konulmuş ve görüntülemeye önce çok ince bir paladyum altın tabaka ile kaplanmıştır. Kaplama sonrasında, örnekler yüksek vakum modunda 20 kV voltaj ile taramalı elektron mikroskobunda (QUANTA 400F Field Emission SEM, ODTU Merkez Lab., Türkiye) incelenmiştir [263, 264].

## 4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Küf Sporlarının Gıda Örneklerine Kontaminasyonunun Gerçekleştirilmesi

#### 4.1.1 Spor Solüsyonu Hazırlanması

Küf sporlarının model örneklerle kontaminasyon yönteminin belirlenmesi amacıyla uygulanan spor solüsyonu eldesi yönteminde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Spor solüsyonu hazırlanması ile elde edilen *A. flavus* ve *A. parasiticus* başlangıç konsantrasyonları

	Başlangıç spor konsantrasyonu				Yüzeğe tutunan spor konsantrasyonu			
	Mikroskopik sayım		Kültürel sayım		Mikroskopik sayım		Kültürel sayım	
	spor/mL (*10 <sup>6</sup> )	log (spor/mL)	kob/mL (*10 <sup>6</sup> )	log (kob/mL)	spor/ boncuk (*10 <sup>5</sup> )	log (spor/ boncuk)	kob/ boncuk (*10 <sup>4</sup> )	log (kob/ boncuk)
<i>A. flavus</i>	9.20±1.60	6.95±0.08	1.97±0.45	6.29±0.10	2.97±0.40	5.47±0.06	6.73±3.52	4.83±0.27
<i>A. parasiticus</i>	9.38±1.06	6.97±0.05	4.42±2.13	6.65±0.26	1.71±0.48	5.23±0.12	3.17±1.26	4.50±0.18

Mikroskopik sayım sırasında, spor hücresi sayımını güçleştirecek boyutlarda büyük hif topluluklarına rastlamamakla birlikte parçalanmış ve küçük boyutlarda hifler gözlenmiştir. Ancak, *Aspergillus* türlerinin morjolojik yapıları göz önünde bulundurulduğunda filtrasyon sırasında hiflerle birlikte sporların da membran yüzeyinde kalabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle saf küf kültürünün yüzeyinde daha fazla spor var iken, elde edilen solüsyondaki spor konsantrasyonunun daha az olması beklenmektedir. Bununla birlikte, başlangıç spor solüsyonundaki sporların yaklaşık 1-2 log birimlik kısmı model örnek yüzeyine aktarılamadığından, yüzeğe tutunan spor konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, saf *Aspergillus* spp. spor solüsyonları ile kontaminasyon gerçekleştirildiğinde model gıda örneklerinin su aktivitesi değerleri değiştirebileceğinden, kontrolsüz küf gelişimi gerçekleşebilmektedir.

#### 4.1.2 Doğrudan Kontaminasyon

Küf sporlarının model örneklerle kontaminasyon yönteminin belirlenmesi amacıyla uygulanan doğrudan kontaminasyon yönteminde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Doğrudan kontaminasyon ile elde edilen *A. flavus* ve *A. parasiticus* başlangıç konsantrasyonları

	Mikroskopik sayım		Kültürel sayım	
	spor/mL	log (spor/mL)	kob/boncuk	log (kob/boncuk)
<i>A. flavus</i>	$2.84 \pm 1.05 \cdot 10^7$	$7.45 \pm 0.20$	$3.98 \pm 0.88 \cdot 10^6$	$6.60 \pm 0.09$
<i>A. parasiticus</i>	$4.37 \pm 1.48 \cdot 10^7$	$7.64 \pm 0.14$	$5.83 \pm 1.17 \cdot 10^6$	$6.77 \pm 0.09$

Mikroskopik incelemelerde, spor hücresi sayımını güçleştirecek boyutlarda büyük hif topluluklarına rastlanmamıştır. Ancak spor solüsyonu hazırlama yöntemine göre daha çok sayıda parçalanmış ve küçük boyutlarda hifler gözlenmiştir.

*A. flavus* ve *A. parasiticus* saf kültürlerinin örnek ile kontaminasyonunu sağlamak amacıyla 2 farklı yöntem kullanılmıştır. 1. yöntemde boncuk yüzeyine küf sporlarını inoküle etmek için 2 aşamalı bir deney planı uygulanırken, 2. yöntemde boncuk ile küf sporları doğrudan karşı karşıya getirildiğinden daha az iş yükü gerektirmekte ve zaman ve kimyasaldan tasarruf sağlanmaktadır. Mikrobiyolojik sayım sonuçlarına bakıldığında da, 1. yöntemde spor solüsyonun başlangıç konsantrasyonu  $\approx 10^6$  spor/mL seviyelerinde iken, boncuk yüzeyine inoküle edilebilen spor konsantrasyonu  $\approx 10^5 - 10^4$  spor/boncuk seviyelerine düşmektedir. Diğer taraftan 2. yöntemde, küf sporları ile örnek doğrudan karşılaştığı için, örnek yüzeyine inoküle edilen küf konsantrasyonları  $\approx 10^7$  spor/boncuk ve  $\approx 10^6$  kob/boncuk seviyelerindedir. Mikrobiyolojik sayımda spor sayısının yüksek çıkmasının sebebi, hem canlı hem de ölü hücrelerin birlikte sayılmasından kaynaklanmaktadır.

Bundan sonraki mikrobiyolojik deneylerde model örneklerle küf sporu inokülasyonu için doğrudan kontaminasyon yöntemi seçilmiştir. Ayrıca, mikroskopik sayım yönteminin getirdiği bazı dezavantajlar nedeniyle (ölü hücrelerin de sayılması, kişisel hataların sonucu büyük oranda etkilemesi) bundan sonraki mikrobiyolojik sayımlara sadece canlı hücrelerin sayıldığı kültürel yöntemle devam edilmiştir.

#### 4.1.3 Gıda Örneklerinin Küf Kültürü ile Kontaminasyonu

Doğrudan kontaminasyon yöntemi kullanılarak saf *Aspergillus* kültürleri ile kontamine edilen ve küf sporlarının yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla 25-28°C'de 18-24 sa süre ile inkübasyona bırakılmış gıda örneklerinin yüzeylerinde başlangıç küf sporu sayısı Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Gıda örneklerinin yüzeyindeki başlangıç *A. flavus* ve *A. parasiticus* sayıları

	FINDIK		MISIR	
	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
kob/g	4.68±0.31*10 <sup>6</sup>	5.76±0.92*10 <sup>6</sup>	9.89±5.16*10 <sup>6</sup>	1.31±0.68*10 <sup>7</sup>
log (kob/g)	6.67±0.03	6.76±0.08	7.00±0.26	7.12±0.23

#### 4.2 Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Sisteminin Model Gıda Örnekleri Üzerindeki Dekontaminasyon Etkisi

Atmosferik basınç plazma cihazı % 100-70 V referans voltaj ve 15-25 kHz frekans ve 1000-5000 L/sa akış hızı aralıklarında çalışmaktadır. Farklı gaz akış hızlarında plazma oluşumu izlenmiş ve 3000 L/sa gaz akış hızında daha stabil bir plazma jeti oluşumu gözlenmiştir. Plazma işlem parametrelerini belirlemek amacıyla farklı frekans ve referans voltaj değerlerinde plazma oluşumu izlenerek, stabil plazma oluşumu takip edilmiştir. Çizelge 4.4.'te gösterildiği üzere 20 kHz ve 25 kHz frekanslarında; % 100-80 referans voltaj aralığında stabil bir plazma oluşumu gözlemlendiğinden bu parametrelerde plazmanın dekontaminasyon etkisinin incelenmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.4. Atmosferik basınç plazma parametrelerinde plazma oluşumu

3000 L/sa	Referans Voltaj %	Plazma Voltaj (V)	Akım (A)	Plazma Gücü (W)	Plazma Oluşumu
25 kHz	100	350	24	655	✓
	90	315	22	590	✓
	80	280	19	525	✓
	70	245	15	460	≈
20 kHz	100	350	24	575	✓
	90	315	22	520	✓
	80	280	19	460	✓
	70	245	15	400	≈
16 kHz	100	350	24	460	✓
	90	315	24	415	≈

#### 4.2.1 Fındık Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Kuru Hava

Fındık örneklerinde atmosferik basınç akışkan yatak plazma sistemi ile kuru hava kullanılarak *Aspergillus* türleri üzerinde dekontaminasyon işlemi, iki farklı akışkan yatak reaktörde, 6 farklı plazma parametresi değişen sürelerde kullanılarak uygulanmıştır.

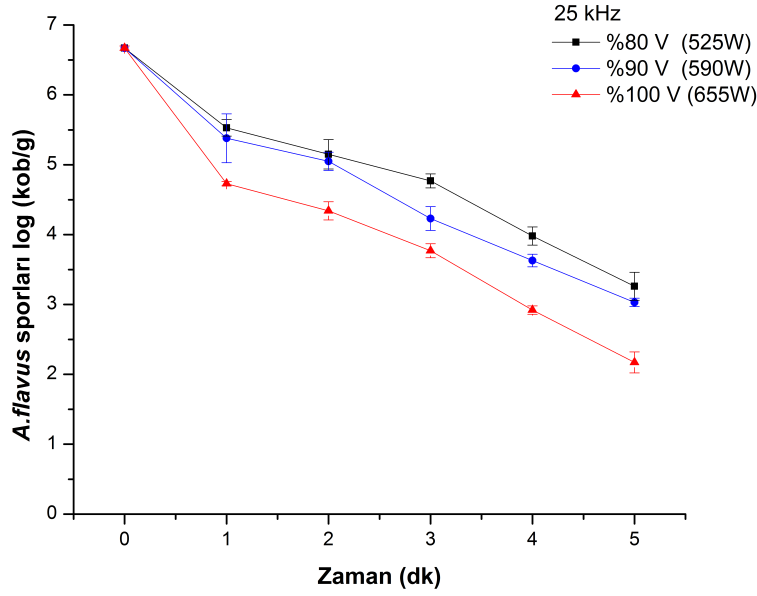
##### 4.2.1.1 1. Akışkan Yatak Reaktör- D<sub>1</sub>: 49 mm L<sub>1</sub>: 165 mm

İlk akışkan yatak reaktör 49 mm çapta ve 165 mm uzunluğunda olup camdan imal edilmiştir.

Öncelikle, akışkan yatak plazma sisteminde uygulanan hava akış hızının, model örnek yüzeyine tutunmuş küf sporlarına muhtemel etkisini incelenmek için *A. flavus* ve *A. parasiticus* ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş fındık örneklerine, plazma oluşturulmadan, 1-5 dk süresinde, 3000 L/sa akış hızıyla hava uygulanmıştır. Uygulama sonunda fındık yüzeyindeki küf sporları sayısının (ortalama  $\cong 10^6$  kob/g) başlangıçta yüzeye tutunan küf sporları sayısından (ortalama  $\cong 10^6$  kob/g) logaritmik düzeyde farklı olmadığı gözlenmiştir. Böylece, küf sporları ile kontamine edildikten sonra küf sporlarının yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla 25-28°C'de 18-24 sa süre ile inkübasyona bırakılmış gıda örneklerinin yüzeyindeki küf sporunun yüzeye kuvvetli bir şekilde tutunduğu ve spor sayısının uygulanan gaz akış hızıyla değişmediği gözlenmiştir.

*A. flavus* ve *A. parasiticus* ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş fındık örneklerine, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde, D<sub>1</sub>: 49 mm reaktörde, 20 kHz ve 25 kHz frekanslarında; % 100 V, % 90 V ve % 80 V referans voltaj parametrelerinde 1-5 dk süresince, 3000 L/sa hava akış hızıyla plazma dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının farklı plazma parametrelerinde uygulanan dekontaminasyon işlemi sonrasında logaritmik canlı kalma eğrileri Şekiller 4.1.-4.4'te gösterilmiştir.





Şekil 4.1. Fındık yüzeyinde *A. flavus*'un  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

25 kHz frekansta, % 80 V, % 90 V ve % 100 V referans voltajlarda uygulanan plazma dekontaminasyon işleminin 5. dakikasının sonunda canlı *A. flavus* sporlarında sırasıyla 3.41, 3.64 ve 4.50 log (kob/g) birimlik indirgenme sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca plazma dekontaminasyon işleminin ilk dakikasında % 100 V parametresinde canlı *A. flavus* sporlarında yaklaşık 2 log (kob/g) birimlik bir indirgenme gözlenmiştir. Plazma işlem süresi arttıkça küf sporlarındaki indirgenme beklendiği gibi artmıştır. Plazma işleminin başladığı andan itibaren ilk 1 dakikalık süre içerisinde indirgenme hızlı iken, ilerleyen zaman içerisinde bu eğilim azalarak sürmüştür. Bu tip bir indirgenme davranışı, küf sporlarının fındık yüzeyinin sahip olduğu topografyada dağılımı ve yerleşimi ile açıklanabilir (Şekil 4.10.a). Plazma aktif türlerinin 3 boyutlu geometride dinamik olarak hareketli olması nedeni ile yüzeyi doğrudan gören türlerin küf sporlarına erişimi ve indirgemesi hızla gerçekleşebilmektedir. Sporların büyük bir kısmı fındıkların dış yüzeyinde dağıldığı için, plazma aktif türleri bu hücrelere kolayca erişebilirken, bir kısmının ise fındık yüzeyindeki pürüzlülük nedeniyle plazma aktif türleri ile yeterince karşılaşamama olasılığı da vardır. Termodinamik olarak, sahip olduğu yüksek enerji seviyesini ilk fırsatta aktarmak isteyen tüm enerjetik parçacıkların, görme alanı dışında (shape

factor) kalan küf sporlarına enerjilerini aktararak indirgeme işlemini gerçekleştirememiş olma olasılıkları malzemenin topografyası nedeniyle vardır.

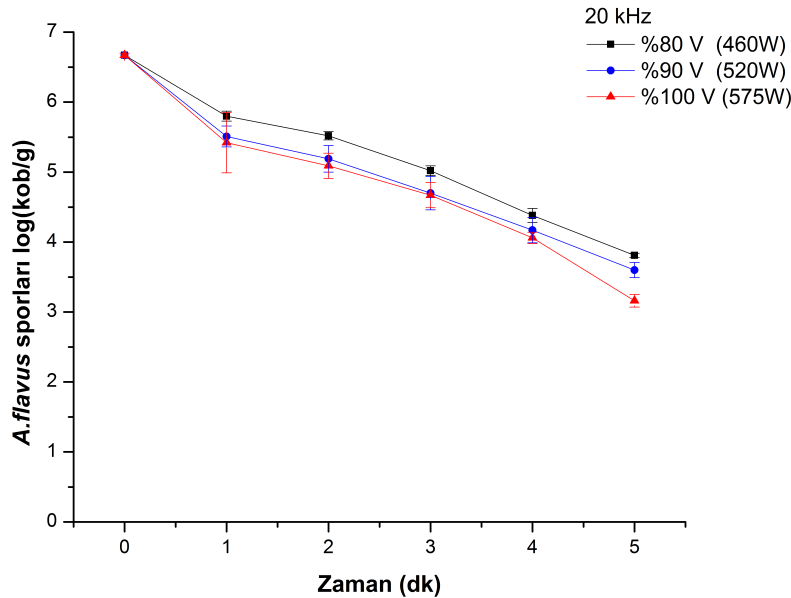
Geleneksel sterilizasyon sistemleri (otoklav, Pastör fırını, etilen oksit) genellikle lineer (doğrusal) canlı kalma eğrileri verir ve bu durumlarda inaktivasyon prosesi zamanın üssel bir fonksiyonudur [204]. Buna karşın, plazma sterilizasyonu üzerine yapılan deneysel çalışmalar plazma prosesinde farklı şekillerde canlı kalma eğrileri elde edilebildiğini göstermiştir. Bazı araştırmacılar lineer eğriler gözlemlerken [265-267], çoğu durumda her birinin farklı bir inaktivasyon fazını gösterdiği iki ya da üç doğrusal kısımdan oluştuğu gözlenmiştir [211, 268, 269]. Bu sonuçlar termal olmayan plazmalarla bakteri inaktivasyonunun, öldürme prosesi kinetiğini bir kaç faktörün etkilediği kompleks bir proses olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Kelly-Winterberg ve ark.'ın [268] iki fazlı canlı kalma eğrileri ile ilgili ortaya koyduğu hipotezde, ilk basamakta plazma aktif türlerinin hücrelerin dış membranlarına etki ettiği ve hasar verdiği belirtilmiştir. Bu proses yeteri kadar ilerlediğinde, reaktif türler kolaylıkla hücre ölümüne sebebiyet verebilmektedir ve bu da daha hızlı olan ikinci basamağı oluşturmaktadır. Üç basamaktan oluşan birden çok eğimli canlı kalma eğrilerinde ise ilk faz en yüksek öldürme hızını verir (en küçük D-değeri) ve çoğunlukla yığın halindeki sporların ilk tabakası üzerindeki UV radyasyonun etkisi ile domine edilmektedir. İkinci faz en yavaş kinetiğe sahiptir ve UV fotonları (foto-desorpsiyon) ve atomik oksijen (aşındırma) gibi diğer aktif türler tarafından gerçekleştirilen erozyon prosesine dayandırılmaktadır. Bu erozyon prosesi mikroorganizma ya da onları örten malzeme üzerinde aşındırma yaparak, devamlı olarak moleküler düzeyde madde uzaklaştırmaktadır. Son olarak üçüncü faz, kalan sporların da yeterince aşındırılmasıyla başlar ve UV fotonlarının genetik materyallerine direk etki etmesine izin verir [204]. Bu sonuçlar öldürme prosesi kinetiğine birkaç faktörün etki ettiği plazma ile mikroorganizma inaktivasyonunun karmaşık bir işlem olduğunu açıkça göstermektedir.

Bu işlemle, canlı *A. flavus* spor sayısı yaklaşık  $10^6$  kob/g seviyesinden  $10^2$  kob/g seviyelerine indirgenmiştir. Genel olarak, daha yüksek plazma gücü daha büyük indirgenme ile sonuçlanmıştır. Akışkan yatak atmosferik plazma reaktöründe uygulanan voltaj değeri arttıkça canlı *A. flavus* sporlarında gözlenen toplam azalma logaritmik olarak artmıştır. Buna göre proses gazına plazma işlemi sırasında uygulanan voltaj değeri arttıkça, plazmanın etkin gücünün arttığı ve plazma

sırasında oluşan aktif bileşenlerin yoğunluğunun artarak mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisini artırdığı sonucuna varılabilir.

Çizelge 4.5. D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. flavus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80 V-25 kHz (525 W) log (kob/g)	% 90 V-25 kHz (590 W) log (kob/g)	% 100 V-25 kHz (655 W) log (kob/g)
0	6.67±0.03	6.67±0.03	6.67±0.03
1	5.53±0.12	5.38±0.35	4.73±0.03
2	5.15±0.21	5.05±0.13	4.34±0.13
3	4.77±0.10	4.23±0.17	3.77±0.10
4	3.98±0.13	3.63±0.09	2.92±0.06
5	3.26±0.20	3.03±0.06	2.17±0.15



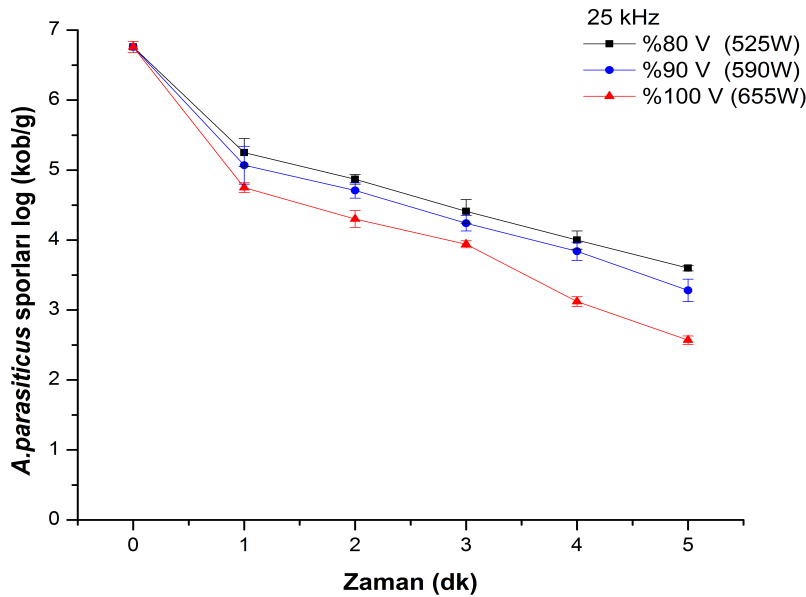
Şekil 4.2. Fındık yüzeyinde *A. flavus*'un D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

20 kHz frekansta, % 80 V, % 90 V ve % 100 V referans voltajlarda uygulanan 5 dk plazma dekontaminasyon işlemi ile canlı *A. flavus* sporlarında sırasıyla 2.86, 3.07 ve 3.51 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır (Şekil 4.2.). Akışkan yatak atmosferik plazma reaktöründe uygulanan frekans değeri azaldıkça canlı *A. flavus* sporlarında gözlenen toplam indirgenme de logaritmik olarak azalmıştır. Plazmada uygulanan frekans değeri azaldıkça, plazma etkin gücünün azalması ve dolayısıyla

plazma sırasında oluşan aktif bileşenlerin türünün ve yoğunluğunun etkilenmesi nedeniyle, mikroorganizmalar üzerinde plazmanın öldürücü etkisinde plazmanın oluşturulduğu “frekans” değerinin önemli bir parametre olduğu sonucuna varılabilir.

Çizelge 4.6. D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. flavus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80V-20kHz (460 W) log (kob/g)	% 90V-20kHz (520 W) log (kob/g)	% 100V-20kHz (575 W) log (kob/g)
	0	6.67±0.03	6.67±0.03
1	5.80 ±0.07	5.51±0.15	5.42±0.43
2	5.52±0.06	5.19±0.19	5.09±0.18
3	5.02±0.07	4.70±0.24	4.67±0.18
4	4.38±0.10	4.17±0.18	4.06±0.08
5	3.81±0.03	3.60±0.11	3.16±0.09



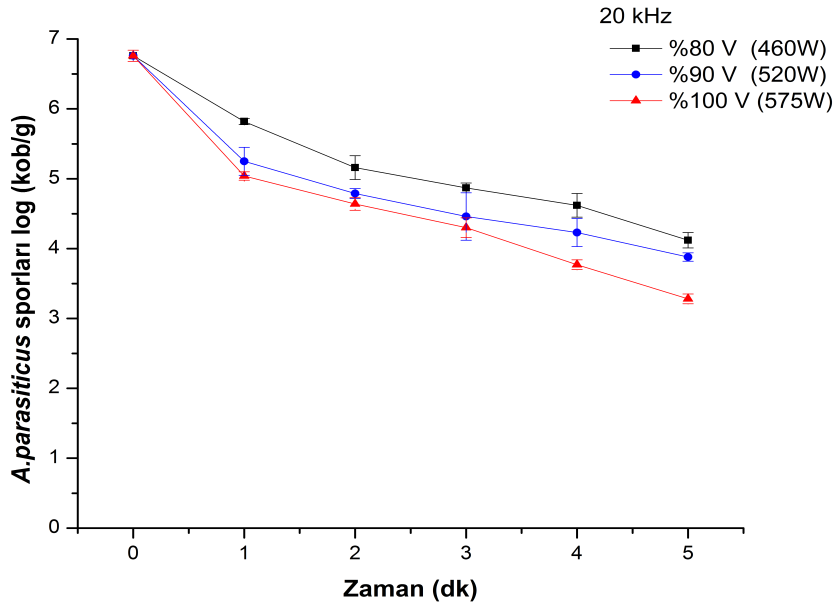
Şekil 4.3. Fındık yüzeyinde *A. parasiticus*'un D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Canlı *A. parasiticus* sporlarında 3.16, 3.48 ve 4.19 log (kob/g) birimlik indirgenme, 25 kHz frekansta, sırasıyla % 80 V, % 90 V ve % 100 V referans voltajlarda uygulanan 5 dk plazma dekontaminasyon işleminin sonunda gözlenmiştir (Şekil 4.3.). Ayrıca, % 100 V parametresinde plazma dekontaminasyon işleminin ilk dakikasında, *A. parasiticus* sporlarında yaklaşık 2 log (kob/g) birimlik bir azalma gözlenmiştir.

*A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının atmosferik basınç akışkan yatak plazma dekontaminasyon işlemine karşı dayanıklılıkları karşılaştırıldığında, plazma aktif bileşenlerinin *A. flavus* üzerindeki öldürücü etkisinin *A. parasiticus*'a göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu iki tür arasında en belirgin farklılık *A. flavus* değişen şekil ve büyüklükte, nispeten ince duvarlı ve kısmen pürüzlü konidiyumlar üretirken, aksine *A. parasiticus* konidiyumları yuvarlak ve kısmen kalın ve pürüzlü duvarları vardır. Uygulanan plazma işleminin *A. flavus* suşuna karşı öldürücü etkisinin daha fazla olmasının nedeni, *A. flavus* konidiyumlarının daha ince ve düz duvarlı olması ile açıklanabilir. Böylelikle plazma aktif türleri daha kolay penetre ederek, nispeten kalın ve pürüzlü konidiyumlara sahip *A. parasiticus* sporlarına göre daha etkili bir inaktivasyon gerçekleştirmiştir. *A. parasiticus*'un coğrafi dağılımının *A. flavus*'a göre sınırlı olması ve doğada daha yaygın bulunan *A. flavus* sporları üzerinde plazmanın öldürücü etkisinin daha fazla olması, uygulanan bu yöntemin daha etkin kullanımını sağlamaktadır [7]. Plazmanın inaktivasyon etkisi değerlendirilirken, *A. flavus* suşunun çevrede bulunma olasılığının daha fazla olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, proses sırasında plazma aktif türlerine karşı tepkileri üzerinde moleküler ve yapısal çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çizelge 4.7. D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. parasiticus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80V-25kHz (525 W) log (kob/g)	% 90V-25kHz (590 W) log (kob/g)	% 100V-25kHz (655 W) log (kob/g)
0	6.76±0.08	6.76±0.08	6.76±0.08
1	5.25±0.20	5.07±0.27	4.75±0.07
2	4.87±0.07	4.71±0.11	4.30±0.12
3	4.41±0.17	4.24±0.11	3.94±0.05
4	4.00±0.13	3.84±0.13	3.12±0.07
5	3.60±0.04	3.28±0.16	2.57±0.06



Şekil 4.4. Fındık yüzeyinde *A. parasiticus*'un D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

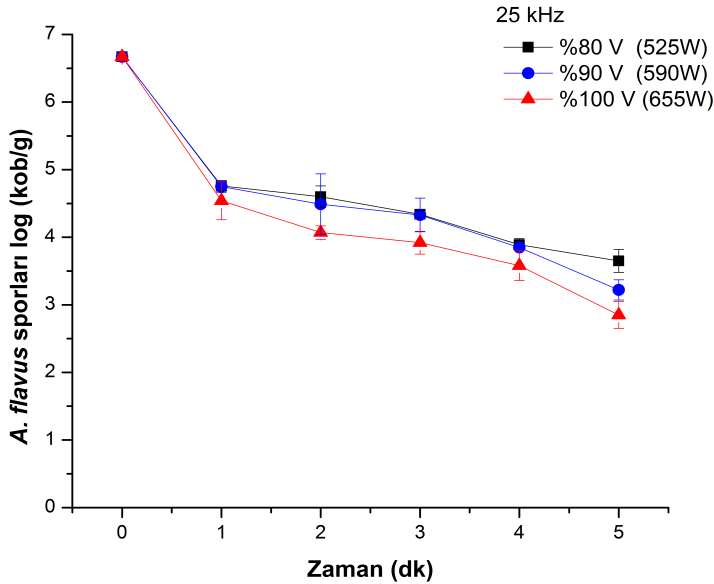
20 kHz frekans ve % 80 V, % 90 V, % 100 V referans voltajlarda 5 dk uygulanan hava plazması sonunda, canlı *A. parasiticus* sporlarında sırasıyla 2.64, 2.88 ve 3.48 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir (Şekil 4.4.). Plazmanın *A. flavus* üzerindeki öldürücü etkisinde de gözlemlendiği gibi, plazmanın oluşturulduğu frekans değerinin doğrudan plazmanın gücünü etkilemesi ve oluşan aktif türlerin çeşit ve yoğunluğunu belirlemesinden dolayı, frekans değeri azaldıkça oluşan aktif türlerin inaktivasyon etkisinin azaldığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.8. D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. parasiticus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80V-20kHz (460 W) log (kob/g)	% 90V-20kHz (520 W) log (kob/g)	% 100V-20kHz (575 W) log (kob/g)
0	6.76±0.08	6.76±0.08	6.76±0.08
1	5.82±0.04	5.25±0.20	5.04±0.06
2	5.16±0.17	4.79±0.07	4.64±0.09
3	4.87±0.07	4.46±0.34	4.30±0.14
4	4.62±0.17	4.23±0.20	3.77±0.07
5	4.12±0.11	3.88±0.06	3.28±0.07

#### 4.2.1.2 2. Akışkan Yatak Reaktör- D<sub>2</sub>: 65 mm L<sub>2</sub>: 195 mm

İkinci akışkan yatak reaktör 65 mm çapta ve 195 mm uzunluğunda olup camdan imal edilmiştir. Atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde reaktör çapının *Aspergillus* türleri üzerindeki inaktivasyon etkinliğine olan etkisini incelemek amacıyla D<sub>2</sub>: 65 mm reaktörde, *A. flavus* ve *A. parasiticus* ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş fındık örneklerine, 20 kHz ve 25 kHz frekanslarında; % 100 V, % 90 V ve % 80 V referans voltaj parametrelerinde 1-5 dk süresince, 3000 L/sa hava akış hızıyla plazma dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının farklı plazma parametrelerinde uygulanan dekontaminasyon işlemi sonrasında logaritmik canlı kalma eğrileri Şekiller 4.5-4.8'de gösterilmiştir.



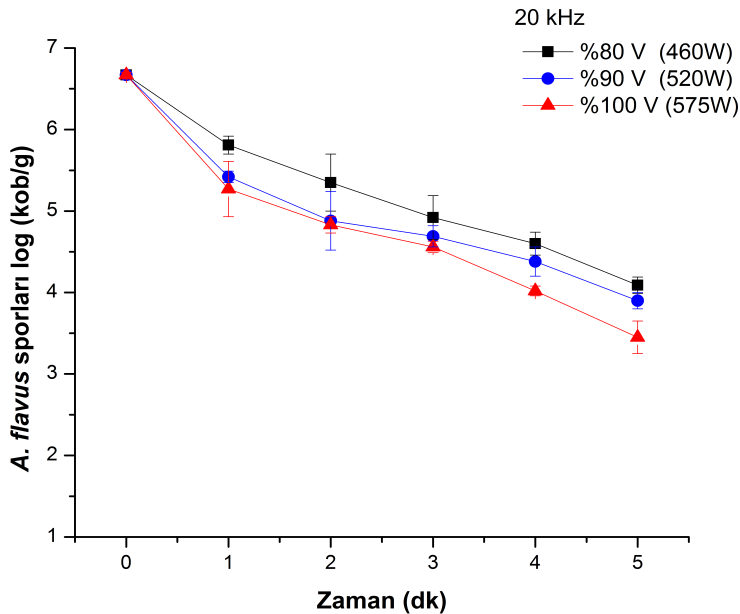
Şekil 4.5. Fındık yüzeyinde *A. flavus*'un D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde, 25 kHz frekansta, % 80 V, % 90 V ve % 100 V referans voltajlarda 5 dk uygulanan plazma dekontaminasyon işlemiyle canlı *A. flavus* sporlarında sırasıyla 3.02, 3.45 ve 3.82 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır. Tasarlanan reaktörde, akışkanlaşmayı sağlayan ve kritik akışkanlaşma hızının üzerinde olan hava akış hızının sabit tutulduğu, fakat reaktör çapının arttırıldığı durumda, yatak içerisindeki partiküllerin çizgisel hızı azalmaktadır. Bu durumda partiküller, oluşan plazma jetine daha yakın hareket edecekleri için plazmanın dekontaminasyon etkisinin model örnekler üzerinde

artması beklenebilir. Ancak sonuçlardan görüldüğü üzere, akışkan yatak reaktörün çapı arttıkça, plazmanın örnekler üzerindeki dekontaminasyon etkisi azalmıştır. Bu durum, reaktör çapı genişlediğinde partiküllerin daha geniş bir alanda hareket kazanması ve ilk reaktöre göre plazma jetinin önünden daha az sayıda geçmiş olması ile açıklanabilir. Bu konuda partiküllerin birbiri ile çarpışma olasılıklarının azalması fiziğin temel “olasılık yoğunluk fonksiyonları” ile açıklanabilir. Ayrıca, reaktör hacminin artması ile aynı koşullarda oluşturulan plazma sırasında ortaya çıkan aktif bileşenlerin yoğunluğu azaldığından, küf sporları üzerindeki öldürücü etkisinin azalması ile de açıklanabilir.

Çizelge 4.9. D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. flavus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80V-25kHz (525 W) log (kob/g)	% 90V-25kHz (590 W) log (kob/g)	% 100V-25kHz (655 W) log (kob/g)
0	6.67±0.03	6.67±0.03	6.67±0.03
1	4.76±0.08	4.75±0.09	4.54±0.28
2	4.60±0.16	4.49±0.45	4.07±0.10
3	4.34±0.05	4.33±0.25	3.92±0.17
4	3.89±0.09	3.85±0.04	3.58±0.22
5	3.65±0.17	3.22±0.15	2.85±0.20



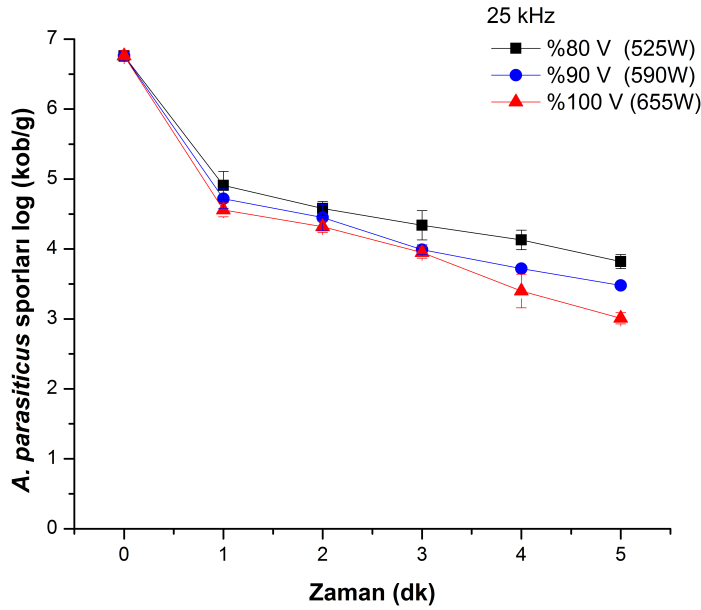
Şekil 4.6. Fındık yüzeyinde *A. flavus*'un D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi



Canlı *A. flavus* sporlarında 2.58, 2.77 ve 3.22 log (kob/g) birimlik indirgenme, 20 kHz frekansta, sırasıyla % 80 V, % 90 V ve % 100 V referans voltajlarda uygulanan 5 dk hava plazmasıyla sağlanmıştır (Şekil 4.6.).

Çizelge 4.10. D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. flavus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80V-20kHz (460 W)	% 90V-20kHz (520 W)	% 100V-20kHz (575 W)
	log (kob/g)	log (kob/g)	log (kob/g)
0	6.67±0.03	6.67±0.03	6.67±0.03
1	5.81 ±0.11	5.42±0.07	5.27±0.34
2	5.35±0.35	4.88±0.36	4.83±0.10
3	4.92±0.27	4.69±0.13	4.56±0.07
4	4.60±0.14	4.38±0.18	4.02±0.06
5	4.09±0.10	3.90±0.10	3.45±0.20

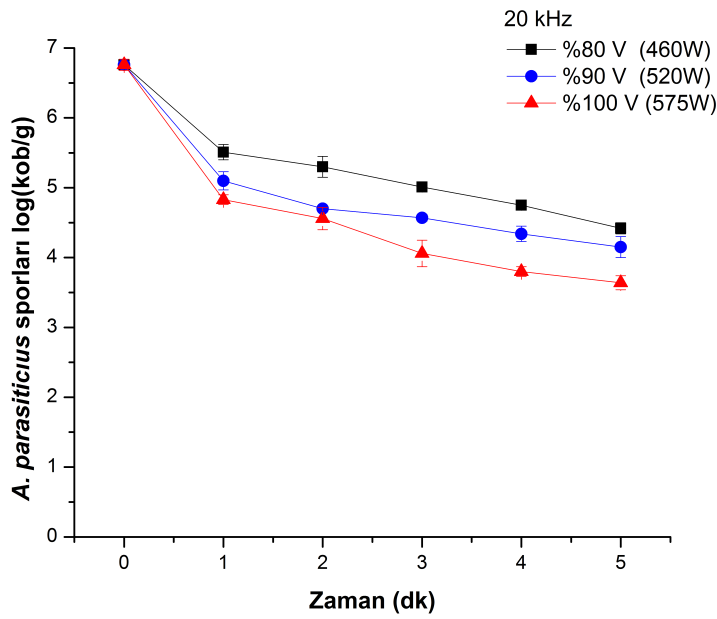


Şekil 4.7. Fındık yüzeyinde *A. parasiticus*'un D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde, % 80 V, % 90 V ve % 100 V referans voltajlarda ve 25 kHz frekansta uygulanan hava plazması işleminin 5. dakikasının sonunda canlı *A. parasiticus* sporlarında sırasıyla 2.94, 3.28 ve 3.75 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir (Şekil 4.7.).

Çizelge 4.11. D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (25 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. parasiticus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80V-25kHz (525 W) log (kob/g)	% 90V-25kHz (590 W) log (kob/g)	% 100V-25kHz (655 W) log (kob/g)
0	6.76±0.08	6.76±0.08	6.76±0.08
1	4.91±0.20	4.72±0.14	4.56±0.10
2	4.58±0.10	4.45±0.19	4.32±0.08
3	4.34±0.21	3.99±0.07	3.95±0.08
4	4.13±0.14	3.72±0.04	3.40±0.24
5	3.82±0.10	3.48±0.04	3.01±0.08



Şekil 4.8. Fındık yüzeyinde *A. parasiticus*'un D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

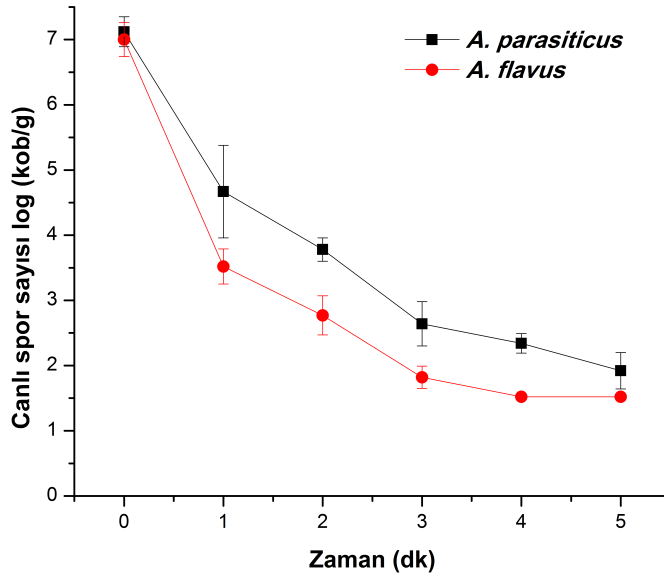
Canlı *A. parasiticus* sporlarında, 20 kHz frekansta, % 80 V, % 90 V ve % 100 V referans voltajlar uygulandığı durumda ise, 5 dk plazma işlemi sonunda sırasıyla 2.34, 2.61 ve 3.12 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir (Şekil 4.8.).

Çizelge 4.12. D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde hava plazması (20 kHz) sonrası fındık yüzeyindeki *A. parasiticus* sporları

İşlem süresi (dk)	% 80V-20kHz (460 W) log (kob/g)	% 90V-20kHz (520 W) log (kob/g)	% 100V-20kHz (575 W) log (kob/g)
0	6.76±0.08	6.76±0.08	6.76±0.08
1	5.51±0.11	5.10±0.13	4.83±0.07
2	5.30±0.15	4.70±0.04	4.56±0.16
3	5.01±0.05	4.57±0.05	4.06±0.19
4	4.75±0.06	4.34±0.11	3.80±0.07
5	4.42±0.08	4.15±0.15	3.64±0.10

#### 4.2.2 Mısır Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Kuru hava

Mısır örnekleri ile gerçekleştirilen bu grup çalışmada, fındık örnekleri ile yapılan çalışmada elde edilen ve en yüksek indirgenmenin elde edildiği plazma parametreleri “optimum” değerler olarak uygulanmıştır. Bölüm 4.2.1’de detaylı olarak verilen ve fındık kullanılan “en iyileştirme (optimizasyon)” çalışmalarında, D<sub>1</sub>: 49 mm ve D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörlerde % 100 V- 25 kHz (655 W) plazma parametresi uygulandığında, *A. flavus* ve *A. parasiticus* spor konsantrasyonlarında elde edilen indirgenmenin en fazla olduğu gözlenmiş ve bu parametreler optimum plazma parametresi olarak seçilmiştir. Bu nedenle, *A. flavus* ve *A. parasiticus* ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş mısır örneklerine, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde, D<sub>1</sub>: 49 mm ve D<sub>2</sub>: 65 mm reaktörlerde, 25 kHz frekansta; % 100 V referans voltaj parametrelerinde 1-5 dk süresince, 3000 L/sa hava akış hızıyla plazma dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. Mısır örnekleri üzerindeki *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının optimum plazma parametrelerinde uygulanan dekontaminasyon işlemi sonrasında logaritmik canlı kalma eğrileri Şekiller 4.9. ve 4.11.’de gösterilmiştir.



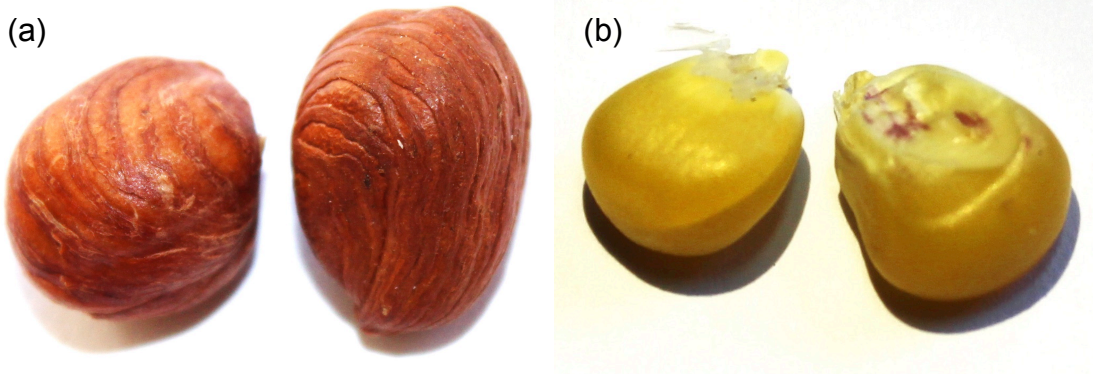
Şekil 4.9. Mısır örneğinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Çizelge 4.13.  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları

İşlem süresi (dk)	<i>A. flavus</i> log (kob/g)	<i>A. parasiticus</i> log (kob/g)
0	7.00±0.26	7.12±0.23
1	3.52±0.27	4.67±0.71
2	2.77±0.30	3.78±0.18
3	1.82±0.17	2.64±0.34
4	1.52±0.00	2.34±0.15
5	1.52±0.00	1.92±0.28

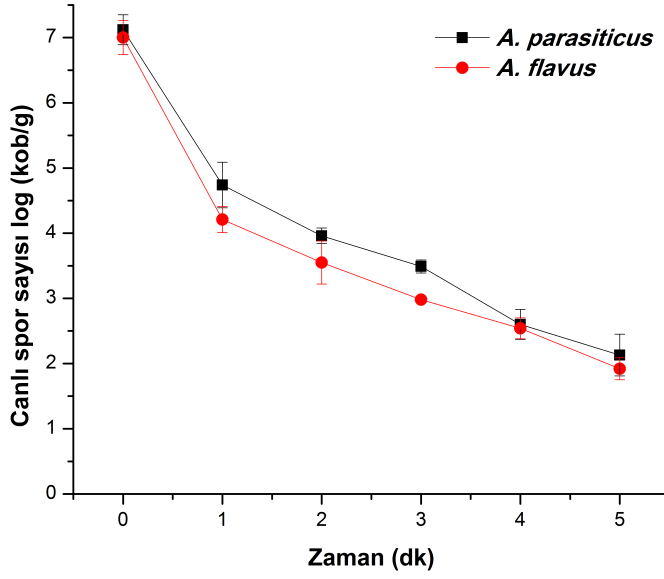
Optimum plazma parametrelerinde, *Aspergillus* sporları ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş mısır örneklerine  $D_1$ : 49 mm reaktörde uygulanan 5 dk hava plazması sonunda, canlı *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında sırasıyla 5.48 ve 5.20 log (kob/g) birimlik bir indirgenme gözlenmiştir (Şekil 4.9.). Atmosferik basınç akışkan yatak plazma dekontaminasyon işleminin mısır örneklerinde fındık örneklerine göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi, Şekil 4.10.'da da açıkça görüldüğü üzere fındık örneklerinin yüzeylerinin mısıra göre daha pürüzlü bir yapıya sahip olmasıdır. Plazma teknolojisinin sterilizasyon ve dekontaminasyon

işlemlerinde kullanımını sınırlayan en büyük faktör, plazma sırasında oluşan aktif türlerin penetrasyon özelliğinin kısıtlı olmasıdır. Bu nedenle plazma işleminin uygulandığı yüzey ne kadar düz ve pürüzsüz olursa, plazma işleminin dekontaminasyon etkinliğini artacaktır. Bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlar bizim gözlemlerimizi doğrular niteliktedir. Örneğin Hertwig vd. (2015), karabiber tanelerindeki çatlaklar, yivler ve çukurların mikroorganizmaları plazma aktif türlerinden koruması sebebiyle direkt plazmanın inaktivasyon etkinliğini azalttığını bildirmişlerdir [235]. Başka bir çalışmada, plazma ile *Geobacillus stearothermophilus* endosporları polipropilen granüller üzerinde 5 log ve polipropilen tabakalarda 4 log birimlik indirgenirken, buğday tanelerinde yüzey topoğrafyasından dolayı sadece 1 log birimlik indirgenme sağlanabilmiştir [270]. İnaktivasyon etkinliklerindeki farklılıklar yüzey yapısının pürüzlülüğüne dayandırılmıştır. Daha ileri bir araştırmada kolza tohumu, kırmızı turp, dereotu, havuç, maydanoz, buğday ve tane karabiber arasında karşılaştırma yapılarak yüzey topoğrafyaları ile inaktivasyon kinetikleri arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir [271].



Şekil 4.10. Model gıda örnekleri (a) fındık (b) mısır

Plazmanın dekontaminasyon etkisinin, mısır örneği yüzeyindeki *A. flavus* sporlarına fındık yüzeyindekinden daha fazla olduğu gözlenmiştir. Aynı model örnek yüzeyindeki farklı küf türleri üzerinde plazmanın öldürücü etkisi karşılaştırıldığında, fındık örneğinde olduğu gibi, *A. flavus* sporları üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11. Mısır örneğinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Çizelge 4.14. D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları

İşlem süresi (dk)	<i>A. flavus</i> log (kob/g)	<i>A. parasiticus</i> log (kob/g)
0	7.00±0.26	7.12±0.23
1	4.21±0.20	4.74±0.35
2	3.55±0.33	3.96±0.12
3	2.98±0.03	3.49±0.10
4	2.54±0.16	2.60±0.23
5	1.92±0.17	2.13±0.32

D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25 kHz'de (655 W) 5 dk uygulanan hava plazmasıyla, mısır örneklerinde canlı *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında sırasıyla 5.08 ve 4.99 log (kob/g) birimlik bir indirgenme gözlenmiştir (Şekil 4.11.). Fındık örneklerinde de gözlendiği gibi D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde uygulanan plazma dekontaminasyon işleminin D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktöre göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Özellikle toksijenik küfler üzerinde plazmanın etkisinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır. Herceg vd. (2014) *Aspergillus ochraceus* üzerinde tek elektrotlu atmosferik

plazma jeti ile 25 kHz'de 5 dk argon plazması uygulayarak 3.42 log azalma sağlamışlardır [239]. Başka bir çalışmada, *A. flavus* ile kontamine edilmiş kırmızı pul biber örneklerine, 900 W gücünde atmosferik azot plazması 5 dk boyunca uygulanmış ve sadece 2.5 log spor/g indirgenme sağlanmıştır [240]. Suhem vd. (2013), tahıllı atıştırmalıklar üzerinde *A. flavus* sayımlarında 3.03 log kob/g azalmayı 5 dk atmosferik argon plazması uygulayarak sağlamışlardır [241]. Düşük basınç soğuk plazma sistemi ile fındık yüzeyinde *A. parasiticus* inaktive etmek için sülfür hekzaflorit (SF<sub>6</sub>) ve hava kullanılmış, ancak plazma işleminin etkinliği düşük kalmıştır. Hava plazması ile 5 dk sonunda *A. parasiticus* üzerinde sadece 2 logaritmik birimlik bir indirgenme sağlanırken, SF<sub>6</sub> plazması ile 20 dk sonunda ancak 5 log indirgenme elde edilmiştir [215]. Benzer bir çalışma tohumlarda *Aspergillus spp.* ve *Penicillium spp.* üzerinde yürütülmüş, 15 dk SF<sub>6</sub> plazması ile her iki türde de 3 log birimlik indirgenme sağlanmıştır [216]. Düşük basınç plazması ile oksijen ve argon kullanılarak 30 dk sonunda selüloz asetat membranlar yüzeyinde *Aspergillus brasiliensis* konsantrasyonunda 3.45 log birimlik indirgenme sağlanırken, 150 W-5 dk, 300 W-1 dk ve 400 W-15 s plazma uygulamalarında argon ve oksijen karışımı kullanılarak 5.4 log indirgenme elde edilmiştir. Buna karşın, doğal olarak küf ile kontamine olmuş fıstıklarda 300 W- 1dk argon-oksijen karışımı kullanılarak oluşturulan düşük basınç plazması ile 2 log indirgenme elde edilmiş ve plazmanın etkinliğinin pürüzlü yüzeylerde azaldığı belirtilmiştir [217]. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde gıdalarda bozulmaya sebep olan ve mikotoksin üreterek insan sağlığını tehdit eden küflerin üzerinde etkili bir dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilememiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda, fındık örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında 5 dakika atmosferik hava plazma uygulaması ile en yüksek 4.5 ve 4.19 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanırken mısır örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında en yüksek 5.48 ve 5.20 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır. Bir dekontaminasyon ya da sterilizasyon işleminin etkili kabul edilebilmesi için 5 logaritmik birimlik indirgenmenin ideal olduğu bilinmektedir [272, 273]. Plazma işlemi uygulanan örneğin sürekli bir biçimde hareketlendirilerek bir reaktör içerisinde akışkanlaştırılması ve örneğin plazma jeti ile doğrudan teması plazma prosesinin dekontaminasyon etkinliğini artırdığını göstermektedir. Doğrudan plazma uygulaması, plazma sırasında oluşan yüklü enerjetik parçacıklarla örnek ya da

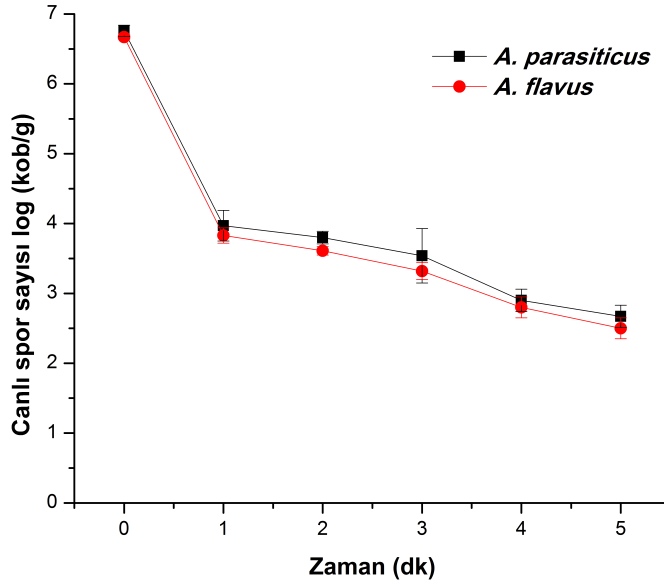
mikroorganizmayı karşı karşıya getirmekte ve mikroorganizmaların daha hızlı ölümü gözlenmektedir [225].

Literatürde bugüne kadar gıda örneklerinin dekontaminasyonu için tasarlanan tek akışkan yatak plazma reaktörü bir düşük basınç plazma sistemidir ve argon/oksijen karışımı kullanılarak buğday tanelerinin yüzeyinde yapay olarak kontamine edilmiş *Bacillus amyloliquefaciens* endosporlarını inaktive etmek için kullanılmıştır [255]. Plazma reaktörü içerisinde gerekli vakumu sağlama ve tahliye etme gereksiniminden dolayı 2.59 log birimlik indirgenme 73.5 s etkin plazma uygulama zamanında elde edilse de, bütün proses 111 dk sürmüştür. Farklı hedef mikroorganizma ve sistem özelliklerinden dolayı indirgenme oranını karşılaştırmak olanaksız olsa da, düşük basınç plazmasının doğası gereği dekontaminasyon prosesi için gerekli toplam süre ele alındığında uygulamanın oldukça uzun sürdüğü gözlenmiştir. Buna ek olarak, tanelerin yüzey sıcaklığı 900 W plazma gücünde prosesin başlangıcından itibaren 90°C'nin üzerindedir.

#### **4.2.3 Fındık Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Azot**

Atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde, plazma oluşturmak için kullanılan gaz türünün *Aspergillus* sporları üzerine dekontaminasyon etkisini incelemek üzere, optimum plazma parametresinde (% 100 V- 25 kHz- 655 W) azot gazı kullanılarak D<sub>1</sub>: 49 mm ve D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörlerde fındık örneklerine plazma dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının elde edilen logaritmik canlı kalma eğrileri Şekiller 4.12. ve 4.13.'te gösterilmiştir.

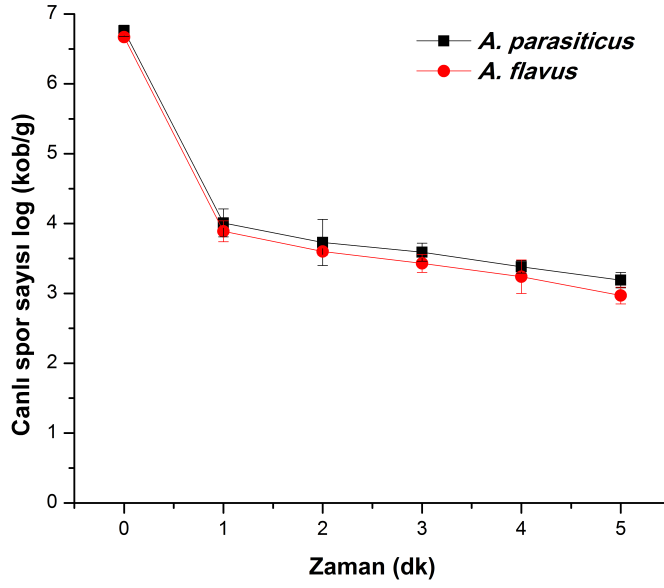




Şekil 4.12. Fındık örneğinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Çizelge 4.15.  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası fındık örneğinde canlı kalan küf sporları

İşlem süresi (dk)	<i>A. flavus</i> log (kob/g)	<i>A. parasiticus</i> log (kob/g)
0	6.67±0.03	6.76±0.08
1	3.83±0.11	3.97±0.22
2	3.61±0.06	3.80±0.09
3	3.32±0.12	3.54±0.39
4	2.80±0.15	2.90±0.16
5	2.50±0.15	2.67±0.16



Şekil 4.13. Fındık örneğinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Çizelge 4.16. D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası fındık örneğinde canlı kalan küf sporları

İşlem süresi (dk)	<i>A. flavus</i> log (kob/g)	<i>A. parasiticus</i> log (kob/g)
0	6.67±0.03	6.76±0.08
1	3.89±0.15	4.01±0.20
2	3.60±0.05	3.73±0.33
3	3.43±0.13	3.59±0.13
4	3.24±0.24	3.38±0.09
5	2.97±0.12	3.19±0.11

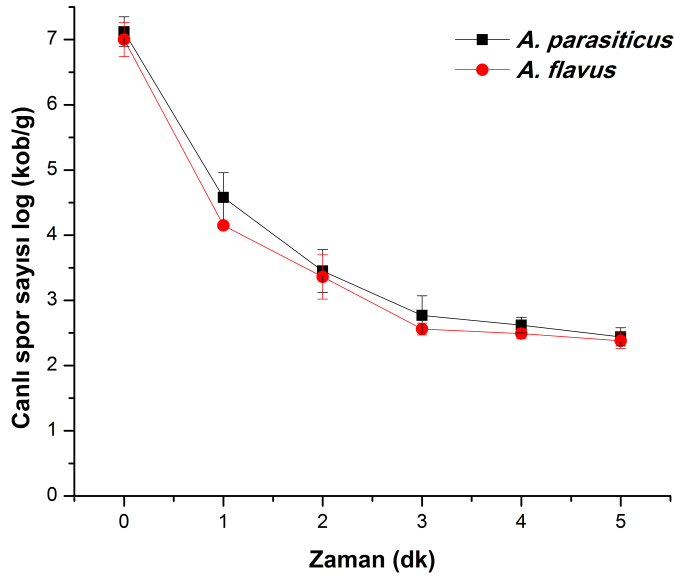
D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktöründe, % 100 V-25 kHz (655 W) plazma parametrelerinde azot kullanılarak uygulanan 5 dk plazma dekontaminasyon işlemiyle fındık örneklerinde, *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında sırasıyla 4.17 ve 4.09 log (kob/g) birimlik indirgenme gözlenirken, D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak plazma reaktöründe ise sırasıyla 3.70 ve 3.57 log (kob/g) birimlik indirgenme gözlenmiştir (Şekil 4.12.-13.). D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak plazma reaktöründe *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında daha fazla indirgenme gözlenirken, *A. flavus* sporlarının *A.*

*parasiticus* sporlarına göre plazma dekontaminasyon işlemine daya duyarlı olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlar, atmosferik basınç akışkan yatak plazma reaktöründe hava plazmasıyla elde edilen dekontaminasyon verilerini doğrular niteliktedir.

*Aspergillus* sporlarının atmosferik basınç akışkan yatak reaktörlerde plazma işlemi ile dekontaminasyonunda, hava ve azot gazları ile elde edilen indirgenmeler karşılaştırıldığında hava plazmasının daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Plazma proses gazı olarak hava kullanıldığında, her birinin mikroorganizma inaktivasyonuna katkıda bulunabileceği reaktif atomlar, yüklü parçacıklar, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve UV fotonları oluşur [274]. Ancak, atmosferik basınç plazmalarının antimikrobiyel etkisinin büyük bir kısmı reaktif oksijen ve nitrojen türlerine (RONS) dayandırılmaktadır [275]. Oksijen varlığında plazma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (atomik oksijen (O), ozon (O<sub>3</sub>), hidroksil radikalleri (OH•)) plazma inaktivasyonunu sağlayan önemli bileşenler olduğu ve hücre hasarı ve hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir [192, 225, 269]. Havanın içerdiği oksijenden dolayı, hava plazması sırasında oluşan aktif türlerin hücre üzerinde oluşturduğu zararın, azot gazı ile oluşturulan plazmaya göre daha fazla olması bu şekilde açıklanabilmektedir.

#### **4.2.4 Mısır Örneklerinde Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörlerinin Dekontaminasyon Etkisi- Azot**

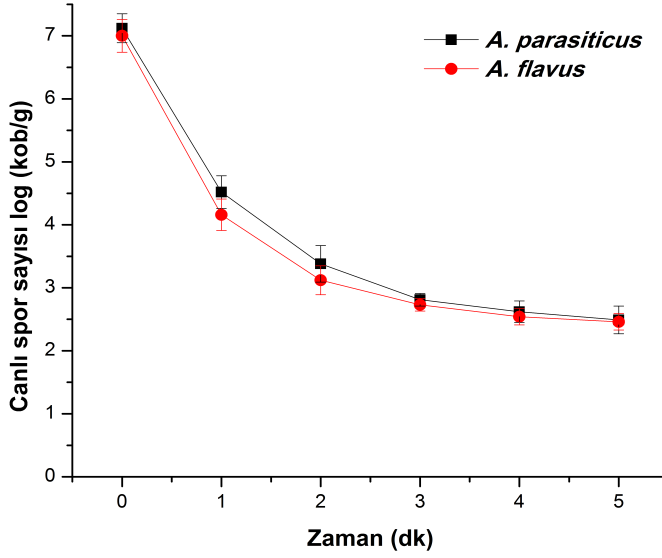
Mısır örneklerinde de, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde kullanılan gaz türünün *Aspergillus* sporları üzerine dekontaminasyon etkisini incelemek üzere, Bölüm 4.2.3.'te anlatıldığı gibi, optimum plazma parametresinde (% 100 V- 25 kHz- 655 W) azot gazı kullanılarak plazma oluşturulmuş, D<sub>1</sub>: 49 mm ve D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörlerde dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının elde edilen logaritmik canlı kalma eğrileri Şekiller 4.14. ve 4.15.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Mısır örneğinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25k Hz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Çizelge 4.17. D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları

İşlem süresi (dk)	<i>A. flavus</i> log (kob/g)	<i>A. parasiticus</i> log (kob/g)
0	7.00±0.26	7.12±0.23
1	4.15±0.05	4.58±0.38
2	3.36±0.34	3.45±0.33
3	2.56±0.09	2.77±0.30
4	2.49±0.08	2.62±0.12
5	2.38±0.12	2.44±0.14



Şekil 4.15. Mısır örneğinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Çizelge 4.18. D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) azot plazması sonrası mısır örneğinde canlı kalan küf sporları

İşlem süresi (dk)	<i>A. flavus</i> log (kob/g)	<i>A. parasiticus</i> log (kob/g)
0	7.00±0.26	7.12±0.23
1	4.16±0.25	4.52±0.26
2	3.12±0.23	3.38±0.29
3	2.73±0.10	2.81±0.10
4	2.54±0.13	2.62±0.17
5	2.46±0.13	2.49±0.22

Mısır örneklerine D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak plazma reaktöründe, 655 W parametresinde 5 dk uygulanan azot plazması sonunda, *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında sırasıyla 4.62 ve 4.68 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanırken (Şekil 4.14.), D<sub>2</sub>: 65 mm akışkan yatak reaktöründe ise sırasıyla 4.54 ve 4.63 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır (Şekil 4.15.). D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak plazma reaktöründe *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında daha fazla indirgenme gözlenirken, *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında gözlenen indirgenme birbirine oldukça yakındır. Fındık örneğinde olduğu gibi atmosferik plazma sisteminde hava

plazmasının azota göre *Aspergillus* türleri üzerindeki inaktivasyon etkisinin daha fazla olduğu gözlenmiştir.

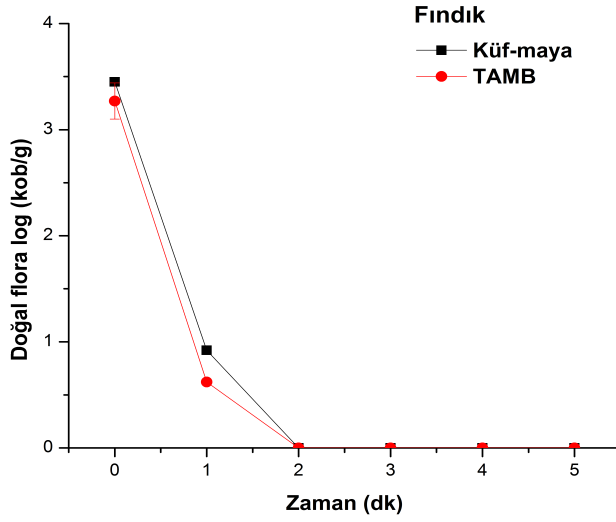
#### 4.3 Gıda Örneklerinin Doğal Florası Üzerinde Plazma Dekontaminasyon Etkisinin Belirlenmesi

Model gıda örneklerinin doğal yüzey florasında bulunan TAMB ve küf-maya yükü kob/g cinsinden belirlenmiş ve Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Gıda örneklerinin doğal florasında bulunan mikroorganizma konsantrasyonları

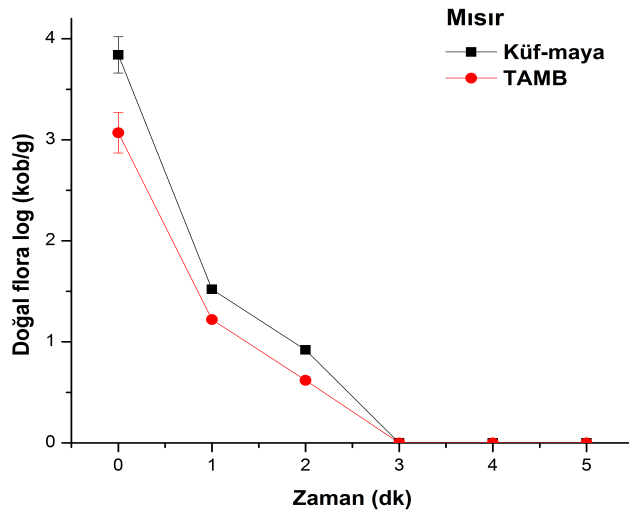
	TAMB (kob/g)	TAMB log(kob/g)	Küf-Maya (kob/g)	Küf-Maya log(kob/g)
Fındık	$1.88 \pm 0.78 * 10^3$	$3.27 \pm 0.17$	$2.82 \pm 0.18 * 10^3$	$3.45 \pm 0.03$
Mısır	$1.17 \pm 0.49 * 10^3$	$3.07 \pm 0.20$	$6.91 \pm 2.48 * 10^3$	$3.84 \pm 0.18$

Fındık ve mısır örneklerinin doğal yüzey florasının inaktivasyonu amacıyla, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde, optimum plazma parametresi olarak seçilen D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V -25 kHz (655 W) plazma parametrelerinde 1-5 dk süresince, 3000 L/sa hava akış hızıyla plazma dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. Optimum plazma parametrelerinde uygulanan dekontaminasyon işlemi sonrasında örnek yüzeylerinin doğal florasında bulunan küf-maya ve TAMB'lerin logaritmik canlı kalma eğrileri Şekiller 4.16. ve 4.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Fındık örneğinin doğal florasındaki mikroorganizmaların  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Fındık örneklerine optimum parametrede ( $D_1$ : 49 mm, % 100 V – 25 kHz (655 W), hava) 5 dk boyunca uygulanan hava plazmasının 2. dakikasından sonra canlı TAMB ile küf ve maya hücreleri saptanamamıştır. Fındık yüzeyinin doğal florasında bulunan TAMB hücrelerinde 3.27 log (kob/g) ve küf-maya hücrelerinde 3.45 log (kob/g) birimlik indirgenme 2 dk plazma işlemi ile sağlanmıştır (Şekil 4.16.).



Şekil 4.17. Mısır örneğinin doğal florasındaki mikroorganizmaların  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V- 25 kHz'de (655 W) hava plazması sonrası logaritmik canlı kalma eğrisi

Mısır örneklerinde ise, optimum parametrede (D<sub>1</sub>: 49 mm, %100 V – 25 kHz, 655 W) 5 dk uygulanan hava plazmasının 3. dakikasından sonra canlı TAMB ile küf ve maya hücresi saptanamamıştır. Mısır yüzeyinin doğal florasında bulunan TAMB hücrelerinde 3.07 log (kob/g) ve küf-maya hücrelerinde 3.84 log (kob/g) birimlik bir indirgenme 3 dk plazma işlemi ile sağlanmıştır (Şekil 4.17.).

Uygulanan atmosferik basınç akışkan yatak plazma işlemi ile gıda örneklerinin yüzeyinde doğal olarak bulunan mikrofloranın 3 dakika sonunda ortadan kalkması, bu prosesin toksijenik olmayan karışık bir mikroflora üzerinde de etkili olduğunu göstermektedir.

#### 4.4 Mikroorganizmalara Ait D-değerlerinin Belirlenmesi

D-değeri; ortamdaki başlangıç mikroorganizma konsantrasyonunun % 90'ının indirgenmesi için gerekli olan süredir. *A. flavus* ve *A. parasiticus* küflerine uygulanan farklı parametreler sonucunda elde edilen logaritmik canlı kalma eğrilerinin verilerinden faydalanarak D-değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.20-21.). Buna göre, en çok indirgenmenin gözlemlendiği optimum parametre olan % 100 V-25 kHz'de (655 W) elde edilen D-değeri en küçüktür. Yani, bu parametrelerde *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un başlangıç konsantrasyonunu % 90 azaltmak (1 logaritmik birimlik azalma) için gerekli olan süre diğerlerine göre daha kısadır.

Çizelge 4.20. Fındık örneğine uygulanan farklı proses parametrelerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerine ait D-değerleri

Fındık D- değerleri (dk)		Hava plazması			
		D <sub>1</sub> : 49 mm		D <sub>2</sub> : 65 mm	
		<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
25 kHz	% 100 V	1.11	1.19	1.31	1.33
	% 90 V	1.37	1.44	1.45	1.52
	% 80 V	1.47	1.58	1.66	1.70
20 kHz	% 100 V	1.42	1.44	1.55	1.60
	% 90 V	1.63	1.74	1.81	1.92
	% 80 V	1.75	1.90	1.93	2.14
		Azot plazması			
25 kHz	% 100 V	1.20	1.22	1.35	1.40



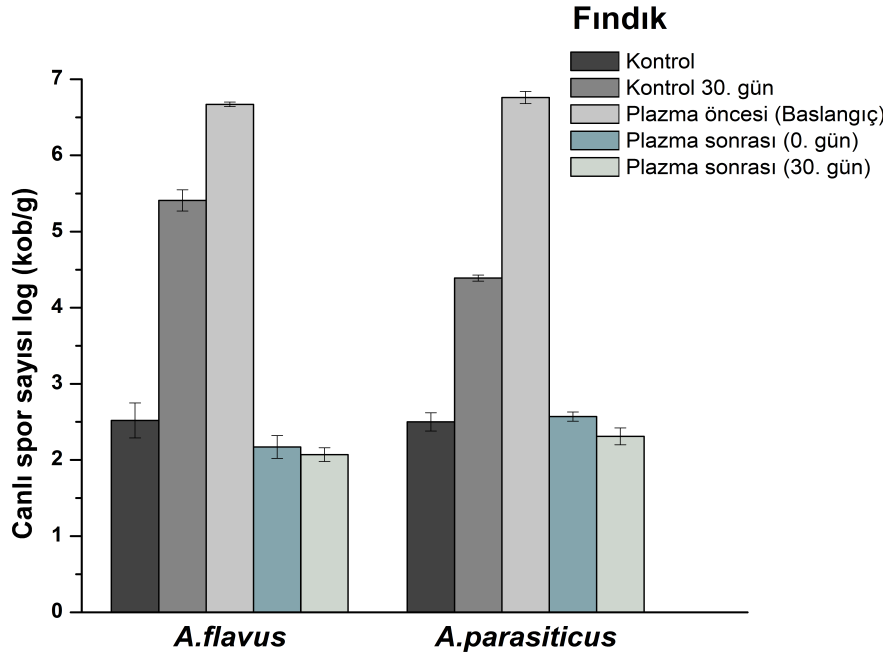
Çizelge 4.21. Mısır örneklerine uygulanan optimum plazma parametresinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerine ait D-değerleri

Mısır D- değerleri (dk) 655 W (25 kHz-% 100 V)	Hava plazması		Azot plazması	
	D <sub>1</sub> : 49 mm	D <sub>2</sub> : 65 mm	D <sub>1</sub> : 49 mm	D <sub>2</sub> : 65mm
<i>A. flavus</i>	<b>0.91</b>	0.99	1.08	1.10
<i>A. parasiticus</i>	<b>0.96</b>	1.00	1.07	1.08

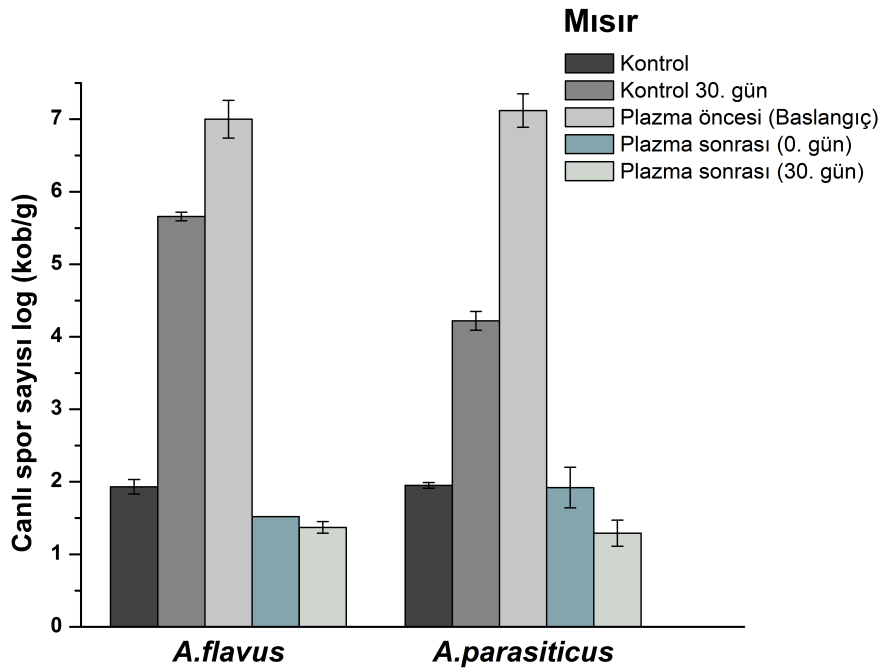
Atmosferik basınç plazmaların inaktivasyon etkisi üzerine yapılan çalışmalar D-değerinin önemli ölçüde değişebileceğini ve canlı kalma eğrilerinin mikroorganizmaların türüne, mikroorganizmaların bulunduğu ortama ve plazma oluşturma şekline (direk ya da indirekt) göre farklı şekillerde olabileceği ortaya konmuştur. İnorganik materyaller üzerinde çok çeşitli mikroorganizmaların inaktivasyonu için gerekli D-değerleri 2 s ile 5.5 dk arasında değişmektedir [276]. Düşük basınç plazması ile yapılan bir çalışmada ise, *A. parasiticus* için D-değerleri proses gazı olarak SF<sub>6</sub> ve hava kullanıldığında sırasıyla 1.1 dk ve 4.2 dk elde edilmiştir [215].

#### 4.5 Depolama İşleminin *A. flavus* ve *A. parasiticus* Sporları Üzerine Etkisi

Atmosferik basınç akışkan yatak plazma reaktöründe optimum parametrede [D<sub>1</sub>: 49 mm; 655 W (% 100 V- 25 kHz)] hava plazması uygulanan fındık ve mısır örnekleri ile plazma işlemi uygulanmayan kontrol örnekleri 25°C 'de 30 gün süresince depolanmıştır. Kontrol örnekleri olarak, fındık ve mısır örnek yüzeylerine, optimum plazma dekontaminasyon işleminden sonra örneklerin yüzeyinde canlı kalan *Aspergillus* sporlarının konsantrasyonunda ( $\approx 2 \log$  (kob/g)) olacak şekilde *Aspergillus* sporlarının kontrollü bir şekilde kontaminasyonu gerçekleştirilmiş ve plazma işlemi uygulanmadan depolama işlemine alınmıştır. Depolama işlemi başlangıcında ve sonunda örneklerin yüzeyindeki canlı kalan *A. flavus* ve *A. parasiticus* spor sayımları Şekiller 4.18. ve 4.19.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Kontrol ve plazma işlemi uygulanmış fındık örneklerinde *Aspergillus* sporlarının 25°C-30 gün depolama sonrası canlılıkları



Şekil 4.19. Kontrol ve plazma işlemi uygulanmış mısır örneklerinde *Aspergillus* spp. sporlarının 25°C-30 gün depolama sonrası canlılıkları

Bu sonuçlara göre, depolama koşulları altında hem fındık hem de mısır kontrol örneklerinin yüzeyindeki *Aspergillus* sporları gelişmeye devam etmiştir. Depolama sonrasında kontrol fındık örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sayılarında % 115 ve % 76 artış gözlenirken, kontrol mısır örneklerinde ise sırasıyla % 193 ve % 116 artış gözlenmiştir. Ancak atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde dekontaminasyon prosesi sonrası 30 gün boyunca depolanan örneklerin yüzeyindeki canlı *Aspergillus* spor sayısı 0. güne azalmıştır. Depolama sonrasında plazma işlemi uygulanmış fındık örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sayılarında % 5 ve % 10 azalma gözlenirken, mısır örneklerinde ise % 10 ve % 33 azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak plazma prosesinin *Aspergillus* sporlarında neden olduğu hasarın geçici olmadığı, sporların yapısında meydana gelen zararlı etkinin 30 gün depolama boyunca onarılamadığı ve aksine plazma işlemi sonrasında yüzeyde kalan sporlar da hasarlı olduklarından canlı spor sayısının azaldığı gözlenmiştir.

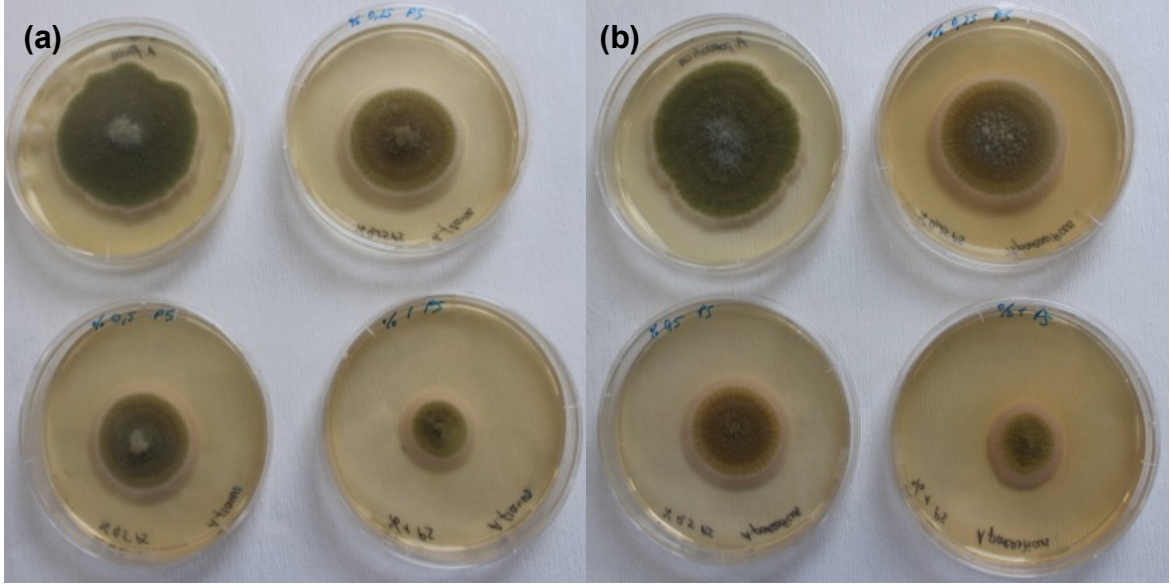
Çizelge 4.22. Kontrol ve plazma işlemi uygulanmış gıda örneklerinde 25°C-30 gün depolama öncesi ve sonrası *Aspergillus* sporlarının konsantrasyonları

log(kob/g)	Fındık		Mısır	
	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Kontrol (0.gün)	2.52±0.23	2.50±0.12	1.93±0.10	1.95±0.04
Kontrol (30.gün)	5.41±0.14	4.39±0.04	5.66±0.06	4.22±0.13
Plazma öncesi	6.67±0.03	6.76±0.08	7.00±0.26	7.12±0.23
Plazma sonrası (0.gün)	2.17±0.15	2.57±0.06	1.52±0.00	1.92±0.28
Plazma sonrası (30.gün)	2.07±0.09	2.31±0.11	1.37±0.08	1.29±0.18

Sonuçlara bakıldığında, aynı depolama koşullarında plazma işlemi görmemiş küf sporları model gıda örnekleri yüzeyinde gelişirken, plazma işlemi uygulanan gıda örneklerinin yüzeyinde, işlem sonrasında *Aspergillus* sporları kalmasına rağmen depolama süresince sayıları artmamış aksine azalmıştır. Model gıda örneklerinin su aktivitelerinin 0.50-0.60 aralığında olduğu göz önünde bulundurulduğunda, küflerin gelişimi için kullanılan besiyerinin sağladığı optimal koşulların örnek yüzeylerinde oluşmadığı depolama sonrası küf spor sayımlarından da görülmektedir. Saf *Aspergillus* kültürleri besiyerinde geliştirildiğinde konsantrasyonları  $\approx 7 \log$  (kob/mL) birime kadar çıkabilirken, plazma işlemi görmemiş kontrol gıda örnekleri yüzeyine  $\approx$

2 log konsantrasyonunda inoküle edilmiş küf sporlarının sayısı 30 gün depolama sonrasında bile  $\approx$  4-5 log (kob/g) birimlere ancak çıkabilmiştir.

Bunun yanı sıra, plazma işlemi sonrasında gıda örnekleri yüzeyinde kalan küf sporlarının depolama süresince örnek yüzeyinde gelişmemesi, bu sporların plazma işlemi sonrasında canlı olduğu halde hücrelerinin hasarlı olmasıyla açıklanabilmektedir. Bunu doğrulamak amacıyla inhibitör etki göstererek küf gelişimini sınırlandırdığı bilinen koruyuculardan yararlanılarak modifiye besi ortamları hazırlanmıştır. Buradaki ana amaç, plazma sonrası örnek yüzeyinde kalan *Aspergillus* sporlarının canlı fakat hasarlı olduğu ve bu nedenle aynı depolama koşullarında işlem görmemiş örneklerde *Aspergillus* türleri gelişebilirken plazma işlemi görmüş örneklerde gelişemediğini ortaya koymaktır. Optimum koruyucu konsantrasyonu varlığında, sağlıklı ve işlem görmemiş *Aspergillus* sporları ile plazma sonrası hasar gören sporların ayırt edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla sodyum benzoat (SB) ve potasyum sorbat (PS) farklı konsantrasyonlarda YGC agar bileşimine katılarak modifiye besiyerleri hazırlanmıştır. Ön denemelerde, işlem görmemiş *A. flavus* ve *A. parasiticus* spor solüsyonlarından kontrol ve modifiye YGC agar besiyerlerine tek nokta ekim yöntemi ile inokülasyonları gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de inkübasyona bırakılarak oluşturdukları koloni çapları takip edilmiş ve *Aspergillus* türlerinin koloni gelişiminin inhibisyonunda potasyum sorbatın sodyum benzoata göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, deneylere değişen konsantrasyonlarda PS kullanılarak modifiye edilen YGC agar besiyerleri ile devam edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, potasyum sorbatın küf gelişimi inhibisyonunda pH ve  $a_w$  gibi fiziksel koşullardan bağımsız olarak en uygun zayıf asit koruyucu olarak tanımlanmıştır [106]. *Aspergillus* türlerinin farklı konsantrasyonlarda SB ve PS kullanılarak modifiye edilen YGC agar besiyerlerindeki koloni gelişimlerinin fotoğrafları Ek-2'de detaylı olarak verilmiştir. İşlem görmemiş *A. flavus* ve *A. parasiticus* spor solüsyonlarından kontrol ve farklı konsantrasyonlarda PS ile modifiye edilmiş YGC agar besiyerlerine tek nokta ekim yöntemi ile inokülasyonları gerçekleştirilmiş ve 25-28°C'de inkübasyonun 7. günündeki koloni gelişimleri Şekil 4.20.'de verilmiştir. YGC agar besiyerine eklenen PS konsantrasyonu arttıkça, *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin gelişimini daha fazla inhibe ettiği koloni çaplarındaki azalmalarla ortaya konmuştur (Çizelge 4.23.).

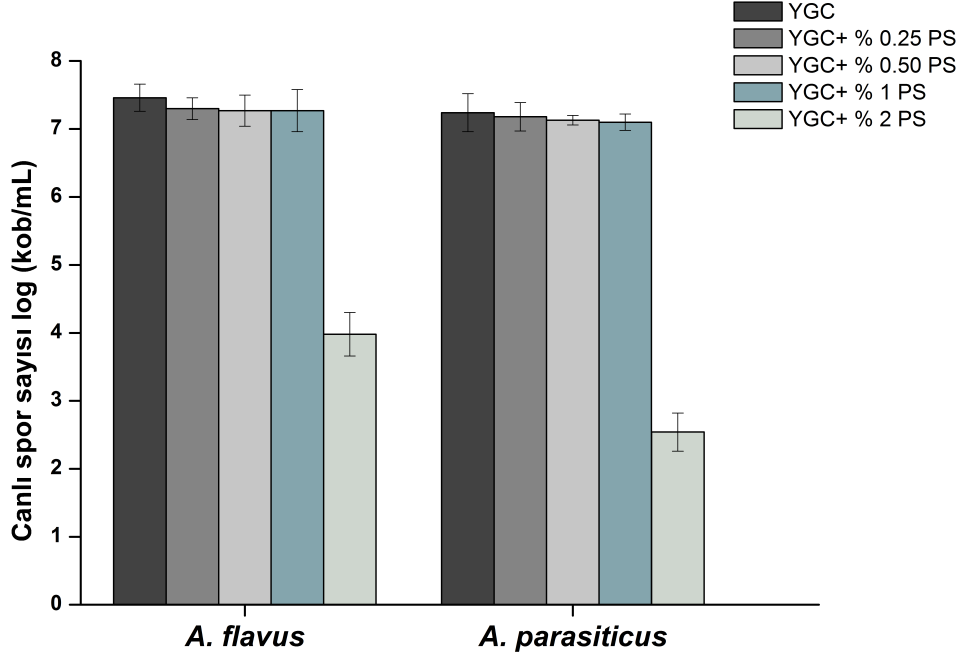


Şekil 4.20. Kontrol ve modifiye YGC agar besiyerlerinde 25-28°C 7 gün inkübasyon sonunda koloni gelişimleri (a) *A. flavus* (b) *A. parasiticus*

Çizelge 4.23. Modifiye YGC agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin kontrol YGC agar besiyerine göre 25-28°C 7 gün inkübasyon sonunda koloni çaplarındaki azalma

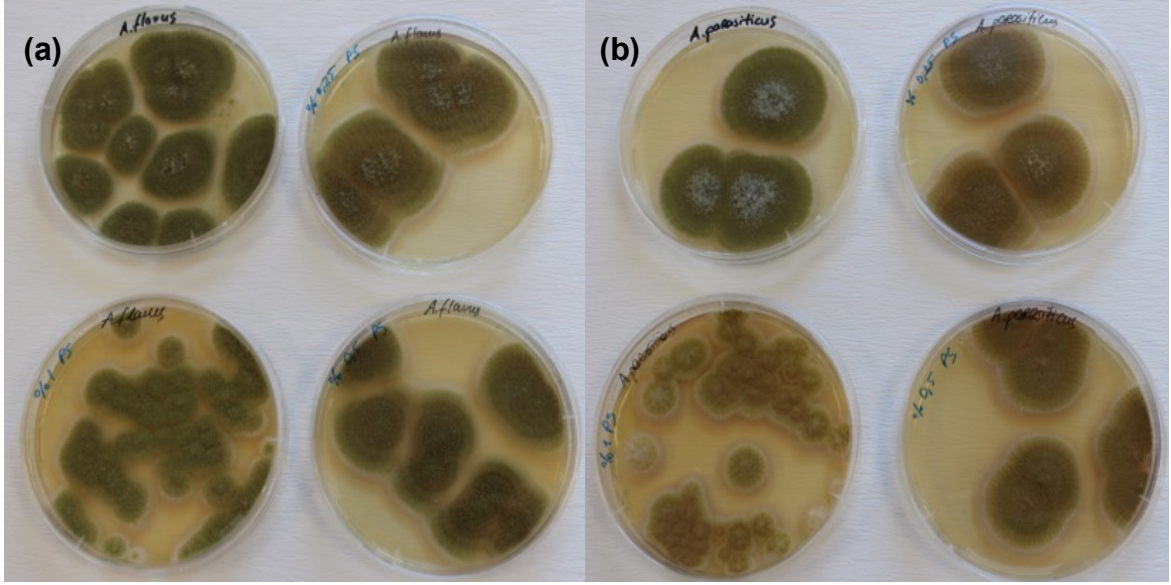
Koloni çapı % azalma	YGC + % 0.25 PS	YGC + % 0.50 PS	YGC + % 1 PS
<i>A. flavus</i>	20	30	51
<i>A. parasiticus</i>	18	29	51

Kontrol grubu olarak *A. flavus* ve *A. parasiticus* saf kültürlerinden  $\approx 7$  log (kob/mL) konsantrasyonunda spor solüsyonları Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve bu solüsyonlardan hem YGC agar besiyerine hem de PS kullanılarak modifiye edilen YGC agar besiyerlerine sayım yapmak amacıyla yüzeye yayma yöntemiyle ekimler gerçekleştirilmiş ve sayım sonuçları Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Plazma işlemi uygulanmamış *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un kontrol ve PS ile modifiye edilmiş YGC agar besiyerlerindeki gelişimleri

Şekil 4.21.'de görüldüğü üzere, plazma işlemi görmemiş *Aspergillus* sporları % 0.25 -1 konsantrasyonlarında PS bulunan YGC agar besiyerlerinde gelişirken, % 2 PS içeren YGC agarda gelişmemiştir. Bu durumda, işlem görmemiş *Aspergillus* türlerinin % 1'e kadar PS varlığında gelişebildiği ve bu konsantrasyondaki PS'nin kontrol küf hücrelerine inhibitör etki göstermediği gözlenmiştir. YGC agara % 2 PS eklenerek modifiye edilen besiyerinde ise işlem görmemiş *Aspergillus* sporlarındaki üreme, PS'nin gösterdiği inhibitör etkisinden dolayı diğer besiyerlerindeki üremenin çok altında kalmıştır. Bu besiyerlerindeki *Aspergillus* türlerinin koloni gelişimleri Şekil 4.22.'de, kontrol ve PS ile modifiye edilen YGC agar besiyerlerinin pH ölçümleri Çizelge 4.24.'te verilmiştir.

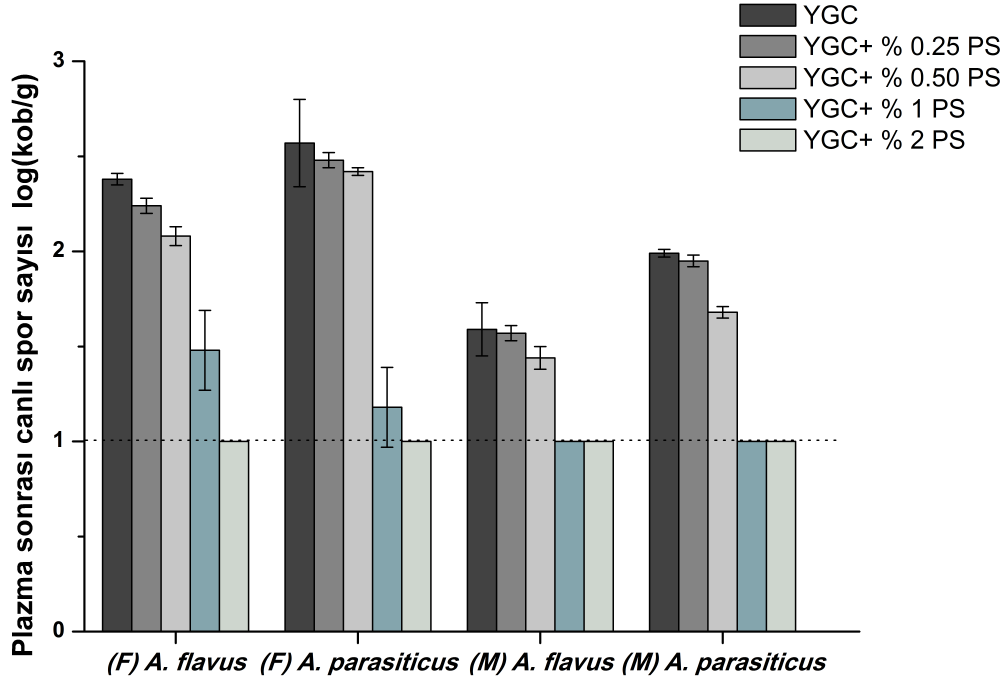


Şekil 4.22. Kontrol ve PS ile modifiye edilmiş YGC agar besiyerlerinde 25-28°C 7 gün inkübasyon sonunda işlem görmemiş (a) *A. flavus* (b) *A. parasiticus* gelişimleri

Çizelge 4.24. Besiyerlerinin pH ölçümleri

Besiyerleri	YGC (kontrol)	YGC + % 0.25 PS	YGC + % 0.50 PS	YGC + % 1 PS	YGC + % 2 PS
pH (41°C)	6.48	6.54	6.58	6.65	6.81

Aynı besiyerlerine, optimum parametrede (655 W hava plazması, D<sub>1</sub>: 49 mm reaktör) plazma işlemi uygulanmış gıda örneklerinin yüzeyinde kalan sporların sayımı amacıyla daha önce Bölüm 3.5.'te anlatıldığı gibi ekimler gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.22.'de verilmiştir.



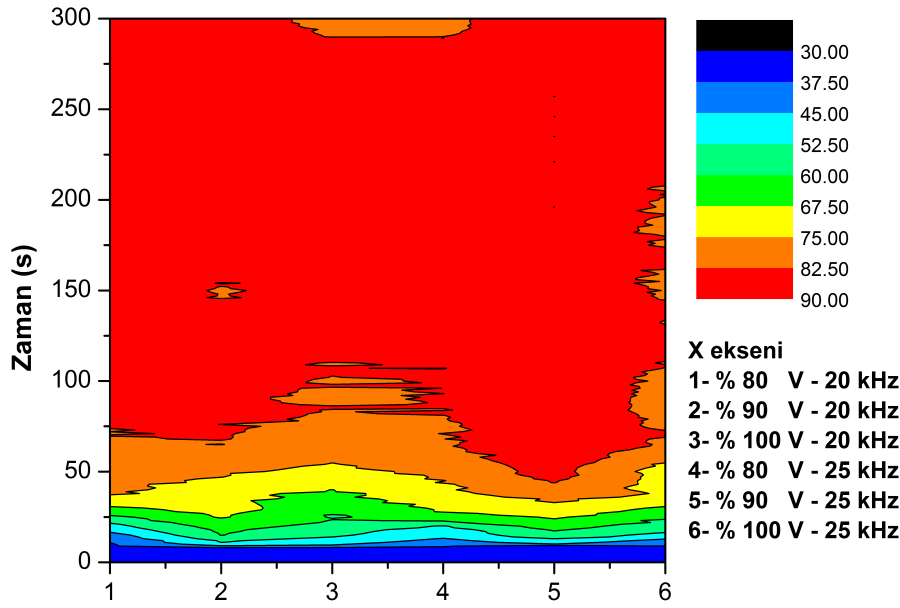
Şekil 4.23. Plazma işleme sonrası fındık ve mısır örnekleri yüzeyinde kalan *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un kontrol ve PS ile modifiye edilmiş YGC agar besiyerlerinde gelişimi

Sonuçlardan açıkça görüldüğü üzere, % 0.25-0.50 PS içeren YGC agar besiyerlerinde kontrol YGC agar besiyerine göre, plazma işleme uygulanmış *Aspergillus* türlerinin gelişiminde önemli farklar gözlenmezken, % 1 PS içeren YGC agar besiyerinde, plazma işleme uygulanmış *Aspergillus* türleri ortamdaki inhibitör etki nedeniyle ya hiç üreyememiş ya da kontrol YGC agar besiyerine göre çok daha az üremişlerdir. Hiç üreme gözlenmeyen modifiye besiyerlerinde, uygulanan yöntemin tespit sınırı 1 log (kob/g-mL) olduğu için grafikte bu sınırın altında gösterilmiştir. Plazma işleme uygulanmamış kontrol *Aspergillus* sporları % 1 PS varlığında gelişebilirken, plazma işleme uygulanan *Aspergillus* sporları aynı konsantrasyondaki PS varlığında gelişememiştir. Plazma sonrası örnek yüzeyinde kalan sporların canlı ancak hasarlı olması sebebiyle, % 1 PS inhibitör etki göstermiştir. Gıda örneklerine uygulanan plazma işleme sonrası hasar görmüş küf sporlarının depolama boyunca örnek yüzeyinde sayılarının artmaması, hücrelerin hasarlı olması sebebiyle sadece canlılıklarını koruması ile açıklanabilmektedir.



#### 4.6 Termal Görüntüleme

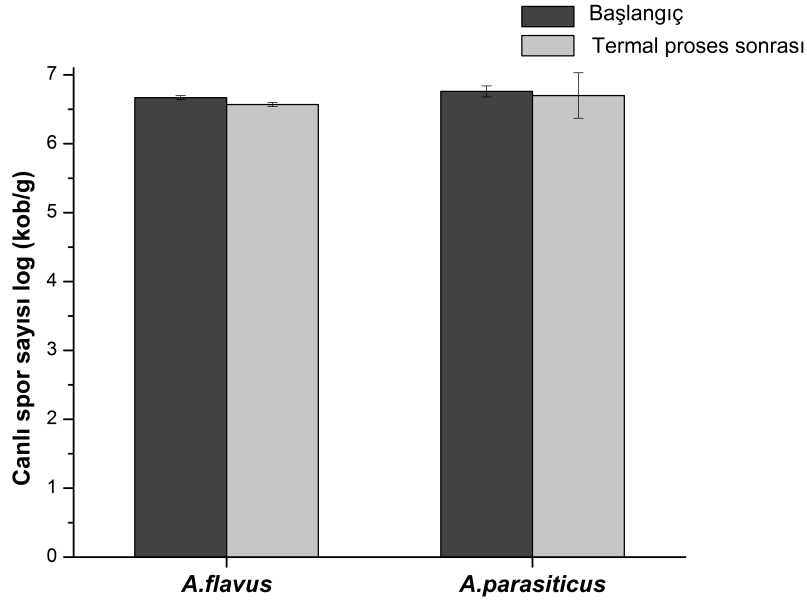
Fındık örneklerinin plazma jetinin önünden geçişleri sırasında yüzeyinde oluşan sıcaklık, plazma dekontaminasyon prosesi süresince (300 s) uygulanan tüm plazma parametrelerinde bir termal kamera ile görüntülenmiştir. Değişen plazma parametreleri ile işlem gören fındık örneklerinin sıcaklık zaman profilleri Şekil 4.24.'te gösterilmiştir. Plazma işlemi uygulanan fındıkların ortalama sıcaklıkları ölçülmüştür. Fındık yüzeyinde oluşan sıcaklığın tüm plazma parametrelerinde proses boyunca ortalama 35-90°C aralığında değiştiği gözlenmiştir. Termal kamera ile elde edilen görüntülere göre fındık yüzey sıcaklığının 90°C'ye ulaştığı düşünülebilir, ancak dizayn ve görüntü işleme tekniğine göre bu sıcaklık sadece tek bir alanla ilişkilendirilmemelidir. Reaktörün alt kısmında, fındık örnekleri plazma jetinin önünden geçerken örnek yüzeyinde ani sıcaklık artışları gözlenirse de, akışkanlaştırma sırasında örnekler reaktörün üst kısımlarına sürekli hava akımı ile taşındığında daha ılımlı sıcaklık farklılıkları gözlenmiştir. Fındıkların yüzey sıcaklıkları 90°C'ye ulaşsa da, fındık tanesinin gövde sıcaklığının bu seviyelerde olmadığı varsayılmaktadır. Ortalama sıcaklık verileri, fındık yüzeyi ve zorunlu olarak paslanmaz çelik ızgara ile cam reaktörü içerirken, plazma jetinin dışarıda bırakıldığı bir alandan elde edilmiştir. Sıcaklık ölçümünü etkileyecek çevresel faktörler olabildiğince önlenirse de, elektromanyetik radyasyon esasına dayalı sıcaklık ölçümüne girişim yapabilecek etkenler, örneğin; reaktör içerisinde plazma oluşumu sırasında oluşan radyasyon, yüksek ısı kapasitesi nedeniyle ısıdıktan sonra hızlı soğuyamayan cam reaktör ve paslanmaz çelik ızgara gibi, sıcaklık ölçümünün yapıldığı ortamda bulunmaktadır. Bütün bunların dışında, dekontaminasyon prosesinin gerçekleştiği akışkan yatak plazma reaktöründe, plazma işlemi süresince sıcaklık 45°C'nin altında kalmıştır ve bu da örneğin besinsel ve organoleptik özelliklerini ve kalitesini etkilemeyecek düzeydedir.



Şekil 4.24. Farklı plazma parametrelerinde elde edilen sıcaklık profilleri

#### 4.7 Termal Prosesin *Aspergillus* Sporları Üzerine Etkisi

Atmosferik basınç akışkan yatak plazma prosesi süresince örneklerin yüzeyinde oluşan sıcaklığın *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporları üzerindeki inaktivasyon etkisini incelemek amacıyla, fındık örneklerine 100°C kuru sıcak havada 5 dk boyunca termal proses uygulanmıştır. Buradaki ana hedef, küf sporlarında plazma dekontaminasyon prosesi sonucunda gözlenen indirgenmeye uygulama sırasında oluşan sıcaklığın değil, plazma aktif türlerinin öldürücü etkisinin sebep olduğunu göstermektir ve bu sebeple normal proses koşullarında oluşmayan ve örnekler için olası en olumsuz ve şiddetli şartlar sağlanmıştır. Fındık örneklerine uygulanan termal proses öncesi ve sonrası elde edilen canlı spor sayıları Şekil 4.25.'te gösterilmektedir. 100°C'de 5 dk süresince uygulanan termal prosesin, *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un başlangıç spor konsantrasyonunu logaritmik bazda değiştirmedeği açıkça görülmektedir. Bu sonuç, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde küf sporlarında elde edilen indirgenmenin sadece plazma işlemi ile sağlandığını doğrulamaktadır. Termal proses sırasında durağan bir ortamda kondüksiyonla ısı transferinin gerçekleşirken, buna karşın plazma prosesi sırasında fındık örneklerinin hareketli bir ortamda sıcaklığının değişken olduğu göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirilmelidir.



Şekil 4.25. 100°C (kuru sıcak hava) -5 dk uygulanan termal proses öncesi ve sonrası canlı *Aspergillus* türlerinin canlı spor sayıları

Doğada yaygın olarak bulunan *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerini barındıran *Eurotiales* familyasında bulunan birçok küf, cinsel spor olan askosporlar üretirler ve bunlar yüksek sıcaklıklara [277] ve kuraklığa [278] dayanıklıdır. Başka aşırı streslere de direnç gösterebildiklerinden, bilinen en dayanıklı ökaryotik hücrelerdir. Örneğin, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus* telemorfu, sulu bir ortamda 85°C'de 10 dakikadan fazla canlı kalabilmektedir [279, 280]. Ayrıca, bağıl nemi % 0.5'in altında olan ortamda 60°C'de 7 günden fazla dayanabilmektedirler [278]. Bu özellikleri *N. fischeri* gibi küflerin yüksek sıcaklıklar gibi olumsuz çevre koşullarında canlı kalabilmelerini sağlamaktadır. Alternatif olarak, bu askosporlar pastörizasyon gibi gıda muhafazası için uygulanan işlemlerde bile canlı kalabilmektedirler. Kalın hücre duvarı, yüksek viskozite, mannitol ve trehaloz gibi koruyucu çözünenlerin birikimi gibi faktörler askosporların stress dayanıklılığını desteklemektedir [277, 278]. Ayrıca pH, su aktivitesi ve koruyucuların varlığı gibi faktörler de sıcaklık direncini oldukça etkilemektedir [281].

Literatürde, *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un 100°C'deki D-değerleri üzerine yapılan bir çalışma bulunmasa da, farklı koşullar altındaki sıcaklık dirençleri bir kaç araştırmacı tarafından çalışılmıştır. *A. parasiticus* sporlarının % 16 NaCl (0.90 a<sub>w</sub>) ortamında D<sub>55</sub> değeri 230 dk, % 60 glukoz (0.85 a<sub>w</sub>) ortamında 210 dk ve % 60 sakaroz (0.90 a<sub>w</sub>)

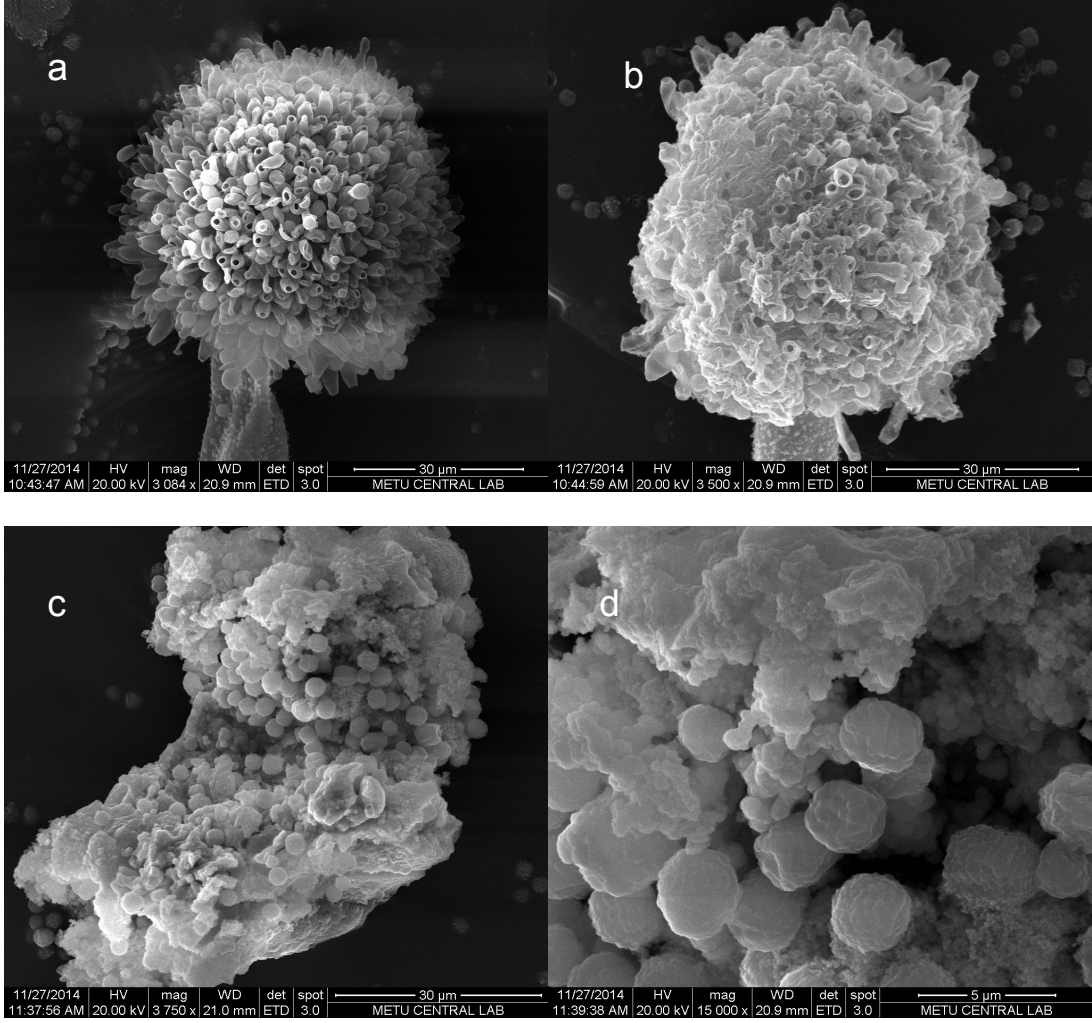
ortamında 200 dk iken, *A. flavus* sporlarının nötral pH ve yüksek  $a_w$ ' de  $D_{52}$  değeri 40-45 dk olarak verilmiş ve  $a_w$  yükseldikçe bu değerlerin daha düşük olduğu belirtilmiştir [18, 19].

#### **4.8 Plazma Dekontaminasyon İşleminin Küf Sporlarının Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi- Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri (SEM)**

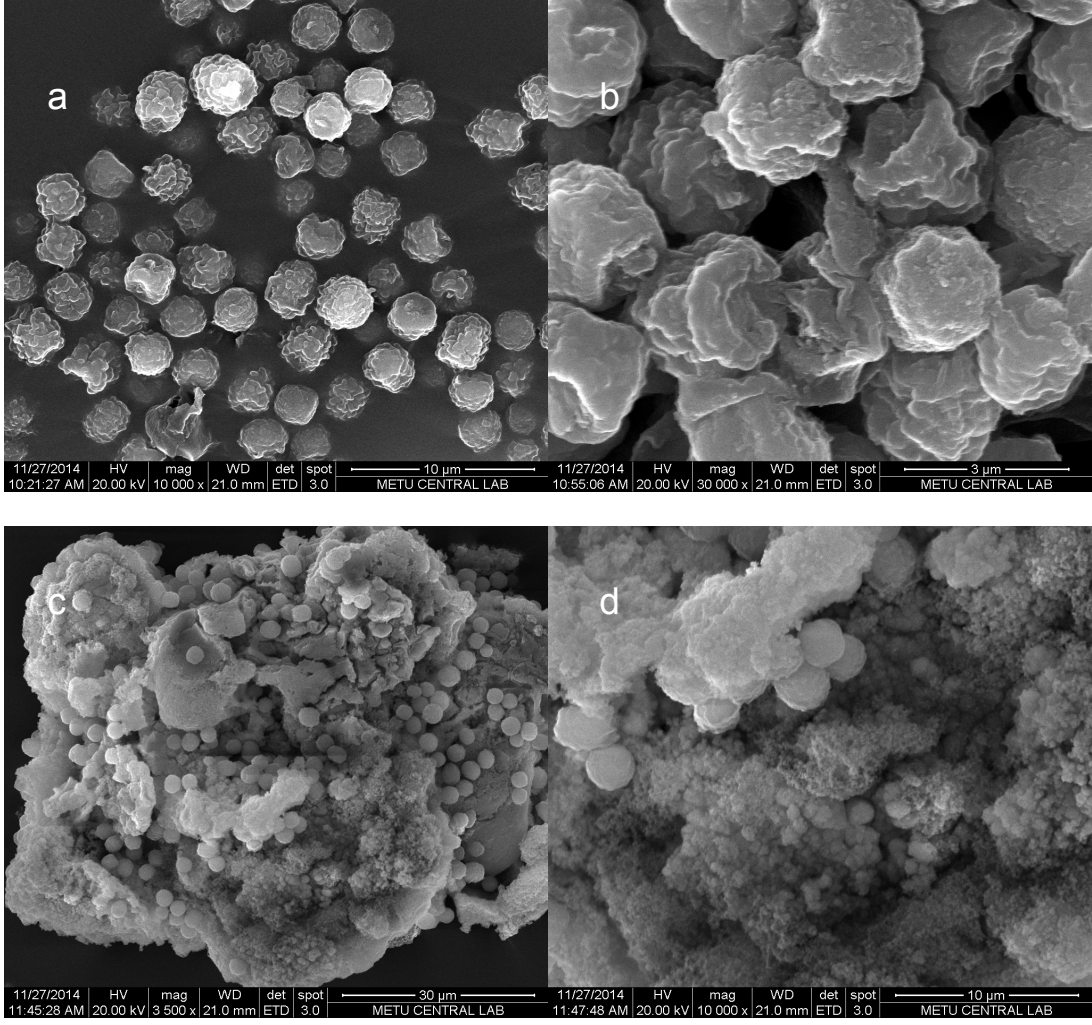
Atmosferik basınç plazma dekontaminasyon işleminin *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının morfolojik yapıları üzerine etkilerini incelemek amacıyla Taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin plazma öncesi ve plazma sonrası SEM görüntüleri Şekil 4.26.(a-d) ve Şekil 4.27.(a-d)'de gösterilmiştir. Şekil 4.26b'de *A. flavus*'un atmosferik plazma işlemi ile phialide ve konidiofor yapısının zarar gördüğü açıkça görülmektedir. Ayrıca plazma işleminin *A. flavus* sporlarına verdiği hasar Şekiller 4.26.c ve 4.26.d de gösterilmiştir. Spor hücrelerinin bütünlüğünün tamamen bozulduğu ve hücre içeriğinin ortama yayıldığı gözlenmektedir.

Şekil 4.27.(b-d)'de görüldüğü üzere de, plazma işlemi sonrası, *A. parasiticus* sporlarının geometrik şeklinin değiştiği, spor hücrelerinin plazma işleminin oluşturduğu hasar ile bütünlüğünün bozulduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca işlem görmemiş sporlar ayrı ayrı gözlenirken, plazma işlemi sonrasında hücreler parçalanması ve içeriklerinin ortama yayılmasından dolayı kümeler halinde gözlenmiştir. SEM sonuçları, hücrelerin ölümüne yol açan, yapılarında meydana gelen büyük değişimleri açıkça göstermektedir.

*Aspergillus* türlerinin inaktivasyonu üzerinde çalışan diğer araştırmacıların çalışmaları incelendiğinde, bazıları plazma uygulaması ile spor hücrelerinde oluşan hasarı sadece bir basit ışık mikroskobu ile ortaya koymuşlardır [215, 241], ancak preparat hazırlanırken bile dikkatli olunmadığı takdirde küfün yapısına zarar verilebildiğinden bu görüntüleme yöntemi yeterli değildir. Başka bir çalışmada ise *A. niger* sporlarının oksijen plazması sonrası parçalandığı ve birbirlerine yapıştığı tipik SEM görüntüleri ile kanıtlanmıştır [282].



Şekil 4.26. Taramalı elektron mikrografileri (a) kontrol *A. flavus* (plazma işlemi uygulanmamış), (b)(c)(d) Plazma uygulaması sonrası *A. flavus* ve sporları



Şekil 4.27. Taramalı elektron mikrografileri (a) kontrol *A. parasiticus* (plazma işlemi uygulanmamış), (b)(c)(d) Plazma uygulaması sonrası *A. parasiticus* sporları

## 5 YORUM

Bu tezin amacı “Laboratuvar ortamında kontrollü bir şekilde aflatoksin üreten küf ile kontamine edilmiş model gıda örneklerinde, küf konsantrasyonunun tüm yüzeyde etkin bir şekilde en kısa sürede minimuma indirilmesi ve bu doğrultuda kullanılacak düşük sıcaklık - atmosferik basınç plazma reaktörünün tasarımı ve uygulanan atmosferik basınç plazma sterilizasyon yönteminin uygulama parametrelerinin optimizasyonu”dur. Tez süresince yapılan deneyler kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Atmosferik basınç plazma sisteminin geometrisine uygun, aynı L/D oranına sahip iki farklı çapta akışkan yatak reaktör tasarlanarak cam malzemeden imal edilmiş ve sistemin kurulması için çeşitli düzenekler (paslanmaz çelik stand ve homojen hava sirkülasyonunu sağlamak için ızgara, kompresör girişi için pirinç aparat) dizayn edilerek atmosferik basınç akışkan yatak plazma sistemi kurulmuştur.
- Fındık örneklerine kontrollü bir şekilde kontamine edilen *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında, D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde “hava” kullanılarak optimum plazma parametresi olan % 100 V-25 kHz (655 W)’de uygulanan plazma işlemiyle 5 dk sonunda 4.50 ve 4.19 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır. D<sub>2</sub>: 65 mm reaktörde ise, aynı koşullarda *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında 3.82 ve 3.75 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır.

Tasarlanan reaktörde akışkanlaşmayı sağlayan ve kritik akışkanlaşma hızının üzerinde olan hava akış hızının sabit tutulduğu, fakat reaktör çapının arttırıldığı durumda, yatak içerisindeki partiküllerin çizgisel hızı azalmaktadır. Bu durumda partiküller, oluşan plazma jetine daha yakın hareket edecekleri için plazmanın dekontaminasyon etkisinin model örnekler üzerinde artması beklenebilir. Ancak sonuçlardan görüldüğü üzere, akışkan yatak reaktörün çapı arttıkça, plazmanın örnekler üzerindeki dekontaminasyon etkisi azalmıştır. Bu durum, reaktör çapı genişlediğinde partiküllerin daha geniş bir alanda hareket kazanması ve ilk reaktöre göre plazma jetinin önünden daha az sayıda geçmiş olması ile açıklanabilir. Bu konuda partiküllerin birbiri ile çarpışma olasılıklarının azalması fiziğin temel “olasılık yoğunluk fonksiyonları” ile açıklanabilir. Ayrıca, reaktör çapı arttığında, daha büyük bir hacimde aynı parametrelerde oluşturulan plazma sırasında meydana gelen

plazma aktif bileşenlerinin yoğunluğu azaldığından, öldürücü etkilerinin azalmasıyla da açıklanabilir.

Atmosferik koşullarda, taneli gıda materyallerinde plazma dekontaminasyon işleminde mümkün olan en kısa sürede, en yüksek indirgenme hedeflendiğinden plazma işlemi 5 dk süre ile sınırlandırılmıştır. Ayrıca logaritmik canlı kalma eğrilerinden de görüldüğü üzere, *Aspergillus* sporlarının ölüm eğrilerinin doğrusal olmaması ve toplam dekontaminasyon işlemi birden fazla inaktivasyon fazından oluşması nedeniyle plazma işlem süresi daha fazla artırılmamıştır.

- Mısır örneklerine *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında,  $D_1$ : 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz'de (655 W) uygulanan 5 dk hava plazmasıyla, 5.48 ve 5.20 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanırken,  $D_2$ : 65 mm reaktörde ise, aynı koşullarda *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında 5.08 ve 4.99 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır.

Atmosferik basınç akışkan yatak plazma dekontaminasyon işleminin mısır örneklerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi fındık örneklerinin yüzeylerinin mısıra göre daha pürüzlü bir yapıya sahip olmasıdır. Plazma teknolojisinin sterilizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinde kullanımını sınırlayan en büyük faktör, plazma sırasında oluşan aktif türlerin penetrasyon özelliğinin kısıtlı olmasıdır. Bu nedenle plazma işleminin uygulandığı yüzey ne kadar düz ve pürüzsüz olursa, plazma işleminin dekontaminasyon etkinliği artacaktır.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde gıdalarda bozulmaya sebep olan ve mikotoksin üreterek insan sağlığını tehdit eden küflerin üzerinde etkili bir dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilememiştir. Proje kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda, atmosferik basınç hava plazması uygulanan fındık örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında en yüksek 4.50 ve 4.19 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanırken, mısır örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında en yüksek 5.48 ve 5.20 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır. Bir dekontaminasyon ya da sterilizasyon işleminin etkili kabul edilebilmesi için 5 logaritmik birimlik indirgenmenin ideal olduğu bilinmektedir [272, 273]. Plazma işlemi uygulanan örneğin hareket kazandırarak bir reaktör içerisinde sürekli bir şekilde akışkanlaştırılması, plazma prosesinin dekontaminasyon etkinliğini artırdığını göstermektedir. Ayrıca, direk kontaminasyon yöntemi



kullanılarak *Aspergillus* sporları ile gıda örnekleri doğrudan karşı karşıya getirildiğinden, model örneklerin yüzeyindeki başlangıç mikroorganizma yükü oldukça yüksektir. Küf sporlarının materyal yüzeyinde üst üste tutunması ve konsantrasyonunun yüksek olması plazmanın dekontaminasyon etkinliğini azaltmış olabilir. Hücreler yüzeyde birden çok tabaka halinde, üst üste olduğu durumda, en üst tabakadaki hücreler alt tabakalardaki hücrelerin yüzeyini kapatarak plazma sırasında oluşan aktif bileşenlerin alttaki hücrelere ulaşmasını kısıtlamış olabilir. Bu nedenle örnek yüzeylerindeki *Aspergillus* sporları sayısı sıfırlanamamış ve ya başka bir deyişle sayılamayacak düzeye indirgenememiştir. Başlangıç *Aspergillus* konsantrasyonunun azaltıldığı durumda, örnek yüzeyinde hücrelerin üst üste yığılması engelleneceğinden, plazmanın inaktivasyon etkisi artacaktır [204, 283]. İnokülasyon derecesinin etkisi gelecekteki çalışmalarda incelenmelidir.

- Plazma oluşturmak için kullanılan gaz türünün, *Aspergillus* türleri üzerindeki inaktivasyon etkinliğini incelemek üzere azot plazması uygulanmıştır. Fındık örneklerine kontrollü bir şekilde kontamine edilen *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında, D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz (655 W)'de uygulanan azot plazmasıyla 4.17 ve 4.09 log (kob/g), D<sub>2</sub>: 65 mm reaktörde ise, aynı koşullarda sırasıyla 3.70 ve 3.57 log (kob/g) birimlik indirgenme elde edilmiştir. Mısır örneklerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarında, D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde optimum plazma parametresinde 5 dk sonunda 4.62 ve 4.68 log (kob/g), D<sub>2</sub>: 65 mm reaktörde ise sırasıyla 4.54 ve 4.63 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmıştır.

Plazma proses gazı olarak hava kullanıldığında, her birinin mikroorganizma inaktivasyonuna katkıda bulunabileceği reaktif atomlar, yüklü parçacıklar, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve UV fotonları oluşur [274]. Ancak, atmosferik basınç plazmalarının antimikrobiyel etkisinin büyük bir kısmı reaktif oksijen ve nitrojen türlerine (RONS) dayandırılmaktadır [275]. Oksijen varlığında plazma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (atomik oksijen (O), ozon (O<sub>3</sub>), hidroksil radikalleri (OH•)) plazma inaktivasyonunu sağlayan önemli bileşenler olduğu ve hücre hasarı ve hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir [192, 225, 269]. Bu nedenle, havanın içerdiği oksijenden dolayı, hava plazma sırasında oluşan aktif türlerin hücre üzerinde oluşturduğu zarar azot plazmasına göre daha fazladır.

- D<sub>1</sub>: 49 mm akışkan yatak reaktörde % 100 V-25 kHz (655 W)'de uygulanan hava plazması sonucu, fındık örneklerinin doğal florasında bulunan küf ve mayalarda 3.45 log (kob/g) ve TAMB'lerde 3.27 log (kob/g) birimlik indirgenme 2 dk sonunda elde edilmiştir.
- Mısır örneklerine optimum plazma parametrelerinde uygulanan inaktivasyon işlemiyle, 3 dk sonunda doğal florasında bulunan TAMB'lerde 3.07 log (kob/g), küf ve mayalarda ise 3.84 log (kob/g) birimlik indirgenme sağlanmış ve her iki model örnekte de plazma işlemi sonrasında canlı hücreye saptanamamıştır.

Uygulanan atmosferik basınç akışkan yatak plazma işlemi ile gıda örneklerinin yüzeyinde doğal olarak bulunan mikrofloranın tamamının 3 dakika sonunda ortadan kalkması, bu prosesin toksijenik olmayan karışık bir mikroflora üzerinde de oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca başlangıç mikroorganizma yükünün daha düşük olması da plazmanın dekontaminasyon etkinliğini artırmış olabilir.

- *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporları ile kontrollü bir şekilde kontamine edilen fındık ve mısır örneklerine optimum parametrelerde hava kullanılarak plazma işlemi uygulandıktan sonra 25°C'de 30 gün depolanmış ve bu süre boyunca depolanan örneklerin yüzeyinde canlı kalan *A. flavus* ve *A. parasiticus* spor sayılarında artış gözlenmemiş ve hatta azalmıştır. Aynı depolama koşulları altında işlem görmemiş kontrol örneklerin yüzeyindeki *Aspergillus* sporları gelişmeye devam etmiştir.

Sonuç olarak plazma prosesinin *Aspergillus* sporlarında neden olduğu hasarın geçici olmadığı, sporların yapısında meydana gelen zararlı etkinin 30 gün depolama boyunca onarılamadığı ve aksine canlı spor sayısının azaldığı gözlenmiştir.

- *Aspergillus* türlerine uygulanan herhangi bir sterilizasyon yöntemi sonrasında ortamda kalan hücrelerin canlı ve sağlıklı ya da uygulanan işlem sonucu hasarlı olduğunu ortaya koyabilen bir ortam tasarlanmıştır. İnhibitör etkisiyle küf gelişimini sınırlandırdığı bilinen potasyum sorbat kullanılarak modifiye edilen YGC agar besiyerinde işlem görmemiş *Aspergillus* sporları gelişirken, plazma işlemi sonrasında örnek yüzeyinde kalan *Aspergillus* sporları aynı konsantrasyonda koruyucu içeren besiyerlerinde gelişmemiştir. Bu sonuç, plazma işleminin hücreler üzerinde bıraktığı hasar sebebiyle, depolama

süresince uygun koşullar bulamadığı takdirde *Aspergillus* türlerinin sayılarının artmadığını göstermiştir.

Ayrıca, tasarlanan ve optimize edilen modifiye besi ortamı, alternatif sterilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesinde, uygulanan yöntemin küf hücreleri üzerinde bıraktığı hasarın ortaya konulmasında her zaman kullanılabilinecek yeni bir yöntemdir. Küflere uygulanan inaktivasyon işlemi sonrasında hücre canlı da olsa, gördüğü hasarın modifiye besi ortamında inhibitör etki nedeniyle gelişiminin azalmasıyla takip edilebilirliği bu çalışma kapsamında literatüre yapılan önemli bir katkıdır.

- *Aspergillus* sporlarında plazma dekontaminasyon prosesi sonucunda gözlenen indirgenmeye uygulama sırasında oluşan sıcaklığın değil, plazma aktif türlerinin öldürücü etkisinin sebep olduğunu göstermek için normal proses koşullarında oluşmayan ve örnekler için olası en olumsuz ve zor şartlar sağlanarak fındık örneklerine 100°C – 5 dk uygulanan termal proses sonrasında *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un başlangıç spor konsantrasyonunu logaritmik bazda değiştirmedeği açıkça görülmektedir. Bu sonuç, atmosferik basınç akışkan yatak plazma sisteminde küf sporlarında elde edilen indirgenmenin sadece plazma işlemi ile sağlandığını doğrulamaktadır.
- Atmosferik plazma işleminin, *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının morfolojik yapısı üzerine etkisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile ortaya konmuştur. Plazma işleminin spor hücrelerine verdiği hasar açıkça gösterilmiştir.
- Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde, aflatoxin üretme potansiyeli olan ve gıdada bulunması durumunda insan sağlığını tehdit eden *A. flavus* veya *A. parasiticus* küfleri için belirlenen bir sınır değeri bulunmamaktadır. Bunun yerine kurutulmuş meyve-sebzeler ve mısır örnekleri için toplam maya ve küf yükü için bir sınırlama getirilmiştir. Bu tebliğe göre, model olarak seçilen ve *A. flavus* ile *A. parasiticus* sporları ile kontrollü bir şekilde kontamine edilen gıda örneklerine uygulanan atmosferik basınç akışkan yatak plazma işlemi sonrasında ulaşılan canlı küf sporu seviyesi bu sınırların altında kalmaktadır. Model gıda örneklerine direkt uygulanan plazma işlemi sonrasında ise doğal küf ve maya ile TAMB florası tamamen indirgenmiş ve ortamda canlı mikroorganizma saptanamamıştır.

- Bu tezin esas amacı olan atmosferik basınç akışkan yatak plazma reaktör sisteminin kurulumu ile fındık ve mısır örneklerinde etkili, hızlı ve ekonomik bir dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Reaktif maddelerin tepkime kabı (reaktör) içerisinde ki alıkonma sürelerinin artması, dönüşümün gerçekleştirildiği proseslerde “dönüşüm verimini” olumlu yönde arttırmakta fakat işlem süresini de uzattığından “genel etkinliğe” olumsuz olarak yansıyabilmektedir [284]. Benzer şekilde, plazma prosesinde uygulanan gaz akış hızı azaltılarak dekontaminasyon etkinliğini artırılabilir. Yapılan çalışmalarda, gaz akış hızının azaltılmasının, plazma sırasında oluşan reaktif türlerin ortamdaki kalıcılığı açısından önemli olduğunu ve örnek ile plazma jeti arasındaki mesafe kısaldıkça mikroroganizma inaktivasyonunun daha hızlı gerçekleştirildiği de belirtilmiştir [285].
- Bu tez kapsamında tasarlanan ve kurulan atmosferik basınç akışkan yatak reaktör sistemi fındık ve mısır gibi taneli gıda maddeleri işleyen fabrikaların işleyiş protokolüne entegre edilmesi düşünülebilir. Böyle bir sistemin sanayide kullanımı, depolamada küf gelişiminden dolayı görülen ürün kayıplarını azaltacak ve aflatoksin gibi kanserojenik etkili metabolitlerin de üründe gelişimi durdurulacaktır. Dünyanın en büyük fındık üreticisi ve tahıl üretiminin merkezinde olmamız nedeni ile bu konu üzerinde önemle durulması gerekmektedir.
- Ayrıca, tasarlanan plazma dekontaminasyon sistemi küf gelişimi ve mikotoksin gelişiminin büyük sorun teşkil ettiği baharatların dekontaminasyonunda da etkin bir biçimde kullanılabilir. Ülkemizde baharat sterilizasyonu oldukça pahalı bir altyapı gereksinimi ve kısıtlı proses hacmi olan “ışınlama” ile gerçekleştirildiğinden, akışkan yatak atmosferik plazma sistemi sürekli sisteme uygunluğu ve hızlı, etkin ve güvenli bir proses süreci sunması sebebiyle alternatif olarak değerlendirilmelidir.
- Ülke için en önemli kazanım, farklı bir uygulama ile kısıtlı ve pahalı işlemlerle dekontamine edilebilecek ürünlerin ileri teknolojik uygulamalar ile işlenmesidir. Teknolojik üstünlüğü, kullanım kolaylığı ve ekonomik olma özelliklerinden dolayı bu teknolojinin kullanımının yaygınlaşması ve kuşkusuz gıda endüstrisinde kalite artışı sağlaması hedeflenmektedir.

- Dünyada gıda işleme yöntemlerinin, her alanda ısıl uygulamalardan uzaklaşma yönünde olduğu düşünüldüğünde, sterilizasyon ve dekontaminasyonun “atmosferik basıncı plazma yöntemi” ile gerçekleşebileceğinin öncelikle bilim dünyasına kabul ettirilmesi, ardından ilgili sektörlerin bu alanda uygulamaya geçmeleri, Türkiye gibi tarımsal ürünlerin depolanmasında, ihracatında zaman zaman sorun yaşayan bir ülkenin bu konuda kendi kaynaklarından bilgi ve teknolojik bazda beslenmesi yüksek derecede önem kazanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., Samson, R. A., The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*, *Studies in Mycology*, 1-10, **2007**.
- [2] Samson, R. A., Varga, J., What is a species in *Aspergillus*?, *Medical Mycology*, 47, S13-S20, **2009**.
- [3] Hawksworth, D. L., Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species, *Medical Mycology*, 49, S70-S76, **2011**.
- [4] Geiser, D. M., Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics, *Medical Mycology*, 47, S21-S26, **2009**.
- [5] Bennett, J. W., An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, (eds: Machida, M., Gomi, K.), Caizer Academic Press, Portland, 1-17, **2010**.
- [6] Krijgheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Muller, W. H., Dijksterhuis, J., Wosten, H. A. B., Development in *Aspergillus*, *Studies in Mycology*, 1-29, **2013**.
- [7] Pitt, J. I., Hocking, A. D., *Aspergillus* and Related Teleomorphs. *Fungi and Food Spoilage*, Springer, New York, 305-311, **2009**.
- [8] Pitt, J. I., The Current Role of *Aspergillus* and *Penicillium* in Human and Animal Health, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32, 17-32, **1994**.
- [9] Brakhage, A. A., Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: Epidemiology, infection process and virulence determinants, *Current Drug Targets*, 6, 875-886, **2005**.
- [10] Denning, D. W., Invasive aspergillosis, *Clinical Infectious Diseases*, 26, 781-803, **1998**.
- [11] Stevens, D. A., Kan, V. L., Judson, M. A., Morrison, V. A., Dummer, S., Denning, D. W., Bennett, J. E., Walsh, T. J., Patterson, T. F., Pankey, G. A., Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*, *Clinical Infectious Diseases*, 30, 696-709, **2000**.
- [12] Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A., Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*, *Studies in Mycology*, 57-80, **2011**.
- [13] Ayerst, G., Effects of Moisture and Temperature on Growth and Spore Germination in Some Fungi, *Journal of Stored Products Research*, 5, 127-141, **1969**.
- [14] Pitt, J. I., Miscamble, B. F., Water Relations of *Aspergillus-Flavus* and Closely-Related Species, *Journal of Food Protection*, 58, 86-90, **1995**.
- [15] Wheeler, K. A., Hurdman, B. F., Pitt, J. I., Influence of Ph on the Growth of Some Toxigenic Species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, *International Journal of Food Microbiology*, 12, 141-150, **1991**.

- [16] Olutiola, P. O., Some Environmental and Nutritional Factors Affecting Growth and Sporulation of *Aspergillus-Flavus*, *Transactions of the British Mycological Society*, 66, 131-136, **1976**.
- [17] Araujo, R., Rodrigues, A. G., Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4335-4337, **2004**.
- [18] Doyle, M. P., Marth, E. H., Thermal Inactivation of Conidia from *Aspergillus-Flavus* and *Aspergillus-Parasiticus*. 2. Effects of Ph and Buffers, Glucose, Sucrose, and Sodium-Chloride, *Journal of Milk and Food Technology*, 38, 750-758, **1975**.
- [19] Doyle, M. P., Marth, E. H., Thermal Inactivation of Conidia from *Aspergillus-Flavus* and *Aspergillus-Parasiticus*.1. Effects of Moist Heat, Age of Conidia, and Sporulation Medium, *Journal of Milk and Food Technology*, 38, 678-682, **1975**.
- [20] Kurtzman, C. P., Smiley, M. J., Robnett, C. J., Wicklow, D. T., DNA Relatedness among Wild and Domesticated Species in the *Aspergillus-Flavus* Group, *Mycologia*, 78, 955-959, **1986**.
- [21] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) Toxigenic fungi: *Aspergillus* Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Food Pathogens., Blackie Academic and Professional, London, 347–381, **1996**.
- [22] Bullerman, L. B., Effects of Potassium Sorbate on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*, *Journal of Food Protection*, 46, 940-942, **1983**.
- [23] Doyle, M. P., Marth, E. H., Thermal Inactivation of Conidia from *Aspergillus-Flavus* and *Aspergillus-Parasiticus* .2. Effects of Ph and Buffers, Glucose, Sucrose, and Sodium-Chloride, *Journal of Milk and Food Technology*, 38, 750-758, **1975**.
- [24] Food and Agriculture Organization, Manuals of food quality control 10, Training in mycotoxins analysis, Food and Agriculture Organization, Rome, **1990**.
- [25] Food and Agriculture Organization, *Sampling Plans for aflatoxin analysis in Peanut and Corn*, Report of FAO technical consultation, Rome, **1993**.
- [26] CAST Council for Agricultural Science and Technology, *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*, Task Force Report, 1-200, **2003**.
- [27] Pitt, J. I., Corrections to Species Names in Physiological-Studies on *Aspergillus-Flavus* and *Aspergillus-Parasiticus*, *Journal of Food Protection*, 56, 265-269, **1993**.
- [28] Tran-Dinh, N., Pitt, J. I., Carter, D. A., Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, *Mycological Research*, 103, 1485-1490, **1999**.
- [29] El-Aasar, S. A., Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus*, *International Journal of Agriculture and Biology*, 8, 468-473, **2006**.

- [30] Stoloff, L., Aflatoxins – an overview. *Mycotoxins in Human and Animal Health*, (eds: Rodricks, J. V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. ), Pathotox Publishers, Park Forest South, IL, 7-28, **1977**.
- [31] Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., Aggarwal, D., Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122, **2004**.
- [32] Krishnamachari, K. A. V. R., Bhat, R. V., Nagarajan, V., Tilak, T. B. G., Investigations into an Outbreak of Hepatitis in Parts of Western India, *Indian Journal of Medical Research*, 63, 1036-1048, **1975**.
- [33] Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R. V., Breiman, R., Brune, M. N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S. H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G. N., Lewis, L., Liu, X. M., Luber, G., McCoy, L., Mensah, P., Miraglia, M., Misore, A., Njapau, H., Ong, C. N., Onsongo, M. T. K., Page, S. W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H. S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J. T., Wilson, D., Workgroup report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries, *Environmental Health Perspectives*, 114, 1898-1903, **2006**.
- [34] Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Giesecker, K., Rogers, H. S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L. F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L., Grp, A. I., Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004, *Environmental Health Perspectives*, 113, 1779-1783, **2005**.
- [35] IARC (International Agency for Research on Cancer), Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, **1993**.
- [36] Van Egmond, H. P., Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. *Mycotoxins in Dairy Products*, (ed: van Egmond, H. P.), Elsevier Applied Science, London, 11-55, **1989**.
- [37] Tunail, N., Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Sim Matbaası, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Ankara, 81-184, **2000**.
- [38] Hendrickse, R. G., Coulter, J. B. S., Lamplugh, S. M., Macfarlane, S. B. J., Williams, T. E., Omer, M. I. A., Suliman, G. I., Aflatoxins and Kwashiorkor - a Study in Sudanese Children, *British Medical Journal*, 285, 843-846, **1982**.
- [39] van Immerzeel, T. D., Mukasa, O., Schmitt, T. S., Moorman, P. W., Morbidity and mortality on a paediatric ward in rural Tanzania, *Tropical Doctor*, 36, 171-173, **2006**.
- [40] Fuhrman, P., Charney, P., Mueller, C. M., Hepatic proteins and nutrition assessment, *Journal of the American Dietetic Association*, 104, 1258-1264, **2004**.
- [41] Muller, O., Krawinkel, M., Malnutrition and health in developing countries, *Canadian Medical Association Journal*, 173, 279-286, **2005**.



- [42] Hatem, N. L., Hassab, H.M.A., El-Deeb, S.A., Ahmed, R.L.E., Prevalence of aflatoxins in blood and urine of Egyptian infants with protein-energy malnutrition, *Food Nutr. Bull.*, 26, 49-56, **2005**.
- [43] Aish, J. L., Rippon, E.H., Barlow, T., Hattersley, S.L., Ochratoxin A. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, (eds: Magan, N., Olsen, M.), Woodhead Publishing Ltd, Boca Raton, 307–338, **2004**.
- [44] Gokmen, V., Acar, J., An investigation on the relationship between patulin and fumaric acid in apple juice concentrates, *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 31, 480-483, **1998**.
- [45] EFSA, Statement of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on the effects on public health of an increase of the levels for aflatoxin total from 4 µg/kg to 10 µg/kg for tree nuts other than almonds, hazelnuts and pistachios, *The EFSA Journal*, 1168, 1-11, **2009**.
- [46] EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products, *The EFSA Journal*, 446, 1-27, **2007**.
- [47] RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), *Annual Report on the Functioning of the RASFF*, Luxembourg, 1-65, **2007**.
- [48] Karaca, H., Velioglu, Y. S., Ozone applications in fruit and vegetable processing, *Food Reviews International*, 23, 91-106, **2007**.
- [49] Sweeney, M. J., Dobson, A. D. W., Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *International Journal of Food Microbiology*, 43, 141-158, **1998**.
- [50] Moss, M. O., Secondary Metabolism and Food Intoxication - Molds, *Journal of Applied Bacteriology*, 73, S80-S88, **1992**.
- [51] Sweeney, M. J., Dobson, A. D. W., Molecular biology of mycotoxin biosynthesis, *Fems Microbiology Letters*, 175, 149-163, **1999**.
- [52] Mclean, M., Dutton, M. F., Cellular Interactions and Metabolism of Aflatoxin - an Update, *Pharmacology & Therapeutics*, 65, 163-192, **1995**.
- [53] Wang, J. S., Groopman, J. D., DNA damage by mycotoxins, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424, 167-181, **1999**.
- [54] Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., Galvano, G., Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review, *Journal of Food Protection*, 64, 120-131, **2001**.
- [55] Aziz, N. H., Moussa, L. A. A., Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits, *Food Control*, 13, 281-288, **2002**.
- [56] DMello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., Mycotoxins, *Animal Feed Science and Technology*, 69, 155-166, **1997**.
- [57] Bennett, J. W., Klich, M., Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516, **2003**.

- [58] Hussein, H. S., Brasel, J. M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 167, 101-134, **2001**.
- [59] Atroshi, F., Rizzo, A., Westermarck, T., Ali-Vehmas, T., Antioxidant nutrients and mycotoxins, *Toxicology*, 180, 151-167, **2002**.
- [60] Ayfer, M., Uzun, A., Bas, F., *Türk fındık çeşitleri*, Karadeniz İhracatçıları Birliği, Giresun/Ankara, **1986**.
- [61] Erdogan, V., Koksall, A. I., Aygun, A., Assessment of Genetic Relationships among Turkish Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Cultivars by RAPD Markers, *Romanian Biotechnological Letters*, 15, 5591-5601, **2010**.
- [62] Sanchis, V., Quilez, L., Viladrich, R., Vinas, I., Canela, R., Hazelnuts as Possible Substrate for Aflatoxin Production, *Journal of Food Protection*, 51, 289-292, **1988**.
- [63] Food and Agriculture Organization, Review of Incidence in commodities, Perspective on Mycotoxin, *Selected documents of the joint FAO/WHO/UNEP conference on mycotoxins*, Rome, Food and Agriculture Organization, **1979**.
- [64] Rustom, I. Y. S., Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods, *Food Chemistry*, 59, 57-67, **1997**.
- [65] European Commission Report, *Opinion on the relationship between the use of plant protection products on food plants and the occurrence of mycotoxins in foods*, Belgium, **1999**.
- [66] Codex Alimentarius Commission, Proposed draft code of practice for the prevention (reduction) of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rotterdam, The Netherlands, **2002**.
- [67] Klich, M. A., Soil fungi of some low-altitude desert cotton fields and ability of their extracts to inhibit *Aspergillus flavus*, *Mycopathologia*, 142, 97-100, **1998**.
- [68] Cleveland, T. E., Dowd, P. F., Desjardins, A. E., Bhatnagar, D., Cotty, P. J., United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops, *Pest Management Science*, 59, 629-642, **2003**.
- [69] Edwards, S. G., Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins, *Toxicology Letters*, 153, 29-35, **2004**.
- [70] D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., Postel, D., Dijkema, W. T. P., Dujardin, A., Placinta, C. M., Pesticide use and mycotoxin production in Fusarium and Aspergillus phytopathogens, *European Journal of Plant Pathology*, 104, 741-751, **1998**.
- [71] Widstrom, N. W., Butron, A., Guo, B. Z., Wilson, D. M., Snook, M. E., Cleveland, T. E., Lynch, R. E., Control of preharvest aflatoxin contamination in maize by pyramiding QTL involved in resistance to ear-feeding insects and invasion by *Aspergillus* spp., *European Journal of Agronomy*, 19, 563-572, **2003**.

- [72] Chen, Z. Y., Brown, R. L., Cleveland, T. E., Damann, K. E., Russin, J. S., Comparison of constitutive and inducible maize kernel proteins of genotypes resistant or susceptible to aflatoxin production, *Journal of Food Protection*, 64, 1785-1792, **2001**.
- [73] Smith, J. E., Lewis, C.W., Anderson, J.G., and Solomons, G.L., *Mycotoxins in Human Health*, European Commission, directorate-General XII, Report EUR 16048 EN, Brussels, **1994**.
- [74] loos, R., Belhadj, A., Menez, M., Faure, A., The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains, *Crop Protection*, 24, 894-902, **2005**.
- [75] Diamond, H., Cooke, B. M., Preliminary studies on biological control of the *Fusarium* ear blight complex of wheat, *Crop Protection*, 22, 99-107, **2003**.
- [76] Payne, G. A., Aflatoxin in Maize, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10, 423-440, **1992**.
- [77] Dayi, C., Ling, X., Rong, Y., Phytic Acid Inhibits the Production of Aflatoxin B-1, *Journal of Food Processing and Preservation*, 19, 27-32, **1995**.
- [78] Brown, R. L., Cotty, P. J., Cleveland, T. E., Widstrom, N. W., Living Maize Embryo Influences Accumulation of Aflatoxin in Maize Kernels, *Journal of Food Protection*, 56, 967-971, **1993**.
- [79] Food and Agriculture Organization, *Recommended practices for the prevention of mycotoxins in food, feed and their products*, Rome, **1979**.
- [80] Mixon, A. C., Bell, D. K., Wilson, D. M., Effect of Chemical and Biological Agents on the Incidence of *Aspergillus-Flavus* and Aflatoxin Contamination of Peanut Seed, *Phytopathology*, 74, 1440-1444, **1984**.
- [81] Brown, R. L., Cotty, P. J., Cleveland, T. E., Reduction in Aflatoxin Content of Maize by Atoxigenic Strains of *Aspergillus-Flavus*, *Journal of Food Protection*, 54, 623-626, **1991**.
- [82] Dorner, J. W., Cole, R. J., Blankenship, P. D., Use of a Biocompetitive Agent to Control Preharvest Aflatoxin in Drought Stressed Peanuts, *Journal of Food Protection*, 55, 888-892, **1992**.
- [83] Guerzoni, M. E., Position paper on some aspects concerning foodborne disease and food toxicity in the mediterranean areas, Università degli studi di Bologna-dipartimento di protezione e valorizzazione agroalimentare: *Bologna, Italy*, **2003**.
- [84] Codex Alimentarius Commission, *Prevention and Reduction of Aflatoxin Contaminastion in Tree Nuts* Prevention and Reduction of Food and Feed Contamination, Rome, 19-32, **2012**.
- [85] Delage, N., d'Harlingue, A., Ceccaldi, B. C., Bompeix, G., Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine, *Food Control*, 14, 225-227, **2003**.
- [86] Mehan, V. K., Ramakrishna, N., Nageswara, R., McDonald, D., Preharvest aflatoxin contamination of groundnuts subjected to terminal drought stress in postrainy season, *Mycotoxin Research*, 11, 103-109, **1995**.

- [87] Boutrif, E., Prevention of aflatoxin in pistachios, *Food Nutrition and Agriculture*, 21, 32-39, **1998**.
- [88] Bertelsen, D., Harwood, J., Lee, H., Somwaru, A., Zepp, G., Pistachios: An economic assessment of the feasibility of providing multiple peril crop insurance, Economic Research Service, US DSA for the Consolidated Farm Service Agency, Office of Risk Management: USA, Volume, **1995**.
- [89] Var, I., Antepfıstığı ve aflatoksin sorunu, *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Gaziantep İl Müdürlüğü Eğitim Semineri*, Gaziantep, **2002**.
- [90] Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A., Al-Jedah, J., Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar, *Food Control*, 11, 157-160, **2000**.
- [91] Bracket, R. E., Strategies for dealing with aflatoxins in peanuts. *Trends in Food Product Development*, (eds: Yam, T. C., Tan, C.), Singapore Institute of Food Science and Technology, Singapore, 83-91, **1989**.
- [92] Codex Alimentarius Commission, Discussion paper on aflatoxins in pistachios, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rotterdam, The Netherlands, **2002**.
- [93] Abramson, D., Mycotoxin formation and environmental factors. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, (eds: Sinha, K. K., Bhatnagar, D.), Marcel Dekker, New York, 255-277, **1998**.
- [94] Ozkaya, S., Taydas, E.E., Basaran, A., Avcı, B., Hızlı, S., Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı aflatoksin analiz kurs notları, 7-14 Ağustos, Ankara, **1999**.
- [95] Lacey, J., Prevention of Mold Growth and Mycotoxin Production through Control of Environmental-Factors, *Mycotoxins and Phycotoxins* 88, 10, 161-168, **1989**.
- [96] Romer, T., Maune, C., A Practical Approach to Mycotoxin Quality-Control, *Cereal Foods World*, 38, 349-352, **1993**.
- [97] Huff, W. E., Hagler, W. M., Evaluation of Density Segregation as a Means to Estimate the Degree of Aflatoxin Contamination of Corn, *Cereal Chemistry*, 59, 152-153, **1982**.
- [98] Schmidt, F. R., Esser, K., Aflatoxins - Medical, Economic-Impact, and Prospects for Control, *Process Biochemistry*, 20, 167-174, **1985**.
- [99] Heathcote, J. G., Hibbert, J.R., *Aflatoxin Chemical and Biological Aspects*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, **1978**.
- [100] DeCastro, M. F. P. P. M., Pacheco, I. A., Soares, L. M. V., Furlani, R. P. Z., DePaula, D. C., Bolonhezi, S., Warehouse control of *Aspergillus flavus* link and *A-parasiticus* speare on peanuts (*Arachis hypogaea*) by phosphine fumigation and its effect on aflatoxin production, *Journal of Food Protection*, 59, 407-411, **1996**.
- [101] Antonacci, L., Salvat, A. E., Faifer, G. C., Godoy, H. M., Suppression of spore germination and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* during and after exposure to high levels of phosphine, *Mycopathologia*, 147, 83-87, **1999**.

- [102] Dutton, M. F., Anderson, M. S., Inhibition of Aflatoxin Biosynthesis by Organo-Phosphorus Compounds, *Journal of Food Protection*, 43, 381-384, **1980**.
- [103] Arino, A. A., Bullerman, L. B., Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus-Parasiticus* Nrri-2999 as Affected by the Fungicide Iprodione, *Journal of Food Protection*, 56, 718-721, **1993**.
- [104] Munimbazi, C., Saxena, J., Tsai, W. Y. J., Bullerman, L. B., Inhibition of production of cyclopiazonic acid and ochratoxin A by the fungicide iprodione, *Journal of Food Protection*, 60, 849-852, **1997**.
- [105] Tubajika, K. M., Damann, K. E., Glufosinate-ammonium reduces growth and aflatoxin B-1 production by *Aspergillus flavus*, *Journal of Food Protection*, 65, 1483-1487, **2002**.
- [106] Marin, S., Guynot, M. E., Neira, P., Bernado, M., Sanchis, V., Ramos, A. J., Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 203-211, **2002**.
- [107] Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marin, S., Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5), *International Journal of Food Microbiology*, 101, 161-168, **2005**.
- [108] Elgazzar, F. E., Marth, E. H., Sodium Benzoate in the Control of Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus-Parasiticus*, *Journal of Food Protection*, 50, 305-309, **1987**.
- [109] Rusul, G., Marth, E. H., Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus-Parasiticus* Nrri-2999 in the Presence of Potassium Benzoate or Potassium Sorbate and at Different Initial Ph Values, *Journal of Food Protection*, 50, 820-825, **1987**.
- [110] Rodriguez, S. B., Mahoney, N. E., Inhibition of Aflatoxin Production by Surfactants, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 106-110, **1994**.
- [111] Zohri, A. A., Saber, S. M., Mostafa, M. E., Effect of selenite and tellurite on the morphological growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus* var. *globosus* IMI 120920, *Mycopathologia*, 139, 51-57, **1997**.
- [112] Petersson, S., Hansen, M. W., Axberg, K., Hult, K., Schnurer, J., Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycological Research*, 102, 1003-1008, **1998**.
- [113] Shantha, T., Fungal degradation of aflatoxin B1, *Natural Toxins*, 7, 175-178, **1999**.
- [114] Munimbazi, C., Bullerman, L. B., Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*, *Mycopathologia*, 140, 163-169, **1998**.
- [115] Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., Schnurer, J., Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria, *Fems Microbiology Letters*, 219, 129-135, **2003**.

- [116] Stiles, J., Penkar, S., Plockova, N., Chumchalova, J., Bullerman, L. B., Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*, *Journal of Food Protection*, 65, 1188-1191, **2002**.
- [117] Laitila, A., Alakomi, H. L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 566-576, **2002**.
- [118] Batish, V. K., Roy, U., Lal, R., Grover, S., Antifungal attributes of lactic acid bacteria - A review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 209-225, **1997**.
- [119] El-Gendy, S. M., Marth, E.H., Growth of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*, *Journal of Food Protection*, 44, 211-212, **1981**.
- [120] Coallierascah, J., Idziak, E. S., Interaction between *Streptococcus-Lactis* and *Aspergillus-Flavus* on Production of Aflatoxin, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 163-167, **1985**.
- [121] Gourama, H., Bullerman, L. B., Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudopantarum*, *International Journal of Food Microbiology*, 34, 131-143, **1997**.
- [122] Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., Damiani, P., Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 253-256, **1998**.
- [123] Kachouri, F., Ksontini, H., Hamdi, M., Removal of Aflatoxin B1 and Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth by the Use of *Lactobacillus plantarum* on Olives, *Journal of Food Protection*, 77, 1760-1767, **2014**.
- [124] Mahmoud, A. L. E., Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants, *Letters in Applied Microbiology*, 29, 334-336, **1999**.
- [125] Montes-Belmont, R., Carvajal, M., Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components, *Journal of Food Protection*, 61, 616-619, **1998**.
- [126] Juglal, S., Govinden, R., Odhav, B., Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi, *Journal of Food Protection*, 65, 683-687, **2002**.
- [127] Solimar, K. M., Badeaa, R.I., Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1669-1675, **2002**.
- [128] Raso, J., Barbosa-Canovas, G. V., Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 265-285, **2003**.
- [129] Molins, R. A., Motarjemi, Y., Kaferstein, F. K., Irradiation: a critical control point in ensuring the microbiological safety of raw foods, *Food Control*, 12, 347-356, **2001**.

- [130] Refai, M. K., Aziz, N. H., ElFar, F., Hassan, A. A., Detection of ochratoxin produced by *A-ochraceus* in feedstuffs and its control by gamma radiation, *Applied Radiation and Isotopes*, 47, 617-621, **1996**.
- [131] Aziz, N. H., El-Zeany, S. A., Moussa, L. A. A., Influence of gamma-irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B-1 by *Aspergillus flavus*, *Nahrung-Food*, 46, 327-331, **2002**.
- [132] Aziz, N. H., Smyk, B., Influence of UV radiation and nitrosamines on the induction of mycotoxins synthesis by nontoxigenic moulds isolated from feed samples, *Nahrung-Food*, 46, 118-121, **2002**.
- [133] Bata, A., Lasztity, R., Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 223-228, **1999**.
- [134] Sinha, K. K., Detoxification of mycotoxins and food safety. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, (eds: Sinha, K. K., Bhatnagar, D.), Marcel Dekker, New York, 381-405, **1998**.
- [135] Commission Regulation (EC), Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Brussel, **2001**.
- [136] Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., Piva, A., Detoxification Methods of Aflatoxins - a Review, *Nutrition Research*, 15, 767-776, **1995**.
- [137] Goldblatt, L. A., Dollear, F. G., Review of Prevention, Elimination, and Detoxification of Aflatoxins, *Pure and Applied Chemistry*, 49, 1759-1764, **1977**.
- [138] Hocking, A. D., Toxigenic *Aspergillus* species. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, (eds: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J.), ASM press, Washington DC, 393-405, **1997**.
- [139] Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21-37, **1999**.
- [140] Huff, W. E., Hagler, W. M., Density Segregation of Corn and Wheat Naturally Contaminated with Aflatoxin, Deoxynivalenol and Zearalenone, *Journal of Food Protection*, 48, 416-420, **1985**.
- [141] Scott, P. M., Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins, *Mycotox'98 International symposium*, Toulouse, France, 543-548, **1998**.
- [142] Rayner, E. T., Koltun, S. P., Dollear, F. G., Solvent-Extraction of Aflatoxins from Contaminated Agricultural Products, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 54, A242-A244, **1977**.
- [143] Kadakal, C., Nas, S., Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice, *Nahrung-Food*, 46, 31-33, **2002**.
- [144] Doyle, M. P., Applebaum, R. S., Brackett, R. E., Marth, E. H., Physical, Chemical and Biological Degradation of Myco-Toxins in Foods and Agricultural Commodities, *Journal of Food Protection*, 45, 964-971, **1982**.
- [145] Scott, P. M., Effects of Food-Processing on Mycotoxins, *Journal of Food Protection*, 47, 489-499, **1984**.

- [146] Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen, M. D., Wei, C. I., Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds by Physical and Chemical Methods, *Journal of Food Protection*, 53, 489-501, **1990**.
- [147] Pluyer, H. R., Ahmed, E. M., Wei, C. I., Destruction of Aflatoxins on Peanuts by Oven-Roasting and Microwave-Roasting, *Journal of Food Protection*, 50, 504-508, **1987**.
- [148] Ozkarslı, M., *Yer fıstıklarında aflatoksin B1 üzerine geleneksel ve mikrodalgada kavurmanın etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2003**.
- [149] Assuncao, E., Reis, T. A., Baquiao, A. C., Correa, B., Effects of Gamma and Electron Beam Radiation on Brazil Nuts Artificially Inoculated with *Aspergillus flavus*, *Journal of Food Protection*, 78, 1397-1401, **2015**.
- [150] Di Stefano, V., Pitonzo, R., Cicero, N., D'Oca, M. C., Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations, *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 31, 2034-2039, **2014**.
- [151] Codex Alimentarius Commission, Revised Codex General Standard for Irradiated Foods, Codex Alimentarius Commission, 1-10, **2003**.
- [152] Yousef, A. E., Marth, E. H., Use of Ultraviolet Energy to Degrade Aflatoxin M1 in Raw or Heated Milk with and without Added Peroxide, *Journal of Dairy Science*, 69, 2243-2247, **1986**.
- [153] Altug, T., Yousef, A. E., Marth, E. H., Degradation of Aflatoxin B-1 in Dried Figs by Sodium Bisulfite with or without Heat, Ultraviolet Energy or Hydrogen-Peroxide, *Journal of Food Protection*, 53, 581-582, **1990**.
- [154] Graham, D. M., Use of ozone for food processing, *Food Technology*, 51, 72-75, **1997**.
- [155] Federal Register, Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption, Volume, 33829-33830, **2001**.
- [156] Prudente Jr, A. D., King, J. M., Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn, *Journal of Food Science*, 67, 2866-2872, **2002**.
- [157] Proctor, A. D., Ahmedna, M., Kumar, J. V., Goktepe, I., Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment, *Food Additives and Contaminants*, 21, 786-793, **2004**.
- [158] Akbas, M. Y., Ozdemir, M., Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2099-2104, **2006**.
- [159] Inan, F., Pala, M., Doymaz, I., Use of ozone in detoxification of aflatoxin B-1 in red pepper, *Journal of Stored Products Research*, 43, 425-429, **2007**.
- [160] Zorlugenc, B., Zorlugenc, F. K., Oztekin, S., Evliya, I. B., The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B(1) in dried figs, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3593-3597, **2008**.



- [161] McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., Norred, W. P., Voss, K. A., Plattner, R. D., Kubena, L. F., Phillips, T. D., Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone, *Food and Chemical Toxicology*, 35, 807-820, **1997**.
- [162] Karaca, H., Velioglu, Y. S., Nas, S., Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone, *Toxin Reviews*, 29, 51-59, **2010**.
- [163] Karlovsky, P., Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production, *Natural Toxins*, 7, 1-23, **1999**.
- [164] Karlovsky, P., Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 491-504, **2011**.
- [165] Topcu, A., Bulat, T., Wishah, R., Boyaci, I. H., Detoxification of aflatoxin B-1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains, *International Journal of Food Microbiology*, 139, 202-205, **2010**.
- [166] Sangare, L., Zhao, Y. J., Folly, Y. M. E., Chang, J. H., Li, J. H., Selvaraj, J. N., Xing, F. G., Zhou, L., Wang, Y., Liu, Y., Aflatoxin B-1 Degradation by a *Pseudomonas* Strain, *Toxins*, 6, 3028-3040, **2014**.
- [167] Zhao, L., Jin, H. T., Lan, J., Zhang, R. Y., Ren, H. B., Zhang, X. B., Yu, G. P., Detoxification of zearalenone by three strains of *Lactobacillus plantarum* from fermented food in vitro, *Food Control*, 54, 158-164, **2015**.
- [168] Line, J. E., Brackett, R. E., Wilkinson, R. E., Evidence for Degradation of Aflatoxin-B-1 by *Flavobacterium aurantiacum*, *Journal of Food Protection*, 57, 788-791, **1994**.
- [169] D'Souza, D. H., Brackett, R. E., The role of trace metal ions in aflatoxin B-1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum*, *Journal of Food Protection*, 61, 1666-1669, **1998**.
- [170] D'Souza, D. H., Brackett, R. E., Aflatoxin B-1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors, *Journal of Food Protection*, 64, 268-271, **2001**.
- [171] Ozkaya, S., *Ülkemizde aflatoksin sorunu yaşanan bazı gıdalarda aflatoksin B1'in azaltılması veya giderilmesinde Flavobacterium aurantiacum'un etkinliğinin araştırılması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2001**.
- [172] Rao, S. B. N., Chopra, R. C., Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M-1 excretion in milk of goats, *Small Ruminant Research*, 41, 203-213, **2001**.
- [173] Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H., Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents, *Toxicology Letters*, 122, 179-188, **2001**.
- [174] Tomasevic-Canovic, M., Dakovic, A., Rottinghaus, G., Matijasevic, S., Duricic, M., Surfactant modified zeolites - new efficient adsorbents for mycotoxins, *Microporous and Mesoporous Materials*, 61, 173-180, **2003**.
- [175] Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, A., Chies, L., Galvano, M., Activated carbons: In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters, *Journal of Food Protection*, 61, 469-475, **1998**.

- [176] Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Fusconi, G., Galvano, M., Piva, A., Piva, G., Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons, *Journal of Food Protection*, 59, 551-554, **1996**.
- [177] El-Nezami, H., Mykkanen, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J., Ability of Lactobacillus and Propionibacterium strains to remove aflatoxin B-1 from the chicken duodenum, *Journal of Food Protection*, 63, 549-552, **2000**.
- [178] Oatley, J. T., Rarick, M. D., Ji, G. E., Linz, J. E., Binding of aflatoxin B-1 to bifidobacteria in vitro, *Journal of Food Protection*, 63, 1133-1136, **2000**.
- [179] Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J., Factors affecting the sequestration of aflatoxin by Lactobacillus rhamnosus strain GG, *Chemico-Biological Interactions*, 128, 39-49, **2000**.
- [180] Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S., Aflatoxin B-1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Journal of Dairy Science*, 84, 2152-2156, **2001**.
- [181] Kabak, B., Dobson, A. D. W., Var, I., Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619, **2006**.
- [182] Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N., Fridman, A., Applied plasma medicine, *Plasma Processes and Polymers*, 5, 503-533, **2008**.
- [183] Heinlin, J., Isbary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Nosenko, T., Zimmermann, J. L., Karrer, S., Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25, 1-11, **2011**.
- [184] Langmuir, I., Oscillations in ionized gases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 14, 627-37, **1928**.
- [185] Denes, F. S., Manolache, S., Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science, *Progress in Polymer Science*, 29, 815-885, **2004**.
- [186] Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., van der Mullen, J., Gas discharge plasmas and their applications, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57, 609-658, **2002**.
- [187] Braithwaite, N. S. J., Introduction to gas discharges, *Plasma Sources Science & Technology*, 9, 517-527, **2000**.
- [188] Conrads, H., Schmidt, M., Plasma generation and plasma sources, *Plasma Sources Science & Technology*, 9, 441-454, **2000**.
- [189] Suchentrunk, R., Staudigl, G., Jonke, D., Fuessler, H. J., Industrial applications for plasma processes - examples and trends, *Surface & Coatings Technology*, 97, 1-9, **1997**.
- [190] Bonizzoni, G., Vassallo, E., Plasma physics and technology; industrial applications, *Vacuum*, 64, 327-336, **2002**.
- [191] d'Agostino, R., Favia, P., Oehr, C., Wertheimer, M. R., Low-temperature plasma processing of materials: Past, present, and future, *Plasma Processes and Polymers*, 2, 7-15, **2005**.

- [192] von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K., Weltmann, K. D., Plasmas for medicine, *Physics Reports*, 530, 291-320, **2013**.
- [193] Kogelschatz, U., Atmospheric-pressure plasma technology, *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 46, B63-B75, **2004**.
- [194] Becker, K., Koutsospyros, A., Yin, S. M., Christodoulatos, C., Abramzon, N., Joaquin, J. C., Brelles-Marino, G., Environmental and biological applications of microplasmas, *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 47, B513-B523, **2005**.
- [195] Becker, K. H., Schoenbach, K. H., Eden, J. G., Microplasmas and applications, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 39, R55-R70, **2006**.
- [196] Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P., Atmospheric pressure plasmas: A review, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 61, 2-30, **2006**.
- [197] Biederman, H., Boyaci, I. H., Bilkova, P., Slavinska, D., Mutlu, S., Zemek, J., Trchova, M., Klimovic, J., Mutlu, M., Characterization of glow-discharge-treated cellulose acetate membrane surfaces for single-layer enzyme electrode studies, *Journal of Applied Polymer Science*, 81, 1341-1352, **2001**.
- [198] Mutlu, M., Mutlu, S., Boyaci, I. H., Alp, B., Piskin, E., High-linearity glucose enzyme electrodes for food industries: Preparation by a plasma polymerization technique, *Polymers in Sensors*, 690, 57-65, **1998**.
- [199] Gunaydin, B., Sir, N., Kavlak, S., Guner, A., Mutlu, M., A New Approach for the Electrochemical Detection of Phenolic Compounds. Part I: Modification of Graphite Surface by Plasma Polymerization Technique and Characterization by Raman Spectroscopy, *Food and Bioprocess Technology*, 3, 473-479, **2010**.
- [200] Akdogan, E., Mutlu, M., Generation of amphoteric surfaces via glow-discharge technique with single precursor and the behavior of bovine serum albumin at the surface, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 89, 289-294, **2012**.
- [201] Cokeliler, D., Caner, H., Zemek, J., Choukourov, A., Biederman, H., Mutlu, M., A plasma polymerization technique to overcome cerebrospinal fluid shunt infections, *Biomedical Materials*, 2, 39-47, **2007**.
- [202] Sen, Y., Bagci, U., Gulec, H. A., Mutlu, M., Modification of Food-Contacting Surfaces by Plasma Polymerization Technique: Reducing the Biofouling of Microorganisms on Stainless Steel Surface, *Food and Bioprocess Technology*, 5, 166-175, **2012**.
- [203] Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L. H., Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms, *International Journal of Pharmaceutics*, 226, 1-21, **2001**.
- [204] Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M. C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B., Plasma sterilization. Methods mechanisms, *Pure and Applied Chemistry*, 74, 349-358, **2002**.

- [205] Park, B. J., Lee, D. H., Park, J. C., Lee, I. S., Lee, K. Y., Hyun, S. O., Chun, M. S., Chung, K. H., Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure, *Physics of Plasmas*, 10, 4539-4544, **2003**.
- [206] Montie, T. C., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J. R., An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials, *Ieee Transactions on Plasma Science*, 28, 41-50, **2000**.
- [207] Philip, N., Saoudi, B., Crevier, M. C., Moisan, M., Barbeau, J., Pelletier, J., The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: The case of N-2-O-2 mixtures, *Ieee Transactions on Plasma Science*, 30, 1429-1436, **2002**.
- [208] Sladek, R. E. J., Stoffels, E., Deactivation of Escherichia coli by the plasma needle, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 38, 1716-1721, **2005**.
- [209] Chau, T. T., Kao, K. C., Blank, G., Madrid, F., Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization, *Biomaterials*, 17, 1273-1277, **1996**.
- [210] Sen, Y., Mutlu, M., Sterilization of Food Contacting Surfaces via Non-Thermal Plasma Treatment: A Model Study with Escherichia coli-Contaminated Stainless Steel and Polyethylene Surfaces, *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3295-3304, **2013**.
- [211] Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J., Ricard, A., Yahia, L., Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate Bacillus subtilis spores: Influence of the operating conditions, *Journal of Applied Physics*, 88, 1166-1174, **2000**.
- [212] Schneider, J., Baumgartner, K. M., Feichtinger, J., Kruger, J., Muranyi, P., Schulz, A., Walker, M., Wunderlich, J., Schumacher, U., Investigation of the practicability of low-pressure microwave plasmas in the sterilisation of food packaging materials at industrial level, *Surface & Coatings Technology*, 200, 962-966, **2005**.
- [213] De Geyter, N., Morent, R., Nonthermal Plasma Sterilization of Living and Nonliving Surfaces, *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol 14, 14, 255-274, **2012**.
- [214] Deng, S. B., Ruan, R., Mok, C. K., Huang, G. W., Lin, X. Y., Chen, P., Inactivation of Escherichia coli on almonds using nonthermal plasma, *Journal of Food Science*, 72, M62-M66, **2007**.
- [215] Basaran, P., Basaran-Akgul, N., Oksuz, L., Elimination of Aspergillus parasiticus from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment, *Food Microbiology*, 25, 626-632, **2008**.
- [216] Selcuk, M., Oksuz, L., Basaran, P., Decontamination of grains and legumes infected with Aspergillus spp. and Penicillium spp. by cold plasma treatment, *Bioresource Technology*, 99, 5104-5109, **2008**.
- [217] Pignata, C., D'Angelo, D., Basso, D., Cavallero, M. C., Beneventi, S., Tartaro, D., Meineri, V., Gilli, G., Low-temperature, low-pressure gas plasma application on Aspergillus brasiliensis, Escherichia coli and pistachios, *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1137-1148, **2014**.

- [218] Surowsky, B., Schluter, O., Knorr, D., Interactions of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma with Solid and Liquid Food Systems: A Review, *Food Engineering Reviews*, 7, 82-108, **2015**.
- [219] Stoffels, E., Gonzalvo, Y. A., Whitmore, T. D., Seymour, D. L., Rees, J. A., A plasma needle generates nitric oxide, *Plasma Sources Science & Technology*, 15, 501-506, **2006**.
- [220] Laroussi, M., Leipold, F., Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure, *International Journal of Mass Spectrometry*, 233, 81-86, **2004**.
- [221] Moreau, M., Orange, N., Feuilloley, M. G. J., Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination, *Biotechnology Advances*, 26, 610-617, **2008**.
- [222] Weltmann, K. D., Brandenburg, R., von Woedtke, T., Ehlbeck, J., Foest, R., Stieber, M., Kindel, E., Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs), *Journal of Physics D-Applied Physics*, 41, **2008**.
- [223] Weltmann, K. D., Von Woedtke, T., Brandenburg, R., Ehlbeck, J., Biomedical Applications of Atmospheric Pressure Plasma, *Chemicke Listy*, 102, S1450-S1451, **2008**.
- [224] Terrier, O., Essere, B., Yver, M., Barthelemy, M., Bouscambert-Duchamp, M., Kurtz, P., VanMechelen, D., Morfin, F., Billaud, G., Ferraris, O., Lina, B., Rosa-Calatrava, M., Moules, V., Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses, *Journal of Clinical Virology*, 45, 119-124, **2009**.
- [225] Fridman, G., Brooks, A. D., Balasubramanian, M., Fridman, A., Gutsol, A., Vasilets, V. N., Ayan, H., Friedman, G., Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria, *Plasma Processes and Polymers*, 4, 370-375, **2007**.
- [226] Sensenig, R., Kalghatgi, S., Cerchar, E., Fridman, G., Shereshevsky, A., Torabi, B., Arjunan, K. P., Podolsky, E., Fridman, A., Friedman, G., Azizkhan-Clifford, J., Brooks, A. D., Non-thermal Plasma Induces Apoptosis in Melanoma Cells via Production of Intracellular Reactive Oxygen Species (Retracted article. See vol. 41, pg. 656, 2013), *Annals of Biomedical Engineering*, 39, 674-687, **2011**.
- [227] Polak, M., Winter, J., Schnabel, U., Ehlbeck, J., Weltmann, K. D., Innovative Plasma Generation in Flexible Biopsy Channels for Inner-Tube Decontamination and Medical Applications, *Plasma Processes and Polymers*, 9, 67-76, **2012**.
- [228] Pointu, A. M., Ricard, A., Odic, E., Ganciu, M., Nitrogen atmospheric pressure post discharges for surface biological decontamination inside small diameter tubes, *Plasma Processes and Polymers*, 5, 559-568, **2008**.
- [229] Zhang, Q., Sun, P., Feng, H. Q., Wang, R. X., Liang, Y. D., Zhu, W. D., Becker, K. H., Zhang, J., Fang, J., Assessment of the roles of various

- inactivation agents in an argon-based direct current atmospheric pressure cold plasma jet, *Journal of Applied Physics*, 111, **2012**.
- [230] Lerouge, S., Wertheimer, M. R., Yahia, L. H., Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations, *Plasmas and Polymers*, 6, 175-188, **2001**.
- [231] Ma, Y., Zhang, G. J., Shi, X. M., Xu, G. M., Yang, Y., Chemical mechanisms of bacterial inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air, *Ieee Transactions on Plasma Science*, 36, 1615-1620, **2008**.
- [232] Shama, G., Kong, M.G., Prospects for treating foods with cold atmospheric gas plasmas. *Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology*, (eds: Machala, Z., Hensel, K., Akishev, Y.), Springer, The Netherlands, 433-443, **2012**.
- [233] Baier, M., Foerster, J., Schnabel, U., Knorr, D., Ehlbeck, J., Herppich, W. B., Schluter, O., Direct non-thermal plasma treatment for the sanitation of fresh corn salad leaves: Evaluation of physical and physiological effects and antimicrobial efficacy, *Postharvest Biology and Technology*, 84, 81-87, **2013**.
- [234] Schnabel, U., Niquet, R., Schlüter, O., Gniffke, H., Ehlbeck, J., Decontamination and sensory properties of microbiologically contaminated fresh fruits and vegetables by microwave plasma processed air (PPA), *Journal of Food Processing and Preservation*, **2014**.
- [235] Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Knorr, D., Schluter, O., Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications, *Food Control*, 55, 221-229, **2015**.
- [236] Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Erdoğan, B., Rauh, C., Schlüter, O., Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices, *Journal of Food Engineering*, 167, 12-17, **2015**.
- [237] Song, H. P., Kim, B., Choe, J. H., Jung, S., Moon, S. Y., Choe, W., Jo, C., Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*, *Food Microbiology*, 26, 432-436, **2009**.
- [238] Montenegro, J., Ruan, R., Ma, H., Chen, P., Inactivation of E-coli O157 : H7 using a pulsed nonthermal plasma system, *Journal of Food Science*, 67, 646-648, **2002**.
- [239] Herceg, Z., Jambrak, A. R., Vukusic, T., Stulic, V., Stanzer, D., Milosevic, S., The effect of high-power ultrasound and gas phase plasma treatment on *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. count in pure culture, *Journal of Applied Microbiology*, 118, 132-141, **2015**.
- [240] Kim, J. E., Lee, D. U., Min, S. C., Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma, *Food Microbiology*, 38, 128-136, **2014**.
- [241] Suhem, K., Matan, N., Nisoa, M., Matan, N., Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment, *International Journal of Food Microbiology*, 161, 107-111, **2013**.

- [242] Topuz, A., *Akışkan Yatakta Fındık Kurutma Prosesinde Isı ve Kütle Geçişinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, **2002**.
- [243] Deniz, Z., *Akışkan Yataklı Kurutucu Modellemesi ve Analizi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, **2010**.
- [244] Başaran, B., *Mısırın Akışkan Yatakta Kuruma Karakteristiklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, **2006**.
- [245] Erçetin, Ü., *Tanecikli Gıda Maddelerinin Akışkan Yatakta Kurutulması*, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eskişehir, **2007**.
- [246] Put, S., Bertels, C., Vanhulsel, A., Atmospheric pressure plasma treatment of polymeric powders, *Surface & Coatings Technology*, 234, 76-81, **2013**.
- [247] Sachs, M., Schmitt, A., Schmidt, J., Peukert, W., Wirth, K.E., Functionalization of polymers using an atmospheric plasma jet in a fluidized bed reactor and the impact on SLM-Processes, *29th International Conference of the Polymer-Processing-Society (PPS)*, JUL 15-19, 2013, Nuremberg, GERMANY, AMER INST PHYSICS, **2014**.
- [248] Jafari, R., Tatoulian, M., Arefi-Khonsari, F., Improvement of the stability of plasma polymerized acrylic acid coating deposited on PS beads in a fluidized bed reactor, *Reactive & Functional Polymers*, 71, 520-524, **2011**.
- [249] Michl, T. D., Coad, B. R., Husler, A., Vasilev, K., Griesser, H. J., Laboratory Scale Systems for the Plasma Treatment and Coating of Particles, *Plasma Processes and Polymers*, 12, 305-313, **2015**.
- [250] Karches, M., von Rohr, P. R., Microwave plasma characteristics of a circulating fluidized bed-plasma reactor for coating of powders, *Surface & Coatings Technology*, 142, 28-33, **2001**.
- [251] Kim, G. H., Kim, S. D., Park, S. H., Plasma enhanced chemical vapor deposition of TiO<sub>2</sub> films on silica gel powders at atmospheric pressure in a circulating fluidized bed reactor, *Chemical Engineering and Processing*, 48, 1135-1139, **2009**.
- [252] Soto, G., Tiznado, H., Contreras, O., Perez-Tijerina, E., Cruz-Reyes, J., Del Valle, M., Portillo, A., Preparation of a Ag/SiO<sub>2</sub> nanocomposite using a fluidized bed microwave plasma reactor, and its hydrodesulphurization and Escherichia coli bactericidal activities, *Powder Technology*, 213, 55-62, **2011**.
- [253] Bretagnol, F., Tatoulian, M., Arefi-Khonsari, F., Lorang, G., Amouroux, J., Surface modification of polyethylene powder by nitrogen and ammonia low pressure plasma in a fluidized bed reactor, *Reactive & Functional Polymers*, 61, 221-232, **2004**.
- [254] Chen, G. L., Chen, S. H., Feng, W. R., Chen, W. X., Yang, S. Z., Surface modification of the nanoparticles by an atmospheric room-temperature plasma fluidized bed, *Applied Surface Science*, 254, 3915-3920, **2008**.
- [255] Butscher, D., Schlup, T., Roth, C., Muller-Fischer, N., Gantenbein-Demarchi, C., von Rohr, P. R., Inactivation of microorganisms on granular materials: Reduction of Bacillus amyloliquefaciens endospores on wheat grains in a low pressure plasma circulating fluidized bed reactor, *Journal of Food Engineering*, 159, 48-56, **2015**.

- [256] Aberkane, A., Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Petrikkou, E., Mellado, E., Monzon, A., Rodriguez-Tudela, J. L., Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 719-22, **2002**.
- [257] Rodriguez-Tudela, J. L., Chryssanthou, E., Petrikkou, E., Mosquera, J., Denning, D. W., Cuenca-Estrella, M., Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5236-5237, **2003**.
- [258] Guarro, J., Pujol, I., Aguilar, C., Llop, C., Fernandez-Ballart, J., Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 385-387, **1998**.
- [259] Basaran, P., Reduction of *Aspergillus parasiticus* on hazelnut surface by UV-C treatment, *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1857-1863, **2009**.
- [260] Marin, S., Ramos, A. J., Sanchis, V., Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates, *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329-341, **2005**.
- [261] Marin, S., Abellana, M., Rubinat, M., Sanchis, V., Ramos, A. J., Efficacy of sorbates on the control of the growth of *Eurotium* species in bakery products with near neutral pH, *International Journal of Food Microbiology*, 87, 251-258, **2003**.
- [262] Guynot, M. E., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., An attempt to optimize potassium sorbate use to preserve low pH (4.5-5.5) intermediate moisture bakery products by modelling *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium corylophilum* growth, *International Journal of Food Microbiology*, 101, 169-177, **2005**.
- [263] Guven, B., Basaran-Akgul, N., Temur, E., Tamer, U., Boyaci, I. H., SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for *Escherichia coli* enumeration, *Analyst*, 136, 740-748, **2011**.
- [264] Kendra, D. F., Dyer, R. B., Opportunities for biotechnology and policy regarding mycotoxin issues in international trade, *International Journal of Food Microbiology*, 119, 147-151, **2007**.
- [265] Laroussi, M., Alexeff, I., Kang, W. L., Biological decontamination by nonthermal plasmas, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 184-188, **2000**.
- [266] Herrmann, H. W., Henins, I., Park, J., Selwyn, G. S., Decontamination of chemical and biological warfare, (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ), *Physics of Plasmas*, 6, 2284-2289, **1999**.
- [267] Choi, J. H., Han, I., Baik, H. K., Lee, M. H., Han, D. W., Park, J. C., Lee, I. S., Song, K. M., Lim, Y. S., Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge, *Journal of Electrostatics*, 64, 17-22, **2006**.
- [268] Kelly-Wintenberg, K., Montie, T. C., Brickman, C., Roth, J. R., Carr, A. K., Sorge, K., Wadsworth, L. C., Tsai, P. P. Y., Room temperature sterilization of



- surfaces and fabrics with a One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 69-74, **1998**.
- [269] Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L. H., Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms, *International Journal of Pharmaceutics*, 226, 1-21, **2001**.
- [270] Butscher, D., Zimmermann, D., Schuppler, M., Rudolf von Rohr, P., Plasma inactivation of bacterial endospores on wheat grains and polymeric model substrates in a dielectric barrier discharge, *Food Control*, 60, 636-645, **2016**.
- [271] Schnabel, U., Niquet, R., Krohmann, U., Winter, J., Schlüter, O., Weltmann, K. D., Ehlbeck, J., Decontamination of Microbiologically Contaminated Specimen by Direct and Indirect Plasma Treatment, *Plasma Processes and Polymers*, 9, 569-575, **2012**.
- [272] Agalloco, J., Akers, J. , Decontamination of advanced aseptic processing environments. *Advanced Aseptic Processing Technology*, (eds: Agalloco, J., Akers, J. ), Informa Healthcare, London, UK, 276-288, **2010**.
- [273] Fridman, A., Friedman, G., Plasma Sterilization of Different Surfaces and Living Tissues. *Plasma Medicine*, Wiley, West Sussex, UK, 293-338, **2013**.
- [274] Mai-Prochnow, A., Murphy, A. B., McLean, K. M., Kong, M. G., Ostrikov, K., Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43, 508-517, **2014**.
- [275] Graves, D. B., The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 45, **2012**.
- [276] Park, B. J., Takatori, K., Lee, M. H., Han, D. W., Woo, Y. I., Son, H. J., Kim, J. K., Chung, K. H., Hyun, S. O., Park, J. C., Escherichia coli sterilization and lipopolysaccharide inactivation using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure, *Surface & Coatings Technology*, 201, 5738-5741, **2007**.
- [277] Dijksterhuis, J., Heat-resistant ascospores. *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, (eds: Dijksterhuis, J., Samson, R.A.), CRC Press Taylor&Francis Group, Utrecht, The Netherlands, 101-117, **2007**.
- [278] Wyatt, T. T., van Leeuwen, M. R., Golovina, E. A., Hoekstra, F. A., Kuenstner, E. J., Palumbo, E. A., Snyder, N. L., Visagie, C., Verkennis, A., Hallsworth, J. E., Wosten, H. A. B., Dijksterhuis, J., Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) and other fungi, *Environmental Microbiology*, 17, 395-411, **2015**.
- [279] Beuchat, L. R., Extraordinary Heat-Resistance of *Talaromyces-Flavus* and *Neosartorya-Fischeri* Ascospores in Fruit Products, *Journal of Food Science*, 51, 1506-1510, **1986**.
- [280] Houbraken, J., Dijksterhuis, J., and Samson, R.A., Diversity and biology of heat-resistant fungi. *Stress Response of Foodborne Microorganisms*, (ed: Wong, H.), Nova Publishers, Taipei, Taiwan, 331-353, **2012**.

- [281] Pitt, J. I., Hocking, A. D., The Ecology of Fungal Food Spoilage. *Fungi and Food Spoilage*, Springer, New York, 5-7, **2009**.
- [282] Yoshino, K., Matsumoto, H., Iwasaki, T., Kinoshita, S., Noda, K., Iwamori, S., Monitoring of sterilization in an oxygen plasma apparatus, employing a quartz crystal microbalance (QCM) method, *Vacuum*, 93, 84-89, **2013**.
- [283] Hury, S., Vidal, D. R., Desor, F., Pelletier, J., Lagarde, T., A parametric study of the destruction efficiency of Bacillus spores in low pressure oxygen-based plasmas, *Letters in Applied Microbiology*, 26, 417-421, **1998**.
- [284] Mutlu, M., Piskin, E., Blood-Plasma Proteins on Polyurethane and Alkylsiloxane Plasma-Treated Polyurethane Surfaces - Dynamic Approach by Stimulus-Response Technique .2. Evaluation of Adsorption Data by Moment Technique, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 28, 232-236, **1990**.
- [285] Vitrac, H., Guespin-Michel, J., Brisset, J.L. , A microbiological investigation of the gliding arc treatment of aqueous media, *International Symposium on High Pressure, Low Temperature Plasma Chemistry, Hakone VII*, Greifswald, Germany, 393-397, **2010**.

## EK 1. GIDALARDAKİ <sup>(1)</sup> BULAŞANLARIN MAKSİMUM LİMİTLERİ

Gıda <sup>(1)</sup>		Maksimum Limit (µg/kg)		
2.1.	AFLATOKSİN	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
2.1.1.	Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar <sup>(5)</sup> (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç	8,0 <sup>(6)</sup>	15,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.2.	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	12,0 <sup>(6)</sup>	15,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.3.	Fındık ve Brezilya fındığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	8,0 <sup>(6)</sup>	15,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.4.	Sert kabuklu meyveler (Bölüm 2.1.2 ve 2.1.3'de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0 <sup>(6)</sup>	15,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.5.	Yerfıstığı, diğer yağlı tohumlar <sup>(5)</sup> ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	5,0 <sup>(6)</sup>	10,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.6.	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği <sup>(7)</sup> (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0 <sup>(6)</sup>	10,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.7.	Fındık ve Brezilya fındığı <sup>(7)</sup> (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	5,0 <sup>(6)</sup>	10,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.8.	Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.6 ve 2.1.7'de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0 <sup>(6)</sup>	10,0 <sup>(6)</sup>	—
2.1.9.	Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—

2.1.10.	Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.11, 2.1.14 ve 2.1.16'de belirtilenler hariç)	2,0	4,0	—
2.1.11.	Mısır ve pirinç (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	—
2.1.12.	Çiğ süt <sup>(8)</sup> , ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
2.1.13.	Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber ( <i>Capsicum spp.</i> ) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber ( <i>Piper spp.</i> ) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) — Hintceviz/Muskat ( <i>Myristica fragrans</i> ) — Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ) — Zerdeçal ( <i>Curcuma longa</i> ) — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5,0	10,0	—
2.1.14.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup> , <sup>(9)</sup>	0,10	—	—
2.1.15.	Bebek formülleri ve devam formülleri <sup>(4)</sup> , <sup>(10)</sup> (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025
2.1.16.	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar <sup>(11)</sup> , <sup>(12)</sup>	0,10	—	0,025
<b>2.2.</b>	<b>OKRATOKSİN A</b>			
2.2.1.	İşlenmemiş tahıllar		5,0	
2.2.2.	(Değişik:RG-19/12/2012-28502) İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (Doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil) (2.2.9., 2.2.10. ve 2.2.13. satırında belirtilenler hariç)		3,0	
2.2.3.	Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm)		10,0	
2.2.4.	Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve (Bölüm 2.2.5'de belirtilenler hariç)		5,0	
2.2.5.	Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve		10,0	
2.2.6.	Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç)		2,0 <sup>(13)</sup>	
2.2.7.	Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli <sup>(14)</sup>		2,0 <sup>(13)</sup>	

2.2.8.	Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm şırası ve konsantreden üretilen üzüm şırası <sup>(15)</sup> (doğrudan insan tüketimine sunulan)	2,0 <sup>(13)</sup>
2.2.9.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup> , <sup>(9)</sup>	0,5
2.2.10.	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar <sup>(11)</sup> , <sup>(12)</sup>	0,5
2.2.11.	<b>(Değişik:RG-19/12/2012-28502)</b> Baharat (Kurutulmuş baharat dahil)  Karabiber ( <i>Piper</i> spp.) (Bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) Hintceviz/Muskat ( <i>Myristica fragrans</i> ) Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ) Zerdeçal ( <i>Curcuma longa</i> )	15,0
	Kırmızıbiber ( <i>Capsicum</i> spp.) (Bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil)	15,0
	Bu satırda belirtilen baharatın bir tanesini içeren karışım baharat	15,0
2.2.12.	Meyan kökü ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>G. inflata</i> ve diğer türler)	
2.2.12.1.	Meyan kökü (bitkisel infüzyon bileşeni olarak kullanılanlar)	20,0
2.2.12.2.	Meyan kökü ekstraktı <sup>(16)</sup> (özellikle alkolsüz içecek ve şekerleme üretiminde kullanılan)	80,0
<b>(Ek:RG-19/12/2012-28502)</b> 2.2.13.	Buğday gluteni (Tüketiciye doğrudan satılmayan)	8,0
<b>2.3.</b>	<b>PATULİN</b>	
2.3.1.	Meyve suları, konsantreden üretilen meyve suyu ve meyve nektarları <sup>(15)</sup>	50,0
2.3.2.	Distile alkollü içkiler <sup>(17)</sup> , elma şarabı ve elmadan üretilen veya elma suyu içeren diğer fermente içkiler	50,0
2.3.3.	Katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve doğrudan tüketime sunulan elma püresi dahil) (Bölüm 2.3.4 ve 2.3.5’de belirtilenler hariç)	25,0
2.3.4.	Bebek ve küçük çocuklar <sup>(17)</sup> için üretilen ve bu amaçla <sup>(4)</sup> piyasaya arz edilen/etiketlenen elma suyu ve katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve elma püresi dahil)	10,0
2.3.5.	Tahıl bazlı olmayan ek gıdalar <sup>(3)</sup> , <sup>(4)</sup>	10,0

<b>2.4.</b>	<b>DEOKSİNİVALENOL (DON) <sup>(19)</sup></b>	
2.4.1.	İşlenmemiş tahıllar <sup>(20)</sup> (durum buğdayı, yulaf ve mısır hariç)	1250
2.4.2.	İşlenmemiş durum buğdayı ve yulaf <sup>(20)</sup>	1750
2.4.3.	İşlenmemiş mısır <sup>(20)</sup> (ıslak öğütülecekler hariç) <sup>(21)</sup>	1750
2.4.4.	Tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym (doğrudan insan tüketimine sunulan) (Bölüm 2.4.7, 2.4.8 ve 2.4.9’da belirtilenler hariç)	750
2.4.5.	Makarna <sup>(22)</sup>	750
2.4.6.	Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar	500
2.4.7.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup> , <sup>(9)</sup>	200
2.4.8.	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelletler (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	750
2.4.9.	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	1250
<b>2.5.</b>	<b>ZEARALENON <sup>(19)</sup></b>	
2.5.1.	İşlenmemiş tahıllar <sup>(20)</sup> (mısır hariç)	100
2.5.2.	İşlenmemiş mısır <sup>(20)</sup> (ıslak öğütülecekler hariç) <sup>(21)</sup>	350
2.5.3.	Tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym (doğrudan insan tüketimine sunulan) (Bölüm 2.5.6, 2.5.7, 2.5.8, 2.5.9 ve 2.5.10’da belirtilenler hariç)	75
2.5.4.	Rafine mısır yağı	400
2.5.5.	Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar (mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç)	50
2.5.6.	Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar	100

2.5.7.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup> , <sup>(9)</sup> (Bölüm 2.5.8'de belirtilenler hariç)	20
2.5.8.	İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup> , <sup>(9)</sup>	20
2.5.9.	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	200
2.5.10.	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	300
<b>2.6.</b>	<b>FUMONİSİNLER</b>	<b>FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> (µg/kg)</b>
2.6.1.	İşlenmemiş mısır <sup>(20)</sup> (ıslak öğütülecekler hariç) <sup>(21)</sup>	4000
2.6.2.	Mısır ve mısır bazlı ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan) (Bölüm 2.6.3 ve 2.6.4'de belirtilenler hariç)	1000
2.6.3.	Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerezler	800
2.6.4.	İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup> , <sup>(9)</sup>	200
2.6.5.	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	1400
2.6.6.	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	2000

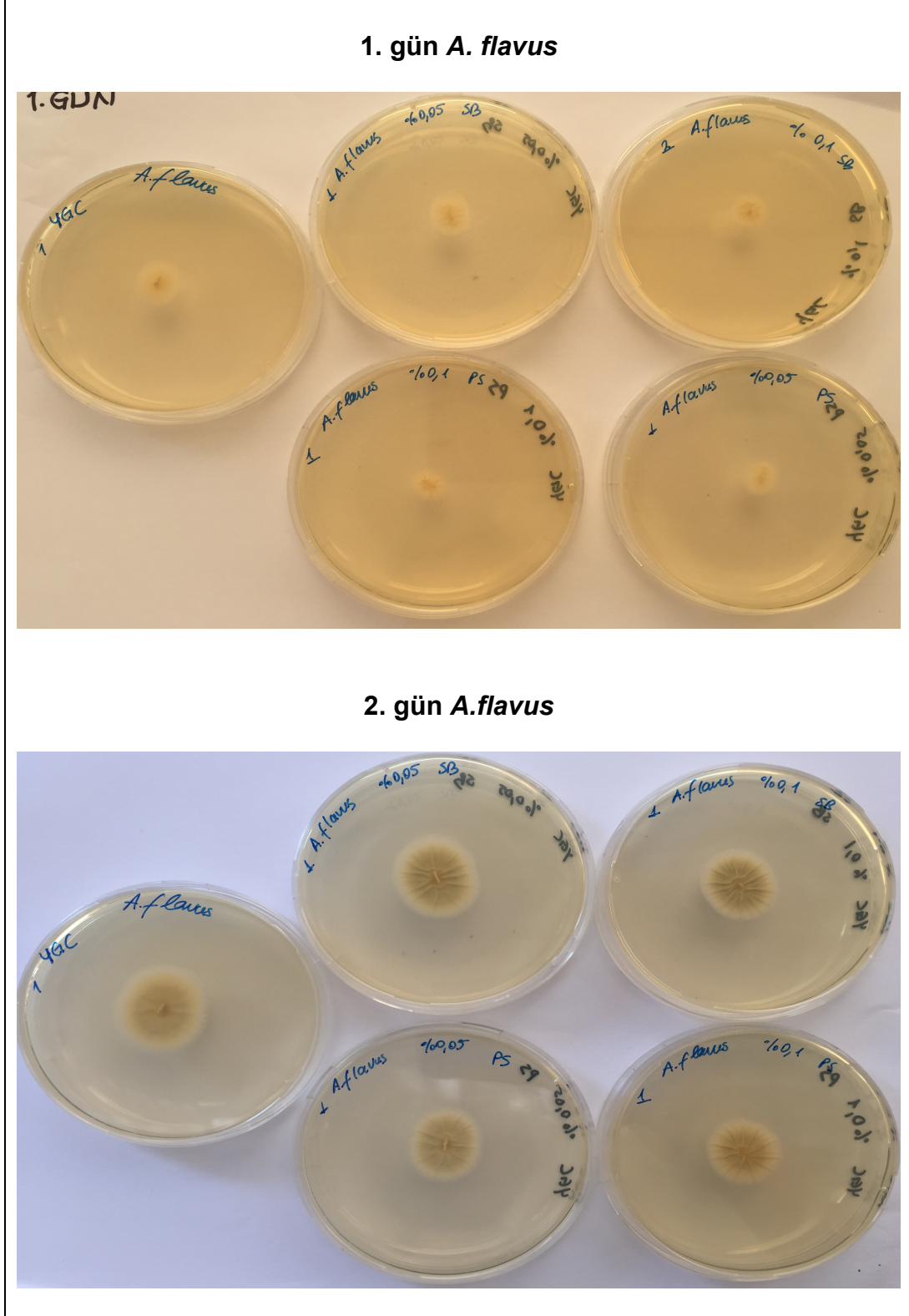
- (1) Meyve, sebze ve hububat için Türk Gıda Kodeksi – Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliğinde yer alan sınıflandırma esas alınır. Buna göre; karabuğday (*Fagopyrum spp.*) hububat ve karabuğdaydan elde edilen ürünler ise hububat ürünleri kapsamında değerlendirilir. Meyveler için belirlenen maksimum limitler sert kabuklu meyveleri kapsamaz.
- (2) Maksimum limit, işlenmek üzere tarladan fabrikaya doğrudan nakledilen taze ıspanak için uygulanmaz.
- (3) Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.

- (4) Maksimum limit; üretici tarafından beyan edilen kullanım talimatına göre hazırlanan veya doğrudan tüketime hazır olarak piyasaya arz edilen ürünler için geçerlidir.
- (5) GTİP 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207 kapsamındaki yağlı tohumları ve GTİP 1208'den üretilen ürünler; GTİP 1207 99 kavun tohumu hariç
- (6) Maksimum limit; yerfıstığı ve sert kabuklu meyvelerin yenilebilir kısımlarına uygulanır. Yerfıstığı ve sert kabuklu meyveler kabuklarıyla analiz edilirse Brezilya fıncığı hariç, aflatoksin miktarı hesaplanırken tüm bulaşanın yenilebilir kısım üzerinden olduğu kabul edilir.
- (7) İşlenmiş ürünlerin tamamı veya hemen hemen tamamı bahse konu sert kabuklu meyvelerden üretiliyorsa bu sert kabuklu meyveler için belirlenen maksimum limit; işlenmiş ürünü için de kullanılır. Aksi halde 6 ıncı maddenin birinci, ikinci ve üçüncü fıkraları uygulanır.
- (8) Hayvansal Gıdalar için Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliğinde tanımlanan ürünleri kapsar.
- (9) Maksimum limit; kuru madde üzerinden geçerlidir. Kuru madde, mikotoksin limitlerinin resmi kontrolü için gıdalardan numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri ilgili mevzuatında belirtilen şekilde hesaplanır.
- (10) Bebek formülleri ve devam formülleri ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.
- (11) Özel tıbbi amaçlı diyet gıdaları ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.
- (12) Maksimum limit; süt ve süt ürünleri için üretici tarafından beyan edilen kullanım talimatına göre hazırlanan veya doğrudan tüketime hazır olarak piyasaya arz edilen ürünlere uygulanırken süt ve süt ürünleri dışındaki ürünler için ise kuru madde üzerinden geçerlidir. Kuru madde, mikotoksin limitlerinin resmi kontrolü için gıdalardan numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri ilgili mevzuatında belirtilen şekilde hesaplanır.
- (13) Maksimum limit; 2005 yılı ve sonrasında hasat edilerek üretilen ürünlere uygulanır.
- (14) Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar. Maksimum OTA limiti; son üründeki şarap ve/veya şıra oranı hesaplanarak uygulanır.
- (15) Meyve suyu ve benzeri ürünler mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.
- (16) Maksimum limit; 3-4 kg meyan kökünden üretilen 1 kg saf ve seyreltilmemiş ekstraktlara uygulanır.
- (17) Distile alkollü içkiler ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.
- (18) Bebek formülleri, devam formülleri ve bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ilgili mevzuatında tanımlanan bebek ve küçük çocukları kapsar.
- (19) Maksimum limit; tahıl ve tahıl ürünleri kapsamında değerlendirilmediğinden 2.4 ve 2.5 kapsamına girecek olan pirinç ve pirinç ürünlerine uygulanmaz.
- (20) Maksimum limit; birincil işleme tabi tutulacak olan işlem görmemiş tahıllara uygulanır. Birincil işlem; tahıl tanesinin kurutulması haricindeki herhangi bir fiziksel veya ısıl işlemi ifade eder. Temizleme, ayıklama ve kurutma birincil işlem olarak değerlendirilmez. Uygulanan temizleme veya ayıklama sonrasında tahıl tanesinin aslını bozacak fiziksel işlemler uygulanmaz.
- (21) İstisnalar sadece kullanım amacı etiketinde ve/veya ürün ile birlikte hareket eden orijinal doküman üzerinde açıkça belirtilen mısırlar için kullanılır. Örneğin; etiketinde veya herhangi bir belgesinde, "nişasta üretimi için" gibi kullanım amacı belirtilenler vb.

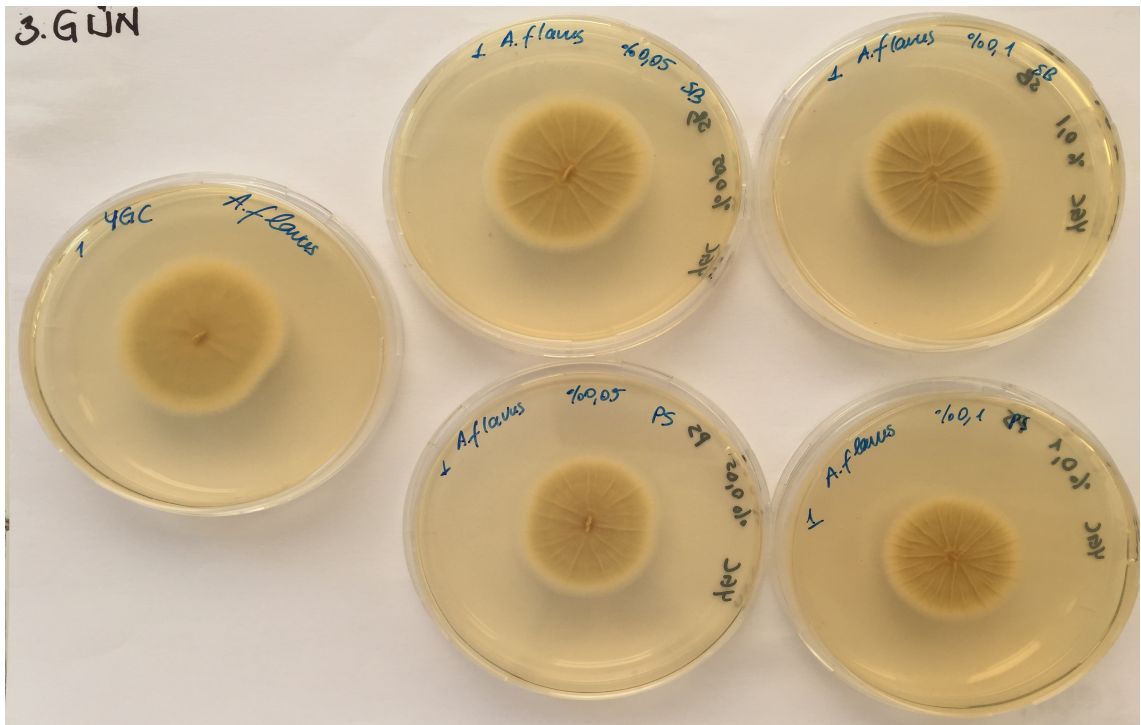


## EK 2. FOTOĞRAFLAR

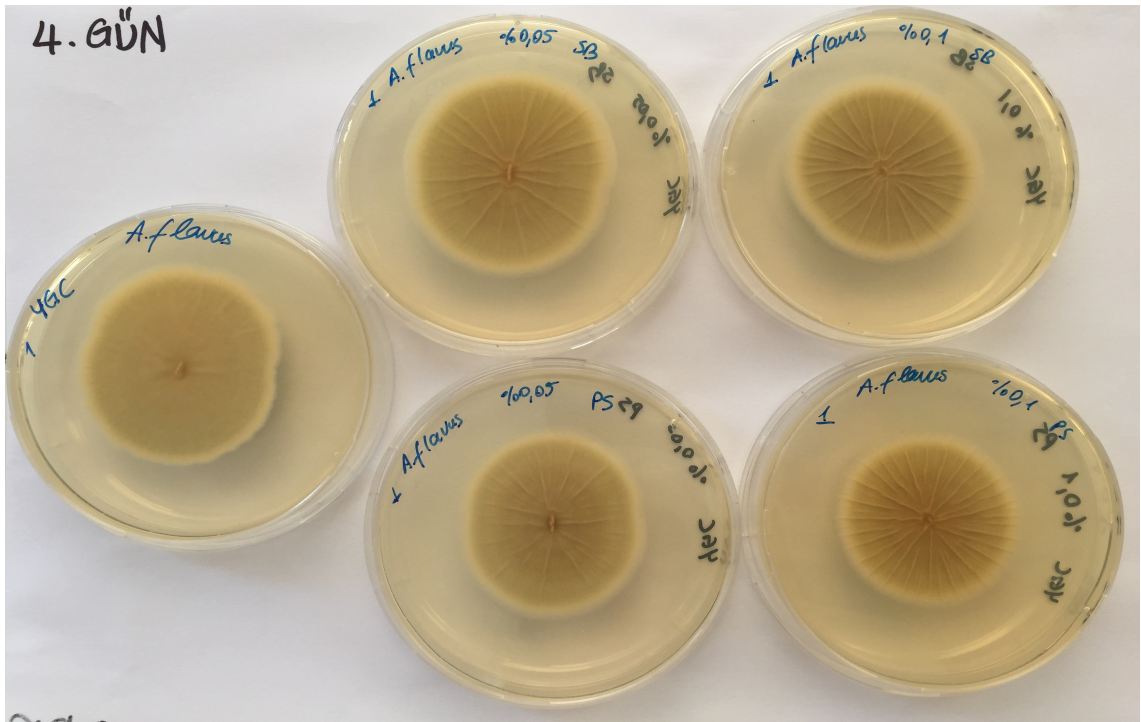
EK 2.1. %0.05-0.1 Konsantrasyonlarında Sodyum Benzoat (SB) ve Potasyum Sorbat (PS) ile Modifiye Edilen YGC Agar Besiyerlerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* Türlerinin 25-28°C'de Koloni Gelişimleri



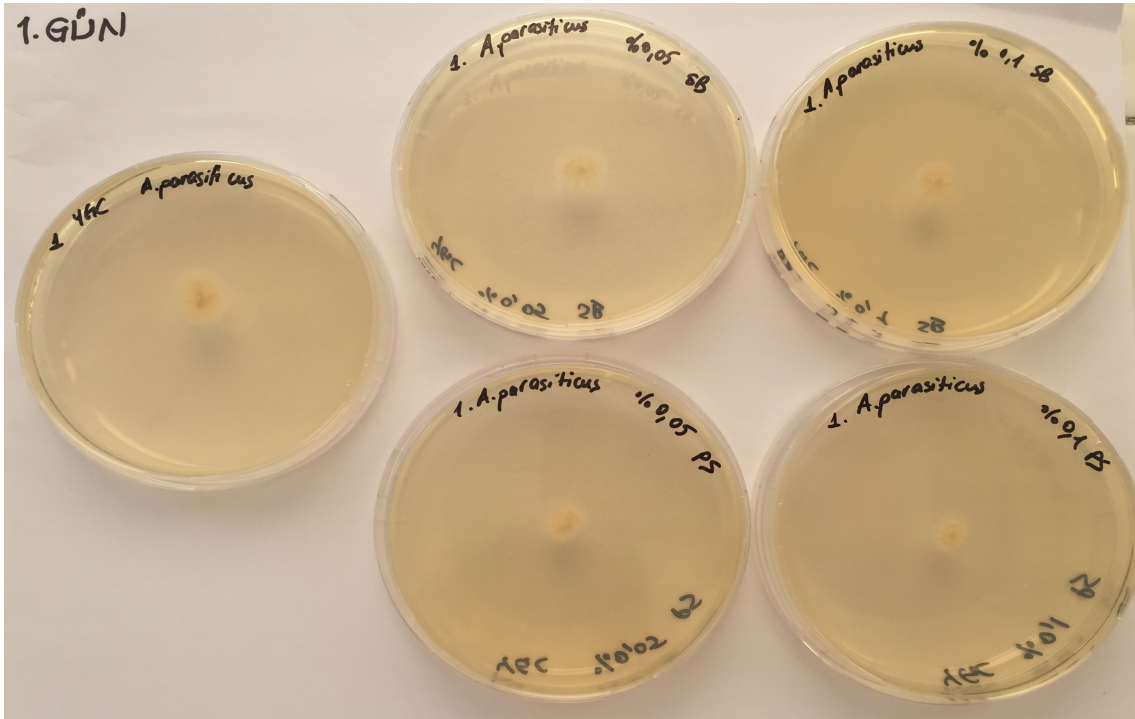
### 3. gün *A. flavus*



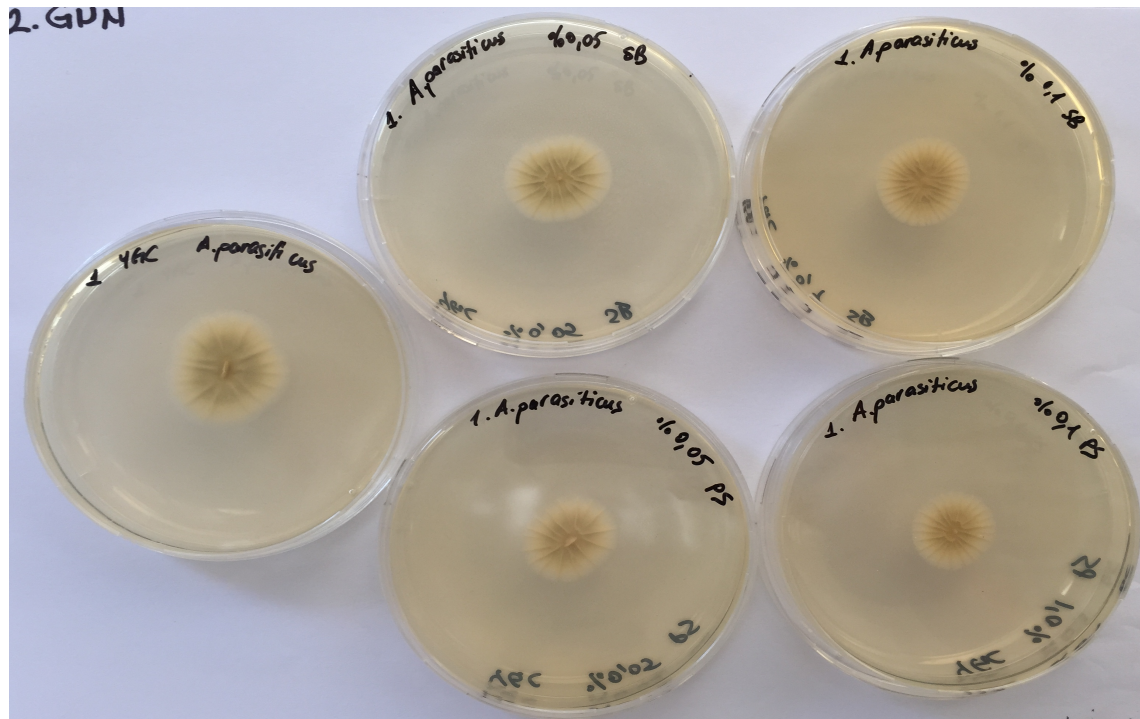
### 4. gün *A. flavus*



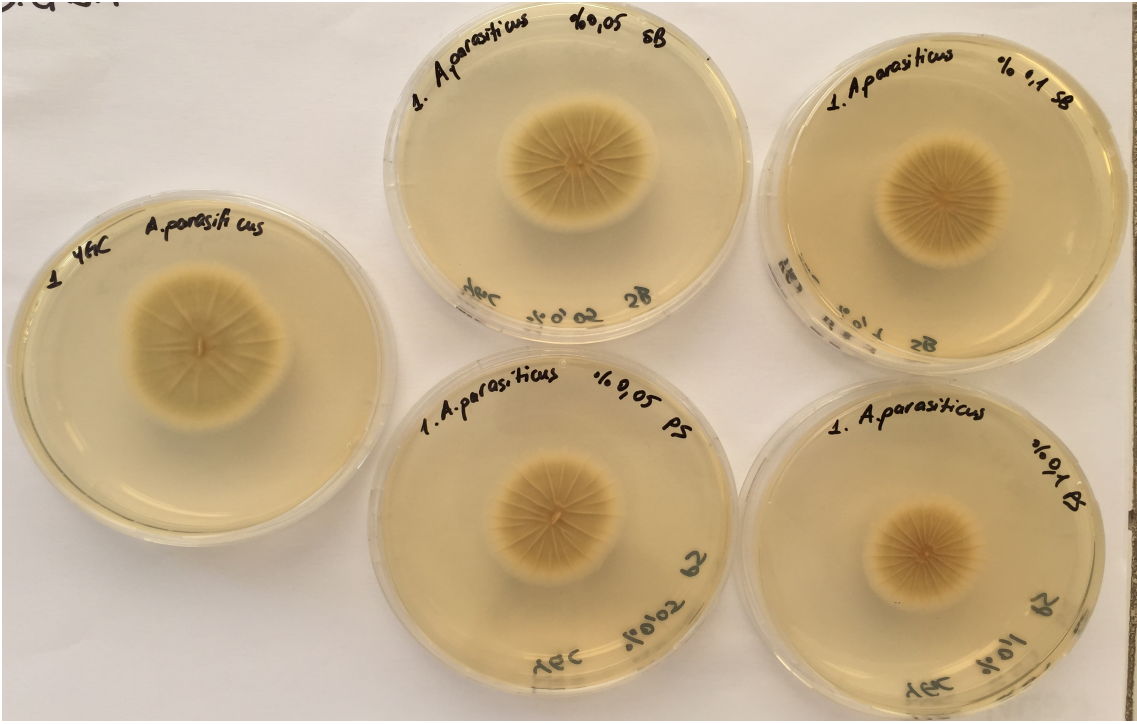
## 1. gün *A. parasiticus*



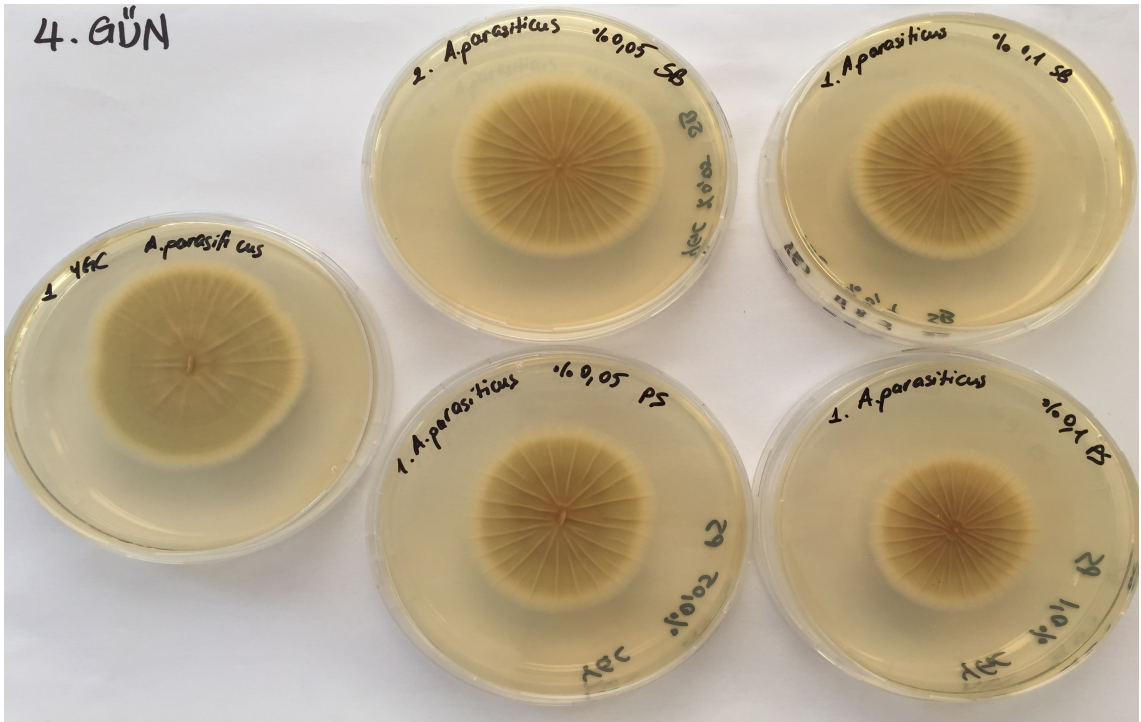
## 2. gün *A. parasiticus*



### 3. gün *A. parasiticus*

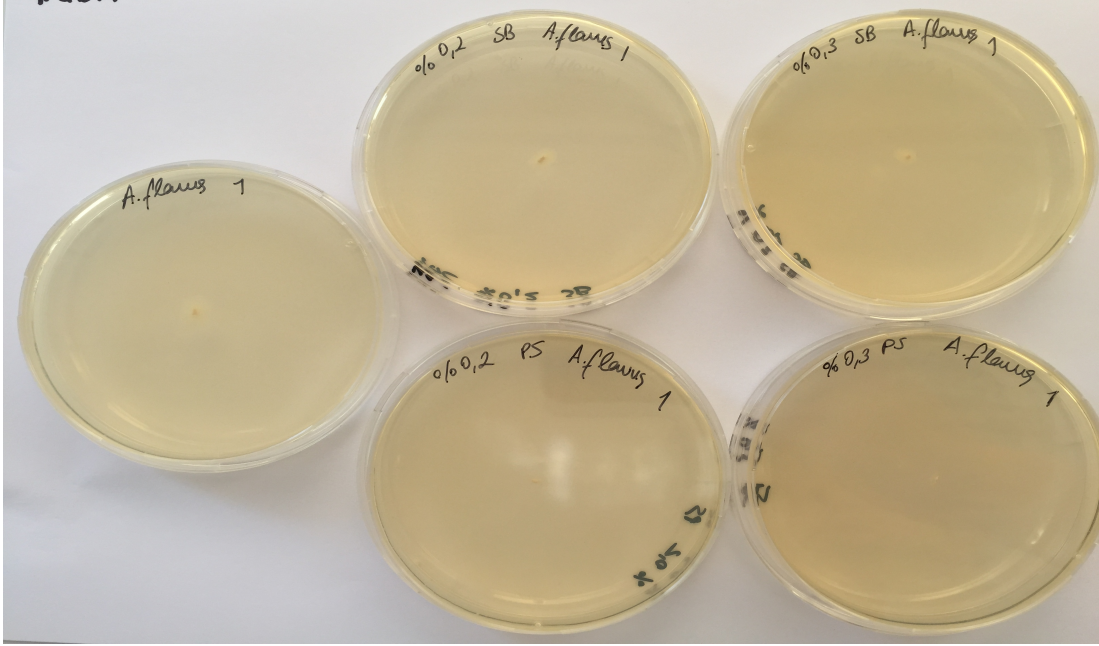


### 4. gün *A. parasiticus*

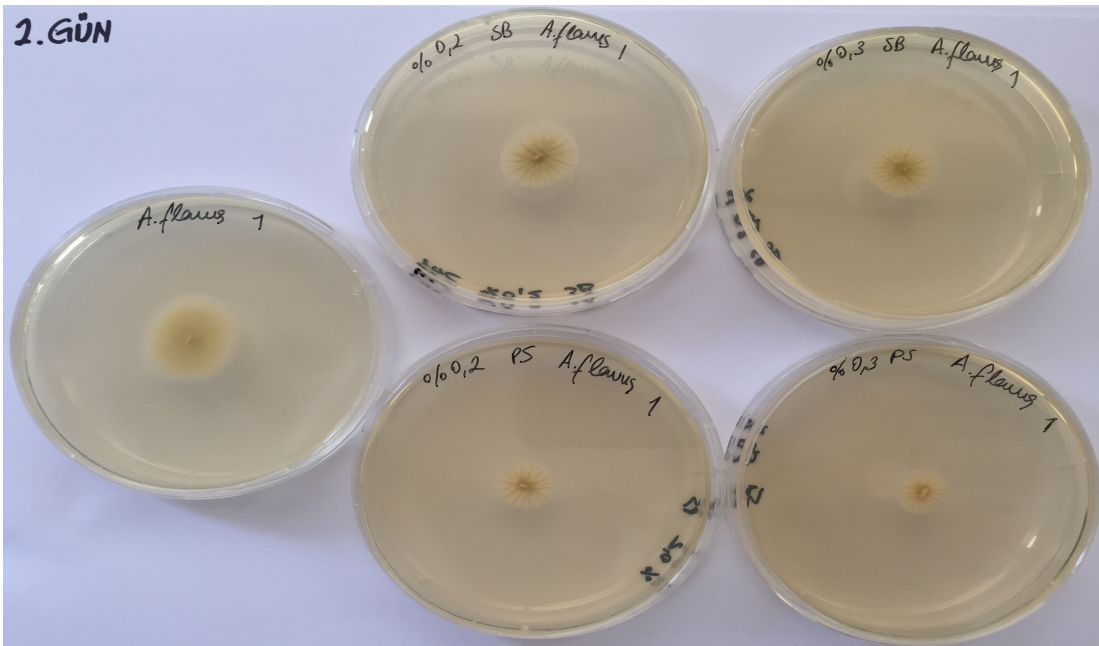


**EK 2.2. %0.2-0.3 Konsantrasyonlarında Sodyum Benzoat (SB) ve Potasyum Sorbat (PS) ile Modifiye Edilen YGC Agar Besiyerlerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* Türlerinin 25-28°C'de Koloni Gelişimleri**

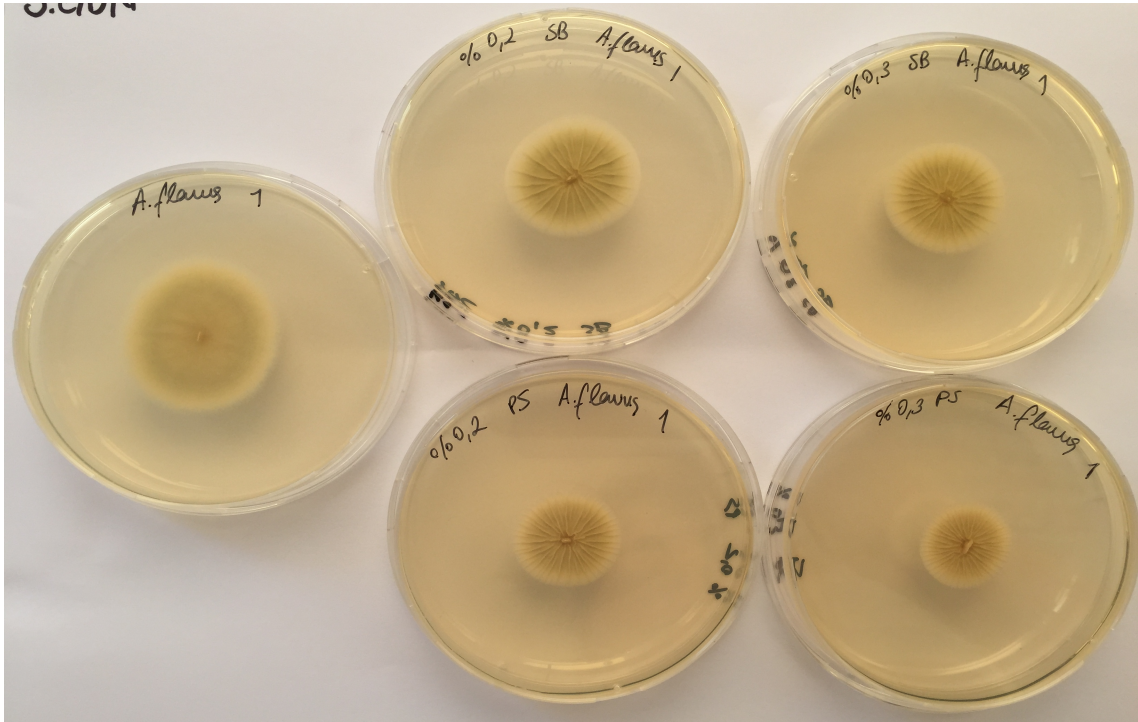
**1. gün *A. flavus***



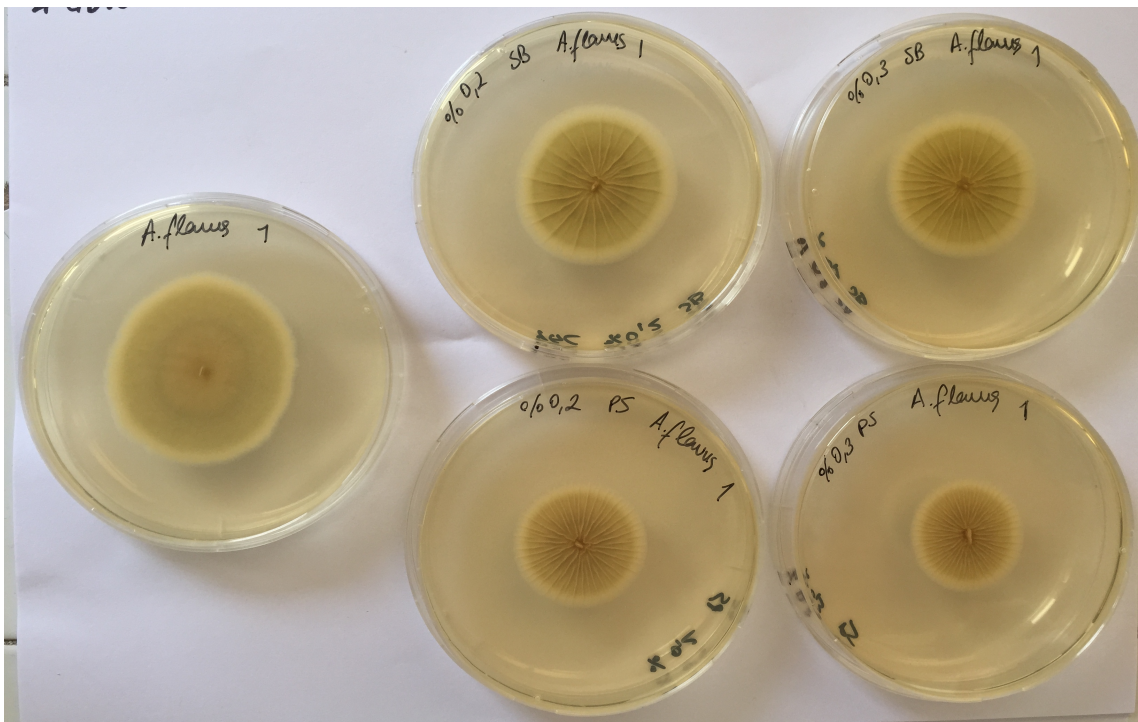
**2. gün *A. flavus***



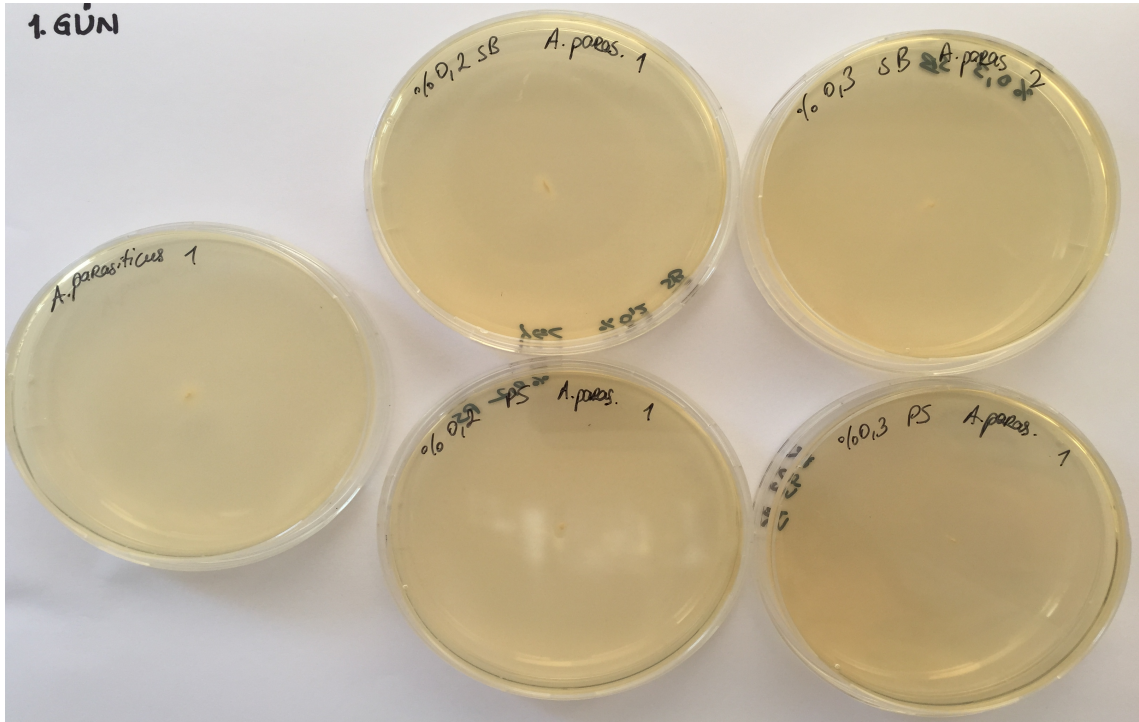
**3. gün *A. flavus***



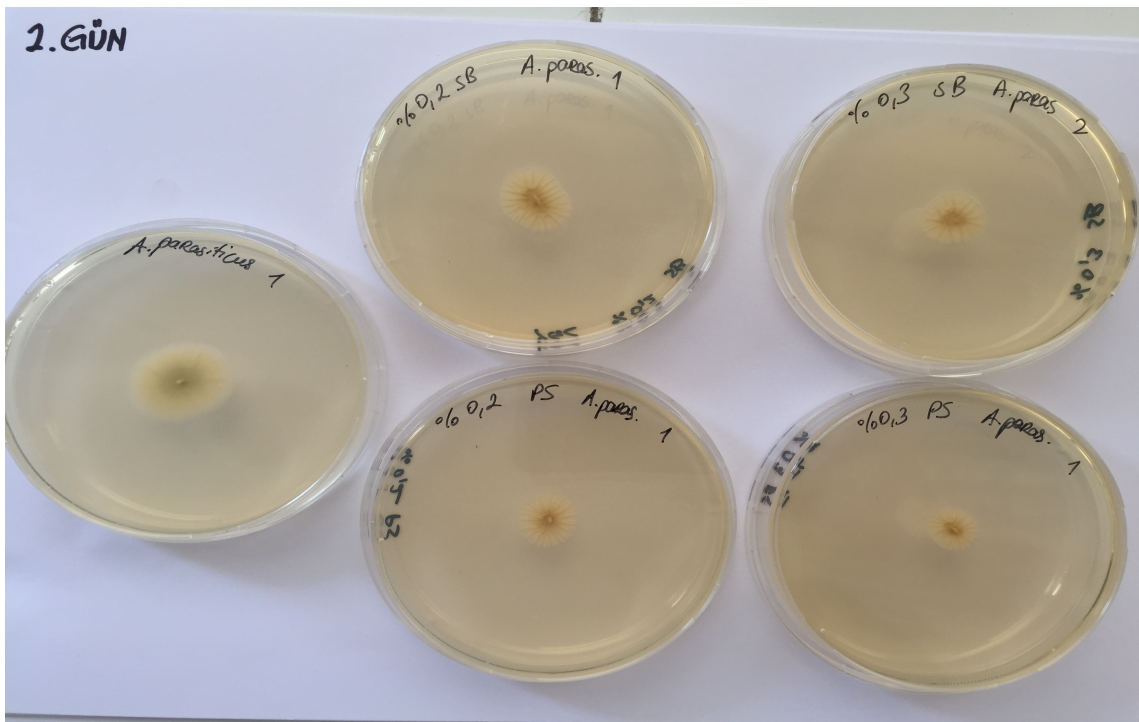
**4. gün *A. flavus***



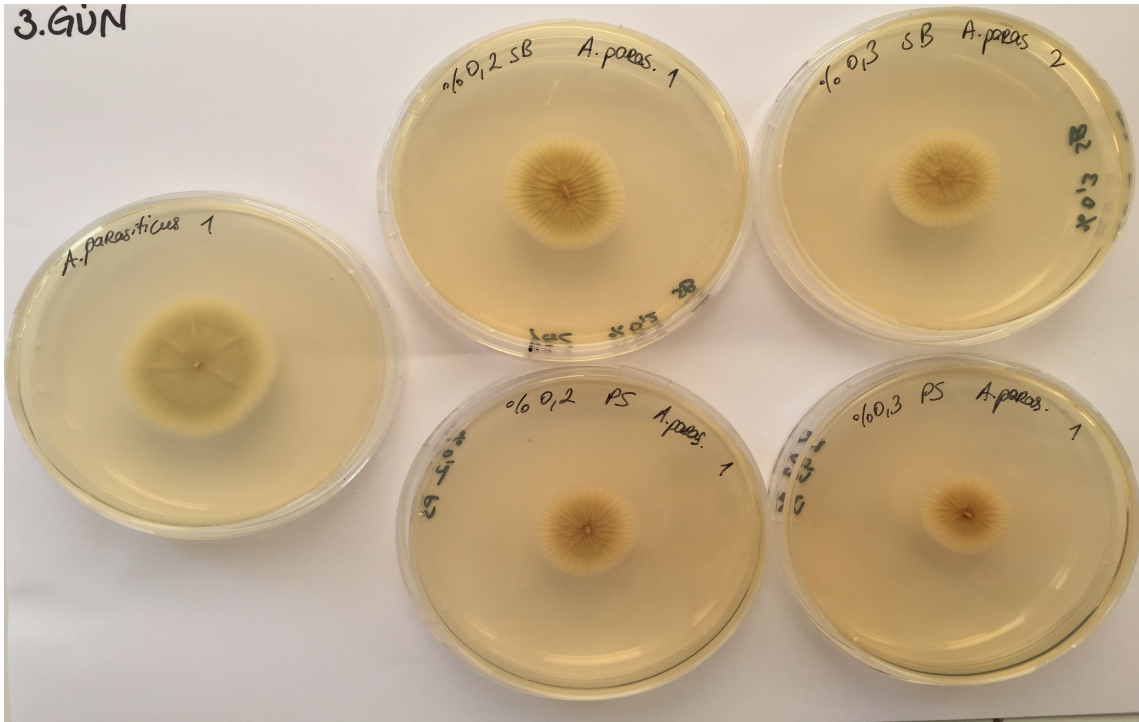
## 1. gün *A. parasiticus*



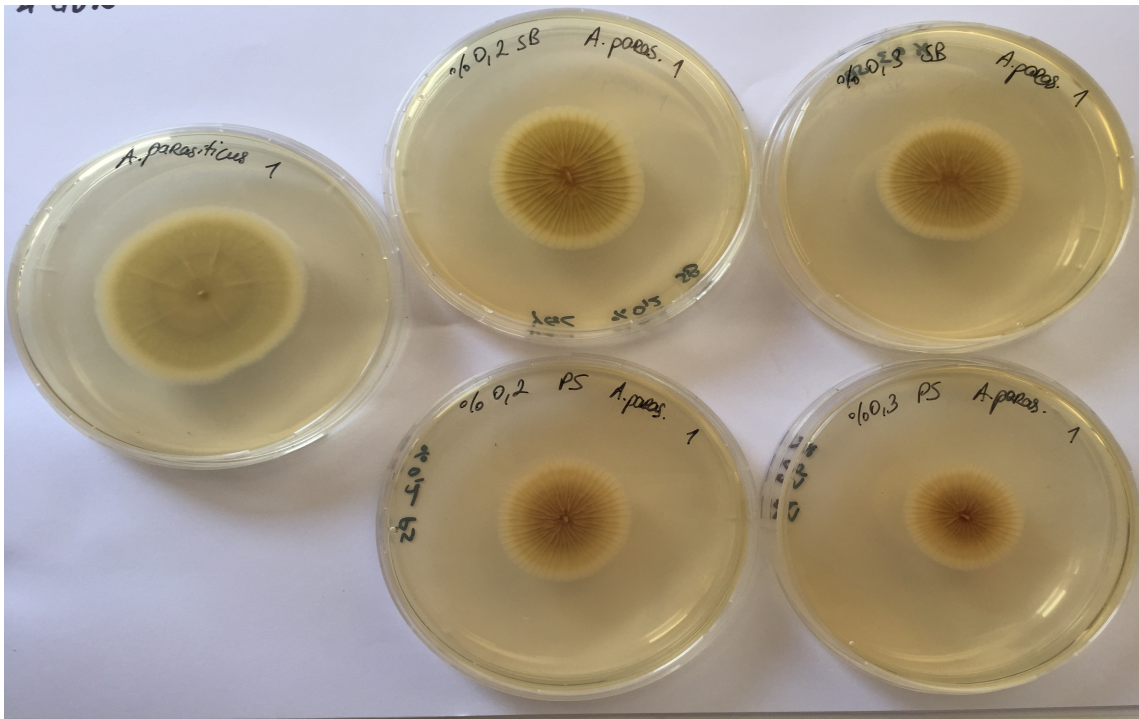
## 2. gün *A. parasiticus*



### 3. gün *A. parasiticus*



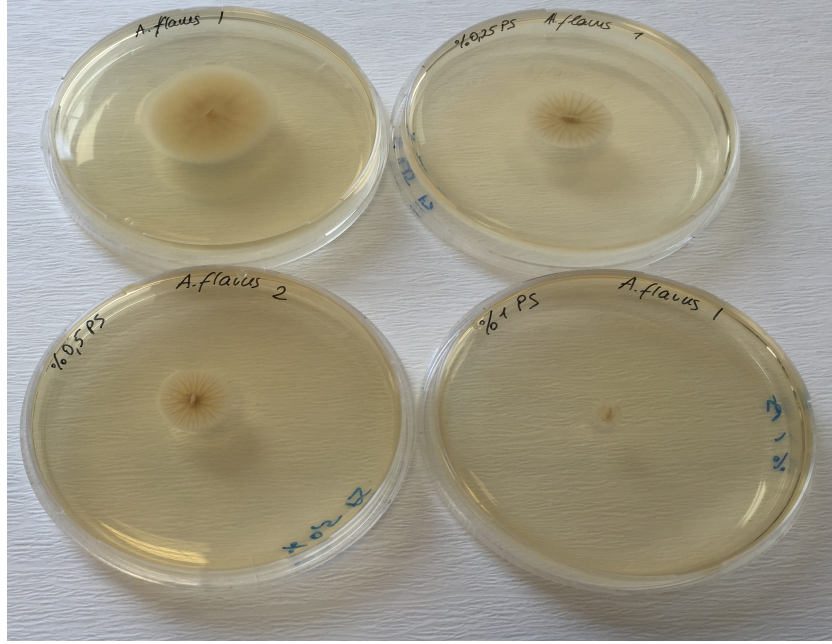
### 4. gün *A. parasiticus*



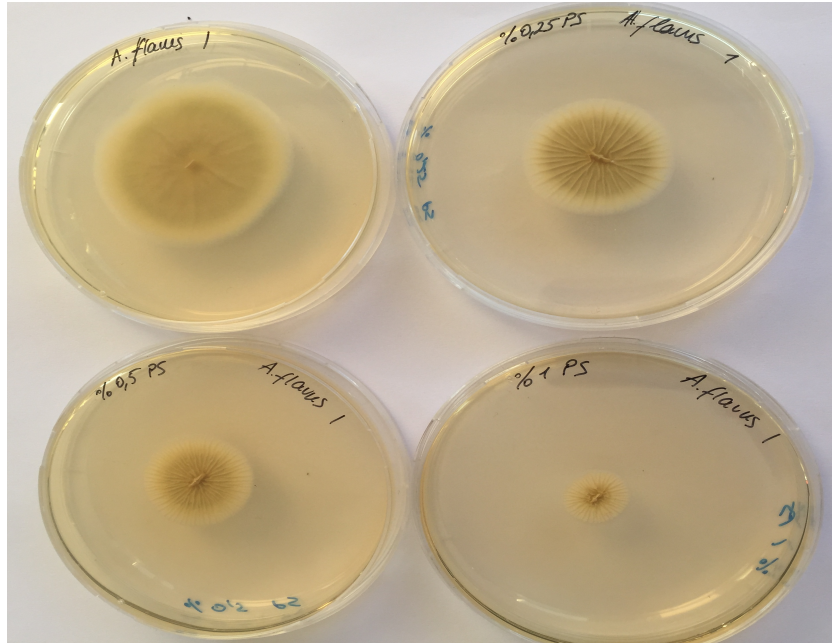


**EK 2.3. %0.25-1.00 Konsantrasyonlarında Potasyum Sorbat (PS) ile Modifiye Edilen YGC Agar Besiyerlerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* Türlerinin 25-28°C'de Koloni Gelişimleri**

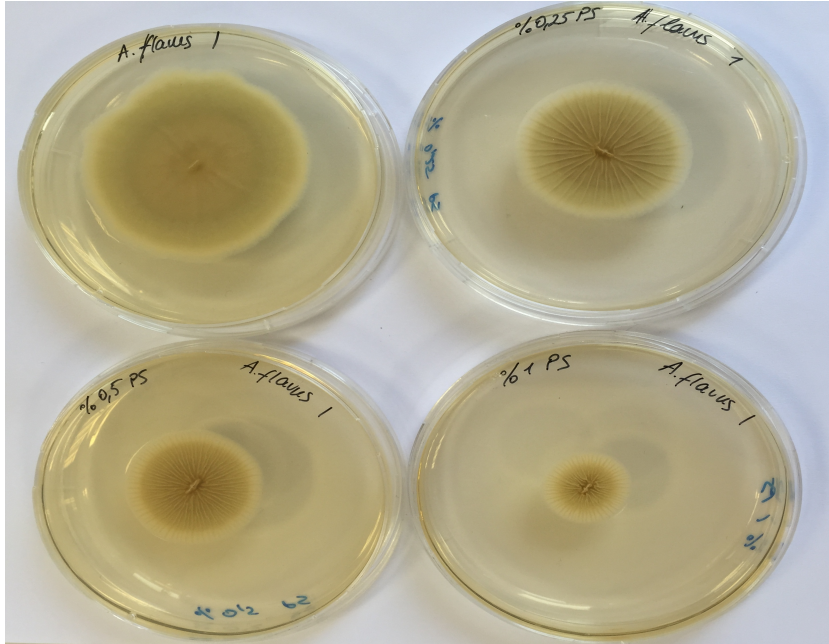
**3. gün *A. flavus***



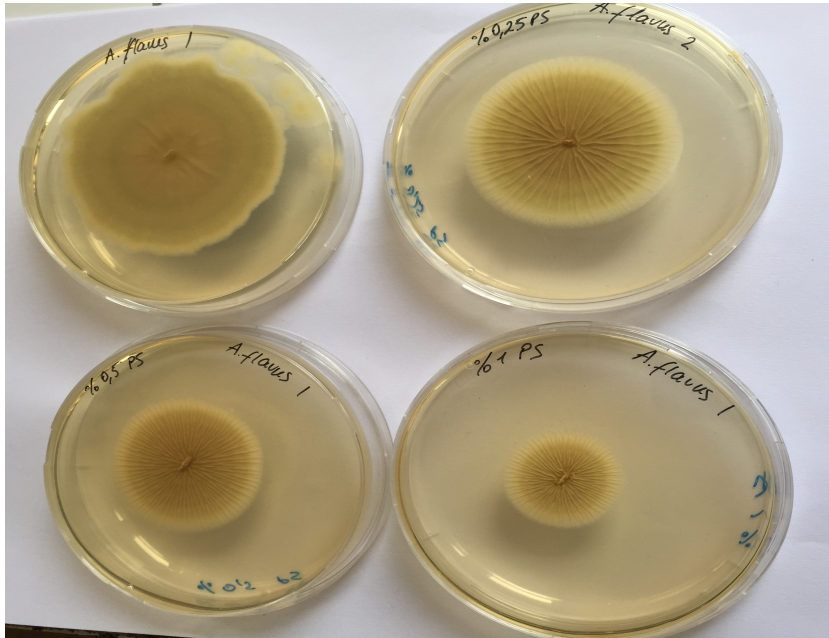
**4. gün *A. flavus***



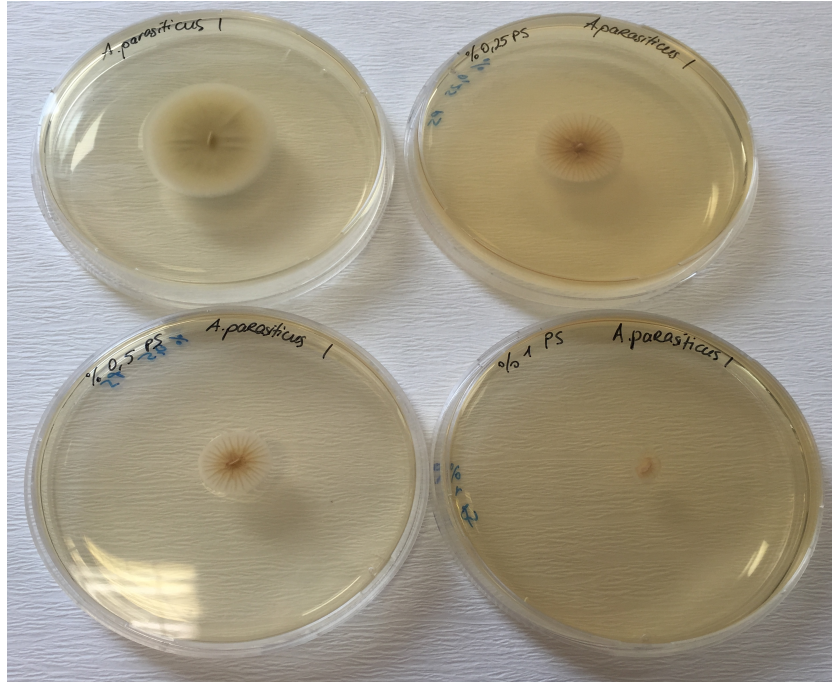
**5. gün *A. flavus***



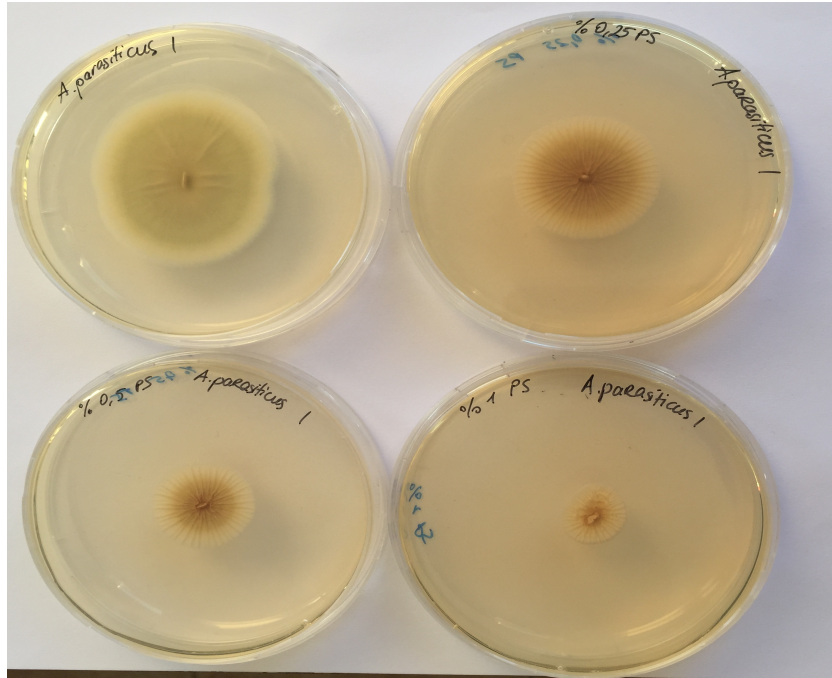
**6. gün *A. flavus***



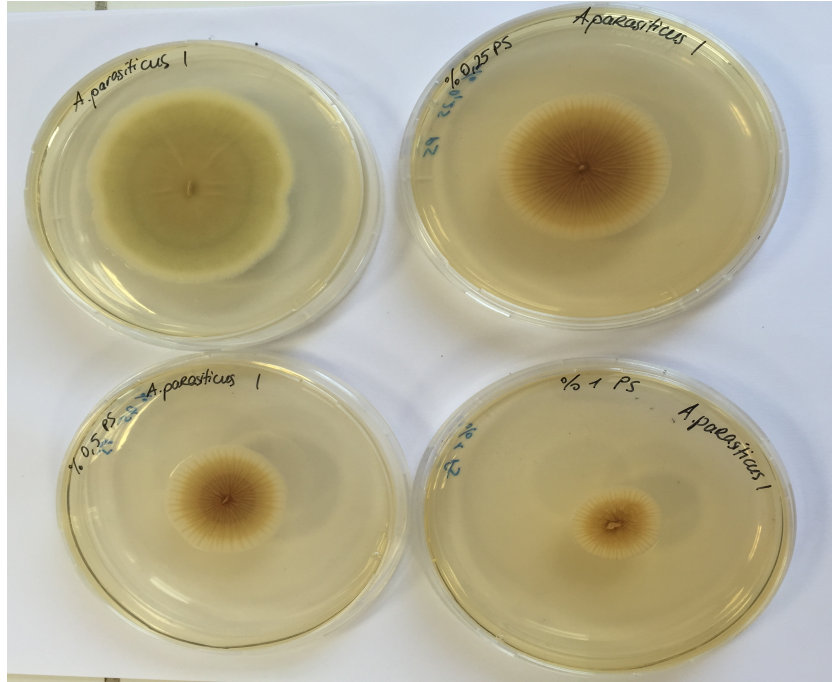
### 3. gün *A. parasiticus*



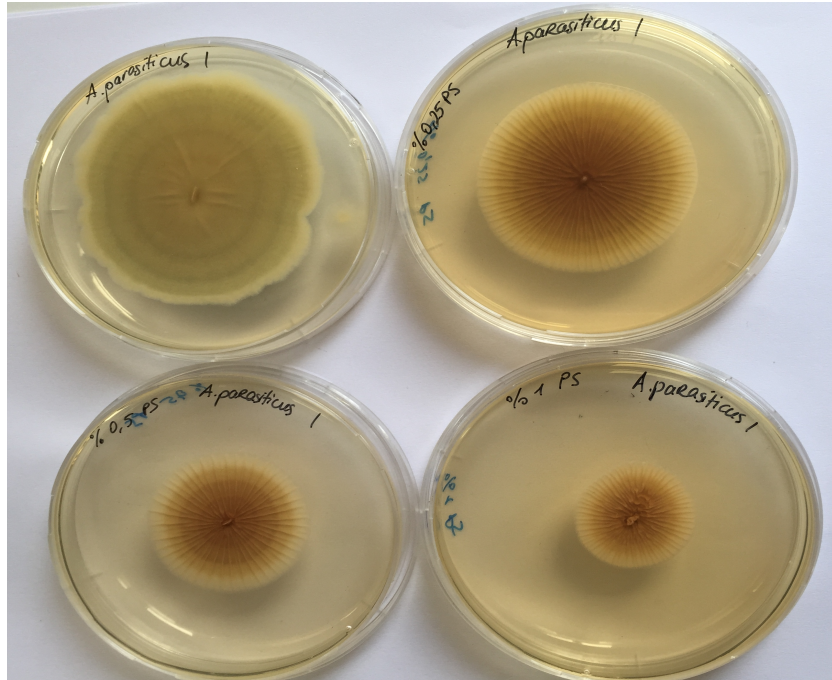
### 4. gün *A. parasiticus*



**5. gün *A. parasiticus***



**6. gün *A. parasiticus***



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Beyhan GÜNAYDIN DAŞAN

Doğum Yeri : Konya, Türkiye

Medeni Hali : Evli

E-posta : [beyhang@hacettepe.edu.tr](mailto:beyhang@hacettepe.edu.tr)

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü  
06800, Beytepe, Ankara, Türkiye

### Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2003-2007)  
Universita D'egli Studi FEDERICO II Napoli- ITALY,  
Faculty of Agriculture (*Socrates/Erasmus Programı*)  
(09.2006-02.2007)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2007-2009)

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2009-2016)

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (Akıcı); İtalyanca (Başlangıç)

### İş Deneyimi

Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2008-devam)

### Deneyim Alanları

Gıda Mühendisliği, Plazma Teknolojisi, Gıda Güvenliği

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

TÜBİTAK “Gıda Dekontaminasyonuna Yönelik Düşük Sıcaklık-Atmosferik Basınç Akışkan Yatak Plazma Reaktörü Tasarımı” 2013-2014 (Proje Numarası: 113O779-30.000 TL)

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

[1] Dasan, B.G., Mutlu, M., Boyaci, I.H., Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor, *International Journal of Food Microbiology*, 216, 50–59, 2016.

## **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

### **Sözlü Sunumlar:**

**[1]** Dasan, B.G., Mutlu, M., Boyaci, I.H., “A New Approach for Food Decontamination: Atmospheric Plasma Processing”, PITTCON Conference & EXPO, March 8-12, 2015, New Orleans, LA, USA.

**[2]** Dasan, B.G., Mutlu, M., “Design of Atmospheric Pressure-Fluidized Bed Plasma Reactor for Food Decontamination, Novel Approaches in Non-Thermal Processing of Materials”, FP7-KORANET Summer School, 23-27 June 2014, Ankara, Turkey.