

**ATMOSFERİK BASINÇ PLAZMA UYGULAMASININ
GIDALARIN DEKONTAMİNASYONU VE
DETOKSİFİKASYONU AMACIYLA KULLANIMI**

**UTILIZATION OF ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA
FOR DECONTAMINATION AND DETOXIFICATION OF
FOODS**

YASİN ŞEN

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

YASİN ŞEN' in hazırladığı “**Atmosferik Basınç Plazma Uygulamasının Gıdaların Dekontaminasyonu Ve Detoksifikasyonu Amacıyla Kullanımı**” 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. Mehmet Ali ONUR

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

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 değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.. / .. / 2015

YASİN ŞEN

ÖZET

ATMOSFERİK BASINÇ PLAZMA UYGULAMASININ GIDALARIN DEKONTAMİNASYONU VE DETOKSİFİKASYONU AMACIYLA KULLANIMI

Yasin ŞEN

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

İkinci Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr.Baran ÖNAL ULUSOY

Mart 2015, 223 sayfa

Bu çalışma, ısı olmayan atmosferik ve düşük basınç plazmalarının model gıdalar (fındık, pul biber) üzerine inoküle edilen fungal sporların indirgenmesinde kullanılarak mevcut dekontaminasyon ve detoksifikasyon metotlarına etkin alternatif bir yöntem olup olmadığının belirlenmesini amaçlamaktadır. Her iki plazma sistemi *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* inaktivasyonu için test edilmiştir. Farklı plazma parametreleri ve farklı gaz türü kullanılarak düşük basınç (boşalım gücü: 0–100 W, uygulama zamanı: 0–30 dk, uygulama gazları: azot, oksijen, hava) ve atmosferik basınç (frekans: 16-20-25 kHz, referans voltaj: % 40-100, plazma jet hızı: 50-100 m/dk, gaz akış hızı: 3000-5000 L/saat, tarama aralığı: 3-5 mm, döngü zamanı: 5, uygulama gazları: azot, hava) plazmaları için test edilmiştir.

Her bir plazma uygulamasından sonra kalan sporlar sayılmış ve optimum plazma parametreleri belirlenmiştir. Buna göre düşük basınç plazma sisteminde spor dekontaminasyonunun sağlandığı en optimum parametre olarak 100 W-30 dk hava plazması; atmosferik plazmada ise frekans: 25 kHz; referans voltaj: 100, plazma jet hızı: 60 m/dk, gaz akış hızı: 3000L/s, tarama aralığı: 3 mm, döngü zamanı: 5, uygulama gazı: hava olarak belirlenmiştir. Daha sonra, ısı olmayan plazma uygulamalarının model gıdaların yani fındık ve pul biberin temel gıda bileşenleri ile biyoaktif bileşikleri üzerine olan etkisini belirlemek için fizikokimyasal ve aflatoksin

analizleri ile sitotoksisite deneyleri yapılmıştır. Sonuçlar, 10 kGy gamma ile ışınlanması yapılmış örneklerle kıyaslanmıştır.

Plazma ve ışınlama uygulaması sonrasında gıda örneklerinde nem, su aktivitesi (a_w) ve renk tayini ile serbest yağ asitliği (SA), peroksit sayısı (PD), tokoferol miktarı, toplam polifenol tayini (TPC) ve aflatoksin bileşenlerindeki değişim belirlenmiştir.

Farklı aflatoksin konsantrasyonlarının (1-1000 ppb) L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksisiteleri 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) testleriyle incelenmiştir. Sitotoksisite testlerinin sonuçları aflatoksinlerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmesi ile doğrulanmıştır. Plazmanın dekontaminasyon etkinliği, plazma uygulanmış sporların dış yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile görüntülenmesiyle desteklenmiştir.

Oksijen yada azot gazı yerine hava kullanıldığında spor inaktivasyonunda artış sağlanmıştır. Her iki plazma uygulaması sonucu sporların sayısında yaklaşık 4-5 log indirgenme sağlanmıştır. SEM görüntülerine göre plazma uygulamalarından sonra her bir küfün spor hücre duvarının parçalandığı ve stoplazmik yapıların dışarıya çıktığı gözlenmiştir.

Fiziksel ve kimyasal analizlere göre nem ile a_w değeri en düşük olan örnekler düşük basınç plazması uygulanan fındık ve pul biber örnekleri olurken, HunterLab ve ΔE parametreleri bakımından üç uygulama arasında belirgin fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Her iki örnekte de plazma ve radyasyon uygulamasından en fazla etkilenen kimyasal parametreler SA, PD, TPC ve tokoferol olmuştur.

Özellikle ışınlama, düşük basınç plazma ve nispeten atmosferik basınç plazma uygulaması aflatoksin degradasyonunu belirli bir düzeye kadar başarıyla sağlamaktadır. Aflatoksin parçalanma ürünlerinin sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar, aflatoksin B1 (AFB1) ve toplam aflatoksinin (TopAF) plazma uygulamasıyla parçalanarak daha az toksisiteye sahip maddelere dönüştüğünü göstermektedir.

Bu çalışmada her iki plazma tipinin model gıdaların dekontaminasyonu/detoksifikasyonu için uygun ve etkili olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, atmosferik basınç plazma sistemi model gıdaların fizikokimyasal özelliklerinde ışınlamaya yakın düzeyde değişime neden olduğu için düşük basınçlı plazma sistemine göre gama ışınlamasına alternatif olabilecek bir sistemdir. Atmosferik plazma sistemi diğer iki sisteme göre açık bir sistem olmasının yanında, bu iki sistemden farklı olarak sürekli akışa sahip gıda işleme sistemlerine kolay adapte edilebilir ve kısa uygulama süresine sahip olması ile öne çıkmaktadır.

Anahtar kelimeler: ısı olmayan dekontaminasyon, düşük-basınç plazması, atmosferik-basınç plazması, aflatoksin detoksifikasyonu, aflatoksin degradasyon ürünlerinin sitotoksisitesi, MTT testi

ABSTRACT

UTILIZATION OF ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA FOR DECONTAMINATION AND DETOXIFICATION OF FOODS

Yasin ŞEN

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Co-Supervisor: Assistant Prof. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY

March 2015, 223 pages

This study focuses on the utilization of plasma technique for the reduction of fungal spores, inoculated on model foods (hazelnut, flaked red pepper), to determine whether non-thermal atmospheric and low-pressure plasmas could provide an effective alternative method to current decontamination and detoxification methods. Both plasma systems were tested for the inactivation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Different plasma parameters and different gas types were tested for low-pressure plasma (discharge power 0–100 W, exposure time 0–30 min, application gases: nitrogen, oxygen, air) and atmospheric pressure plasma (plasma frequency: 16-20-25 kHz, reference voltage: 40-100, plasma jet velocity: 50-100 m/min, gas flow rate: 3000-5000 L/h, raster offset: 3-5 mm, cycle time: 5, application gases: nitrogen, air).

After each plasma treatment, remained spores were counted and optimum plasma parameters were determined. The optimum parameters for decontamination of spores were determined as air plasma 100 W-30 min (discharge power-time) for low pressure plasma and air plasma with frequency of 25 kHz, reference voltage at 100 W, plasma jet rate of 60 m/min, gas flow rate of 3000 L/h, scanning range at 3mm, recycle time of 5 min for atmospheric pressure plasma. After that, physicochemical and aflatoxin analysis, and toxicological experiments were carried out to determine the effects of non-thermal plasma treatment on basic components and bioactive compounds of model foods, i.e. hazelnut and red pepper. Results were also

compared with gamma irradiated test samples. After the plasma and irradiation treatments of both food samples, moisture, water activity (a_w) and color; free fatty acids (FFA), peroxide value (PV), total phenolic content (TPC), and aflatoxin analysis were performed.

Cytotoxicity of different concentrations of aflatoxins (1-1000 ppb) on L929 mouse fibroblast cells was investigated with MTT tests. Results of cytotoxicity tests were confirmed by HPLC results quantitatively. The effectiveness of plasma decontamination was also supported by SEM images to see how plasma can affect the outer surface of spores.

Improved spore inactivation was achieved when air was used instead of pure oxygen or nitrogen gases. Approximately 4-5 log reductions in spore numbers were achieved for both plasma applications. According to SEM images, fragmentation of spore cell wall and leakage of cytoplasmic matter were observed after plasma treatments of each fungi.

According to physical and chemical analysis, low pressure plasma treated hazelnut and red pepper samples had the lowest moisture and a_w content while no difference was found in HunterLab and ΔE parameters among three treatments ($p > 0,05$). FFA, PV, TPC and tocopherol in both food samples were most affected chemical parameters from plasma and irradiation treatments.

Especially irradiation, low pressure and relatively atmospheric pressure plasma treatment could achieve aflatoxin degradation to a certain extent. Studies, carried out for investigation of cytotoxic effects of aflatoxin degradation products, demonstrates that aflatoxin B1 (AFB1) and total aflatoxin (TopAF) convert into less toxic substances by degradation with plasma treatment.

In this study, both plasma systems were determined to be adequate and efficient for decontamination/detoxification of model foods. Since effects of atmospheric pressure plasma on physico-chemical properties of food were close to that of gamma radiation, atmospheric pressure plasma could be an alternative to gamma radiation compared to low-pressure plasma system. Besides, atmospheric pressure plasma is an open system contrary to gamma radiation and low-pressure plasma system, it can be easily attached to continuous food processing systems and it has shorter plasma application time than either low-pressure system or gamma radiation.

Keywords: Non-thermal decontamination, low-pressure plasma, atmospheric-pressure plasma, aflatoxin detoxification, cytotoxicity of aflatoxin degradation products, MTT test

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşumundan sonuçlanmasına kadar her aşamasında, ilgi, destek, yardım ve bilgisini esirgemeyen ve söz konusu çalışmanın gerçekleştirilmesini mümkün kılan değerli hocam sayın Prof.Dr. Mehmet Mutlu'ya,

Tez çalışması boyunca göstermiş olduğu hoşgörü ve sabır ile bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof.Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya

Bu çalışma süresince değerli katkılarını, ilgi, destek, yardım ve bilgisini esirgemeyen sayın Yrd.Doç.Dr. Baran Önal Ulusoy'a

Bu çalışmanın özellikle sitotoksiste kısımlarının gerçekleştirilmesini sağlayan, bu konudaki ilgi, destek, yardım ve bilgisini esirgemeyen sayın Prof.Dr. Mehmet Ali Onur'a ve sevgili arkadaşım Bil.Uzm. Esin Akbay'a.

Bu çalışmanın mikrobiyolojik analizleri hususunda karşılıklı bilgi paylaşımında bulunduğum ve her konuda ilgi, destek ve yardımını esirgemeyen Yük.Müh. Beyhan Günaydın Daşan'a,

Bu tez çalışmasını Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Tarım ve Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma (TOVAG) destek grubu 1110570 nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a,

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

Hafta sonları dahil, her anını benimle laboratuvarında çalışarak geçiren, tez çalışmamın tamamlanmasında büyük emeği geçen, öncelikle arkadaşım ve sırdaşım olan, değerli eşim Yük.Müh. Dilara Şen'e,

Doktoram süresince her zaman yanımda olan, desteklerini, yardımlarını ve sabırlarını esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER.....	xii
ÇİZELGELER.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Küfler Hakkında Genel Bilgi	9
2.1.1. Aspergillus	10
2.1.2. Tarım Ürünlerinde Küflerin Sebep Olduğu Başlıca Problemler.....	11
2.1.3. Küflerin Aflatoksin Üretme Nedenleri	12
2.2. Aflatoksinler, Toksisitesi, Metabolizması ve Limitleri.....	13
2.2.1. Aflatoksinlerin Organizma Üzerindeki Etkileri	20
2.2.1.1. Biyokimyasal Etkiler.....	20
2.2.1.2. Enerji Metabolizması Üzerindeki Etkileri.....	20
2.2.1.3. Karbonhidrat ve Lipit Metabolizması Üzerindeki Etkileri	20
2.2.1.4. Nükleik Asit Ve Protein Metabolizması Üzerindeki Etkileri.....	20
2.2.1.5. Biyolojik Etkileri.....	21
2.2.2. Aflatoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	22
2.2.3. Gıdaların Aflatoksinler İle Kontaminasyonu	23
2.2.4. Doğal ve Yapay Aflatoksin Kontaminasyonu	26
2.2.5. Aflatoksin Oluşumunun/Bulaşmasının Önlenmesi	27
2.2.6. Kontamine Olmuş Ürünlerin Ortamdan Uzaklaştırılması	30
2.2.6.1. Fiziksel Ayırma ve Temizleme	30
2.2.6.2. Sınıflandırma	30
2.2.6.3. Yoğunluklarına Göre Ayırma	30
2.2.6.4. Yıkama	31
2.2.6.5. Ögütme.....	31

2.2.6.6. Çözücü Ekstraksiyonu	31
2.2.6.7. Adsorbsiyon.....	31
2.2.7. Detoksifikasyon Stratejileri.....	32
2.2.7.1. Fiziksel Metotlar.....	32
2.2.7.1.1. Isı Uygulaması.....	32
2.2.7.1.2. İyonize Radyasyon	33
2.2.7.2. Kimyasal Metotlar	34
2.2.7.2.1. Asit Uygulaması	34
2.2.7.2.2. Baz Uygulaması	34
2.2.7.2.3. Okside Edici Ajan Uygulamaları	36
2.2.7.2.4. İndirgeyici Ajanlar	37
2.2.7.2.5. Klorlama Ajanları	37
2.2.7.2.6. Diğer Uygulamalar.....	37
2.2.7.3. Biyolojik Metotlar	38
2.2.8. Aflatoksinlerin Gastrointestinal Sistemde Absorblanmasının Engellenmesi .	40
2.2.9. Aflatoksin B1'in Vücuttaki Etki Mekanizması	40
2.3. Plazma, Yapısı ve Özellikleri.....	42
2.3.1. Plazmanın Sınıflandırılması	44
2.3.1.1. Düşük Basınç (Vakum) ve Atmosferik Basınç Plazmaları	46
2.3.2. Plazma Teknolojisinin Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması	50
2.3.3. Direk Kontak veya Dolaylı Akış Plazmalarıyla Sterilizasyonun Avantaj ve Kısıtlamaları	53
2.3.4. Gama Işınlaması Uygulamasının Gıda Bileşenleri Üzerine Etkisi.....	54
2.3.5. Plazma Parametreleri	56
2.3.6. Plazma İnaktivasyon Mekanizması.....	58
2.3.6.1. Plazma-Hücre Etkileşimleri.....	61
2.3.6.2. Plazma İyonlarının Rolü	62
2.3.6.3. İlk Hedef Olarak "Hücre Membranı"	62
2.3.6.4. Hücre İçi Biyokimyası	63
2.3.6.5. Plazma Türlerinin Hücrelerdeki Yapılara Seçiciliği	63
2.3.6.6. Uygulanan Dozun Etkisi	64
2.4. Plazmanın Gıda Uygulamalarında Kullanımı	65
2.5. Fındığın Ülkemiz İhracatındaki Önemi ve Besinsel Bileşimi	71
2.6. Kırmızı Biberin Ülkemiz İhracatındaki Önemi ve Besinsel Bileşimi	74

2.7. Antioksidan Etkili Gıda Bileşenleri: Fenolik Bileşikler	76
2.8. Aflatoksin ve Degradasyon Ürünlerinin Sitotoksik Özelliklerinin İncelenmesi ...	79
3. MATERYAL VE METOD	81
3.1. Materyal	82
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	82
3.2. Metot.....	83
3.2.1. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Fiziksel Analizler	83
3.2.1.1. Nem Tayini	83
3.2.1.2. Su Aktivitesi Tayini	85
3.2.1.3. Renk Analizi.....	85
3.2.1.3.1. Hunterlab Yöntemi Kullanılarak Gerçekleştirilen Renk Analizi.....	85
3.2.1.3.2. Ekstrakte Edilebilir Renk İndeksi (ASTA) Yöntemi İle Renk Analizi	86
3.2.2. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Kimyasal Analizler	87
3.2.2.1. Yağ Miktarı Tayini	87
3.2.2.2. Serbest Yağ Asitliği Tayini	87
3.2.2.3. Peroksit Sayısı Tayini	87
3.2.2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini.....	88
3.2.2.4.1. Fındık Örneklerinden Fenolik Madde Ekstraksiyon Yöntemleri	89
3.2.2.4.2. Pul Biber Örneklerinden Fenolik Madde Ekstraksiyon Yöntemleri.....	91
3.2.2.4.3. Örnek Ekstraktlarının ve Standart Çözeltilerin Toplam Fenolik Madde Miktarının Spektrofotometrik Tayini	92
3.2.2.5. Tokoferol Miktarının Belirlenmesi	93
3.2.2.6. Aflatoksin Tayini	94
3.2.3. Mikrobiyolojik Analizlerin Gerçekleştirilmesi	96
3.2.3.1. Düşük Basınç Plazma Uygulaması ile Gerçekleştirilen Ön Deneme Sonuçları	96
3.2.3.2. Test Örneklerinin Başlangıç Mikroorganizma Sayılarının Belirlenmesi.....	97
3.2.3.3. Ön-Dekontaminasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi.....	97
3.2.3.4. Gıda Örneklerinde Maksimum Küf Oluşumunun Sağlandığı Su Aktivitesi Değerinin Tespit Edilmesi.....	98
3.2.3.5. Örneklerin Belirlenen Denge Nem Değerine Getirilmesi.....	98
3.2.3.6. Spor Süspansiyonunun Elde Edilmesi ve Örneklerle İnokülasyonu	99
3.2.3.7. Küf İle Kontamine Edilmiş Olan Test Örneklerinde Doğal Aflatoksin Oluşum Limitlerinin Belirlenmesi.....	101

3.2.3.7.1. Fındık Örneklerinde Küf Suşlarının Meydana Getirdiği Aflatoksinlerin Ekstraksiyonu	102
3.2.3.7.2. Pul Biber Örneklerinde Küf Suşlarının Meydana Getirdiği Toksinlerin Ekstraksiyon Prosesi	102
3.2.3.8. Aflatoksin İle Kontamine Edilmiş Örneklerle Plazma Uygulanması	102
3.2.3.9. Plazma Uygulamasının Saf Aflatoksin Çözeltileri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	103
3.2.4. Plazma Dekontaminasyon İşlemi.....	104
3.2.4.1. Düşük Basınç Plazma Sistemi.....	104
3.2.4.2. Atmosferik Basınç Plazma Sistemi	106
3.2.4.3. Sıcaklık Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi.....	108
3.2.5. Işınlama İşlemi.....	108
3.2.6. Sitotoksisite Testi.....	108
3.2.6.1. MTT Testi	109
3.2.6.2. Floresan Mikroskobu Altında L929 Fare Fibroblast Hücrelerindeki Apoptozun Değerlendirilmesi.....	111
3.2.7. Plazma İşlemi Sonrası Aspergillus Küf Sporlarının Morfolojilerinde Meydana Gelen Değişimlerin SEM ile Belirlenmesi	111
3.2.7.1. Hücrelerin SEM Analizi Öncesi Fiksasyon Aşaması	112
3.2.7.2. Hücrelerin Dehidratasyon Aşaması	112
3.2.7.3. Kaplama Aşaması	112
3.2.8. İstatistiksel Yöntem.....	112
4. SONUÇ VE YORUM	114
4.1. Fındık Ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	114
4.1.1. Plazma İşlemi Öncesi Gerçekleştirilen Ön Dekontaminasyon İşlemi Sonuçları	114
4.1.2. Örneklerin Farklı Küf Sporları ve Farklı Yöntemler ile Kontamine Edilmesi	115
4.1.2.1. Yöntem I'e Göre Kontamine Edilen Örneklerin Spor Sayım Sonuçları	115
4.1.2.2. Yöntem II'ye Göre Kontamine Edilen Örneklerin Spor Sayım Sonuçları ..	116
4.1.3. Küf Suşlarının Dekontaminasyon İşlemi Öncesi Ortalama Spor Sayılarının Belirlenmesi.....	117
4.1.4. Plazma İşlemi Sonrası Ortamda Kalan Spor Sayısının Belirlenmesi	118

4.1.4.1. Düşük Basınç Plazma Sistemi ile Gerçekleştirilen Dekontaminasyon İşlemi Sonuçları	118
4.1.4.1.1. Fındık Örneklerinde Gerçekleştirilen Dekontaminasyon Denemeleri ...	118
4.1.4.1.2. Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Dekontaminasyon Denemeleri.....	120
4.1.4.2. Atmosferik Plazma Sistemi ile Gerçekleştirilen Dekontaminasyon Denemeleri	124
4.1.4.2.1. Plazma Parametrelerinin Optimizasyonu	124
4.1.4.2.1.1. Atmosferik Plazma Sisteminde Farklı Plazma Parametreleri Uygulamalarıyla Sıcaklıkta Meydana Gelen Değişimlerin İzlenmesi	127
4.1.4.2.1.2. Atmosferik Plazma Uygulaması Sonrası Mikrobiyal Yükteki Değişimin Belirlenmesi.....	128
4.1.5. Plazma İnaktivasyon Ajanları Dışında Plazma Sistem Özelliklerinden Kaynaklanan Mikroorganizma Kayıplarının Belirlenmesi.....	133
4.2. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Fiziksel Analiz Sonuçları ...	135
4.2.1. Nem Tayini Deney Sonuçları	135
4.2.2. Su Aktivitesi Deney Sonuçları.....	137
4.2.3. Renk analizi sonuçları.....	138
4.3. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Kimyasal Analiz Sonuçları	142
4.3.1. Yağ Miktarı Tayini Sonuçları	142
4.3.2. Serbest Yağ Asitliği Tayini Sonuçları	144
4.3.3. Peroksit Sayısı Analiz Sonuçları	145
4.3.4. Toplam Fenolik Madde Tayini.....	146
4.3.4.1. Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu İçin Kullanılacak Yöntemlerin Belirlenmesi	146
4.3.4.2. Yağ Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik Bileşenler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	147
4.3.5. Tokoferol miktarının belirlenmesi	149
4.4. Aflatoksin Deney Sonuçları	151
4.4.1. Yapay Olarak Kontamine Edilmiş Örneklerden Elde Edilen Aflatoksin Sonuçları	152
4.4.2. Saf Aflatoksin Çözeltilerinin Plazma ve Işınlama Sonrası Degradasyon Sonuçları	153
4.4.2.1. Düşük Basınç Plazma Uygulaması Sonrası Toksin Miktarlarındaki Değişim Sonuçları	154

4.4.2.2. Atmosferik Basınç Plazması Uygulaması Sonrası Toksin Miktarlarındaki Değişim Sonuçları	155
4.4.2.3. Işınlama uygulaması sonrası toksin miktarlarındaki değişim sonuçları.....	157
4.5. Sitotoksikolojik Deney Sonuçları	158
4.5.1. Farklı Aflatoksin Konsantrasyonlarına Tabi Tutulmuş Hücrelere Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri	158
4.5.2. Sitotoksisite Testi (MTT)	161
4.6. Plazma uygulamalarının spor morfolojileri üzerindeki etkileri.....	163
5. TARTIŞMA	166
KAYNAKLAR.....	169
EK-1	193
EK-2	194
EK-3	195
EK-4	196
EK-5	197
ÖZGEÇMİŞ	198

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2. 1 Aspergillus'un şematik görünüşü	10
Şekil 2. 2 Aflatoksinlerin kimyasal yapıları	14
Şekil 2. 3 AFB1-N ₇ -Gua kompleksi	21
Şekil 2. 4 Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara geçiş yolları	24
Şekil 2. 5 Hasat öncesi ve sonrasında gerçekleşen, toksin oluşumunun gerçekleştiği basamaklara ait diagram	25
Şekil 2. 6 AFB1'in tahmini degradasyon mekanizması	35
Şekil 2. 7 Ozon uygulamasının aflatoksinlerin furan halkasındaki 8,9 çift bağına bağlanmasının şematik gösterimi (a) AFB1 and (b) AFG1	36
Şekil 2. 8 (a) Rhizopus türleri tarafından biyolojik olarak indirgenmiş AFB1 ; (b) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> tarafından indirgenen AFB1'in hidroksi türevi	39
Şekil 2. 9 Aflatoksin B1'in vücuttaki metabolizması	41
Şekil 2. 10 Aktif plazma türleri	42
Şekil 2. 11 Kırılma voltajına karşılık pd değerlerini Paschen eğrileri	44
Şekil 2. 12 Gaz basıncının fonksiyonu olarak elektron ve iyon sıcaklıkları	49
Şekil 2. 13 Çeşitli Plasmatreat® nozül başlıkları	50
Şekil 2. 14 Sterilizasyon etkinliğini belirleyen iç ve dış plazma parametreleri	57
Şekil 2. 15 Plazma sterilizasyonunda gözlenen üç fazlı inaktivasyon eğrilerinin şematik gösterimi	58
Şekil 2. 16 Aktif plazma türlerinin mikroorganizma üzerindeki etkileri	59
Şekil 2. 17 Plazmanın sterilizasyon etkisinin ve biyolojik materyallerle interaksiyonunun şematik gösterimi	60
Şekil 2. 18 Mikroorganizmaların UV-C hassasiyetlerinin karşılaştırılması	61
Şekil 2. 19 Ökaryot ve prokaryot hücrelerin şematize görünümü	64
Şekil 2. 20 Plazma aktif türlerinin fiziksel ve kimyasal anlamda oluşum zamanları ...	70
Şekil 2. 21 Dünya 2012 fındık üretimi ve ülkelerin gelir dağılımı	72
Şekil 2. 22 Dünya 2012 biber üretimi ve ülkelerin gelir dağılımı	74
Şekil 3. 1 Pul biber nem ölçüm düzeneği	85
Şekil 3. 2 Aflatest immunoafinite kolonu ile aflatoksin elüsyonunun gerçekleştirilmesinin şematik gösterimi	96

Şekil 3. 3 Örneklerin denge nem değerlerinin ayarlanmasında kullanılan sistemin şematik görüntüsü	99
Şekil 3. 4 Üç nokta ekim yapılmış besiyerleri a) <i>A. flavus</i> ve b) <i>A. parasiticus</i>	101
Şekil 3. 5 Aflatoksin çözeltilerine düşük basınç plazma uygulaması	104
Şekil 3. 6 Düşük basınçlı plazma sisteminin şematik görünümü	105
Şekil 3. 7 Döner tambur sisteminin şematik görünümü	105
Şekil 3. 8 Atmosferik basınçlı plazma sisteminin şematik gösterimi	106
Şekil 3. 9 MTT testi prosedürünün şematize gösterimi	110
Şekil 4. 1 Toplam fenolik madde tespiti için hazırlanan kalibrasyon eğrisi	146
Şekil 4. 2 AFB1 çözeltileri ile inkübe edilmiş hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri	159
Şekil 4. 3 TopAF çözeltileri ile inkübe edilmiş hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri	160
Şekil 4. 4 Farklı konsantrasyonlardaki AFB1 çözeltilerinin hücre canlılıkları üzerine etkisi (a:kontrol; b:düşük basınç plazması uygulanmış; c:atmosferik plazma uygulanmış; d:işinlama işlemi uygulanmış aflatoksin çözeltileri)	161
Şekil 4. 5 Farklı konsantrasyonlardaki TopAF çözeltilerinin hücre canlılıkları üzerine etkisi (a:kontrol; b:düşük basınç plazması uygulanmış; c:atmosferik plazma uygulanmış; d:işinlama işlemi uygulanmış aflatoksin çözeltileri)	162
Şekil 4. 6 <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> sporlarının SEM görüntüleri: a-c: İşlem görmemiş <i>A. flavus</i> ; d-f: İşlem görmemiş <i>A. parasiticus</i> ; g-j: Atmosferik plazma uygulanmış <i>A. flavus</i> ; k-m: Atmosferik plazma uygulanmış <i>A. parasiticus</i> ; n-p: Düşük basınç uygulanmış <i>A. flavus</i> ; r-t: Düşük basınç uygulanmış <i>A. parasiticus</i>	165

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2. 1 Gıda ile bağlantılı akut ve kronik riskler	14
Çizelge 2. 2 Bazı önemli mikotoksinlerin IARC sınıflandırması	15
Çizelge 2. 3 Türkiye'de gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri (µg/kg)	16
Çizelge 2. 4 Avrupa Birliği'nde gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri (µg/kg)	18
Çizelge 2. 5 Farklı aflatoksin türlerine ait LD50 değerleri	22
Çizelge 2. 6 Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler	23
Çizelge 2. 7 Plazmanın sınıflandırılması	45
Çizelge 2. 8 Organik yapıların disosiasyon enerjileri	48
Çizelge 2. 9 Dekontaminasyon tekniklerinin karakteristik özellikleri	51
Çizelge 2. 10 Substratla temas biçimlerine göre plazma çeşitlerinin sınıflandırılması	53
Çizelge 2. 11 Plazma-gıda etkileşimlerini inceleyen literatür çalışmaları.....	66
Çizelge 2. 12 100 gr fındığın besinsel içeriği	73
Çizelge 2. 13 100 gr kırmızıbiberin besinsel içeriği	76
Çizelge 3. 1 Temin edilen saf <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> kültürlerinin kimlik bilgileri .	83
Çizelge 3. 2 Tuz çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan tuz ve destile su miktarları	99
Çizelge 3. 3 Tez kapsamında kullanılan plazma sistemlerinin özellikleri	107
Çizelge 4. 1 Fındık örneklerinin başlangıç mikroorganizma sayılarına ve kullanılan ön dekontaminasyon yöntemlerine ait sonuçlar	114
Çizelge 4. 2 Fındık yüzeylerine Yöntem I'e göre inoküle edilen <i>A. parasiticus</i> ve <i>A.</i> <i>flavus</i> sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları	115
Çizelge 4. 3 Pul biber yüzeylerine Yöntem I'e göre inoküle edilen <i>A. parasiticus</i> ve <i>A.</i> <i>flavus</i> sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları	115
Çizelge 4. 4 Fındık yüzeylerine Yöntem 2'ye göre inoküle edilen <i>A. parasiticus</i> ve <i>A.</i> <i>flavus</i> sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları	116
Çizelge 4. 5 Pul biber yüzeylerine Yöntem II'ye göre inoküle edilen <i>A. parasiticus</i> ve <i>A. flavus</i> sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları.....	116

Çizelge 4. 6 İnkübatörde toplam 7 gün beklemiş örneklerdeki spor sayıları	118
Çizelge 4. 7 Döner tambur sistemli düşük basınç plazma sistemi kullanılarak <i>A. parasiticus</i> 'un fındık örneklerinden dekontaminasyonu	119
Çizelge 4. 8 Döner tambur sistemli düşük basınç plazma sistemi kullanılarak <i>A. flavus</i> 'un fındık örneklerinden dekontaminasyonu	119
Çizelge 4. 9 Döner tambur sistemli düşük basınç oksijen plazması kullanılarak <i>A. parasiticus</i> 'un pul biber örneklerinden dekontaminasyon sonuçları	120
Çizelge 4. 10 Döner tambur sistemli düşük basınç azot plazması kullanılarak <i>A. parasiticus</i> 'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu	121
Çizelge 4. 11 Döner tambur sistemli düşük basınç hava plazması kullanılarak <i>A. parasiticus</i> 'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu	121
Çizelge 4. 12 Döner tambur sistemli düşük basınç oksijen plazması kullanılarak <i>A. flavus</i> 'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu	122
Çizelge 4. 13 Döner tambur sistemli düşük basınç azot plazması kullanılarak <i>A. flavus</i> 'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu	122
Çizelge 4. 14 Döner tambur sistemli düşük basınç hava plazması kullanılarak <i>A. flavus</i> 'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu	122
Çizelge 4. 15 Plazma jet hızının belirli tarama aralığında uygulama süresi üzerine etkisi	126
Çizelge 4. 16 Atmosferik plazmada farklı frekans ve referans voltaj değerleri uygulaması sonrası fındık ve pul biber örneklerinde meydana gelen sıcaklık değişimleri	127
Çizelge 4. 17 Atmosferik plazma sisteminin çalışma aralığı ve optimum plazma parametreleri	128
Çizelge 4. 18 Atmosferik plazma uygulanmış fındık örneklerinden <i>A. parasiticus</i> 'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/gr)	129
Çizelge 4. 19 Atmosferik plazma uygulanmış fındık örneklerinden <i>A. flavus</i> 'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/gr)	130
Çizelge 4. 20 Atmosferik plazma uygulanmış pul biber örneklerinden <i>A. parasiticus</i> 'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/gr)	131
Çizelge 4. 21 Atmosferik plazma uygulanmış pul biber örneklerinden <i>A. flavus</i> 'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/gr)	132
Çizelge 4. 22 Plazma sistem özelliklerinden kaynaklanan mikrobiyal indirgenme ...	134
Çizelge 4. 23 Fındık ve pul biber örneklerine ait nem değerleri (%)	136

Çizelge 4. 24 Fındık ve pul biber örneklerine ait su aktivitesi değerleri	137
Çizelge 4. 25 Etil alkol uygulaması sonrası fındık örneklerinin a_w değerleri	138
Çizelge 4. 26 Test örneklerinin uygulamalar öncesi ve sonrasına ait HunterLab renk değerleri	138
Çizelge 4. 27 Pul biber örneklerine ait ekstrakte olabilen renk (ASTA) değerleri.....	140
Çizelge 4. 28 Fındık ve pul biber örneklerine ait yağ miktarları (% kuru maddede).142	
Çizelge 4. 29 Fındık ve pul biber örneklerine ait serbest yağ asitliği (SA)(% oleik/kg yağ) verileri.....	144
Çizelge 4. 30 Fındık ve pul biber örneklerine ait peroksit sayısı (PD) (meqO ₂ /kg yağ) verileri.....	145
Çizelge 4. 31 Fındık örneğine uygulanan farklı ekstraksiyon yöntemlerinin fenolik madde miktarı üzerine etkileri.....	147
Çizelge 4. 32 Fındık ve pul biber örneklerine ait toplam fenolik madde miktarı (mgGAE/gr kuru madde)	148
Çizelge 4. 33 Fındık ve pul biber örneklerine ait tokoferol miktarları (mg/100 gr yağ)*	149
Çizelge 4. 34 Fındık ve kırmızı pul biber örneğinde kullanılan aflatoksin tayin yönteminin her bir aflatoksin için LOD değerleri	151
Çizelge 4. 35 Fındık ve kırmızı pul biber örneklerine ait geri kazanım düzeltilmesi yapılmış aflatoksin değerleri	151
Çizelge 4. 36 Test örneklerine Yöntem 2'ye göre inoküle edilen küflerin ürettikleri aflatoksin miktarları	152
Çizelge 4. 37 Aflatoksin çözeltileri ile yapay olarak kontamine edilmiş ve işlem uygulanmış test örneklerine ait toksin miktarları	153
Çizelge 4. 38 AFB1'in düşük basınç plazma uygulaması ile değişimi.....	154
Çizelge 4. 39 TopAF'nin düşük basınç plazma uygulaması ile değişim.....	155
Çizelge 4. 40 AFB1'in atmosferik basınç plazma uygulaması ile değişimi.....	156
Çizelge 4. 41 TopAF'nin atmosferik basınç plazma uygulaması ile değişimi.....	156
Çizelge 4. 42 AFB1'in ışınlama uygulaması ile değişimi.....	157
Çizelge 4. 43 TopAF'nin ışınlama uygulaması ile değişimi.....	158

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	Absorbans
a_w	Su aktivitesi
cm	Santimetre
m	Metre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Derece santigrat
K	Kelvin
dk	Dakika
L	Litre
kg	Kilogram
gr	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
ppb	Milyarda bir (part per billion) μ g/kg
ppm	milyonda bir (part per million) mg/kg
>	Büyüktür
<	Küçüktür
\approx	Yaklaşık
%	Yüzde
kHz	Kilohertz

Ghz	Gigahertz
kV	Kilovolt
eV	Elektronvolt
W	Watt
atm	Atmosfer basıncı
meq	Miliekivalen
ΔE	Toplam renk değişimi
kGy	Kilogray

Kısaltmalar

<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
SA	Serbest Asitlik
PD	Peroksit Değeri
TFB	Toplam Fenolik Bileşikler
AB	Avrupa Birliği
AF	Aflatoksin
AOAC	Amerika Analitik Kimyacılar Organizasyonu (American Organization of Analytical Chemists)
AOCS	Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği (The American Oil Chemists' Society)
ASTA	Amerikan Baharat Ticareti Birliği (American Spice Trade Association)
EC	Avrupa Komisyonu
FTG	Fındık Tanıtım Grubu

HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
LOD	Minimum tespit limiti
UV	Ultra viyole
PDA	Potato Dextrose Agar
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FBS	Fetal bovine serum
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
AFM1	Aflatoksin M1
AFM2	Aflatoksin M2
AFD1	Aflatoksin D1
AFP1	Aflatoksin P1
AFQ1	Aflatoksin Q1
TopAF	Toplam aflatoksin
ZEN	Zearalenon
DON	Deoksinivalon
OTA	Okratoksin

NIV	Nivelenol
Kob	Koloni oluşturan birim
STD	Standart sapma
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
ISO	Uluslararası Standardizasyon Teşkilatı
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
PBS	Fosfat tamponu çözeltilisi
RH	Bağıl nem
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
USD	Amerikan doları
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
NASA	Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi
ROT	Reaktif oksijen Türleri
RAT	Reaktif Azot Türleri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu(Scanning Electron Microscopy)
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu(Transmission Electron Microscopy)

1. GİRİŞ

Tarımsal ürünler, hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında, ortam koşullarına, tarım ürünlerinin bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik küflerle kontamine olurlar. Gelişme süreçlerini tamamlayan funguslar, miselleri içinde oluşturdukları ve birçok durumda üzerinde buldukları ürüne salgıladıkları toksik metabolitleri insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır. Fungusların ürettikleri bu toksik metabolitlere mikotoksin adı verilir [1].

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'ne göre dünyadaki hububat ürünlerinin % 25'inde mikotoksin kontaminasyonu gerçekleşmektedir. Kuvvetli toksik etkiye sahip bir mikotoksin türü olan aflatoksinler, 1960 yılında İngiltere'de 100.000 hindi ve ördek yavrusunun ölümüne sebep olan "Hindi X" hastalığı ile ortaya çıkmıştır. Araştırmalar sonucunda, hindilerin tükettiği Brezilya kaynaklı yerfıstığı küspesinden izole edilen küflere *Aspergillus flavus* ismi verilmiş ve bu küf cinsinin ürettiği toksinlere de "Aflatoksin" adı verilmiştir [2]. Aflatoksinler yüksek toksisite ve kanserojenik etkiye sahip akut ve kronik etki gösteren metabolitlerdir. Teratojenik ve mutajenik etkisi de olan aflatoksinin toksin etkisi türe, yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişiklik gösterir ve hedef organı karaciğerdir. Aflatoksinler, bilinen birçok karsinojen ve mutajen gibi hücrede hedef olarak DNA, RNA ve proteinleri seçer [3].

Ülkemiz, dünya fındık üretiminde % 74'lük payı ile en büyük üretici, % 87'lik payı ile de en büyük ihracatçı konumundadır. Fındık üretimi 2013 yılı itibarıyla yaklaşık 550 bin ton olarak gerçekleşmiş, bunun 274.657 tonu ihraç edilerek yaklaşık 2 milyar dolar gelir elde edilmiştir [4]. Fındık ticari değerinin yanında insan beslenmesi açısından büyük öneme sahip amino asitleri, B₁, B₂, B₆, pantotenik asit, niasin ve E vitamini gibi vitaminleri, Fe, Ca, Mg, Mn, K, Zn, Cu, P gibi mineral maddeleri ve oleik asiti, F vitamini olarak adlandırılan çoklu doymamış yağ asitlerinden linoleik ve linolenik asidi içermektedir [5].

Kırmızı pul biber (*Capsicum annum* L.) ise ülkemizde yetiştirilen en önemli baharat türlerinden biridir. Gıda endüstrisinde tatlandırıcı, lezzet arttırıcı, çeşni, aroma kuvvetlendirici ve renk maddesi olarak kullanılmaktadır. Türkiye, dünya pazarında kırmızı pul biber üretiminde yaklaşık 2 milyon ton ile Çin'den sonraki en

büyük üreticilerdendir. Ayrıca biber üretiminden elde edilen gelir 2012 yılında yaklaşık 100 milyon dolar seviyelerindedir [6]. Fındık ve kırmızı pul biber sıcaklık, nem, kurutma ve diğer proses parametrelerine bağlı olarak aflatoksin kontaminasyonuna çok duyarlıdır ve bu gıdalarda hasat, kurutma, ayıklama ve depolama sırasında yapılan hatalardan dolayı aflatoksin oluşmaktadır.

Aflatoksin sorunu, ülkemizin ihraç ürünlerinde önemli ekonomik kayıplara neden olduğundan yerel literatür tarafından oldukça ayrıntılı işlenmiştir. Örneğin; Şanlıurfa'da Erdogan [7]; Bursa'da Dokuzlu [8], Kayseri'de Kanbur ve ark. [9] ve İstanbul'da Aydın ve ark. [10] kırmızı pul biberlerdeki toplam aflatoksin miktarlarını incelemişler ve ülkemizde ve Avrupa birliğinde üst sınır olan 10 ppb'lik sınırın 8-9 kat fazlasını tespit etmişlerdir. Dünya genelinde yapılan çalışmalara bakıldığında Macaristan'da Fazekas ve ark. [11]; İtalya'da Romagnoli ve ark. [12]; Hindistan'da Reddy, [13]; Çin'de Hu ve ark. [14]; ve İngiltere'de Patel ve ark. [15] yüksek aflatoksin seviyelerine ulaşıldığı bildirilmiştir.

Mikotoksinleri parçalamak, oluşumlarını önlemek veya mikotoksinlerin toksik etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler, kontamine olmuş gıda maddelerinin ortamdan uzaklaştırılması [16], ısı uygulamaları [17], çöktürme işlemi [18], ozon uygulaması [19], radyasyon uygulaması [20], katkı maddeleri kullanımı [21] ve biyolojik uygulamalar [22] olarak sıralanabilmektedir. Araştırılan bu yöntemler, belirli derecelerde etkili bulunmalarına karşın; yeterli dekontaminasyon seviyesini sağlayamamaları, uygulanan gıdalarda besin öğelerinde kayıplara neden olmaları, kalıntı bırakmaları, yüksek maliyet gerektirmeleri ve toksik metabolitlerin oluşmasına neden olmaları gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Bu sebeplerden dolayı, proses etkinliği, işlem süresi, toksik etkinin azaltılması gibi özellikler iyileştirilerek yeni yöntemlerin geliştirilmesinin gerekli olduğu görülmektedir [23]. Ayrıca bu yöntemler genellikle ekonomik açıdan endüstriye uygulanabilme imkanı kısıtlı, yüksek maliyetler gerektiren ekipmanlardan oluşan laboratuvar ölçekli küçük sistemlerdir.

Ürün depolanmasında kayıplara sebep olan küflerin inaktivasyonu için yeni tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Zira birçok ülkede aflatoksin detoksifikasyonuna maruz kalmış ürün tüketimi yasaklandığından ve bu işlemler için ekstra maliyet gerektiğinden aflatoksin oluşumunu süreç başında engellemek en verimli yaklaşımdır. Tüketici yaklaşımı minimum işlem görmüş ürün tüketmek

yönünde olduğu için detoksifikasyondan önce dekontaminasyon sürecinde kullanılacak yöntemler birincil önem arz etmektedir. Son yıllarda ürünlerin besinsel ve tekstürel yapılarında herhangi bir değişikliğe neden olmayan farklı teknolojik yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Bu teknolojilerin temel ortak noktası ısı olmayan teknolojilere dayanmalarıdır. Son zamanlarda zararlı materyallerin inaktivasyon veya dekontaminasyon metotları arasında plazma uygulamalarına büyük önem verilmektedir. Bunun en büyük kanıtı NASA (Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi) tarafından gerçekleştirilen uzay araştırmalarında kullanılan uzay problemlerinin sterilizasyonda plazma destekli sistemler kullanılmasıdır [24].

Plazma maddenin katı, sıvı ve gaz hali dışındaki dördüncü hali olarak tanımlanır. Yüksek sıcaklık, kuvvetli elektrik veya magnetik alanların etkisi plazma oluşumunu sağlamaktadır. Güçlü bir elektriksel boşalımla da plazma oluşturabilmek mümkündür. Plazma ortamında enerji kazanan serbest elektronlar, ortamdaki diğer atomlar ve moleküllere çarparak enerjilerini transfer ederler ve bu esnada ışığa gerçekleştirirler. Bunların da birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucu ortamda çok değişik tür ve sayıda yeni moleküller, atomlar, radikaller, fotonlar, iyonlar vb. oluşur. Plazma, gaz sıcaklığına bağlı olarak iki başlık altında incelenebilir Sıcak plazmada, ortamda esas olarak çok sayıda iyon vardır. Soğuk plazmada (termal olmayan plazma) ise diğer aktif plazma türlerinden de önemli miktarda bulunur [25,26]. Plazmalar termodinamik özellikleri baz alınarak kullanılan plazma jeneratörüne göre (radyo frekansı, düşük frekans, mikrodalga); boşalım türüne göre (yük boşalımı, korona boşalımı, dielektrik bariyer boşalımı) veya çalışma basıncına göre (düşük basınç, atmosferik basınç) sınıflandırılabilir.

Plazma tekniği malzemelerin yüzey özelliklerini değiştirmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Özellikle malzemelerin yığın özelliklerini değiştirmeden ıslanabilirlik, metal adezyonu, boyanabilirlik, sertlik, yağlanabilme, bakteri/protein yapışmayan yüzey ve materyallerin biyo-uyumluluğu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir. Plazma; otomotiv sektörü, mikro-sistem teknolojileri, ambalaj teknolojisi, elektronik mühendisliği, optik ve tekstil teknolojileri uygulamalarında kullanılan bir teknoloji olmasında rağmen son zamanlarda özellikle biyomedikal sektörde yüzey modifikasyonu ve sterilizasyon konularında büyük ilgi odağı olmuştur. Medikal alanda yapılan mikroorganizma ve virüs inaktivasyonu çalışmalarından elde edilen etkili sonuçlar, bu yöntemin gıda endüstrisinde

kullanımı için de gelecek vadetmektedir. Plazma teknolojisinin bu kapsamda günümüzde kullanılan diğer yöntemlere katkıda bulunacak iyi bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Bunun başlıca nedenleri;

- Plazma sisteminde proses sırasında toksik bir madde kullanılmaması ve sonrasında toksik kalıntı bırakmaması,
- Sterilizasyon sonrası ek bir işlem (havalandırma) gerektirmemesi,
- Elektrik alan kapatıldığında milisaniyeler içinde yok olan reaktif türlerin personel için tehlike teşkil etmemesi,
- Proses zamanının kısa ve sıcaklığının da yaklaşık oda sıcaklığında olması,
- Yüksek maliyet gerektirmemesi,
- Paketleme materyalleri üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmaması,
- Sistemin uygun koşullarda birçok prosese adapte edilebilir olması,

şeklinde sıralanabilir [27,28].

Plazma sterilizasyonu üzerine ilk patent 1968 yılında Menashi tarafından alınmış [29], onu Ashman ve Menashi [30], Boucher [31] ile Bithell [32] izlemiştir. Bunların çoğu vakum altında yapılan uygulamalardır. Atmosferik basınçta gerçekleştirilen plazma çalışmaları ise son yıllarda başarılı sonuçlar vermeye başlamıştır.

Plazma dekontaminasyonu/sterilizasyonunun etki mekanizmasının birçok çalışmada üç temel aşamadan meydana geldiği belirtilmiştir. Aşağıdaki şekilde de görüldüğü üzere birinci aşamada UV ışınması etkisiyle mikroorganizmaların genetik materyalinde hasar oluşmaktadır. İkinci aşamada, ışınma etkisiyle ara yüzeylerde atomik düzeyde kopmaların artmasıyla mikroorganizmalar yüzeyden aşındırılmakta, UV fotonlarının etkisiyle mikroorganizmadaki kimyasal bağların kırılması ile gaza dönüşebilen bileşiklerin, mikroorganizma için temel teşkil eden atomik bileşenlerden meydana gelmesi sürecinin başlatılması sonucu foton kaynaklı desorpsiyon oluşmaktadır. Üçüncü aşamada yüzeyden kopma “etching” etkisi sonucu mikroorganizmanın atomik düzeyde erozyonu ve UV etkisidir. Daha önce de belirtildiği gibi plazma fazında birçok molekül bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri reaktif oksijen ve azot türleridir (O , O_2^* , O_3 , NO ve NO_2). Ayrıca mikroorganizma inaktivasyonunda rol alan en etkin radikal olan hidroksil radikali oluşma olasılığı, plazma fazında oksijen gazı varlığında çok yüksektir. Gürol ve

ark. [33], plazma sırasında oluşabilecek aktif türler ve serbest radikallerin milisaniyeler içinde sönmüldüğünü ve insan sağlığı açısından hiçbir risk teşkil etmediğini belirtmişlerdir.

Bilim dünyasının, gıda endüstrisinde plazma uygulamalarında özellikle tüketici açısından çelişkiye düştüğü temel sorun, bu radikallerin gıdaların temel içeriğine ve besinsel değerine herhangi bir etki bulunup bulunmadığıdır. Tez kapsamında, bu temel soru ve sorunların belirlenmesine yönelik çalışma planı oluşturulmuş ve bu temel konulara cevaplar bulunmaya çalışılmıştır.

Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada, düşük basınçlı plazma sistemi kullanılarak gıda endüstrisinde kullanılan paslanmaz çelik ve polietilen yüzeylerine kontrollü bir şekilde inoküle edilmiş *E.coli* K12 bakterisinin, yüzeyden dekontaminasyonu hava, N₂, O₂ ve su buharı plazması kullanılarak sağlanmıştır. Çalışma sonucunda yaklaşık 7 logaritmalık bir indirgenme sağlanmıştır. Ayrıca, plazma prosesi ile bakteri hücre duvarında oluşturulan hasar Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) vasıtası ile görüntülenmiştir [34].

Bakteriler, sporlar, küfler, mayalar, virüsler ve hatta prion proteinlerinin plazma ile sterilizasyonunun gerçekleştirilebildiği literatürde yaygın olarak yer almaktadır. Nagatsu ve ark. [35] bakteri sporları üzerine yaptığı çalışmada oksijen plazması kullanarak *Bacillus stearothermophilus* ve en dayanıklı mikroorganizma olarak bilinen *Bacillus subtilis* sporlarının inaktivasyonunu 3 dk içinde gerçekleştirmiştir. Vickery ve ark. [36] Hepatit B virüsünde hidrojen peroksit plazmasıyla 7 logaritmalık bir azalma sağlamıştır. Kyenam ve ark. [37] bakteri (*E. coli*, *S. aureus*), maya (*S. cerevisiae*) ve bakteriyel sporlarının (*B. subtilis*) helyum ve oksijen plazması kullanılarak kolaylıkla inhibe edilebileceğini ve bu sistemin yüksek sıcaklıklara gerek duymaması ve zararlı gaz üretiminin olmaması gibi avantajları olduğunu belirtmişlerdir. İnaktivasyonunun neredeyse imkansız olduğu belirtilen ve bir zamanlar ülkemizde de büyük endişelere yol açan deli dana hastalığına sebep olan prion proteinlerinin sterilizasyonu, Moisan ve ark. [38] tarafından plazma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Plazmanın gıda güvenliğine yönelik kullanımı oldukça yeni bir kavramdır. Yapılan çalışmalarda genel olarak mikroorganizmaların yüzeyden dekontaminasyonu kavramı üzerinde durulmuştur. Plazma prosesinin gıdanın temel bileşenleri

üzerine etkileri konusunda detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Critzer ve ark. [39] elma, kavun ve marul örneklerinde; Montenegro ve ark. [40] elma sularında; Deng ve ark. [41] ve Niemira [42] badem örneklerinde atmosferik basınçlı hava plazması ve Song ve ark. [43] peynir ve jambon örneklerinde atmosferik basınçlı helyum plazması kullanarak bakteri inaktivasyonunu sağlamışlardır.

Selçuk ve ark. [44] hububat ve baklagil tanelerinde bulunan küfler üzerine düşük basınçlı SF₆ plazma uygulamasının inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Diğer bir çalışmada ise SF₆ ve hava plazması kullanarak düşük basınçlı sistemlerde fındık yüzeylerine inoküle edilmiş *A. parasiticus* türü küflerin dekontamine edildiğini ve bunun yanı sıra plazmanın aflatoksin miktarında da azalma sağladığını ortaya koymuşlardır [45].

Park ve ark. [46] yaptıkları çalışmada 3 farklı mikotoksin; Aflatoksin B1 (AFB1), deoxynivalenol (DON) ve nivelenol'un (NIV) plazma sistemi kullanılarak 5 saniye gibi kısa bir sürede degradasyonunu sağlamayı başarmıştır. Bu sonuçlar plazmanın mikotoksinlerin degradasyonu için etkin bir sistem olabileceğini göstermektedir. Yine aynı çalışmada plazma uygulanmış toksin örneklerinin sitotoksik etkileri de incelenmiştir.

Literatürde özellikle baharat sterilizasyonu ile ilgili çalışmalarda plazma sterilizasyon tekniğinin bu zamana kadar iki çalışma dışında denenmemiş olması ve tez kapsamında gerçekleştirilen atmosferik plazma dekontaminasyon sisteminin sanayiye direkt olarak uygulanabilir/adapte edilebilir olması bu yöntemin halihazırda kullanılan gamma sterilizasyonu yöntemine doğrudan alternatif bir yöntem olmasını sağlayamaktadır. Bu konuda gerçekleştirilmiş olan ilk çalışmada sadece pul biber örneklerinin doğal florasında bulunan küflerin indirgenmesi incelenmiştir [47]. Kim ve ark. [48] ise plazma uygulamasının sadece gıdadaki spor miktarı ve gıdanın renk içeriğindeki değişimi incelemiştir.

Literatürde fındık ile ilgili yapılan dekontaminasyon çalışmalarında Başaran ve ark. [45] ve grubumuzca laboratuvar ölçekli düşük basınç plazmasıyla yapılmış olan bir ön deneme niteliği sayılabilecek çalışma dışında, herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır [49]. Bu çalışmalarda kullanılan plazma düzeneği atmosferik skalada ölçeklendirilebilecek bir plazma düzeneği olmamakla birlikte uygulanan

işlemin gıda materyalinin spesifik özelliklerine etkisi üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Tez kapsamında fındık ve kırmızı pul biberin model gıda örnekleri olarak seçilmesinin başlıca sebepleri; bu ürünlerin sağlık açısından büyük risk olan aflatoksinlerin başlıca kaynaklarından biri olmaları ve ülkemiz açısından ihracatta çok önemli bir paya sahip olmalarıdır. Dolayısıyla, meydana gelebilecek her türlü kayıp hem sağlık hem de ekonomik açıdan büyük önem arz etmektedir.

Tezin temel başarı çıktıları fungal sporlarda meydana gelen azalma ile birlikte bu sporların üretmiş oldukları aflatoksinlerin de detoksifikasyonunun sağlanmasıdır. Bununla birlikte tez kapsamında model gıdaların fizikokimyasal özelliklerinin plazma uygulamalarıyla nasıl bir değişime uğradıkları da detaylı olarak incelenmiştir. Ayrıca plazmanın spor morfolojilerinde nasıl bir değişikliğe sebebiyet verdiğinin incelenmesi amacıyla uygulama öncesi ve sonrası Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tez kapsamında yenilikçi olarak değerlendirilebilecek bir diğer yaklaşım da plazma uygulaması sonucu degrade olmuş farklı konsantrasyonlardaki aflatoksin çözeltilerinin sitotoksikolojik açıdan incelenip, oluşan ikincil ürünlerin daha toksik bir etki gösterip göstermediğinin incelenmesidir.

Plazmanın gıda güvenliği açısından kullanımı oldukça yeni ve gelişmekte olan bir çalışma alanıdır. Çalışma kapsamında hedeflenen dekontaminasyon ve detoksifikasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi ile birlikte literatür, bilim ve gıda sanayisinin uygulama alanlarına birçok katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

(i) Sıcaklığa duyarlı maddelerin işlenmesi özellikle gıda endüstrisi açısından büyük önem arz etmektedir. Bunun sebebi bu materyallerin uygulanan işlem (sterilizasyon/ dekontaminasyon/kurutma vb.) ile birlikte bazı önemli bileşenlerinin kaybedilmesidir. Bu sebeple gıda sanayinde yeni yaklaşımların hepsi düşük sıcaklıkta çalışan teknolojilerin geliştirilmesi yönünde ilerlemektedir.

(ii) Literatürde plazma sterilizasyon/dekontaminasyon işleminin gıda ürünlerine uygulanması kavramı çok yeni bir kavramdır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda uygulanan işlemlerin gıda materyali üzerine etkileri detaylı bir biçimde araştırılmamıştır. Tez kapsamında kırmızı pul biber ve fındık ürünlerinin analizleri

detaylı bir biçimde yapılmış olup literatüre bu konuda özgün makalelerin kazandırılacağı düşünülmektedir.

(iii) Ülke için en önemli kazanım, kısıtlı ve pahalı işlemlerle dekontamine edilebilecek ürünlerin farklı ve ileri teknolojik uygulamalar ile işlenmesidir. Teknolojik üstünlüğü, kullanım kolaylığı ve ekonomik olma özelliklerinden dolayı bu teknolojinin kullanımının yaygınlaşması ve kuşkusuz gıda endüstrisinde kalite artışının sağlanması hedeflenmektedir.

(iv) Özellikle atmosferik temelli sistemin fındık ve kırmızı pul biber işleyen fabrikaların işleyiş protokolüne entegre edilmesi düşünülebilir. Böyle bir sistemin sanayide kullanımı, depolamada küf gelişiminden dolayı görülen ürün kayıplarını azaltacak ve aflatoxin gibi kanserojenik etkili metabolitlerin de üründen uzaklaştırılmasını sağlayacaktır. Ülkemizin, dünyanın en büyük fındık üreticisi ve sayılı büyük baharat üreticilerinden biri olmasınedeni ile bu konu üzerinde önemle durulması gerekmektedir.

(v) Tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksisite testleri, tezin çıktılarının sağlık açısından irdelenmesi imkanını sağlamakta ve aflatoxin parçalanma ürünlerinin toksisitesini yani plazma uygulamalarının insan sağlığını etkileme düzeyini de koymaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Gıdalarda meydana gelen fiziksel, kimyasal ve biyolojik bozulmalar tüketici kullanımını açısından sorunlara neden olmaktadır. Fiziksel bozulmalar özellikle tüketicinin ürünü kabulü açısından önemli olup, ihracat değerlerini de etkileyen parametrelerin başında gelmektedir. Kimyasal bozulmalar özellikle hasattan sonra başlayıp depolama ve taşıma aşamasında gerçekleşebilmektedir. Mikrobiyolojik bozulma, tarladan başlayarak ürünün sofraya gelene kadarki sürecinde gerçekleşebilecek birincil olarak dikkat edilmesi gereken tehdittir. Mikrobiyolojik bozulma etkenleri sınırlandırıldığında diğer bozulma etkenleri de belirli oranda sınırlandırılmış olunur. Gıda üretimi açısından tehdit oluşturan bu etkenler tüketici kullanımına sunulurken gerçekleştirilen sterilizasyon, dezenfeksiyon ve dekontaminasyon kavramları geçmekte, fakat içerik açısından birbirleriyle karıştırılan bir durum yaratmaktadır.

2.1. Küfler Hakkında Genel Bilgi

Küfler, ökaryotik hücre yapısına sahip, miselyum oluşturan hetetrof funguslar olarak tanımlanabilir. Küf hücreleri ard arda dizilerek, hif adı verilen hücre iplikçiklerini oluştururlar. Hifler ise çeşitli şekilde dallanma yapmak suretiyle bir araya gelerek hif topluluğunu oluşturmaktadır. Bu hif topluluklarına miselyum adı verilmektedir [50].

Beslenilecek yüzeye temas edecek şekilde paralel olarak uzanan veya besiyeri içine giren hiflere vejetatif hif (beslenme hifi), besiyerinin üstünde kalan ve çoğunlukla küflerin üreme organelleri olan sporları taşıyan hiflere hava hifi denir. Hava hifleri üreme yapılarını oluşturur ve çoğalmayı sağlayan spor üreten konidiofor veya sporangiofor olarak adlandırılan yapılar içerirler. Burada üretilen sporların etrafa dağılıp çimlenmesiyle çoğalma gerçekleşir [51].

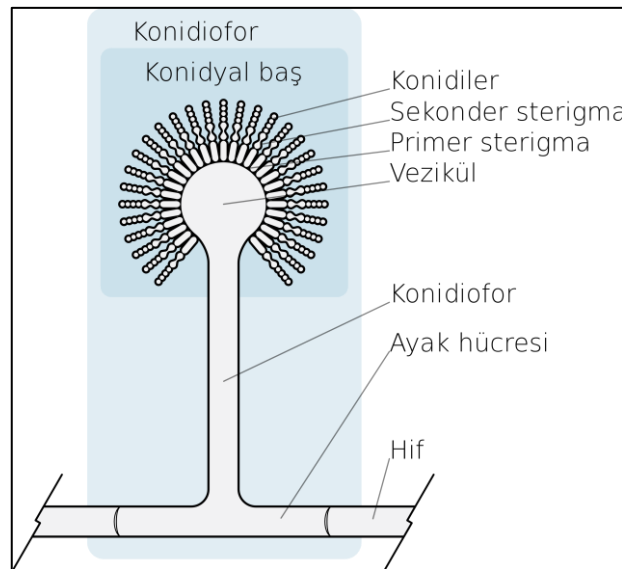
Konidioforların ucundaki özel hücreler tarafından üretilen açıkta meydana gelen sporlara konidiospor (konidi) denir (Şekil 2.1). Konidiler büyüklük olarak mikroskobiktir, çok hafif ve kurudurlar, hidrofob yapılarından dolayı kolaylıkla ıslatılamazlar ve birleşmeye meyillidirler. Küçük ve hafif oluşları nedeniyle sporlar kolaylıkla hava yoluyla yayılabilmektedir. Eğer sporlar koşulların gelişme için uygun olduğu bir yere yerleşirlerse hızlıca çimlenir ve yeni küf kolonileri oluştururlar.

Sporangioforların sonunda sporangium adı verilen kese benzeri kapalı yapılar içerisinde üretilen spora ise sporangiospor denilir. Bu spora sporangium patladığı zaman havaya yayılırlar. Sporangiospor ve konidiospor türü spora birçoğu aseksüel (eşeysiz) spora olarak adlandırılır. Gıdalarda özellikle bulunan birçok küf bu yolla çoğalmaktadır. Bununla birlikte küfler askospor, oospor ve zigospor gibi eşeyli spora da çoğalabilmektedirler [51].

Küfler oldukça geniş bir pH aralığında (pH 2-9) gelişebilmektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 10-35°C ve gelişmeleri için optimum su aktivitesi ise 0,85'in üzerindedir. Yüksek tuz ve şeker konsantrasyonlarında bile gelişebilmelerinin yanısıra kompleks karbonhidratlar, proteinler ve lipitleri de kullanabilmektedirler [52].

2.1.1. Aspergillus

Mikotoksinlerden en kuvvetli toksik etkiye sahip olan aflatoksinler, ilk defa 1960 yılında İngiltere'de 100000 hindi ve ördek yavrusunun ölümüne sebep olan "HindiX" hastalığı ile ortaya çıkmıştır. Araştırmalar sonucunda, hindilere yedirilen Brezilya kaynaklı yerfıstığı küspesinden izole edilen küflere *Aspergillus flavus* cinsi denmiş ve bu küf cinsinin ürettiği toksinlere de "Aflatoksin" adı verilmiştir.



Şekil 2. 1 Aspergillus'un şematik görünüşü [53]

A. flavus kolonileri hızlıca büyümekte ve 10-14 günde 6-7 cm çapına ulaşmaktadır. Koloni rengi başta sarı olmakta ve ilerleyen zamanda sarı-yeşil veya yeşil bir görünüm kazanmaktadır. Şekilleri düz ve radial olarak kırışık görünümlüdür. Ters

tarafları renksiz veya kumsu bej görünümlüdür. Konidioforları 400-800 µm uzunluğunda ve küre şeklindeki veziküllerin (25-45 µm) tam altında bulunmaktadır. Veziküllerin çapı ise 10-65 µm çapındadır. *A. flavus* konidyaları daha az pürüzlü iken *A. parasiticus*'un konidyaları çok pürüzlüdür [54].

Aspergilluslar mezofilik karakterli olup 6-8°C'den 50-60°C'ye kadar gelişebilirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38°C'dir. 10-13°C'nin altında ve 41-42°C'nin üzerinde aflatoksin oluşumu sınırlanır. En yüksek toksin oluşumuna ise 25-30°C'lerde ulaşılır [55,56]. *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri diğer bazı Aspergillus türleri ile birlikte kserofilik küfler içinde yer alır. Aspergillusların optimum gelişmeleri için gereken a_w : 0,97- 0,99 olmakla beraber gelişmelerini a_w : 0,80 değerinin altında da sürdürebilirler [57].

2.1.2. Tarım Ürünlerinde Küflerin Sebep Olduğu Başlıca Problemler

Küfler bir çok tarım ürününde; özellikle kırmızı biber, incir, fındık, mısır, buğday, arpa, çavdar ve bir çok yağlı tohumda tarlada, bahçede, hasat sonrasında, depolama süresince veya bu ürünlerin gıda ve hayvan yemi olarak işlenmeleri sırasında doğal olarak gelişmektedirler.

Küfler, gıdaların protein, yağ ve karbonhidratlarını enzimatik faaliyetlerle parçalayarak gıdanın dokusunu değiştirmekte, yağ içeriğinin azalmasına, serbest yağ asidi miktarının artmasına, proteinlerin parçalanmasına, amino asit bileşiminde değişime, renk değişimine, kötü koku oluşmasına, tat değişimlerine ve ağırlık kaybına (kuru madde kaybı) ve endospermdeki biyokimyasal değişimler sonucu besin kaybına yol açmaktadırlar. Küfler sağlam gıdanın içine de girebildiklerinden bakterilerden daha fazla zarar vermektedirler [58].

Küflerin oluşturduğu en önemli sorunlardan biri, gıda ve yemlerde gelişen küflerin gelişme sürecini tamamladıktan sonra miselleri içerisinde oluşturdıkları ve birçok durumda üzerinde buldukları ürüne (substrata) salgıladıkları toksik metabolitlerdir [50]. Bu durum insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır. Küflerin ürettikleri bu sekonder metabolitlere mikotoksin denir.

Gerçekleştirilen bir çalışmada ülkemizde aflatoksin çalışmalarının temelini iade edilen ihraç ürünlerimizin oluşturduğu ve bunların başında fındık, antepfıstığı,

kırmızı biber, kuru incir geldiğini bildirilmiştir [59]. Özellikle ihracat potansiyeli yüksek fındık (birinci sırada), antepfıstığı ve kırmızı biberde dünyanın sayılı üretici ülkeleri arasında yer almaktayız [60].

Küfler ayrıca tohumun çimlenme kapasitesini de olumsuz yönde etkilemektedir. Tohumların özellikle embriyo kısımlarını istila edip çimlenme kapasitelerini hızlı bir şekilde azaltmaktadırlar. Tahıl tanelerinde küflerin neden olduğu ürün kayıpları, dünya çapında ekonomik bir sorun teşkil etmektedir. Bazı tropikal ülkelerde ürünün depolama sırasında 1/3'ünün küfler nedeniyle kayba uğradığı belirtilmiştir [61].

Fındıkta küf bulaşması yaygın olup, bazı türlerin gelişmeleri insan ve hayvan sağlığı için önemli bir risk oluşturmaktadır. Fındıkta raf ömrünü kısaltan etkenlerin başında küflenme gelmektedir. İşleme koşullarının iyileştirilmesi ve etkili bir fiziksel ayırım ile aflatoksinli sert kabuklu ürünlerde aflatoksin miktarının % 90 oranında azaltılabileceği belirtilmektedir [62].

Dünyadaki tarımsal ürünlerin yaklaşık % 25'i her yıl mikotoksinlerden farklı düzeylerde etkilenmekte, bu durum çiftlik hayvanları ve tahıl üreticileri ile işleyiciler ve tüketiciler için büyük ekonomik sorunlara neden olmaktadır. ABD ve Kanada'da sadece yemlerde ve çiftlik hayvanlarında mikotoksinlerin neden olduğu yıllık kaybın 5 milyar \$ düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir [63].

Mikotoksinlerin yarattığı ekonomik kayıplar ve neden oldukları sağlık sorunlarının farkına varılması, önlem alma ve kontrol için uygun programların gerçekleştirilebilmesinde ilk basamağı oluşturmaktadır [63,64].

2.1.3. Küflerin Aflatoksin Üretme Nedenleri

Küfler metabolik etkinlikleri sırasında birincil ve ikincil metabolitler olarak adlandırılan birçok ürün üretmektedirler. Birincil metabolitler, organizmanın gelişimi için gerekli olup; bunlar arasında yağ asitleri, steroller, proteinler ve aromatik aminoasitler yer almaktadır. İkincil metabolizma ürünlerinin, küflerin normal metabolik faaliyetleri açısından bir öneme sahip olmadığı ve logaritmik gelişme fazının sonlarında sentezlendiği ifade edilmektedir [65-68]. Bu metabolitler küflerin çoğalma evresinin sonuna doğru (tropofaz) veya durma evresinin başında (idiofaz) sentezlenmektedir. Bununla birlikte bu açıklamanın tam olarak doğrulanamaması

ortaya atılan çeşitli görüşlerin de günümüzde geçerliliğini korumasına sebep olmuştur.

Mikroorganizmaların sekonder metabolitleri sentezlemelerindeki amacı konusunda belirtilen görüşlerden bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

- Metabolizmanın tamamen durmasındansa, düşük bir akışla süren sekonder metabolizmanın mikroorganizma için bir avantaj oluşturduğu, hücrede biriken bileşiklerin hücreden uzaklaştırılabilecek maddelere çevrimini olanaklı kıldığı ileri sürülmekte, antibiyotik ve mikotoksinlerin antagonizm için gerekli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte suda çözünemez bir endotoksin olan sterigmatosistin salgılanmayarak miseller içerisinde birikmesi durumu bu bağlamda açıklanamamaktadır.

- Sekonder metabolitler mikroorganizmalar tarafından direk kullanılmamaktadır. Bu nedenle metabolizmanın gereksiz metabolitleri olarak tanımlanmaktadır. Antagonistik ilişkilerin doğada pek saptanamaması, sentezlenen ürünlerin miktarca çok düşük olması, antibiyotiklerin genellikle üretici mikroorganizmayı da inhibe etmesi sekonder metabolizmanın bu konudaki amacını açıklayamamaktadır.

- Bazı görüşlere göre de birçok sekonder metabolit sentezini belirleyen genin mikroorganizma için gereksiz olduğu, evrim içinde bu genlerin çoktan DNA'dan ayrılmaları gerekirken sürüklenip geldikleri düşünülmekte ve sonuç olarak evrim içerisinde doğanın tahmin edilenden daha konservatif davrandığı ileri sürülmektedir [2].

2.2. Aflatoksinler, Toksisitesi, Metabolizması ve Limitleri

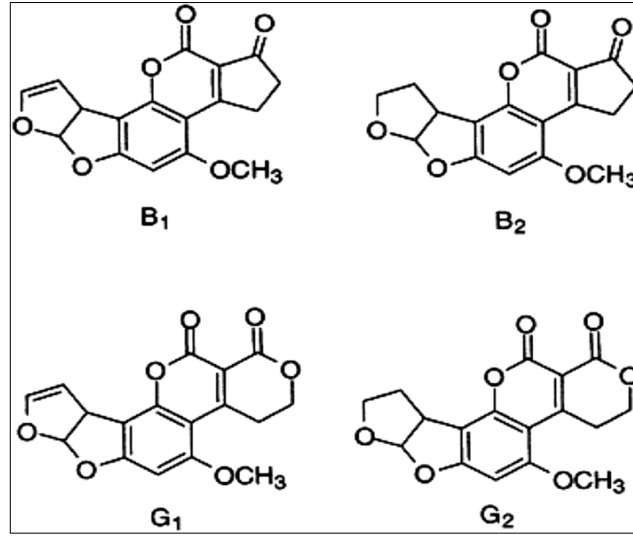
Günümüzde bilinen 300'den fazla mikotoksin çeşidi bulunmasına rağmen bunlar içerisinde birinci derecede önemli olarak kabul edilenlerin sayısı 5-6 civarındadır.

Genel bir sıralama yapılması güç olmakla birlikte konu hakkında çalışan araştırmacıların görüş birliğine vardıkları aflatoksinler, okratoksin A, fumonisinler, trikotesenler ve zearelenonun birinci derecede önemli mikotoksinler olduğudur.

Oluşumu ve toksisitesi göz önüne alındığında AFB1 en önemlilerinden biri olup bunu sırasıyla AFG1, AFB2 ve AFG2 izlemektedir (AFB1 > AFM1 = AFG1 > AFB2 > AFG2 > AFM2). Aflatoksinlerin kendileri karsinojenik özellikte olmayıp bunların bazı metabolitleri bu etkiye sahiptirler [69,70].

Bazı mikotoksinler misel içinde birikirken (endotoksin), birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülür. Bu nedenle küflü ürünlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmaz [2].

Aflatoksinler kimyasal yapı olarak lakton bağı ve bifuran halkası içeren difurano kumarin türevleridir. Ultraviyole ışığı altında mavi veya yeşil floresans vermelerine dayandırılarak adlandırılmışlardır [71]. AFB1 ve AFG1 difuran halkası içerirken AFB2 ve AFG2 ise tetra bifuran halkası içermektedir [72]. Aflatoksinlerin kimyasal yapıları Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2. 2 Aflatoksinlerin kimyasal yapıları

Aflatoksinler yüksek sıcaklıklara karşı oldukça dayanıklı olup, normal pişirme sıcaklıklarında ve pastörizasyon sıcaklıklarına karşı oldukça dayanıklıdır. Ayrıca aflatoksinin yapısında bulunan lakton halkası bu molekülün alkali hidrolizine karşı hassas olmasını sağlamaktadır [73]. Aflatoksinler yüksek toksisite ve kanserojenik etkiye sahip akut ve kronik etki gösteren metabolitlerdir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1 Gıda ile bağlantılı akut ve kronik riskler [74]

AKUT RİSKLER		KRONİK RİSKLER
Mikrobiyolojik	YÜKSEK ▼	Mikotoksinler
Fikotoksinler		Antropojenik bulaşanlar
Bazı fitotoksinler		Bazı fitotoksinler
Mikotoksinler		Fikotoksinler
Antropojenik bulaşanlar		Gıda katkıları
Pestisit kalıntıları		Pestisit kalıntıları
Gıda katkıları		Mikrobiyolojik
	DÜŞÜK	

Aflatoksinler fare, sıçan, hemstir, balık, ördek ve maymun gibi birçok hayvan türlerinde yüksek karsinojeniteye sahiptirler. Bununla birlikte genotoksik etkileri de bulunan aflatoksinler hakkında Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi tarafından yapılan araştırmalarda bu toksinin insanlar üzerinde de toksik olduğu belirlenmiş ve başlıca bilinen aflatoksinlerin (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) 1. Grup mikotoksin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.2). AFM1'in toksisitesi ise AFB1'den 10 kat daha düşük olup Grup 2B statüsünde sınıflandırılmıştır [75].

Çizelge 2. 2 Bazı önemli mikotoksinlerin IARC sınıflandırması

IARC numarası	Mikotoksinin tanımı	Mikotoksinler
1	İnsanlar için kanserojenik	Aflatoksinler
2A	İnsanlar için yüksek olasılıkla kanserojenik	-
2B	İnsanlar için muhtemelen kanserojenik	AFM1, OTA, FB(1-2-3), sterigmatosistin
3	İnsanlar için kanserojenite sınıflaması yapılamamakta	DON, NIV, PAT, T-2/HT-2, ZEN, citrinin, fusarenon-X
4	İnsanlar için muhtemelen kanserojenik değil	-

Avrupa Komitesi Komisyonu (Commission of the European Communities) gıdalarda aflatoksin B1 limitini 2 ng/gr ve toplam aflatoksin içeriğini 4 ng/gr olarak belirlemiştir. Diğer tüm türler için limitler 5 ng/gr toplam aflatoksin ve 10 ng/gr diğer toksinler olarak belirlenmiştir. Bu limit değerler ülkemizde AFB1 için 5 ng/g; TopAF için 10 ng/gr olarak belirlenmiştir [76].

Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi'nde [77] gıdalar, için aflatoksin limitleri belirlenmiştir. Çizelge 2.3'te Türkiye'de gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri ve Çizelge 2.4'te ise Avrupa Birliği'nde gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen en yüksek aflatoksin düzeyleri verilmiştir [78].

Çizelge 2. 3 Türkiye'de gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri (µg/kg) [77]

NO	Gıda AFLATOKSİN	Maksimum Limit (µg/kg)		
		B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
1	Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar (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	15,0	—
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	15,0	—
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	15,0	—
4	Sert kabuklu meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	—
5	Yerfıstığı, diğer yağlı tohumlar 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	10,0	—
6	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
7	Fındık ve Brezilya fındığı (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	5,0	10,0	—
8	Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0	10,0	—

9	Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
10	Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	2,0	4,0	—
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	—
12	Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
13	Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri 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>) — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5,0	10,0	—
14	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	—	—
15	Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025
16	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	—	0,025

Çizelge 2. 4 Avrupa Birliği'nde gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri (µg/kg) [78]

NO	Gıda AFLATOKSİN	Maksimum Limit (µg/kg)		
		B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
1	Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar (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	15,0	—
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	15,0	—
3	Fındık ve Brezilya fındığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	—
4	Sert kabuklu meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	—
5	Yerfıstığı, diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	2,0	4,0	—
6	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
7	Fındık ve Brezilya fındığı (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0	10,0	—
8	Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,0	4,0	—

9	Kuru meyveler (Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	—
10	Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,0	4,0	—
11	Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	2,0	4,0	—
12	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	—
13	Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
14	Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri 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>) — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5,0	10,0	—
15	Tahıl bazlı işlenmiş gıdalar, bebek ve küçük çocuk gıdaları	0,10	—	—
16	Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025
17	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	—	0,025

Avrupa Birliği'nin Gıda Maddelerinde Bazı Kontaminantların Maksimum Düzeylerini Belirleyen Komisyon Direktifi'nde; özellikle AFB1 olmak üzere, aflatoxinlerin genotoksik karsinojen maddeler olduğu, bu nedenle herhangi bir NOEL (No Observable Effect; gözlenebilir etki oluşturmayan düzey) ve ADI

(Acceptable Daily Intake; kabul edilebilir günlük alım miktarı) değerinin belirlenemediğine değinilmektedir [79].

2.2.1. Aflatoksinlerin Organizma Üzerindeki Etkileri

Aflatoksinlerin yaşayan organizmalardaki etkileri çok ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Bu etkileri biyokimyasal ve biyolojik etkiler olarak iki ana başlık altında incelemek mümkündür [80].

2.2.1.1. Biyokimyasal Etkiler

Aflatoksinler in-vivo ve in-vitro ortamlarda yüksek dozlarda bütün biyokimyasal sistemlerde çöküőe neden olarak; düşük dozlarda ise farklı metabolik sistemleri etkileyerek biyosentetik inhibitörler etkisine neden olmaktadır [81].

2.2.1.2. Enerji Metabolizması Üzerindeki Etkileri

AFB1, AFG1 ve AFM1 elektron taşıma sistemini etkileyerek dokuların oksijen alımını engellemektedirler. ATPaz enzim aktivitesini engelleyerek ATP üretiminde düşüşe neden olmaktadır [82].

2.2.1.3. Karbonhidrat ve Lipit Metabolizması Üzerindeki Etkileri

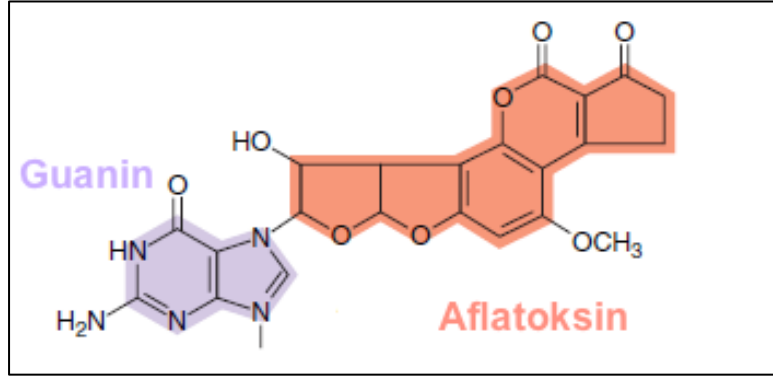
Aflatoksinler glikojen üretimini (glikojenesis) azaltmakta, karaciğere glikoz transferini engellemekte ve glikojenin glikoza yıkımını artırarak (glikojenoliz) hepatik glikojen miktarında azalmaya sebep olmaktadır. Ayrıca lipid sentezi ve hücreler arası taşınımı artmaktadır [82].

2.2.1.4. Nükleik Asit ve Protein Metabolizması Üzerindeki Etkileri

Aflatoksinler DNA'ya bağlanarak aktivitelerini azaltmaktadır. Aflatoksin molekülünün 8,9 konumu oksidasyon sonucu Aflatoksin-8,9-oksite dönüşür, sonra da kovalent bağla; DNA, RNA ve proteine bağlanır. AFB1'in DNA'ya afinitesinin AFG1 ve AFM1'den çok daha yüksek olduğu belirtilmiştir. AFB1'in epoksit formu DNA'ya bağlanıp transkripsiyonunu engellemektedir [83,84]. Bunun yanı sıra RNA'ya bağlandığında protin sentezini engellemektedir [84]. AFB1 bulunduğu doza bağlı olarak serum albuminle birleşerek proteinlerin lizin aminoasiti iđerен kısımlarına bağlanırlar. Bu yolla insanların AFB1'e ne kadar maruz kaldıkları da tespit edilebilmektedir [85].

2.2.1.5. Biyolojik Etkileri

Biyolojik etkiler karsinojenite mutajenite, teratojenite, hepatoksisite, aflatoksikoz olarak sıralanabilir. Aflatoksinler DNA'nın N₇ konumundaki guanin bazına kovalent bağ ile bağlanabilmektedir (Şekil 2.3). Bu aktivasyon reaksiyonu sonucu, hücre veya organizma için potansiyel bir biyolojik tehlike olarak görülen toksik, karsinojenik ve genotoksik etkiler ortaya çıkmaktadır [86].



Şekil 2. 3 AFB1-N₇-Gua kompleksi [87]

Aflatoksinler, insanlarda ve hayvanlarda oldukça güçlü akut toksik etki göstermektedirler. Sindirim sistemi yoluyla vücuda alınan aflatoksinler birçok canlıda akut toksisite ve karsinojeniteye neden olmakla birlikte, etkilenen başlıca organ karaciğer olmaktadır. Aflatoksinler, akut toksik ve karsinojenik etki gösterebilmeleri için oksidatif metabolizmaya uğramalıdır [88].

Diyetle alınan aflatoksin karaciğerden kolayca diğer organlara dağılılabılır ve orada metabolize olarak toksik veya karsinojenik etki gösterebilmektedir. Akut toksisite, kontamine ürünün tüketimini takip eden 3 hafta içerisinde oluşabilmektedir [71].

Yapılan son çalışmalar, aflatoksine maruz kalan insanlarda karaciğer kanseri görülme oranının yüksek olmasına kronik enfeksiyonların da neden olabileceğini ortaya koymuştur. AFB1'in deney hayvanlarında hücre bağışıklığını baskıladığı görülmüştür [69].

Çizelge 2. 5 Farklı aflatoksin türlerine ait LD50 değerleri

Toksin	LD ₅₀ (mg/kg)
AFB1	0,36
AFB2	1,70
AFG1	0,80
AFG2	2,50
AFM1	0,80
AFM2	3,10

Hayvan türlerinde tek çeşit doz aflatoksin uygulamasıyla çok geniş bir aralıkta LD50 değeri elde edilmektedir. Birçok tür için bu değer 0,5-10 mg/kg vücut ağırlığı arasında değişmektedir [89]. Omaye [71], aflatoksinin LD50 değerinin 0,5 mg.kg⁻¹ (vücut ağırlığı) olduğunu ve 72 saat içinde karaciğer hasarı, bağırsak sisteminde ve karın boşluğunda kanama nedenleriyle ölüm gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Müller ve Weber [90] ise aflatoksin derivatlarının LD50 değerlerinin Çizelge 2.5'teki gibi olduğunu belirtmişlerdir.

2.2.2. Aflatoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksinler primer olarak küflerin miselyumunda oluşur ve sporlarda da bulunma olasılıkları vardır. Bu sekonder metabolitler küflerin üremelerinin eksponansiyel fazlarının sonunda sentezlenmekte ve küflerin üreme ve gelişmelerini biyolojik olarak etkileyecek herhangi bir belirtiyeye neden olmamaktadırlar [65,67,91-93].

Mikotoksinler küf gelişiminde eksponansiyel fazın sonunda veya durağan fazın başlangıcında üretilmektedir. *Aspergillus* cinsi küflerde aflatoksin üretimi beşinci günde, durağan faza yaklaşıırken maksimuma çıkmaktadır. Altıncı ve sekizinci günler arasında aflatoksin üretimi azalmaktadır. *Aspergillus* cinsi küfler optimum sıcaklık (27-30°C) ve nem (% 85) koşulları sağlandığı takdirde 24 saat içinde aflatoksin üretmeye başlarlar ve maksimum aflatoksin üretimi sağlanana kadar üretim artarak devam eder ve sonrasında azalarak yaklaşık 12 gün sürebilir [94].

Mikotoksin oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunmakla birlikte bunların başında çevresel faktörler gelmektedir. Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği, atmosfer bağıl neminden etkilendiğinden sıcaklıkla birlikte bağıl nem öncelikle fungus sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini ardından da toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Tarım ürününün veya gıdanın çeşidi, kimyasal

kompozisyonu, ürünün yetiştirildiği klima zonu, ürünün uygunluk durumu, hasat, işlemler, depolama bulaşan küflerin spektrumuna etki eden diğer faktörlerdir. Ayrıca atmosferik oksijen, diğer modifiye atmosfer gazları, ışık, süre, pH gibi faktörlerin de etkisi vardır (Çizelge 2.6).

Karbon, azot varlığı da aflatoksin üretiminde önemli rol oynamaktadır. Basit şekerler (Glikoz, sukroz, maltoz ve galaktoz) aflatoksin üretimini artırırken, kompleks karbonhidratlar (nişasta ve pepton gibi) arttırmaz [72,95].

Çizelge 2. 6 Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler [96]

	Tarlada	Hasat ve Kurutmada	Depoda
Fiziksel Faktörler			
Nem	+	+	+
— Kurutma hızı	-	+	+
— Tekrar ıslanma	-	+	+
— Nisbi rutubet	+	+	+
— Net buharlaşma	+	+	-
Sıcaklık	+	+	+
Mekanik hasar	+	+	+
Hububatın karışması	-	+	+
Kızışma	-	-	+
Zaman	+	+	+
Kimyasal Faktörler			
CO ₂	-	-	+
O ₂	-	-	+
Substrat yapısı	+	-	+
Mineral değerler	+	-	+
Kimyasal uygulama (ilaçlama)	-	-	+
Biyolojik Faktörler			
Bitki stresi	+	-	+
Zararlıların faaliyeti	+	-	+
Bitki farklılıkları	+	-	+
Fungal cins farklılıkları	+	-	+
Fungal yük	+	+	+
Böcek zararları	+	-	+
Bitki hastalıkları kaynaklı zararlar	+	+	+
Mikrobiyolojik ekosistem	+	-	+

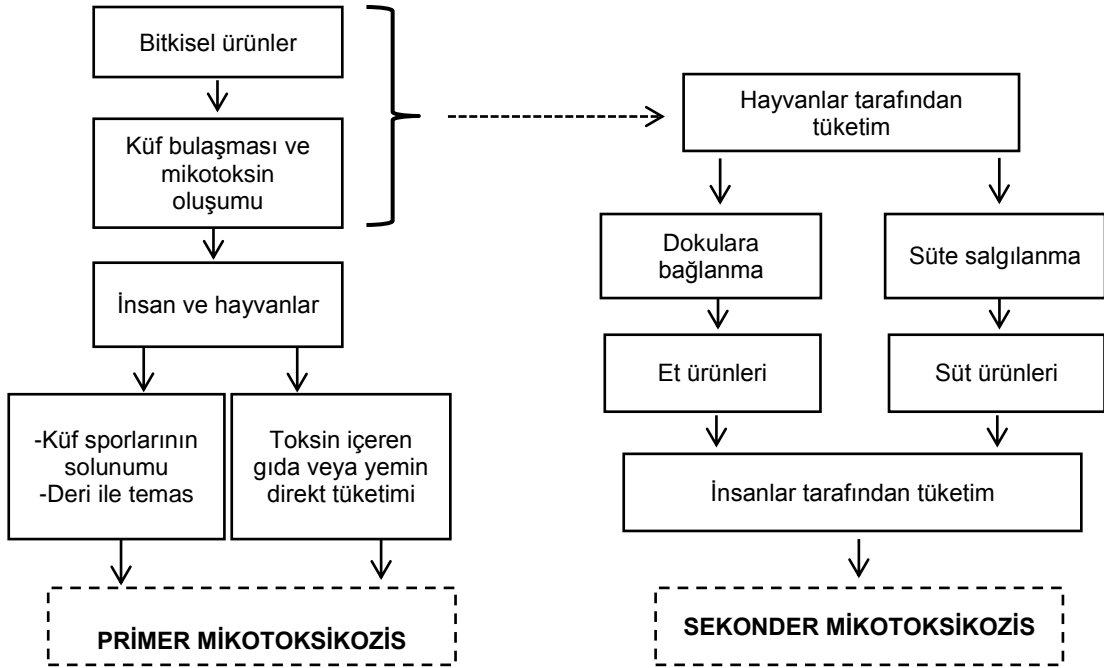
2.2.3. Gıdaların Aflatoksinler İle Kontaminasyonu

Gıdaların aflatoksinlerle kontaminasyonu temelde iki yolla gerçekleşebilir. Bunlar direkt (primer mikotoksikozis) ve indirekt (sekonder mikotoksikozis) olarak gerçekleşebilir. Şekil 2.4'te bu kontaminasyon yollarına ait detaylı anlatım yer almaktadır.

a) Direkt kontaminasyon: Tarlada tarımsal ürünlerin, hammaddenin, yarı-mamul maddenin ve son ürünlerin doğrudan küf ile kontaminasyonudur. Direkt

kontaminasyon ekmekte, meyvelerde, doğal küflerle olgunlaştırılan et ürünlerinde, süt mamullerinden özellikle peynirlerde görülür. Ancak mikotoksin içerikleri yüksek düzeyde olabilecek küflenmiş ekmek ve meyveler tüketilmeyecek görüntüye sahip oldukları için direkt tüketim için risk oluşturmazlar. Tarlada bozulmaya örnek olarak özellikle Türkiye için önemli bir ürün olan fındıklarda aflatoksin oluşumu verilebilir.

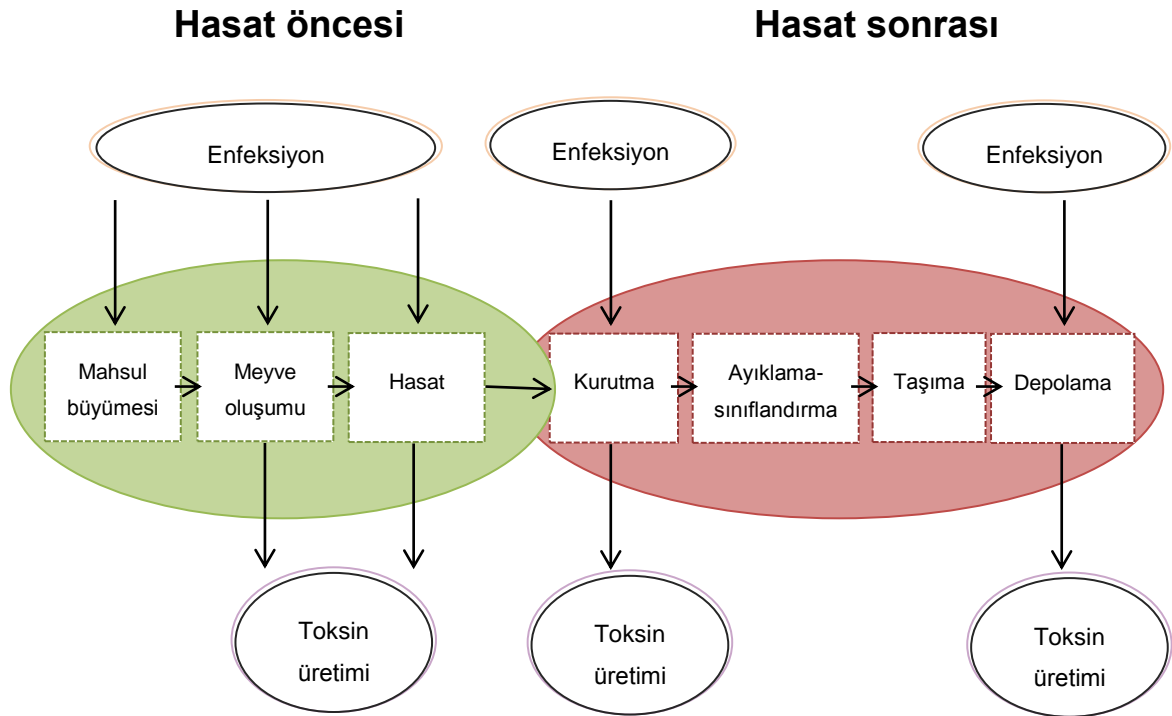
b) İndirekt kontaminasyon: Mikotoksinle kontamine olmuş hammaddelerin veya katkı maddelerinin gıda üretiminde kullanılmasıyla meydana gelen kontaminasyondur. Özellikle yemlerin kontamine olması sonucu bu yemleri tüketen hayvanlardan elde edilen ürünlerin kaynaklanmaktadır. AFB1 içeren yemlerin tüketilmesi sonunda ineklerde oluşan bir metabolit olan AFM1 ile kontamine olmuş süt ve süt ürünleri verilebilir [97]. Ayrıca patulinle kontamine olmuş meyvelerin meyve suyu ve konsantrelerine işlenmesi, aflatoksin içeren incirlerden kuru incir ve incir ezmelerinin üretilmesi, yine kontamine yer fıstıklarının fıstık ezmesi vb. ürünlerde kullanılması indirekt yolla kontaminasyonlara örnek oluşturur. Çeşitli gıdalarda tat ve aroma kazandırmak amacıyla kullanılan baharat (kırmızı toz biber, kırmızı pul biber, karabiber, zencefil, safran, kişniş) çoğunlukla mikotoksinlerle kontamine dir. Baharat özellikle et ürünlerinde indirekt kontaminasyona neden olmaktadır [1].



Şekil 2. 4 Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara geçiş yolları

Yukarıda belirtilen iki kontaminasyon yolunun dışında taşınma-kalıntı (carry over) adlı üçüncü bir kontaminasyon yolu da bulunmaktadır. Çiftlik hayvanları mikotoksinlerle kontamine yemlerle beslendiklerinde toksinleri metabolize ederek, büyük kısmını idrar ve dışkı ile atarlar. Ancak metabolize formlara kanda, sütte, bazı organlarda hatta ender olarak yağlı kas dokularında rastlanır. Aflatoksin içeren yemlerin süt ineklerine yedirilmesi sonucu AFB1 ve AFB2, aflatoksin M1 (AFM1) ve aflatoksin M2 (AFM2)'ye dönüşerek kalıntı halinde sütte ortaya çıkar. Hayvansal gıdalardan süt, karaciğer, böbrek, yumurta "Carry over" yoluyla aflatoksinle kontamine olur. Yemlerin kritik aflatoksinkonsantrasyonlarında, toksin % 0,01-0,3 oranı ile organ ve dokulara geçmektedir [2].

Potansiyel kontaminasyon kaynaklarından (fungus enfeksiyon ve mikotoksin üretimi) bir tanesi için, üretim zincirindeki birçok hassas kaynak dikkatlice takip edilmelidir. Üretimdeki her bir prosese bütün gözüyle bakılması üretim kalitesini etkileyecektir (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5 Harat öncesi ve sonrasında gerçekleşen, toksin oluşumunun gerçekleştiği basamaklara ait diagram

Uygun olmayan koşullarda yapılan hasat, kurutma tekniğine uygun yapılmayan kurutma, depolama ve işleme sonucunda fındıkta küf gelişiminin görülmemesi neredeyse kaçınılmazdır [98].

Aflatoksin oluşumunun fındıkların erken hasat edilmesi, yaş olarak rutubetli ortamlarda naylon çuvalda bekletilmesi ve toprak üzerinde kurutma yapılması durumunda artış gösterdiği, yağışlı koşullarda çiftçi harman yerlerinde kurutma işleminin uzun sürmesi durumunda limitlerin üzerinde aflatoksin oluşabileceği tespit edilmiştir [99].

Mikotoksin üretimi için gereken min. a_w değerleri, gelişim için talep edilen min. a_w değerlerinden daha yüksektir. Her bir mikotoksin çeşidi bu toksinleri sentezleyen küf türüne bağlı olarak farklı a_w değerinde oluşturulur. Mikotoksinlerin yüksek düzeyde sentezlenmeleri, küflerin optimum gelişme sıcaklıklarında veya biraz daha altında gerçekleşir.

2.2.4. Doğal ve Yapay Aflatoksin Kontaminasyonu

Litaratürde aflatoksin kontaminasyonunu sağlamak amacıyla doğal (natural) ve yapay (artificial) kontaminasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Doğal aflatoksijenik küfler tarafından üretilmiş olan veya aflatoksijenik küflerle kontamine edilmiş örneklerde oluşan aflatoksin “doğal kontaminasyona” örnektir. Yapay olarak aflatoksin kontaminasyonu ise örneklerin direkt olarak aflatoksin ile kontamine edilmesine denmektedir. Doğal kontaminasyonda oluşmuş olan aflatoksinin örnekteki dağılımı düzensizdir. Bununla birlikte yapay kontaminasyon gerçek üretim koşullarını simüle edememektedir. Gerçek üretim koşullarına ulaşmak amacıyla doğal kontaminasyon tercih edilmekte ve burada meydana gelebilecek hataları minimize etmek için de örnek miktarı fazla tutulmaktadır [100].

Alencar ve ark. [101] ve Proctor ve ark. [102], yapay ve doğal olarak kontamine edilmiş olan fıstık örneklerinden aflatoksin uzaklaştırılmasının doğal örneklerde daha zor olduğunu belirtmişlerdir. Buradaki temel sebepler incelendiğinde aflatoksinin yapay olarak kontamine edildiği örneklerde bu kimyasalın sadece örnek yüzeyinde kaldığı ve aflatoksin dağılımlarının homojen olmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte doğal kontaminasyonda aflatoksinin sadece yüzeyde değil ürün içerisinde ve kotiledonda da bulunduğu belirtilmiştir. Doğal kontamine ürünlerdeki aflatoksin dağılımını açıklayan iki hipotez belirtilmiştir. Bunlardan ilki yüzeyden iç

kısımlara doğru aflatoksin difüzyonu olmasıdır. İkincisi ise aflatoksijenik küflerin ürünün kotiledon kısmına penetre olarak aflatoksini burada oluşturmasıdır.

Tez kapsamında gerçekleştirilecek olan doğal ve yapay kontaminasyonlarda burada belirtilmiş olan yöntemlerin dezavantajlarını minimize etmek için çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır.

2.2.5. Aflatoksin Oluşumunun/Bulaşmasının Önlenmesi

Aflatoksinli ürünler sağlam ürünlerden kimyasal özelliklerinin yanında fiziksel özellikleri itibarı ile de farklılıklar gösterebilmektedirler. Bu fiziksel farklılıklardan faydalanılarak ayırma işleminin üzerinde önemle durmak gerekmektedir. Ancak aflatoksin detoksifikasyon işlemleri sırasında gıda ya da yemde yeni toksik/mutajenik maddeler oluşabilmektedir. Bu nedenle, detoksifikasyona tabi tutulmuş ürünler insan veya hayvanlar tarafından tüketildiğinde sorunlar meydana gelebilmektedir. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü tarafından detoksifikasyona uğramış ürün tüketimi uygun bulunmamaktadır. Dolayısı ile, ihracat ürünlerimizin geleceğini kurtarmak ve ekonomik kayıpları en aza indirmek için bu konuda öncelikle aflatoksin oluşumunu engelleyici önlemler almak bir zorunluluktur.

Küf kontaminasyonu ve gelişiminin engellenmesi için düzenlenmesi ve kontrol altında tutulması gereken başlıca parametreleri şöyle sıralayabiliriz:

- 1) Çiftlik/alan yönetimi
- 2) Antifungal ajanlar
- 3) Genetik mühendislik yaklaşımları
- 4) Çevresel şartların kontrolü:
 - a) Nem
 - b) Sıcaklık
 - c) Atmosfer

Kontaminasyonun alan yönetimi bazında engellenmesi için küf ile kontamine olmamış tohum kullanma, ürün rotasyonu, toprak kültivasyonu, sulama ve gübreleme işlemleri, böceklenme ve hastalanmanın kontrolü sağlanmalıdır. Ayrıca ürünlerin uygun olgunlukta toplanması ve toplanırken yaralanmamasına dikkat

edilip, depolama koşulları da optimize edilerek küf kontaminasyonunun ve aflatoksin üretiminin önüne geçilebilir [103].

Kısa zincirli yağ asitleri küf gelişimini durdurmaktadır. Propiyonik asit iyi bir fungostatik ajan olarak *A. flavus* gelişimini engellemektedir. Bu maddeler uçucu yağ asitleridir ve yüksek nem içeriğine sahip hayvan yemleri olan mısırlarda kullanılırlar [104]. Sorbik asit tuzları da *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin gelişimini engellemektedirler [105]. Diklorvos herhangi bir antifungal etkiye sahip olmamasına rağmen *A. parasiticus*'un aflatoksin üretimini inhibe eder.

Genetik mühendislik bazında küf gelişimine dirençli veya toksin üretimini engelleyebilecek çalışmalar en ideal sonucu verebilir.

Hızlı görüntüleme teknikleri de küf yayılmasını engellemekte kullanılabilecek yöntemler arasındadır. Çünkü genellikle kontamine olmuş ürün başlangıçta miktar olarak azdır. Manuel, mekanik ve elektronik yöntemler yaralı veya rengi bozuk ürünlerin ayrılması üründeki aflatoksin içeriğini azaltmaktadır [106]. Bununla birlikte hava ile ayırma yöntemi kullanılarak az yoğun ve hafif ürünler belirlenen kalitedeki ürünlerden ayrılabilir. Kaldırma kuvveti kullanılarak mısır gibi ürünlerde aflatoksin kontaminasyonu olan ürünlerin ayrımı belirli oranlarda gerçekleştirilebilmektedir.

Çevresel şartlar ve depolar ürünlerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalitelerini belirleyen başlıca unsurlardır. Spesifik fungal türler çevre nemi, sıcaklığı, ortamda rekabetçi mikroorganizmaların bulunması ve ortamın doğası gibi etkenlere bağlı olarak gelişirler. Bu ve diğer faktörler küf metabolizmasını ve toksin üretme kapasitesini etkileyebilmektedirler [107].

Mikotoksin kontaminasyonu temelde hasat öncesi (pre-harvest), hasat zamanı (harvesting) ve hasat sonrası (post-harvest) depolama ve işleme süreçleri olarak gerçekleşir. Aflatoksin oluşumunun önlenmesi için öncelikle hammaddenin tarlada gelişimi, gelişim sırasında meydana gelen zararlı istilaları, iklim değişikliklerine bağlı bozulmalar ve fiziksel etkenler, ürünün hasatı, depolanması, nakliyesi, ürüne işlenmesi ve ürün elde edilmesi aşamalarında küf bulaşmasının engellenmesi veya en aza indirilmesi önem taşımaktadır. Fındıkların hasattan hemen sonra kurumuş çotanaklarından ayrılması esnasında ve daha sonrasında iç fındıkta mekanik çarpmalardan dolayı meydana gelen yaralanmalar ve zedelenmelerin

bulduğın mikrobiyolojik ve kimyasal olarak bozulmasına neden olduğunu belirtilmiştir. Mikrobiyal bulaşmanın tarlada kontrol altında tutulması çok güçtür. Bununla birlikte mikrobiyal bulaşma ürünün hasatı ve onu izleyen aşamalarda alınacak hijyen ve sanitasyon önlemleri ve iyi üretim uygulamalarıyla büyük lde engellenebilir.

Aflatoksin bulaşmasının önlenemediği durumlarda ürünlerden aflatoksinin uzaklaştırılması ve detoksifikasyonu amacıyla çok sayıda araştırma yapılmakta ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik birçok yöntem denenmektedir.

Temel olarak gıda ve yemlerde aflatoksin kaynaklı kontaminasyonların engellenmesi için 3 farklı olasılık mevcuttur. Bunlar [108];

1. Kontaminasyonun engellenmesi
2. Aflatoksin içeren gıda ve yemlerin detoksifikasyonu
3. Mikotoksinlerin tüketilen gıdalar aracılığı ile sindirim sisteminden absorpsiyonudur.

Hangi strateji kullanılırsa kullanılsın dekontaminasyon işlemlerinin sahip olması gereken bazı temel kriterler mevcuttur. Bunlar [108-110];

- Mikotoksin tamamen uzaklaştırılmalı, inaktive edilmeli veya toksik olmayan ürünlere paralanmalı
- Kf sporları ve miseller toksin oluşumu sağlanmaması adına yok edilmeli
- Gıda veya yem maddesi besinsel değerini kaybetmemeli yenilebilir özellikte olmalı
- Hammaddenin fiziksel özellikleri değişmemeli
- Teknik ve ekonomik olarak uygulanabilir olmalı. Dekontaminasyon işlemi ürün getirisinden daha yüksek olmamalıdır.

Aflatoksinin üründen uzaklaştırılması ile ilgili olarak araştırılan farklı yöntemler, belirli derecelerde başarılı bulunmasına karşın; yeterli detoksifikasyon düzeylerini sağlayamamaları, besin öğelerinde kayıplara neden olmaları ve yüksek maliyet gerektirmeleri gibi önemli dezavantajlara sahiptir.

Aflatoksinlerin detoksifikasyon uygulamalarının temel amacı furan halkasındaki çift bağı kırmak yada lakton halkasını açmak olmalıdır. Lakton halkası açıldığında aflatoksin-DNA kompleksinin oluşumunu engelleyen diğer reaksiyonlar oluşabilir

[111]. Bu tarz yapısal değişiklikler aflatoksinler tarafından absorblanan enerjiler veya aktif türleri yok eden veya bloklayan kimyasallarla oluşabilir [112].

Gıda ve yemlerde aflatoksin detoksifikasyonunu sağlamak amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin temel amacı gıdalarda toksini uzaklaştırmak veya toksini gıdanın içinde iken yok etmektir. Aflatoksin detoksifikasyon yöntemleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılabilir.

2.2.6. Kontamine Olmuş Ürünlerin Ortamdan Uzaklaştırılması

2.2.6.1. Fiziksel Ayırma ve Temizleme

Aflatoksinlerin kimyasal yollarla ayrılması birçok ülkede yasaklandığı için kontamine ürünlerin fiziksel ayrılması üreticiler için önemli bir opsiyondur [113-117].

2.2.6.2. Sınıflandırma

Yaralı, rengi değişmiş ve gözle görülür seviyede küf oluşumu olan ürünlerin ayrılması toplam üründe bu tarz özelliklere sahip tanelerin az olmasından dolayı önemlidir. Manuel, mekanik ve elektronik yöntemlerin hepsi sınıflandırma için uygulanabilir. Manuel ayırmada büyüklük, şekil, renk ve küf bulaşları ayrılabilir. Fakat bu işlem basit olmasının yanında zaman alıcı bir işlemdir. Endüstriyel düzeyde elektronik sınıflandırma ve ayıklama makinaları kullanılmaktadır. Özellikle floresan ışık (365 nm) kullanılarak gerçekleştirilen sınıflama ile aflatoksin bulaşısı olan ürünler rahatça ayrılabilir [118].

2.2.6.3. Yoğunluklarına Göre Ayırma

Diğer bir aflatoksin dekontaminasyon metodu ise yüzdürme ve yoğunluklarına göre ayırmadır. Bu işlem özellikle mısırlarda etkin bir biçimde kullanılmaktadır. Küfler tarafından hasar oluşmuş, mikotoksin bulaşmış taneler farklı fiziksel özellikler göstermektedirler. Yoğunluklarına göre ayırma su ve doygun sodyum klorit çözeltileri yüzeyinde kalabilen tanelerin ayrılması ile hububatların DON, ZEN ve aflatoksin miktarlarında büyük düşüş gözlenmektedir [119]. Özellikle küçük taneli ürünlerde ve özellikle mısırdaki yoğunluğa göre ayırma uygulanabilmektedir [117,120].

2.2.6.4. Yıkama

Su ve sodium karbonat solüsyonları ile yıkama Fusaryum toksinlerinin tahıl ve mısırlarda azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Scott, [121] arpa ve mısırın distile su ile üç defa yıkanmasının DON miktarında % 65-69 oranında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Acar ve ark. [122] yıkama ve ayıklama işleminin elmalarda dış kirliliği ve bölgesel kimyasal kalıntı miktarını azalttığını ve patulin miktarında %54'lük bir azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir.

2.2.6.5. Öğütme

Öğütme işlemi kontamine olmuş tanedeki aflatoksin miktarında azalmaya neden olmaktadır. Standart öğütme işlemiyle durum buğdayından elde edilen undaki OTA miktarında %66'lık; normal unda ise % 40'lık bir azalma meydana geldiği belirtilmiştir [119].

2.2.6.6. Çözücü Ekstraksiyonu

Mikotoksinleri buldukları gıdalardan ekstrakte etmek için kullanılan birçok solvent vardır. Bunlardan en çok kullanılanı % 95'lik etanol, % 90'lık aseton, % 80'lik isopropanol, hekzan-metanol, aseton-hekzan-su karışımlarıdır [123].

Gıdanın besinsel değerinde herhangi bir değişime neden olmadan ve toksik yan ürün oluşturmadan uygulanabilecek bir yöntem olmasına rağmen işlem maliyetinin yüksek olması ve toksik ekstraktların atıkları bu sistemi tam olarak uygulanabilir kılmamaktadır. Ayrıca bu organik çözücülerin üründen uzaklaştırılması işlemi de bu sistemin diğer bir dezavantajıdır. Yağlı tohumların işlenmesinde uygulanan proses, aflatoksinlerin tamamına yakın kısmının uzaklaşmasını sağlamaktadır.

Methanol ve etanol gibi polar çözücüler efektif olarak bu sistemlerde kullanılsa da aynı ortamda bulunan farklı gıda bileşenlerinden ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilirken bazı problemler oluşmaktadır. Örneğin % 80'lik izopropanol pamuk çekirdeği ve yerfıstığında bulunan aflatoksinini tamamen uzaklaştırırsa da % 8,7-9,5 oranlarında katı kısım uzaklaşmasına neden olurlar [124].

2.2.6.7. Adsorbsiyon

Bazı adsorbanlar sıvı solüsyonlarda aflatoksinlere bağlanarak gıdadan uzaklaştırılmasına yardımcı olurlar [125]. Aktif kömür ve bentonit bu amaçla en çok

kullanılan iki adsorbandır. Adsorban partikül büyüklüğü ve uygulama sıcaklığı mikotoksinlerin uzaklaştırılması için optimizasyonu gerekli parametrelerdir [126]. Aktif kömürün (3-5 g/L) 5 dk uygulanması ile elma suyunun patulin miktarında büyük oranda azalma meydana getirdiği belirtilmiştir [127]. Betonit süttten AFM1'in % 65-79 oranında azalmasına, sıvı solüsyondan % 100'ünün alınmasına yardımcı olmaktadır. Kane ve ark. [128] AFB1'in fıstık yağından atapulgit, kaolin ve novasil gibi kil bazlı ürünler kullanılarak % 99 oranında uzaklaştırıldığını belirtmişlerdir.

2.2.7. Detoksifikasyon Stratejileri

2.2.7.1. Fiziksel Metotlar

Mikotoksin detoksifikasyon amacıyla kullanılan birçok fiziksel yöntem mevcuttur. Bu yöntemler arasında termal degradasyon, gama radyasyonu ve tez kapsamında kullanmış olduğumuz plazma sterilizasyon yöntemi de yer almaktadır.

2.2.7.1.1. Isı Uygulaması

Aflatoksinler, 237 ile 306°C arasında değişen yüksek dekompozisyon sıcaklıklarına sahip olmaları nedeniyle ısıya oldukça dayanıklıdırlar. Aflatoksinlerin kısmen parçalanabilmeleri için sıcaklığın 150°C'nin üzerinde olması gereklidir [123].

Dolayısıyla mikotoksinler geleneksel gıda işleme tekniklerinde kullanılan sıcaklık aralıklarına (80–121°C) dayanıklıdır. Pişirme, haşlama, kızartma ve hatta pastörizasyon sıcaklıklarında yapıları stabil olarak kalmaktadır [129]. Mikotoksinlerin ısı hassasiyeti gıdanın nemi, pH'sı ve iyonik kuvvetine bağlı olarak değişmektedir. 150–200°C arasında 30 dk süre ile gerçekleştirilen kavurma veya kızartma işlemleri ile % 20-60 oranında toksin kaldığı belirtilmiştir.

Aflatoksinin ısı ile degradasyonunda kritik faktörün ürünün nem içeriği olduğu belirtilmiştir. Nem içeriğinin fazla olması aflatoksinin ısı ile inaktivasyonunu kolaylaştırmaktadır. Nemin varlığı, AFB1'in lakton halkasının açılarak terminal karboksilik asit oluşmasına neden olmaktadır. Daha sonra karboksilik asit ısının etkisiyle dekarboksilasyona uğramaktadır [126,130].

Gıdanın nem içeriğinin artırılması ile aflatoksin degradasyonu artmaktadır. Örneğin % 30 nemli pamuk çekirdeği küspesindeki AFB1 ve AFB2 karışımının %

74,8'i 100°C'de 1 saat ısı uygulamasıyla degrade olurken nem % 6,6'ya indirildiğinde toplam degradasyon % 32,7'ye düşmektedir [123].

Yüksek sıcaklık ve basınç esasına dayanan ekstrüzyon pişirme gıdalarda bulunan birçok doğal toksinin yıkımı için kullanılabilecek bir tekniktir [131]. Yüksek enerjili mikrodalga uygulamasının neden olduğu sıcaklıkların da mikotoksinlerin degradasyonunda etkili olduğu belirtilmektedir [130].

pH değişimi aflatoksin detoksifikasyonu üzerine oldukça etkilidir. pH 10'da AFB1'de 98°C'de % 97; AFB2'de 50°C'de % 87 oranında degradasyon görülürken aynı koşullarda AFG1 ve AFG2'nin tamamen degrade olduğu belirtilmiştir [132].

2.2.7.1.2. İyonize Radyasyon

İyonize radyasyon hasat sonrası mikotoksin kontrolü için kullanılan bir yöntemdir. Soğuk sterilizasyon adıyla da anılan irradyasyon gıda kaynaklı patojenleri oda sıcaklıklarında inaktive edebilmektedir [133]. Mikotoksin degradasyonunun etkinliği ışın dozununa ve gıda ve toksinin cinsine bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte ortamda bulunan su ışınlamada kritik bir rol oynamaktadır. Suyun radyolizi ile oluşan serbest radikaller aflatoksin degradasyonunu sağlamaktadır [123,130].

Aflatoksinler ayrıca UV radyasyonuna karşı çok hassastır. 222, 265 ve özellikle 362 nmdeki ışınları adsorblamaktadırlar. Kurutulmuş incirlere uygulanan 365 nm UV ışını 30 dk sonunda AFB1 miktarında % 46 oranında azalmaya neden olmuştur [134].

Temcharoen ve Thilly [135] 1 ve 10 kGy dozunda γ -ışını uygulanan yarfıstığı örneklerinde sırasıyla % 75 ve % 100 azalma görüldüğünü belirtmiştir. 10 kGy dozun üstündeki uygulamalarda tohumlarda çimlenme durması ve yağlarının peroksit değerlerinde artış meydana gelmiştir [136].

Alternatif olarak solar enerjinin kullanıldığı çalışmalar da gerçekleştirilmiş olup işlemin etkinliğinin içerdiği UV ışınlar olduğu belirtilmiştir [134,137]. Yeni gelişen teknoloji ve fikirler doğrultusunda 600 ppb AFB1 içeren fıstık yağı saydam cam ve yarı saydam plastik kaplara konularak 18-24 saat güneş ışığına muruz bırakılmıştır. Toksinin tamamen degrade olduğu belirtilmiştir [128].

Plazma uygulaması da fiziksel detoksifikasyon yöntemlerinden biri olup Bölüm 2.3'te detaylarıyla belirtilmiştir.

2.2.7.2. Kimyasal Metotlar

Çok geniş kapsamda kullanılan kimyasallar mikotoksinleri inaktive etmekte, azaltmakta ve parçalamaktadır. Bu uygulamalar aşağıda detaylarıyla belirtilmiştir.

Birçok kimyasal aflatoksinlerle reaksiyona girerek daha az toksik bileşenler oluşmasına neden olabilir. Bununla birlikte birçok kimyasal uygulama ya pratik değil (uç sıcaklık ve basınçlarda gerçekleşmekte), ya güvenli değil (toksik kalıntılar oluşabilmekte) ya da gıda uygulamaları için elverişsizdir (ürünün duyuusal, besinsel ve fonksiyonel özelliklerini indirger).

2.2.7.2.1. Asit Uygulaması

Asit uygulamalarında suyun da yardımıyla AFB1 ve AFB1 hemiasetal formları olan AFB2a ve AFG2a'ya dönüşmektedirler. HCl (pH:2) uygulamasıyla AFB1 seviyesinde % 19,3 oranında degradasyon meydana gelmektedir. Tabata ve ark. [138] % 1'lik HCl ve H₂SO₄ solüsyonlarının AFB1 ve AFB2'yi tamamen; AFB2a ve AFG2a'yı sırasıyla % 13 ve % 18 oranında azalttığını belirtmişlerdir.

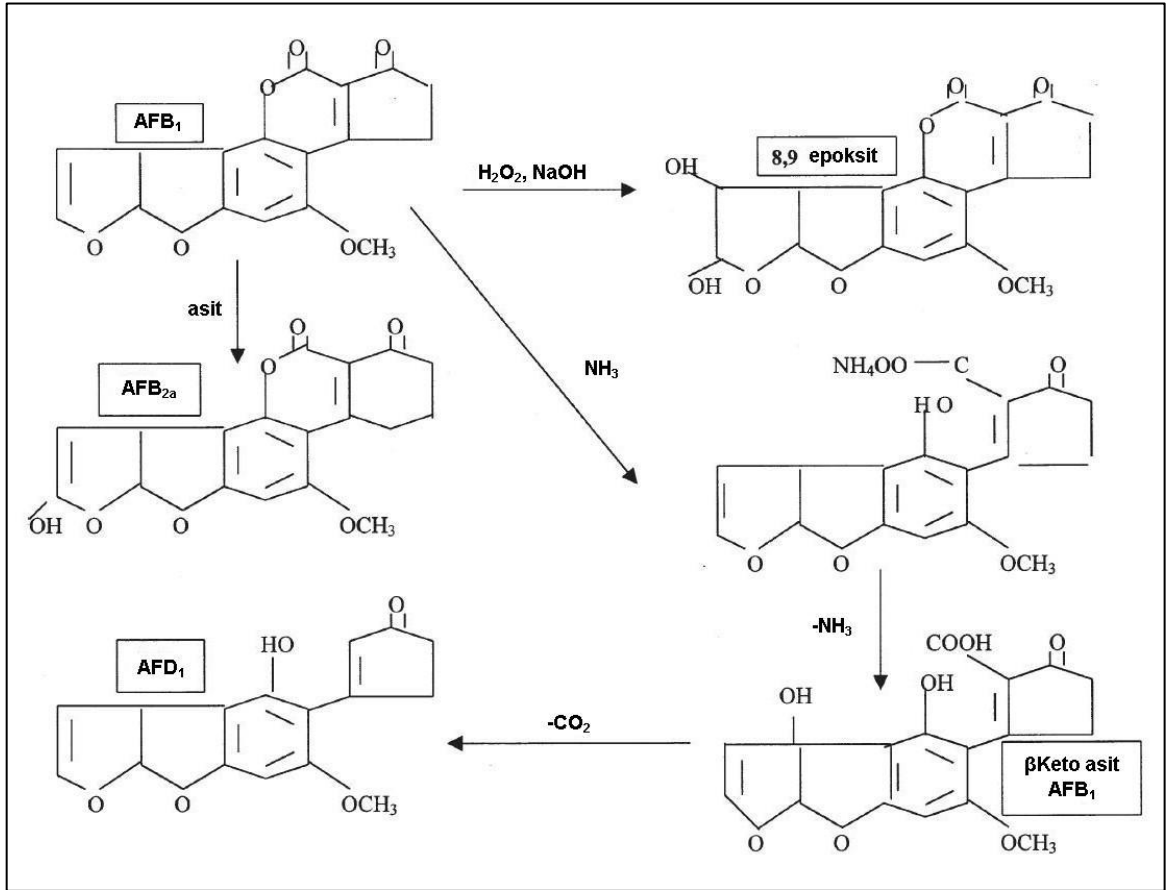
2.2.7.2.2. Baz Uygulaması

İnorganik ve organik bazlar aflatoksinleri ve diğer önemli mikotoksinleri yüksek miktarlardaki bulaşılı tarım ürünlerinden detoksifiye eden etkili ve ucuz kimyasallardır. Bu kimyasal ajanların arasında amonyaklama, aflatoksin bulaşmış tarım ürünlerini ve yemleri detoksifiye etmek için gerekli görülen bir uygulamadır. Bu yöntem, pamuk, mısır, yer fıstığı unlarını detoksifiye etmek için Kuzey Amerika'daki bölgeler (Arizona, Kaliforniya, Teksas, Alabama) ile Fransa ve Senegal'de uygulanmaktadır [139, 140].

Amonyak uygulamasında amonyum hidroksit veya gaz fazında amonyak kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu uygulama düşük basınçta kullanıldığında ihtiyaç duyulan kimyasal miktarı da azalmaktadır. Yüksek sıcaklık-yüksek basınçta (80–120°C/35–50 psi) amonyak uygulaması pamuk çekirdeği ve küspesinde ticari aflatoksin detoksifikasyon işlemi olarak kullanılmaktadır [121]. Amonyak uygulamasına tabi tutulmuş AFB1 lakton bağında hidrolize neden olmakta ve devamında dekarboksilasyon işlemi ile AFD1 ve AFB1'in β-keto asit formu oluşmaktadır (Şekil 2.6).

Sodyum, potasyum veya kalsiyum hidroksit gibi bazik ajanların mikotoksin degradasyonu üzerindeki etkisi amonyak uygulamasından elde edilen etkiden azdır. 110°C'deki AFB₁ çözeltilerine farklı alkalilerin yıkım gücü sıralaması şöyledir [130]: Potasyum hidroksit > sodyum hidroksit > potasyum karbonat > sodyum karbonat > potasyum bikarbonat > amonyum hidroksit > sodyum bikarbonat > amonyum karbonat

Amonyak kullanma prosesinin en önemli kısımlarından biri de üründen havalandırma ile amonyağın uçurulması gerekmektedir. ABD'de Food and Drug Administration (USFDA) tarafından, amonyak işlemini görmüş yem hammaddesinin (pamuk tohumu için) % 20'den fazla katılmaması ve uyarıların etikette bulunması gibi koşullarla geviş getiren hayvanlarda yem olarak kullanımına izin verilmiştir.

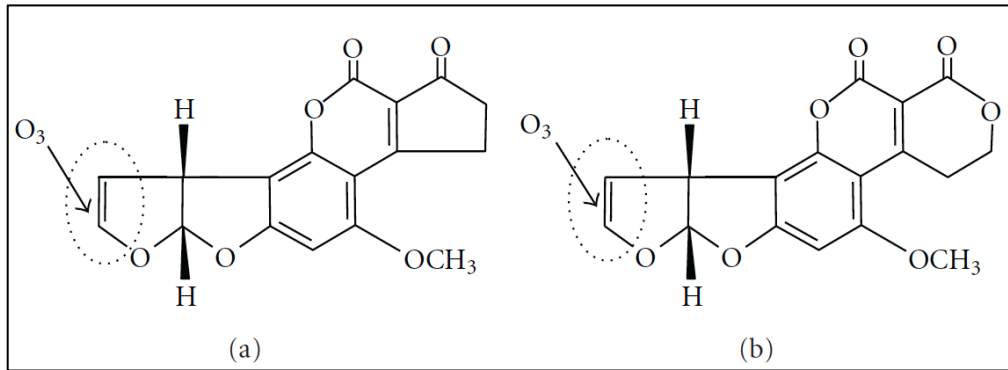


Şekil 2. 6 AFB₁'in tahmini degradasyon mekanizması [112]

2.2.7.2.3. Okside Edici Ajan Uygulamaları

Ozon (O_3) çok güçlü bir oksidan olup özellikle olefinik çift bağlara etkili olmasının yanında birçok kimyasal gurupla da etkileşime girebilmektedir [141].

Pamuk tohumu ve fıstık küspesine uygulanan O_3 ürünlerin aflatoksin miktarlarında düşüşe neden olmaktadır [142]. AFB1, AFG1 ve AFM1'in terminal furan halkalarındaki C=C doymamış çift bağı O_3 ve diğer okside edici ajanlara karşı dayanıksızdır. Bununla birlikte terminal furan halkalarında çift bağ içermeyen AFB2, AFG2 ve AFM2 ozon oksidasyonuna dayanıklıdır [106]. Ozon floritten sonra ikinci en büyük okside edici ajandır. Bu özelliği onu iyi bir sanitasyon ve detoksifikasyon ajanı yapmaktadır [143]. Bununla birlikte yüksek reaktiviteye ve penetrasyon özelliğine sahiptir ve kendiliğinden toksik olmayan oksijene dönüşerek herhangi bir toksik kalıntı bırakmaz [144]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ozonu gıda sanayisinde kullanılabilecek güvenli ve efektif bir yöntem olarak onaylamışlardır [145-147].



Şekil 2. 7 Ozon uygulamasının aflatoksinlerin furan halkasındaki 8,9 çift bağına bağlanmasının şematik gösterimi (a) AFB1 and (b) AFG1 [148]

İnan ve ark. [149] ozon uygulamasıyla kırmızı pul biberde AFB1 detoksifikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Akbas ve Ozdemir [150] pul biberdeki ve Akbas ve Ozdemir [151] fıstıklardaki aflatoksinin ozon uygulamasıyla degradasyonunu incelemişlerdir. Şekil 7'de ozonun aflatoksinler üzerindeki etkisi belirtilmiştir.

Hidrojen peroksit ticari uygulamalarda aflatoksinler, ZEN ve DON'u detoksifiye etmekte kullanılmaktadır [152]. Altuğ ve ark. [134] incirlerde aflatoksin

degradasyonunu hidrojen peroksit ve sodyum bisülfid varlığında % 65,5 oranında gerçekleştirmişlerdir.

2.2.7.2.4. İndirgeyici Ajanlar

Sodyum bisülfid (NaHSO_3) gıda ve içecek katkısı olarak enzimatik degradasyon inhibitörü, antioksidan ve bakteriyostatik olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte aflatoksin detoksifikasyonunda da kullanılmaktadır. AFB1'e uygulandığında ana reaksiyon ürünü sülfonattır. NaHSO_3 de aflatoksinlerin furan halkasındaki çift bağa etki etmektedir [140].

Mısırlarda % 0,5 ve % 2'lik NaHSO_3 solüsyonu sırasıyla % 80 ve % 90 miktarında azalmaya neden olmuştur [126]. 100 ppm AFB1 ile kontamine edilmiş kuru incir örnekleri 200 ppm sodyum sorbat uygulamasına tabi tutulmuş ve toplam aflatoksin miktarında % 68 indirgenme tespit edilmiştir. Bununla birlikte sorbik asit uygulaması ısı ve UV radyasyonu gibi fiziksel uygulamalarla kombine edildiğinde etkisi % 95 düzeylerine kadar artmaktadır [153].

2.2.7.2.5. Klorlama Ajanları

Sıvı klor gıda endüstrisinde malzeme dezenfeksiyonunun yanı sıra meyve-sebze, fındık, balık ve hatta et gibi ürünlerin dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Bununla birlikte klor ve sodyum hipokloritin toksinleri parçaladığı yönünde çalışmalar belirtilmiştir [154,155].

Gaz formundaki (% 10) klorun fıstık küspesindeki aflatoksinin % 90 oranında azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Yazıcı ve ark. [155] tiamin hidroklorit ve piridoksin hidroklorit 6 ay depolama sonunda elma sularındaki patulini tamamen yok ettiğini belirtmişlerdir.

2.2.7.2.6. Diğer Uygulamalar

Formaldehit, potasyum permanganat, sodyum borat ve % 75'lik metanol çözeltisi birçok mikotoksinin belirli derecelerde detoksifikasyonunu sağlamaktadır [140].

Bununla birlikte bu kimyasal ajanların gıda ve yemlerde yaratabileceği toksik ürün kalıntısı bırakma problemlerinden dolayı yasaklanmışlardır [130]. Bu kimyasallar dışında yukarıda bahsi geçen diğer kimyasallar da belirli oranlarda aflatoksinleri detoksifiye etmiş olsalar da bunların yanında gıdaların besinsel değerlerinde azalmaya neden olmakta, toksik bileşenler oluşturabilmekte ve istenmeyen etkilere

sebepe olabilmektedirler. Bu durum kimyasal kullanımını geniş kapsamda kısıtlamaktadır. Elektroliz uygulanmış NaCl çözeltisi de aflatoksin detoksifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır [156].

2.2.7.3. Biyolojik Metotlar

Fiziksel ve kimyasal aflatoksin detoksifikasyon yöntemlerinin sahip olduğu dezavantajlar alternatif teknoloji ve sonuçların aranmasına neden olmuştur. Bu bağlamda moleküler biyoloji ve genetik mühendislikte kullanılan teknikler kullanılarak aflatoksin sorunu çözümlenmeye çalışılmıştır [108,157]. Birçok fungal kültür AFB1 detoksifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır.

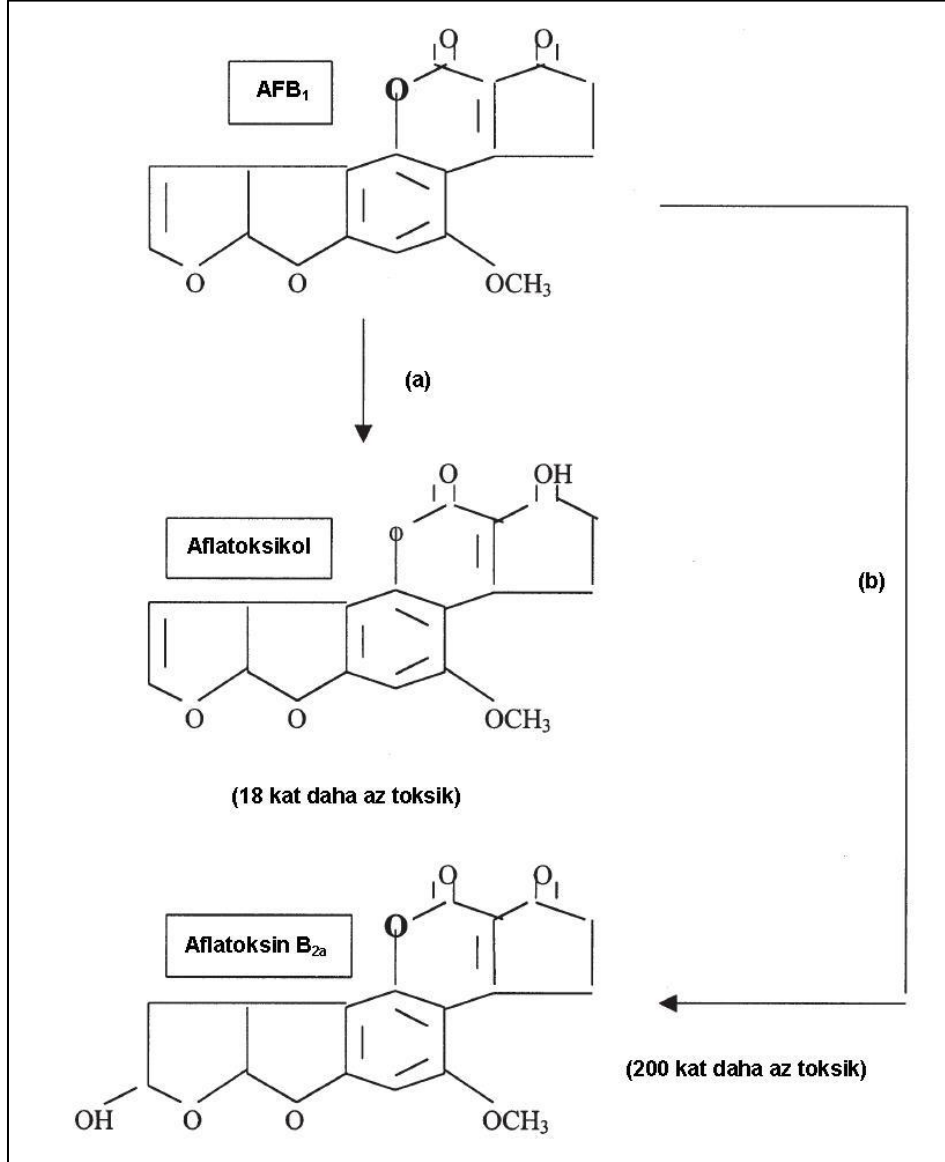
Lactobacillus, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* türlerinin bazı suşları sütteki OTA ve AFB1'i fermantasyon yoluyla degrade edebilmektedirler [157,158]. *Flavobacterium aurantiacum* gıdalardan, özellikle süt, fıstık ve mısırdan AFB1'i toksik bir yan ürün oluşturmadan uzaklaştırmaktadır [22,159].

Bakteriler ve asit üreten küfler dahil birçok mikroorganizma aflatoksinleri metabolize ederek daha az toksik bileşenlere parçalanmasını sağlayabilir. *F. aurantiacum* bunlar içerisinde en popüler ve literatürde etkisi en fazla incelenidir. AFB1'i yaklaşık 1000 kat daha az toksik olan AFB2a'ya çevirebilmektedirler (Şekil 2.8) [160].

Özkaya [159] *F. aurantiacum* NRRL-B-184'nin fosfat tamponu ortamında % 79,9–98,9; fıstıklarda % 92,6–99,8 ve kırmızı biberde % 88,7–100 oranlarında 48 saat içinde AFB1'in dekontaminasyonunu sağladığını belirtmiştir. D'Souza ve ark. [161] divalent katyonların *F. aurantiacum*'un AFB1 degradasyonunu stimüle ettiğini belirtmiştir. Fakat bu mikroorganizmanın parlak turuncu pigmentasyonu gıdalarda ve yem fermantasyonunda kullanımını sınırlandırmaktadır.

Mikrobiyal sistemlerden izole edilen enzimler de aflatoksin degradasyonuna neden olmaktadır. Enzim kullanarak gerçekleştirilen detoksifikasyon yönteminde mikroorganizma kullanarak gerçekleştirilirken karşılaşılan renk değişikliği veya besinsel değerlerde meydana gelen değişimler gibi sorunlar yaşanmamaktadır. Bununla birlikte degradasyon aktivitesi daha yüksektir. *Pleurotus ostreatus*'tan aflatoksin degradasyon yeteneğine sahip aflatoksin saflaştırılmıştır. Liu ve ark. [162] *Armillariella tabescens* E-20'den saflaştırdıkları aflatoksin detoksifizim (ADTZ) adlı enzimi kullanarak AFB1 detoksifikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu

enzimin AFB₁'in difuran halkasında açılmaya neden olduğu belirtilmiştir. Enzim 35°C ve pH 6,8'de optimum aktivite göstermektedir.



Şekil 2. 8 (a) Rhizopus türleri tarafından biyolojik olarak indirgenmiş AFB₁ [163]; (b) *Lactobacillus delbrueckii* tarafından indirgenen AFB₁'in hidroksi türeği [164]

Biyolojik yöntemler kullanım açısından yüksek maliyet gerektirebilmekte, dirençli türler gelişim açısından uzun zaman gerektirmekte ve bazı küf ve bakterilerde beklenmeyen enfeksiyonlar meydana gelmektedir.

Aflatoxinlerin yüksek kimyasal stabiliteleri onların UHT gibi gıda ürün işleme koşullarında da stabil olarak kalmalarını sağlamaktadır [165,166]. Bununa birlikte

asidik koşullardan ve proteolitik enzimlerden de etkilenmedikleri gibi vücuda alınan aflatoksinler idrar yollarından çıkarken aynı kararlı yapılarını korumaktadır [167].

2.2.8. Aflatoksinlerin Gastrointestinal Sistemde Absorblanmasının Engellenmesi

Aflatoksinlerin gastrointestinal sistemden absorban maddelerle absorblanarak biyolojik etkilerini sınırlandırmak veya sonlandırmak temel amaçtır [168,169].

Hidrate sodyum kalsiyum alüminosilikat (HSCAS), zeolit, bentonit ve belirli killer kullanılmaktadır. Bu absorbanlar mikotoksinlere yüksek afinitesi olan maddelerdir [170,171]. Maya hücre duvarından elde edilen polisakkaritler (glukan ve mannan) ve lipitler de aflatoksin adsorblama özelliği göstermektedir [171].

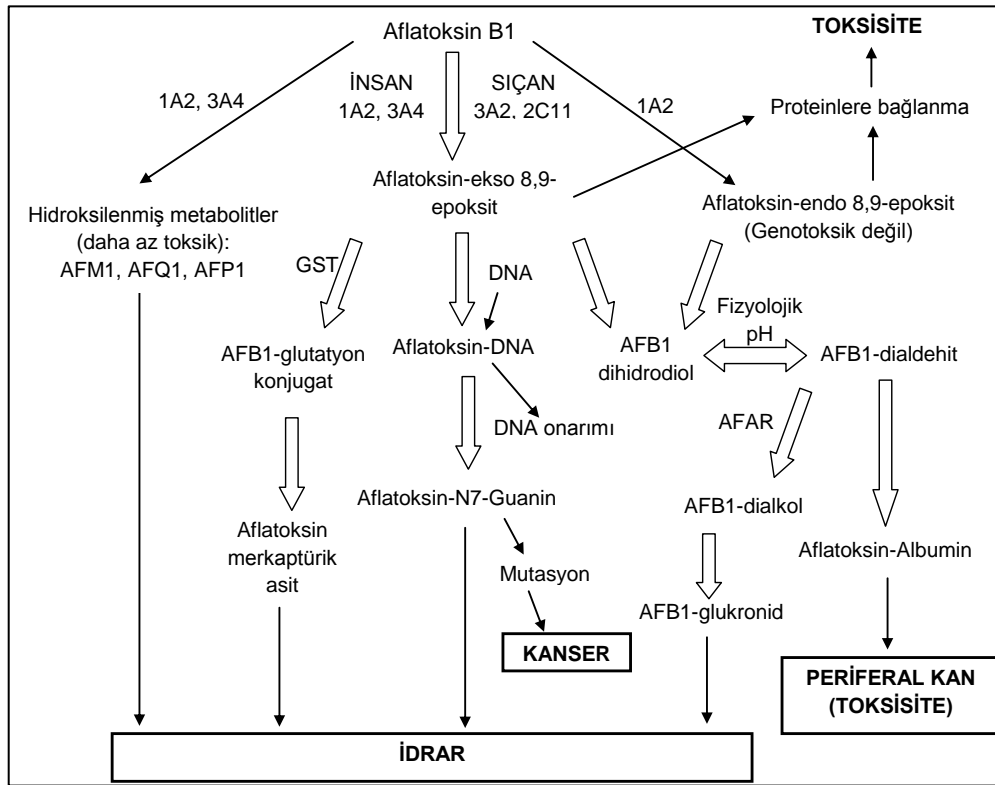
Mikotoksin adsorblanmasını adsorbanların fiziksel yapıları, uygulama dozu, toplam yük dağılımı, por çapı, yüzey alanı ve mikotoksinin fizikokimyasal yapısı etkileyen temel etkenlerdir [171]. Polar fonksiyonel guruba sahip olan aflatoksinler birçok adsorban ile adsorblanmasına rağmen, ZEN ve OTA gibi polar olmayan mikotoksinlerin negatif yüklü hidrofilik olan bu materyaller tarafından adsorblanması güçtür [172].

Aktif kömür yüzey kütle oranı yüksek (500–3500 m²/g) olan, toksik olmayan ve çok güçlü adsorblama özelliğine sahip olan bir maddedir. Aktif kömür özellikle hidrojen bağı yoluyla etkisini sağlamaktadır [173].

Son yıllarda gastrointestinal sistemden aflatoksin adsorbsiyonunu gerçekleştirmek için mikroorganizmaların kullanımı tartışılmaktadır [174]. Laktik asit bakterileri ve Bifidobakterlerin aflatoksin bağlama yetenekleri olduğu birçok çalışma ile de doğrulanmıştır [158,175]. Aflatoksinlerin mikroorganizmalar tarafından bağlanma oranları AFB1> AFB2> AFG1>AFG2 olarak sıralanmaktadır. Burada da hidrofobik etkileşimler ön plandadır [119].

2.2.9. Aflatoksin B1'in Vücuttaki Etki Mekanizması

Aflatoksinlerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinden biyotransformasyonları sonucu oluşan toksik ana ürünler sorumludur. AFB1 'in metabolizması Şekil 2.9'da şematize edilmiştir. Hepatotoksik ve kanserojen olan AFB1'in karaciğer kanserine neden olması molekülün nükleik asitlere etkisinin sonucu olarak görölmektedir [176].



Şekil 2. 9 Aflatoxin B1'in vücuttaki metabolizması [87,177-179]
AFAR: AFB1 redüktaz

AFB1'in sitokrom aracılıklı (P 450) oksidasyonu ile detoksifikasyon ürünleri olarak AFM1, AFP1, AFQ1 gibi çeşitli hidroksile metabolitler oluşabilmektedir [180]. Sitokrom P450 enzimleri aflatoxinleri hem DNA hemde proteinlere bağlanabilen reaktif 8,9-epoksit formuna dönüştürürler. Bu epoksit formu glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi vasıtasıyla AFB1-glutatyon konjugatı oluşturur.

Karaciğerdeki sitokrom P450 enzimlerinin bazı izozimleri aflatoxinleri hem DNA hemde proteinlere bağlanabilen reaktif 8,9-epoksit formuna dönüştürürler. Bu elektrofilik epoksit DNA, RNA ve protein gibi hücrel makromoleküllerdeki çeşitli nükleofilik merkezlere kovalent olarak bağlanabilir [181].

Reaktif aflatoxin epoksit guaninlerin N₇ pozisyonuna bağlanırlar ve aflatoxin AFB1-N₇-Gua kompleksi oluşturularak GC'den TA dönüşümüne neden olurlar. Epoksit formunun oluşumunda CYP2C11, CYP2B ve CYP1A2 izozimleri rol almaktadır. Epoksit formunun endo ve ekzo izomerleri bulunabilmektedir. İnsanlarda AFB1 8,9-epoksit formunun oluşumunda baskın olan CYP izozimi

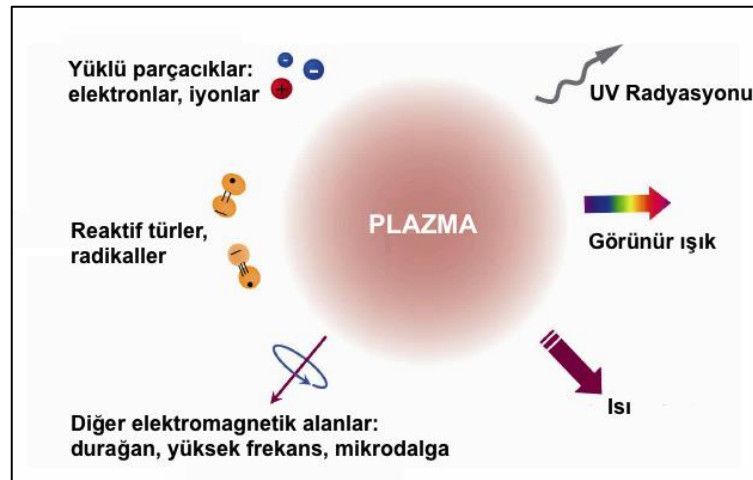
3A4'tür. Özellikle insanlarda CYP3A4 aracılığıyla oluşan ürün sadece ekzo izomer formundadır [182].

Diğer CYP450'ler aracılığıyla ise hem ekzo hem de endo epoksit formları oluşabilmektedir. Ekzo epoksit formu yüksek elektrofilik aktiviteye sahiptir ve sadece bu form DNA ile reaksiyon gösterir [179, 183, 184]. Hem ekzo hem de endo epoksit, GST tarafından katalizlenen GSH konjugasyonu için substrattır, dolayısıyla GSH tüketicisidirler.

AFM1, AFB1'in hidroksillenmiş türevlerinden biridir ve karsinogenik etkisi aflatoksin B₁'den 10 kat daha düşüktür. Aflatoksin Q₁ ve P metabolitleri de aflatoksin B₁'den çok daha az aktif olan maddelerdir. Bu nedenle bu reaksiyonlar, detoksifikasyon prosesi olarak kabul edilmektedir. Metabolizmada AFB1'in detoksifikasyonu hidroksillenmiş metabolitlerin sülfat ve glukuronik asitle birleşerek, suda çözünebilir sülfat veya glukuronid esterlerine dönüşmesi, ardından da idrar ve safra ile atılması ile tamamlanmaktadır [181].

2.3. Plazma, Yapısı ve Özellikleri

Plazma maddenin dördüncü hali olarak belirtilen yarı nötral gaz formudur. Evrenin yaklaşık % 99'u plazma formudur. Plazma fazı pozitif ve negatif iyonlar, elektronlar, metastabiller, atomlar, serbest radikaller ve fotonlar gibi birçok aktif türü içermektedir (Şekil 2.10). Plazma mekanik, termal, kimyasal, radyant, nükleer, voltaj uygulamasıyla ve elektromanyetik dalgalar vasıtasıyla veya bu etkenlerin bazılarının bileşimiyle oluşturulabilir [185].



Şekil 2. 10 Aktif plazma türleri

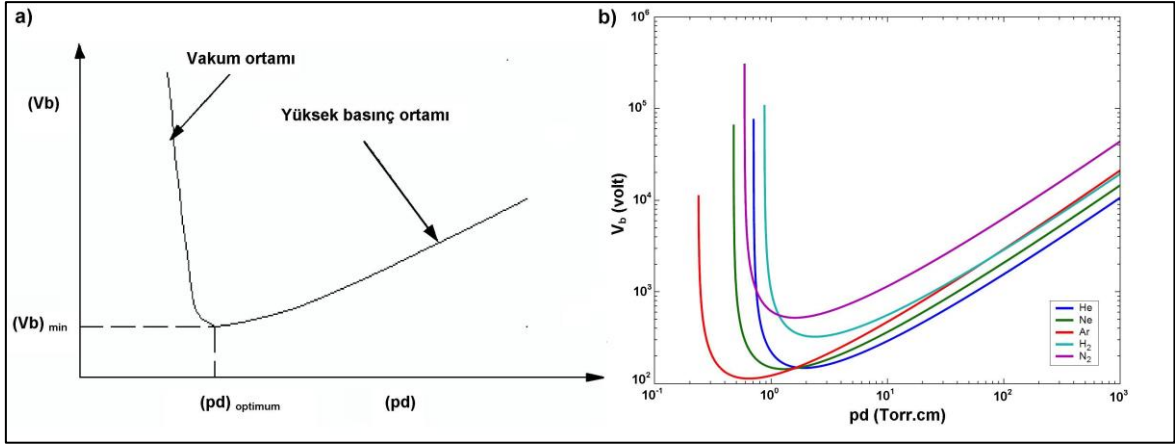
Elektronlar veya fotonlara besleme gazındaki doğal atom ve moleküllerle etkileşime girecek yeterli enerji verildiğinde yeni elektronlar ve iyonlar oluşmaktadır (elektron etkili iyonizasyon veya fotoiyonizasyon). Nötr formdaki gazın plazma oluşumunu sağlayacak yeterli enerjiyi sağlayacak birçok yol kullanılmaktadır [193].

Düşük basınçlı plazma oluşumu ve sürdürülebilirliği için en çok kullanılan metot gazın elektrik alan uygulanmasıdır. Nötr gazlar kozmik ışınlar veya radyoaktif radyasyon etkileşimiyle meydana gelmiş olan belirli bir miktar elektron ve iyon içermektedirler. Bu serbest yüklü taşıyıcılar elektrik alan uygulamasıyla ivmelendirilerek gaz içerisindeki atom veya moleküllere veya elektrot yüzeyine çarparak yeni yüklü parçacıkların oluşmasını sağlamaktadırlar. Bu durum yüklü parçacıkların çoğalması ve en sonunda dengeye gelmesine kadar sürmektedir ve sonunda stabil plazma fazı oluşmaktadır [186].

Plazma terimi ilk defa 1928 yılında Lewi Tonks ve Irving Langmuir tarafından kullanılmıştır [187]. Elektriksel olarak yüklü ve iyonize olan eşit sayıda atom ve molekül içeren maddenin bir halidir. İdeal gazların tersine iyonize gazlar uzun mesafeli Coulomb interaksyonlarına sahip oldukları için dinamik ve kolektif bir davranış göstermektedirler. Yüklü partiküller arasında meydana gelen elektromanyetik çiftlenme (Coulomb çekim ve itim) ve elektrik/manyetik etkilerin kolektif düzensizliği (serbest yüklü taşıyıcılar nedeniyle) Coulomb interaksyonlarını oluşturmaktadır [188].

Plazma fazının oluşturulması için uygulanan voltajın gazların kırılma gerilimini geçmesi gerekmektedir. Bu voltaja ulaşıldığında gazlar dielektrik özelliklerini kaybeder ve iletken özelliğe bürünürler.

Operasyonel harcamalar uygulanan gaz cinsine bağlı olarak kritik olabilmektedir. Helyum diğer gazlardan daha kolay iyonize olabilmektedir (Şekil 2.11). Bu da ihtiyaç duyulan iyonizasyon voltajının, dolayısıyla harcanan enerjinin azalmasına neden olmaktadır [190].



Şekil 2. 11 Kırılma voltajına karşılık pd değerlerini Paschen eğrileri [189]

$$V_b = f(pd)$$

Paschen yasası: V_B : kırılma gerilimi (volt), pd : basınç.mesafe (torr.cm)'nin bir fonksiyonudur.

Kırılma gerilimi belirtilen gazda sadece ürün pd 'sine ve katot materyaline bağlı olmakla birlikte ayrı ayrı p ve d değerlerine bağlı değildir. Paschen eğrileri farklı gazlar için aynı eğriye sahiptir. Tek fark eğrilerin farklı yerlere tekabül etmesidir.

Eğrilerden de açıkça görüleceği üzere belirli bir pd değerinde gazların minimum dayanma gerilimi bulunmakta ve bu değer yukarı ve aşağısındaki değerlerde dayanma gerilimi artmaktadır. Düşük pd değerlerinde çarpışmalar çok az olduğundan dayanma gerilimi yüksektir. Yüksek pd değerlerinde ise dayanma gerilimi çarpışma sayısı çok fazla olduğu için yine yüksektir. Minimum voltajın fiziksel önemi boşluğun veya basıncın ne kadar düşük olduğu ile ilgili değil minimum dayanma geriliminden daha düşük voltaj değerlerinde çarpışma olmamasından kaynaklanmaktadır [191,192].

2.3.1. Plazmanın Sınıflandırılması

Plazma genel bağlamda 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar yüksek sıcaklık veya füzyon plazması ve düşük sıcaklık veya gaz boşalimleridir. Bunların temel sınıflandırılması Çizelge 2.7'de belirtilmiştir. Yüksek sıcaklık plazması elektron, iyon ve nötr türlerin hepsini termal dengede kapsamaktadır. Düşük sıcaklık plazmaları ise yarı termal dengeli ve termal dengede olmayan plazmalar olarak ikiye ayrılmaktadır [191].

Çizelge 2. 7 Plazmanın sınıflandırılması

Plazma	Durum	Örnek
Yüksek sıcaklık plazması (Termal denge plazması)	$T_e \approx T_i \approx T_g, T_p = 10^6 - 10^8 K$ $n_e \geq 10^{20} m^{-3}$	Lazer füzyon plazma
Düşük sıcaklık plazması		
Sıcak plazma (Yarı termal dengede plazma)	$T_e \approx T_i \approx T_g \leq 2 \times 10^4 K$ $n_e \geq 10^{20} m^{-3}$	Ark plazma, plazma meşalesi, RF etkileşik çiftlenmiş plazma
Soğuk plazma (Termal dengede olmayan plazma)	$T_e \gg T_i \approx T_g = 300 \dots 10^3 K$ $n_e \approx 10^{10} m^{-3}$	Işıltılı boşalım, korona, APPJ, DBD, MHCD, OAUGDP, plazma iğnesi vb.

T_e =Elektron sıcaklığı; T_p =Plazma sıcaklığı; T_g =Gaz sıcaklığı; T_i =İyon sıcaklığı; n_e =Elektron yoğunluğu
DBD:Dielectric Barrier Discharge; MHCD:Micro Hollow Cathode Discharge; OAUGDP:one atmosphere uniform glow discharge plasma

Sıcak plazmada, ortamda esas olarak çok sayıda iyon vardır. Soğuk plazmada ise diğer elemanlardan da önemli miktarda bulunur. Plazma, gaz sıcaklığına bağlı olarak iki başlık altında incelenebilir [26].

- Yüksek sıcaklık plazmasının gaz sıcaklığı 10^6 K'den fazladır. Güneş sisteminde meydana gelen nükleer patlamalar ve kontrollü füzyon reaksiyonları yüksek sıcaklık plazmasına örnek olarak verilebilir.
- Düşük sıcaklık plazması; gaz sıcaklığı 10^6 K'den daha düşüktür.

Düşük sıcaklık, diğer adıyla soğuk plazmalar enerji yüklü elektronlar oluşturmakta ve gaz sıcaklığını çok fazla yükseltmemektedirler. Dolayısıyla plazma iyon fazı ve nötral içerikleri oda sıcaklıklarına yakın bir sıcaklık değerinde kalmaktadırlar. Plazma ortamının düşük sıcaklıkta olması bu çeşit plazmaların düşük sıcaklık gerektiren gıda ve biyomedikal ortamlarda kullanımını olanaklı kılmaktadır. Düşük sıcaklık plazmaları yüksek termodinamik dengesizliğe sahip olmalarının yanısıra, düşük gaz sıcaklığı ve reaktif kimyasal türlerin fazlalığı da bu plazmaların geniş bir alanda kullanılmasına olanak sağlamaktadır [191].

Düşük sıcaklık plazması da iki başlık altında incelenebilir:

(i) Sıcak plazma; gaz sıcaklığı 1000 K'den daha fazladır ve normal şartlarda 10^4 K civarındadır. Lamba ışınması, elektrik arkı ve diğer yüksek güç boşalımları sıcak plazmaya örnek olarak verilebilir;

(ii) Soğuk plazma; gaz sıcaklığı 1000 K'den daha düşüktür, normal şartlarda 10^2 K civarındadır. Düşük basınçta gerçekleşen yük boşalım plazmaları soğuk plazmaya örnektir [193].

2.3.1.1. Düşük Basınç (Vakum) ve Atmosferik Basınç Plazmaları

Atmosferik basınçta ısıl olmayan plazma, proses gazının elektrik alandan geçirilmesiyle oluşmaktadır. İyonizasyon prosesiyle oluşan elektronlar bu elektrik alanda hızlandırılmakta ve darbeli iyonizasyon (impact-ionization) prosesi tetiklenmektedir. Eğer bu işlemde kaybolan elektronlardan fazla serbest elektron üretilirse boşalım oluşur. İyonizasyon derecesi teknik olarak kullanılan plazmalarda çok düşüktür (genellikle 10^{-3} veya daha düşük).

Bu serbest yüklü taşıyıcılar tarafından üretilen elektriksel iletkenlik, elektriksel gücü bir araya getirmek için kullanılır. Gaz atomları veya molekülleriyle çarpışan serbest elektronlar gıdalarla etkileşime giren yüksek reaktivitedeki ürünleri oluşturur. Elektronların enerjileri organik moleküllerdeki kovalent bağların ayrılmasını sağlayacak güçtedirler. Proses gazı olarak kullanılacak gazların ayrışma enerjileri oksijen için 5,7 eV ve azot için 9,8 eV'tur. Kısa ve uzun UV aralığında (100–380 nm) yayılan ışık birçok fitokimyasal reaksiyonu indüklemektedir. Radikal oksijen ve azottürleri oksidasyon, ayrılma yada polimerizasyon reaksiyonlarına neden olmaktadır.

Soğuk plazma boşalımlarını atmosferik plazma koşullarında gerçekleştirmek dekontaminasyon ve detoksifikasyon proseslerini daha pratik ve ucuz yapmaktadır [194].

Atmosferik basınç (1 bar, 100 kPa) temelli sistemler kullanılırken vakum reaktörüne gerek duyulmamaktadır. Sistemin vakum kapağı veya contası olmadığına proses edilecek materyal işlem alanına/plazma bölgesine konveyör veya herhangi bir taşıyıcı sistemle taşınabilmektedir. Atmosferik ortamda gerçekleştirilen işlemler iyonizasyon işleminin zor gerçekleştirilmesi sebebiyle bazı

zorlukları beraberinde getirmektedir. Paschen eğrilerinden de görüleceği üzere atmosferik basınç temelli plazma üretimi için yüksek voltaj gerekmektedir. Yüksek plazma voltajı üniform ve stabil bir plazma alanı oluşturmada zorluğa neden olmaktadır. Bununla birlikte plazma sıcaklıkları da düşük basınç plazmalarına göre daha yüksek olmaktadır. Bu durum özellikle gıda yüzeylerine uygulanacak plazmalarda hesaba katılması gereken bir durumdur. Bu sorunu çözümlmek için iyonizasyon potansiyelini düşürecek gaz karışımları kullanılmaktadır [190].

Atmosferik plazmalar yüksek antibakteriyel özelliğe sahip molekülleri (>100 ppm ozon, nitrik oksitler, peroksitler vb.) oda sıcaklığında, düşük güç parametrelerinde ve birkaç saniyeden birkaç dakikaya süren uygulama zamanlarında içerirken, ürün yüzeyinde meydana gelen sıcaklık artışını minimumda tutmaktadırlar. Klockow ve Keener [195] ıspanak kalitesinin ve raf ömrünün artırılması amacıyla gerçekleştirmiş oldukları atmosferik plazma prosesinde ürün sıcaklığının 5°C'den daha az arttığını belirtmişlerdir.

Düşük basınç-ışılı boşalım plazmaları birçok temel araştırma alanına sahiptir ve mikroelettronik endüstrileri ve materyal teknolojilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu plazmalar hava olmayan ortamlarda işlevsellik kazandıkları için vakum reaktörler bu sistemleri yüksek maliyetli ve zaman harcayan sistemler yapmaktadır. Ayrıca aktif türlerin yoğunluğunun düşük olması atmosferik basınçta çalışıp düşük basınç özelliklerine sahip olabilecek yeni plazma kaynaklarının araştırılması için teşvik unsuru olmaktadır. 1 atm basınçta çalışan plazma sistemleri ekonomik ve operasyonel avantajlara sahiptir ve birçok bilimsel ve endüstriyel uygulamada kullanım alanı bulmaktadır.

Düşük basınç sistemleri ekonomik dezavantajlarının yanında sürekli sisteme (sürekli akışlı, konveyörlü sistemler) uygulanabilirlik açısından birçok problemi beraberinde getirmektedir. Dolayısıyla düşük basınçlı sistemler sürekli sistem yerine kesikli sistemler olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel boyutta üretimler için kesikli sistemler üretim hızı ve proses edilen materyal hacmi bazında sorunlara sebep olmaktadır. Dolayısıyla atmosferik basınç temelli sürekli sistemler endüstriyel üretimler için bir adım öne çıkmaktadır.

Atmosferik basınç-düşük sıcaklık plazma sistemleri birçok elektriksel boşalım tekniği ile oluşturulabilmektedir. Bunlardan başlıcaları korona boşalımı, mikro

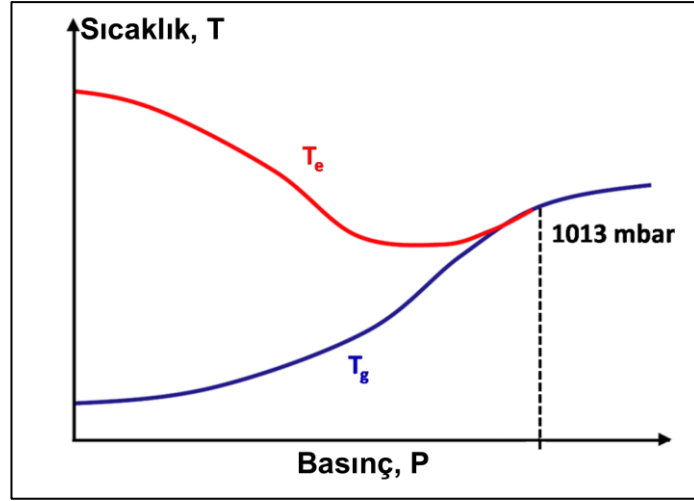
silindir katot boşalımı, atmosferik basınç plazma jeti, ışıltılı ark boşalımı, tek atmosferik üniform ışıltılı boşalımı, dielektrik bariyer boşalımı ve plazma iğnesidir. Bu plazmaların herbiri farklı teknolojik uygulamalarda kullanılabilir [191]. Plazma fazındaki gaz moleküllerinin uyarılması elektronlar, protonlar, uyarılmış moleküller ve iyonlar gibi aktif türlerin oluşmasını sağlamaktadır. Serbest radikallerin oluşması için gerekli enerji 3-4 eV iken iyonların oluşması için gerekli enerji 9-13 eV'tur. Düşük basınç plazmalarında ortalama enerjinin 2-5 eV olduğu ve bu enerjinin neredeyse her türlü bağı kırmaya yeterli olduğu belirtilmektedir. Atomlar arasındaki tipik bağ enerjileri Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2. 8 Organik yapıların disosiasyon enerjileri [196]

Bağ cinsi	Bağ enerjisi (kJ/mol)	Bağ enerjisi (eV)
C-H	411	4,25
C-C	346	3,56
C-N	276	2,86
C-O	358	3,70
C=C	602	6,23
C=O	724	7,50
C≡C	835	8,65
N-H	385	3,99
O-H	456	4,73

Soğuk plazmaların da neredeyse tamamı organik bileşiklerdeki bağları ayırmaya yetecek enerjiye sahiptir. Bu özellik yüksek moleküler ağırlığa sahip kontaminantların uzaklaştırılması için büyük öneme sahiptir.

Basıncın yükselmesiyle elektron ve gaz sıcaklıkları birbirine yaklaşmaktadır. Bunun başlıca sebebi elektron ve iyonlar arasındaki çarpışmanın artmasıdır [197]. Farklı türler arasındaki interaksiyon artan basınç veya elektron yoğunluğu nedeniyle artarsa T_e ve T sıcaklıkları bir dengede eşitlenmektedirler (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12 Gaz basıncının fonksiyonu olarak elektron ve iyon sıcaklıkları

Atmosferik plazmada elektronların ortalama serbest yolu çok kısadır ve elektronlar enerjilerini yeterli sayıda elastik çarpışma ile ağır türlere transfer ederler. Bundan dolayı gaz sıcaklığı elektron sıcaklığına yaklaşmaktadır. Vakum ortamında gerçekleştirilen plazmalarda elastik çarpışmalar az olduğu için elektronlardan enerji transferi sağlanması yeterli değildir. Gaz sıcaklığı oda sıcaklığında kalmaktadır [198].

Atmosferik plazma cihazında kullanılan jet çeşitleri plazma jet ucundan çıkacak aktif partikül yoğunluğu ve plazma etki alanını belirlemektedir. Çıkış açısı daha küçük olan tekli jetler, dar profillerin işlenmesi için daha uygundur. Daha geniş işlem alanları için ise yarık şeklinde çıkışa sahip birden fazla plazma jeti veya birkaç adet döner jet kombine edilebilir. Proses edilecek maddeye olan mesafeye ve hıza bağlı olarak yüzeyde elde edilecek etkinlik de değişebilmektedir.

Tez kapsamında kullanılan atmosferik plazma sistemi Plasmatreat® marka otomatik tarama sistemine sahip ve yukarıda belirtilmiş olan prob başlıklarına uyumlu bir sistemdir. Sabit plazma jetinin maksimum işlem genişliği 13-18 mm arasında değişebilmektedir. Döner jetlerin ise maksimum işlem genişliği ise 30-40 mm'dir. Mikroelektronik uygulamaları ve çok dar alanların işlenmesi için kullanılacak işlemlerde iğne uçlu proplar kullanılmaktadır (Şekil 2.13).



Şekil 2. 13 Çeşitli Plasmatreat® nozül başlıkları [199]

Döner plazma nodülü özellikle çalışılacak örnek gıda gibi ısıya duyarlı ve karmaşık geometriye sahip ise efektif olarak kullanılabilen bir seçenektir. Ayrıca plazma işlem genişliğinin fazla olması daha geniş alanda fazla miktarda ürün dekontaminasyonunun elde edilmesini sağlamaktadır.

2.3.2. Plazma Teknolojisinin Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması

Kimyasal ve biyolojik tehlikelerin geleneksel dekontaminasyon ajanları genellikle ıslak kimyasallar olmaktadır. Bu da bu kimyasalların depolanma, ulaşım ve atık sorunlarını beraberinde getirmektedir. Bu kimyasallar büyük oranda korozif yapıya sahip oldukları için gıda gibi hassas materyallere uygulanmaları sorun yaratmaktadır. Çizelge 2.9'dan da görüleceği üzere dekontaminasyon amacıyla kullanılan kimyasallar beraberinde birçok dezavantajı getirmektedir. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak adına ısı olmayan sterilizasyon teknikleri (ultraviyole ışınlar [200], gama radyasyonu [201], yüksek basınç [202]) geliştirilmiş olup bu tekniklerin de uygulama alanında bazı sıkıntıları mevcuttur. Yüksek uygulama maliyeti, özelleştirilmiş ekipman ve personel ihtiyacı, istenmeyen yan ürünlerin oluşması, uzun proses zamanları, düşük etkinlik gibi problemler bu yeni tekniklerin bazı dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır. Gama ışınlama uygulama etkinliği olarak mükemmel bir sterilizasyon aracı olarak görülse de yüksek tesis maliyetleri ve gıdalar üzerinde meydana getirebileceği değişimlerden ötürü bu teknoloji de endüstride tamamen tercih edilen yöntem olmaktan çıkmaktadır [203].

Çizelge 2. 9 Dekontaminasyon tekniklerinin karakteristik özellikleri [204]

Teknik	Hızlı	Kuru	Taşınabilir	Güvenli	Tahribatsız	Yeşil Teknoloji	Penetrasyon
Kimyasal yöntem	○	○	◐	○	○	○	◐
İyonize rad. (γ)	◐	●	○	◐	◐	◐	●
Non-iyonize rad. (UV)	○	●	●	●	◐	●	○
Termal	○	◐	◐	◐	○	●	◐
Ultrasonik	○	○	◐	◐	◐	◐	◐
Atmosferik plazma	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐
Düşük basınç plazması	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐

●=İyi; ◐=Orta; ○=Zayıf

Plazma sistemleri gıda güvenliği açısından kullanıcılarına birçok avantaj sunmaktadır. Bunlar;

- Kuru bir sistemdir, ıslak kimyasallar kullanımı gerektirmez.
- Gıda üretim alanına kolayca adapte edilebilir (atmosferik plazma sistemi).
- Enerji gerekliliği azdır.
- Reaktif gaz türleri dakikalar içinde orjinal gaz formlarını alabilir.
- Uygulama zamanı çok kısadır.
- Plazma yan ürünleri genellikle H₂O, CO₂, CO ve düşük moleküler ağırlıklı hidrokarbonlardır. Dolayısıyla çevre dostu bir teknolojidir. 10 dk otomobil eksozundan çıkan gazlar yaklaşık bir yıl plazma gazından çıkan eksoz gazına eşdeğerdir [205].
- Gerçekleştirilen yeni teknolojik yaklaşımlarla paket içerisindeki ürünün sterilizasyonu da sağlanabilmektedir.

Plazmanın gıda sektöründe kullanımına yönelik ilk laboratuvar ölçekli testler, termal dekontaminasyon metotlarının taze meyve ve sebzeler, et ve yumurta gibi

sıcaklığa hassas ürünlerin dekontaminasyon işlemlerine uygulanamayacağı görüşlerinden sonra ortaya çıkmıştır.

Plazma prosesinin bu kapsamdaki avantajları, düşük sıcaklıklarda (genellikle $<70^{\circ}\text{C}$) yüksek etkinlik, ihtiyaç duyulan kullanıma yönelik net plazma üretimi, etkin ajanların anında üretimi, ürünün iç matriksinde düşük etki etme, su ve çözücü kullanmadan uygulama, kalıntı bulunmaması, kaynak etkinliği olarak sıralanabilir.

Termal olmayan plazma farklı elektron ve gaz sıcaklıklarına sahiptir. Örneğin elektron sıcaklığı birkaç 10.000 K ve ortalama kinetik enerji 1 eV'tan büyük iken gaz sıcaklığı oda koşullarında olabilmektedir.

Plazma gıdalara direkt olarak uygulanabilir. Özellikle plazma kaynağı ile gıda arasındaki mesafe ayarlanarak bu işlem gerçekleştirilebilir. Tez kapsamında plazma ile gıda arasındaki mesafe, gaz üfleme hızı, plazma probunun x-y düzlemindeki hareket hızı ve güç parametreleri ayarlanarak gıda materyallerinde sıcaklık artışı minimum düzeye indirilmeye çalışılmıştır.

Gıda endüstrisinde soğuk plazma denilen ve doğrudan gıdalara uygulanabilecek direk veya yarı-direk olarak uygulama esasına dayanabilen ve genellikle 70°C 'nin altında işlem sıcaklığına sahip plazmalar kullanılmaktadır. Plazmaların gıda ile temas şekillerine göre çeşitlerini Çizelge 2.10'da da belirtildiği gibi sınıflandırabiliriz. Endüstride özellikle atmosferik basınçta çalışan (DBD, plazma jet) plazmalar tercih edilmektedir. Bunun sebebi sürekli sistemlere uygulanabilir olmaları ve düşük basınç ($p < 10$ mbar) ve indirgenmiş basınç ($p < 10^{-13}$ mbar) gibi istenmeyen faz değişikliklerini hızlandırmamalarıdır.

Çizelge 2. 10 Substratla temas biçimlerine göre plazma çeşitlerinin sınıflandırılması

Uygulama Şekli	Uygulama Biçimi	Örnek
Direk (doğrudan)	Plazma substrat ile direk olarak temas halindedir. Etkileşim radyasyon (UV, VUV), yüklü moleküller, radikaller ve aktif partiküller sayesinde olmaktadır.	<ul style="list-style-type: none"> • Plazma jeti • DBD
Yarı-direk (dolaylı) (afterglow)	Plazma ve substrat arasındaki mesafe ortalama serbest partikül yolundan uzundur. Yüklü partiküllerle etkileşim yoktur. Antimikrobiyal etki radyasyon, uzun ömürlü radikaller (özellikle metastabiller), inhibe edici bileşenler tarafından sağlanır.	<ul style="list-style-type: none"> • Plazma ile aktifleştirilen hidrojen peroksitle çalışan Sterrad • Aralık içeren SDBD
İndirek	UV ve VUV radyasyonu ile sağlanır. Plazma UV ve VUV geçirebilen kapalı bir reaktörde tutulur. Plazma partikülleriyle herhangi bir interaksiyon olmaz. Plazma gaz ve sıvılara uygulanır.	<ul style="list-style-type: none"> • UV lambalar

SDBD=Single DBD (Tekli Dielektrik Bariyer Sistemi)

2.3.3. Direk Kontakt veya Dolaylı Akış Plazmalarıyla Sterilizasyonun Avantaj ve Kısıtlamaları

Direk plazma boşalımında aktif plazma türleri daha fazladır. Fakat bununla birlikte literatürde “afterglow” diye tanımlanan dolaylı plazma uygulaması oldukça yaygındır. Dolaylı plazma uygulamasının sağladığı bazı avantajlar şöyledir:

- Mikrodalga gibi yüksek yoğunluklu plazmalarda gaz sıcaklığı birkaç yüz dereceyi bulmaktadır. Dolaylı uygulamalarda bu sıcaklık 50°C’den düşüktür. Sıcaklığa duyarlı ürünler için bu önemli bir kriterdir.
- Direk plazma uygulamaları özellikle pozitif iyonların etkisiyle uygulama yüzeyinde değişikliklere neden olmaktadır. Dolaylı plazma uygulamalarıyla bu değişiklikler minimum seviyede tutulmaktadır.
- Son yapılan araştırmalar sonucu mutlaka direk plazma uygulaması olmalı yönünde bir düşünce ortadan kalkmış olup yüklü partiküllere nazaran nötr

partiküllerin plazma sterilizasyonunda ana etkenlerden biri olduğu belirtilmiştir.

- Proses alanındaki elektrik alandan kaynaklı lokal ısınmalar dielektrik olmayan materyallerde de oluşmakta ve yüzeysel zararlar vermektedir.
- Büyük reaktör alanlarını dolaylı plazma direk plazmadan daha uygun maliyetlere doldurabilir.

Bununla birlikte direk plazma uygulamasında uygulama zamanı daha kısa olmaktadır [28].

2.3.4. Gama Işınlaması Uygulamasının Gıda Bileşenleri Üzerine Etkisi

Lee ve ark. [206] 7 kGy ışınlama dozunun kırmızı biberdeki mezofilik bakterileri yok ettiğini fakat ürün kokusunda değişikliğe neden olduğunu belirtmiştir. Ayrıca paketleme materyalinde 1,3-di-tert-butylbenzene oluştuğu ve kırmızı biberlere geçtiği belirtilmiştir.

Işınlama ile kırmızı biberde *Aspergillus* cinsi küflerin gelişimi önlenmektedir [207]. Bunun yanı sıra aflatoksin detoksifikasyonunun sağlanabilmesi için ışınlama işlemi ısı uygulamalar gibi ekstra uygulamalarla kombine edilerek uygulanmaktadır. Bu uygulamalar gıdanın bileşimi ve duyuşal özelliğı üzerine olumsuz etkilere neden olabilmektedir.

Işınlama temiz bir teknoloji olması, uygulama kolaylığı, oda sıcaklığında işlem yapılması, düşük enerji gereksinimi, yığın haldeki ürüne uygulanabilmesi, sektörde kimyasal kullanımını kısıtlaması, ambalajlı gıdaya uygulanabilmesi gibi birçok avantajı bir arada barındırmaktadır. İstenmeyen mikroorganizmaların inaktivasyonu, filizlenmenin önlenmesi ve raf ömrünü uzatma amacıyla başarılı şekilde kullanılmaktadır [208,209]. Temel prensiplerde bir problem neden olmuyor gibi gözükmesine karşın, gama ışınlamanın besinsel olarak karbonhidrat, yağ, protein ve vitaminler üzerindeki etkileri ve neden oldukları kayıplar kısaca şöyle özetlenebilir;

Karşılaşılan birincil temel sorun ışınlamanın gıdalarda bulunan suyun radyolizini sağlaması ve dolayısıyla başta hidroksil radikali olmak üzere, hidrojen peroksit, elektron ve proton iyonları oluşturarak gıda bileşenleri ile birçok reaksiyona neden olmasıdır [210,211].

Karbonhidratlar iyonize radyasyona maruz kaldığında birçok parçalanma ürünü (hidrojen, karbondioksit, asit, aldehit ve ketonlar) oluşabilmektedir. Von-Sontag [212] glikozun radyolizi sonucunda 34 farklı ürün oluştuğunu belirtmiştir. Bunun nedeninin suyun iyonlaşmasından oluşan peroksitlerden veya ışının direk olarak etkisinden meydana geldiği belirtilmektedir. Işınlama sonrası polisakkaritler monosakkaritlerine ayrılabilir [211].

Radyasyonun proteinler üzerine etkileri ise amino asitlerin radyasyon kimyasına ve ışınlama şartlarına bağlıdır. Bazı aminoasitler yapıları itibari ile ışınlamaya daha az dayanıklıdır. Kükürt içeren aminoasitler etkilenebileceği bir radyasyon dozuna maruz bırakıldıklarında ise istenmeyen kokuların oluşabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle et ve et ürünleri donma ısısının altında ışınlanırlar. Gıdaların ışınlanmasına müsaade edilen limitler dahilinde protein yapılarının büyük oranda korunduğu belirtilmiştir [211].

Yağlar ışınlama işlemi sonrasında ışınlama dozu, ortamda oksijen olup olmaması, sıcaklık vb. gibi koşullara bağlı olarak okside olurlar. Ortamda oksijen varlığında oluşan ozon yüksek derecede oksitleyici özelliğe sahiptir. Bunun yanı sıra hidroperoksitler, alkoller, aldehitler, ketonlar, asitler ve laktonlar gibi çeşitli ürünler meydana gelmektedir [213].

Enzimler de protein yapıda oldukları için radyasyondan etkilenmektedirler. Ayrıca canlı dokunun yaşamsal işlevlerinin gerçekleştirilmesi için gerekli olan bu bileşenlerin yapılarında meydana gelen değişimler son ürün kalitesini de etkilemektedir. Genellikle sulu ortamlarda buldukları için ışınlamada etkilenen bileşenlerdir. Buldukları ortamda yoğun olarak mevcutlarsa ve kompleks bileşenler ile bir aradalarsa ışınlamanın etkilerinden daha az etkilenmektedirler [214].

Vitaminler stabilite olarak gıdaların en hassas bileşenleri oldukları için ışınlama işlemi ile belirli kayıplara neden olmaktadır. Denemeler genellikle düşük radyasyon dozlarında gerçekleştirilmiş olup özellikle A, D, E, K ve B gurubu vitaminler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Vitamin çözeltilerinin gama ışınlarından gıdalarda bulunan vitaminlerden daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir [211].

Işınlama uygulamasının ambalaj materyalleri üzerine etkileri de incelenmiş olup polipropilenin 25 kGy dozun üstünde kırılanlaştığı, polivinilkloridin 100 kGy dozun

üstünde HCL oluşturduğu ve cam malzemelerin de 10 kGy'in üzerinde kahverengileştiği belirtilmiştir. Bu dozlar genellikle gıda ışınlama limiti olan 10 kGy'in çok üstünde değerler olup prensip olarak gıda ışınlanırken ilgili sorunlarla karşılaşılması beklenir [209].

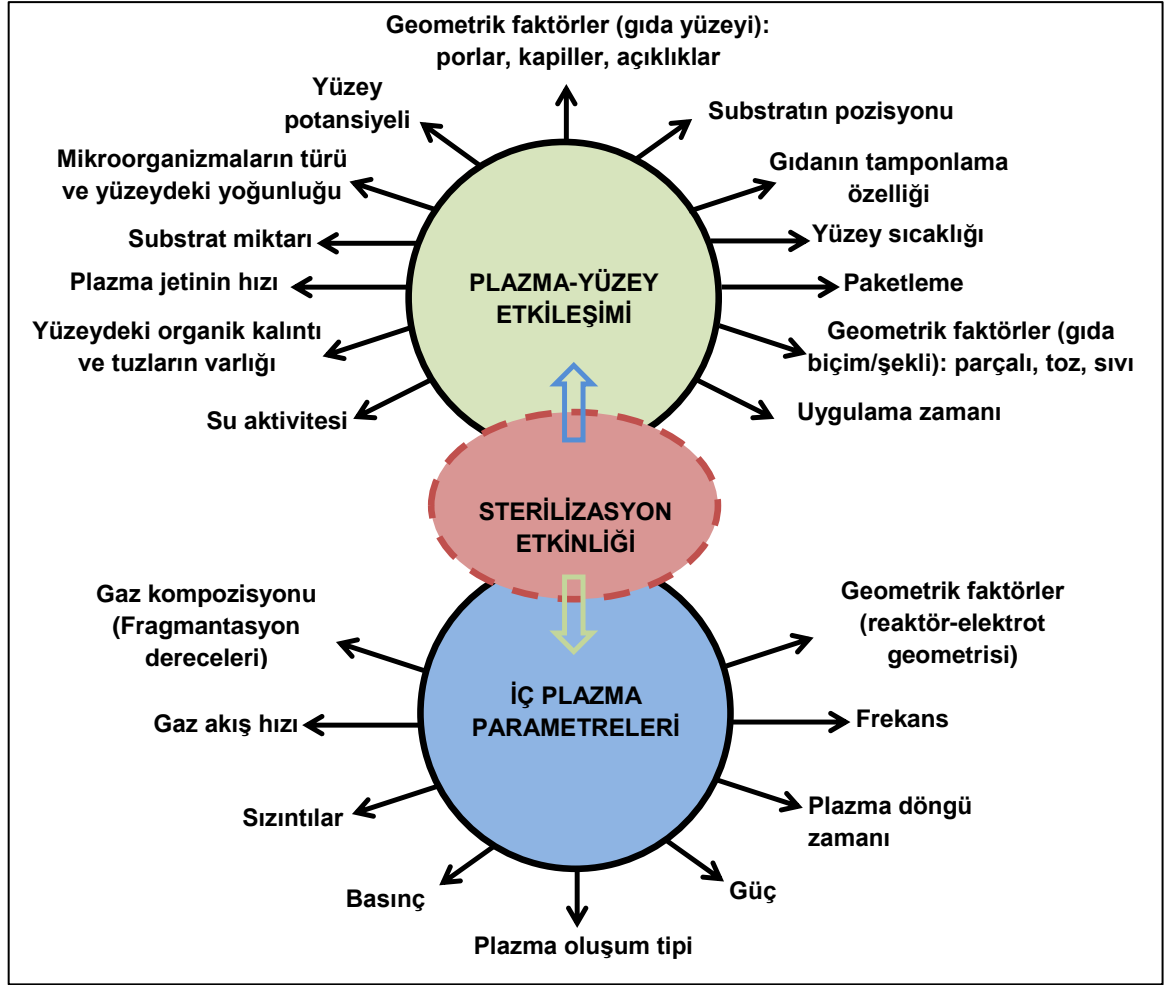
Gama ışınlaması yüksek penetrasyon özelliği nedeniyle birçok alanda kullanılsa da birçok dezavantajı da beraberinde getirmektedir. En genel dezavantajı ortam yumuşaklığının yitirilmesine neden olmasıdır. Radyasyon nedeniyle serbest radikaller oluşmakta ve polimer yapılarda çapraz bağlanma ve yapıdaki zincirlerde kopma meydana getirmektedir. Ayrıca uygulama zamanı kısa olmasına rağmen yüksek maliyet getiren bir sistemdir [215]. Penetrasyon özelliğinin yüksek olmasının dekontaminasyon işlemleri için faydalı olduğu gerçeğinin yanı sıra yukarıda da belirtmiş olduğumuz gıda bileşenleri üzerine etkilerinin de göz önünde bulundurulması şarttır.

2.3.5. Plazma Parametreleri

Plazmanın inaktivasyon etkisi birçok faktöre bağlıdır. Substratın yüzey yapısı plazma etkisini güçlü bir şekilde etkilemektedir. Gıdaların yüzeyleri de çok kompleks oldukları için plazmanın farklı gıdalar üzerinde çok farklı etkilere neden olması beklenmektedir. Bununla birlikte model yüzeyler kullanılarak bunlardaki çalışmaların gıda uygulamalarına yönelik modellenmesi çok basit bir işlem olarak gözükmemektedir.

Metot etkinliği ayrıca spesifik ürün özelliklerine de bağlıdır. Beslenen enerji, ürünün ısınması ve sıcaklık dağılımı da ürün özellikleri, kompozisyonu, geometrisi ve biçimi (parçalı, toz veya sıvı) kadar önemlidir. Porlar, kapiler açıklıklar, yüksek su aktivitesi ve gıdanın tamponlama özelliği inaktivasyon etkinliğini etkilemektedir.

Lerouge ve ark. [216] sterilizasyonu etkileyen iç ve dış plazma parametrelerini belirtmişlerdir. Şekil 2.14'te bu tablonun daha geniş kapsamda modifiye edilmiş hali yer almaktadır.



Şekil 2. 14 Sterilizasyon etkinliğini belirleyen iç ve dış plazma parametreleri

İç plazma parametreleri, genellikle işlemkoşullarına bağlı olarak değişen dış plazma parametreleri tarafından değişmektedir. Farklı plazma sistemlerinde aynı ürün kalitesini alabilmek adına aynı iç plazma koşullarının oluşması için farklı dış plazma parametrelerinin denenmesi gerekmektedir.

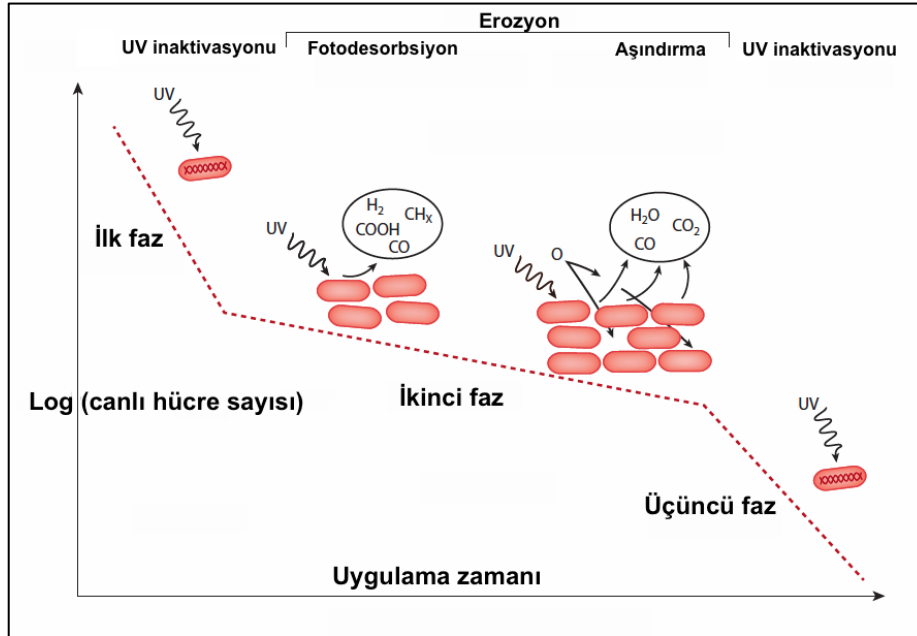
Hücre duvarı yapı farklılıklarına bağlı olarak bakteri ve funguslarda plazma sterilizasyon çalışmalarında farklı inaktivasyon cevapları elde edilmektedir. Bakteriler açısından gram pozitif olanlar negatiflere göre daha dayanıklıdır [217,218].

Çalışma gazının türü oluşacak reaktif türlerin çeşitliliğini direk olarak etkilemektedir [219-221]. Çalışma gazı olarak hava kullanıldığında oluşacak reaktif oksijen (ROT) ve azot türleri (RAT), UV ışınları, enerjetik iyonlar ve yüklü partiküller oluşmaktadır. ROT mikroorganizmaların inaktivasyonunda en etkin rolü oynamaktadır [222].

Hidrojen peroksit ve tekli ve atomik oksijen, ozon gibi mikroorganizmalar üzerinde yüksek oksidatif etkiye sahiptir [223].

2.3.6. Plazma İnaktivasyon Mekanizması

Plazma inaktivasyonunun genellikle UV radyasyonu nedeniyle gerçekleştiği belirtilmektedir. UV ışınları hücre içine penetre olarak DNA sarmalında hasara neden olmaktadır. Normal UV-C uygulamasında üstüste binmiş mikroorganizmalar dekontaminasyon etkinliğini düşürmektedir. Fakat plazma uygulamasında UV fotonlar, iyonlar ve reaktif diğer türlerin kombine etkileri olduğu için dekontaminasyon etkinliği çok yüksek olmaktadır. Plazma sterilizasyonunda mikroorganizma inaktivasyonunun kademeli olarak gerçekleştiği bu konuda gerçekleştirilmiş olan birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (Şekil 2.15) [34,224].

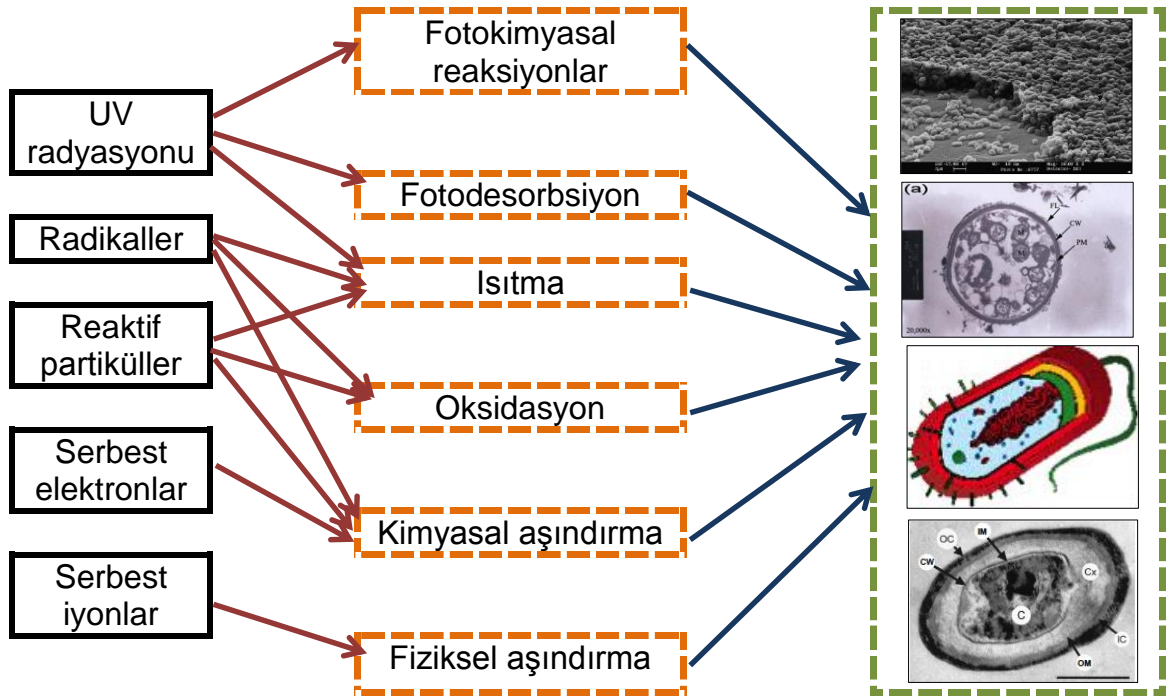


Şekil 2. 15 Plazma sterilizasyonunda gözlenen üç fazlı inaktivasyon eğrilerinin şematik gösterimi

Bu çalışmalarda, araştırmacılar inaktivasyon kinetikleri ile plazmanın fiziksel ve kimyasal özellikleri arasında bağlantı kurmaya çalışmışlardır. En çok kabul gören 3 fazlı inaktivasyon mekanizması incelenecek olunursa en hızlı kinetiğe (en düşük D değerine) sahip ilk fazdır. Bu fazda UV radyasyonu yüzeyde bulunan mikroorganizmaları direkt olarak etkilemektedir. İkinci faz en yavaş kinetiğe sahip olan fazdır. Bu fazda UV fotonların neden olduğu erozyon (fotodesorbsiyon) etkisi ve atomik oksijen gibi diğer aktif türlerin neden olduğu erozyondur (etching-

aşındırma). Bu erozyon prosesi üst yüzeydeki ölü mikroorganizmaları uzaklaştırmakta ve canlı mikroorganizmaların yüzeyini saran organik kalıntıları uzaklaştırmaktadır. Son faz son canlı sporun erozyonu ile başlamakta ve UV fotonlarının genetik materyale direkt olarak etki etmesini sağlamaktadır. İlk ve son fazın kinetik hızları yaklaşık aynıdır. Fotodesorbsiyon yüksek enerjili UV radyasyonu vasıtasıyla biyokütlerdeki kovalent yapıları bağların kopmasını ve uçucu reaksiyon ürünlerinin (H_2 , $COOH$, CO , CH_4) oluşmasını sağlamaktadır [225].

Atmosferik plazma sistemlerinde dekontaminasyonun işlemi aktif türlerin ve yüklü partiküllerin akısına bağlıdır. Vakum reaktörde oluşturulan düşük basınç sistemlerinden farklı olarak atmosferik plazma sistemlerinde inaktivasyonda etkili olan reaktif türler daha fazladır (atomik oksijen, ozon, hidroksil radikalleri vb.). Düşük basınç plazma sistemi ile karşılaştırıldığında UV fotonları atmosferik plazma sisteminde daha az etkili olmaktadır. Bunun başlıca sebebi atmosferdeki gaz atom ve moleküllerinin UV fotonlarını absorblamasıdır [226]. Fiziksel aşındırma ağır partiküller tarafından gerçekleştirilmektedir ve sadece ivmelendirilmiş iyonlar vasıtasıyla sağlanmaktadır (Şekil 2.16).

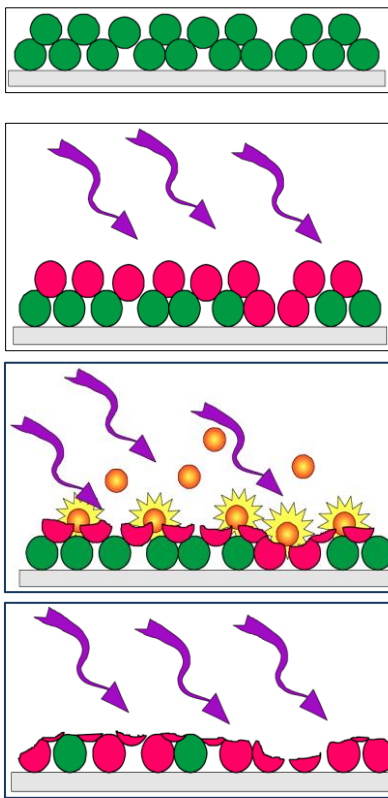


Şekil 2. 16 Aktif plazma türlerinin mikroorganizma üzerindeki etkileri

Isınma ekzotermik reaksiyonlar ve radyasyon absorpsiyonu vasıtasıyla olur. Kimyasal aşınma daha önce bahsedildiği üzere erozyon mekanizmasına göre etki etmektedir ve ROT ve radikaller uçucu bileşenler oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 2.17).

Kong ve Laroussi [227]'ye göre plazma kolaylıkla bir metreküp hacimde beşyüz milyanın üzerinde serbest radikal üretebilir. Bu miktarda serbest radikal plazma sisteminin etkili bir dekontaminasyon aracı olmasını sağlamaktadır.

Mikroorganizmaların hücre zarları plazmaya maruz kaldığı zaman, hücrenin dış yüzeyine çarpan ve hücre zarındaki yüzey gerilimini yok edebilecek elektrostatik güce sahip yüklü parçacıklar yüzünden parçalanabilmektedirler [34,227].



(a) Plazma uygulaması öncesi bütün mikroorganizmalar yüzeyde sıkışık olarak bulunmakta ve canlıdır. Canlı hücreler yeşille belirtilmektedir.

(b) Plazma uygulaması başlangıcında üst kısımdaki mikroorganizmalar hızlıca inaktif olur (inaktif olmuş mikroorganizmalar kırmızı ile belirtilmektedir). UV ışınları ok ile gösterilmiştir. Üstteki tabaka kalkan görevi görmekte alttaki mikroorganizmaları radyasyondan korumaktadır.

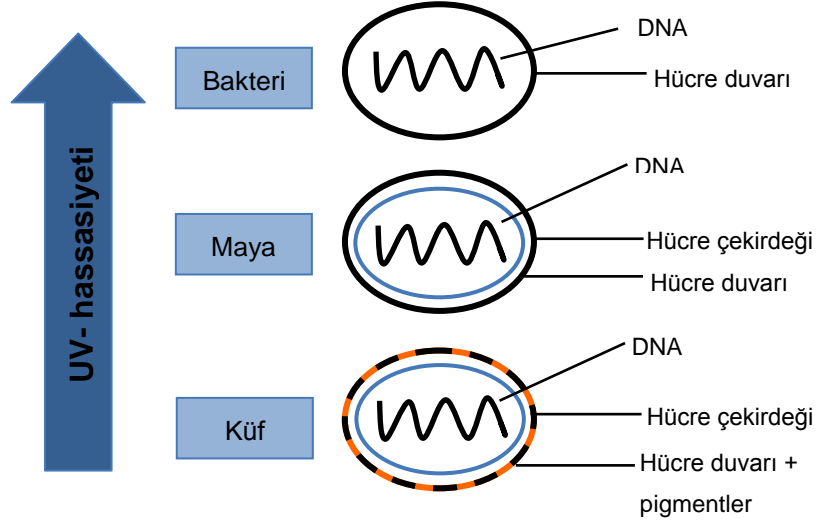
(c) Plazma uygulaması sırasında inaktif olmuş biyokütle aşınma ve fotodesorpsiyon mekanizmalarıyla erozyona uğramaktadır. Aktif kimyasal maddeler yuvarlak şekillerle belirtilmiştir.

(d) En üst tabaka erozyona uğradığı zaman mikroorganizmalara UV radyasyonu kolaylık ulaşmakta ve (a)'daki gibi hızlı inaktivasyon gerçekleşmektedir.

Şekil 2. 17 Plazmanın sterilizasyon etkisinin ve biyolojik materyallerle etkileşiminin şematik gösterimi

Atmosferik plazma sistemlerinde dekontaminasyonun işlemi aktif türlerin ve yüklü partiküllerin akısına bağlıdır. Vakum reaktörde oluşturulan düşük basınç sistemlerinden farklı olarak atmosferik plazma sistemlerinde inaktivasyonda etkili olan reaktif türler daha fazladır (atomik oksijen, ozon, hidroksil radikalleri vb.).

Düşük basınç plazma sistemi ile karşılaştırıldığında UV fotonları atmosferik plazma sisteminde daha az etkili olmaktadır. Bunun başlıca sebebi atmosferdeki gaz atom ve moleküllerinin UV fotonlarını absorblamasıdır [226]. Şekil 2.18’de mikroorganizmaların plazmanın en etkin inaktivasyon ajanlarından olan UV radyasyonu hassasiyetleri belirtilmiştir.



Şekil 2. 18 Mikroorganizmaların UV-C hassasiyetlerinin karşılaştırılması

Bakteriler UV radyasyonunda küfler kadar dayanıklı değildirler. Bu durum üç farklı nedenle açıklanmaktadır [228]. Bunlardan ilki bakterilerin küf/maya hücrelerinden daha küçük olması ve UV ışığını daha kolay geçirmesidir [229]. İkinci olarak bakteri hücrelerinin farklı yapıda hücre duvarına sahip olmaları ve bakteri DNA’larının yüksek oranda pirimidin içermesinden dolayı timin-sitozin çapraz bağlanmasının gerçekleşme olasılığının fazla olmasıdır [230]. Şekil 2.18’den de görüleceği üzere mikroorganizmaların UV hassasiyetleri bakteri>maya>küf olarak sıralanmaktadır. Diğer sebep ise farklı pigmentasyon oluşumu ve küf ve mayalardaki onarım sistemidir [228].

2.3.6.1. Plazma-Hücre Etkileşimleri

Plazma uygulamasında birincil hedef hücre membranıdır ve ilk etkilenen yer burasıdır. Ökaryotlar için fosfolipid, prokaryotlar için ise polisakkarit tabakası membranların üst yapılarını oluşturmaktadır. Plazma uygulaması ile hücrelerde biyokimyasal birçok mekanizma gerçekleşmektedir. Örneğin bakteri ve memli hücreleri için mutajenik olan malodialdehit (MDA) lipid peroksidasyonu sonucunda

oluşmaktadır. MDA DNA ile etkileşime girerek deoksiguanozin, dG, deoksiadenozin, dA, ve deoksisitidin, dC:M1G, M1A ve M1C DNA eklentileri oluşturmaktadır. MDA plazma etkilerinin hücresele duyarlılığını belirlemek için iyi bir örnektir. Bunun nedeni bu oluşan DNA eklentileri memeli hücreleri tarafında kolaylıkla onarılmasına rağmen bakteriler tarafından onarılamaz. Plazma uygulamasının seçicilik özelliğine diğere bir örnek plazma uygulamasının kanser hücrelerinde apoptozu geliştirmesi ve ökaryot ve prokaryot hücrelerde farklı metabolizmalara neden olmasıdır [223].

2.3.6.2. Plazma İyonlarının Rolü

İyon temelli plazma-hücre interaksiyonunun spesifikasyonlarını şöyle belirtebiliriz:

- Pozitif ve negatif iyonların hücre üzerindeki etkileri yaklaşık aynıdır;
- Yüklü partiküllerin etkileri kayma gerilimi, iyon bombardımanı veya termal etkiler gibi fiziksel değil kimyasaldır;
- İyonlar hem hücre içi hem de hücre yüzeyindeki peroksidasyon prosesini katalizler, bu nedenle nötr aktif türlerden daha etkilidirler;
- İnaktivasyonda önemli bir yere sahip olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu için ortamda oksijen varlığı önemlidir. Bu durum reaktif azot türleri (RAT) için de gerekli olup azot da bu bağlamda önemlidir [223].

2.3.6.3. İlk Hedef Olarak “Hücre Membranı”

Plazma prosesinin hem ilk etkilediği yer hemde hücrenin en çok değişim görülen yeri olarak hücre membranları büyük öneme sahiptir.

Membranlarda meydana gelmiş olan önemli prosesler şöyledir:

- Lipid ve polisakkaritlerin peroksidasyonu yüklü partiküller tarafından katalizlenir;
- Etki kimyasal bir etkidir ve ortamda bulunan suya bağlıdır:
 - ‘kuru’ organizma (düşük etki)
 - ‘nemli’ organizma (sıvı olmayan ortam da bulunmakta, en yüksek etki)
 - ‘ıslak’ organizma (sıvı içerisinde, azalmış etki);

- Etki ortamının kimyasal kompozisyonuna büyük oranda bağlıdır. Örneğin ortama veya hücre içine eklenen antioksidanlar plazmanın etkilerini azaltabilir veya kontrol altına alabilir [223].

2.3.6.4. Hücre İçi Biyokimyası

Yukarıda belirtilmiş olan mekanizmalar hücre biyolojisinden ziyade büyük oranda plazmayla ilgili durumlardır. Çünkü bunlar biyokimyasal olarak plazma ile üretilen türler tarafından kontrol edilmektedirler. Bununla birlikte plazma uygulamalarının biyolojik sonuçlarına örnekleri de şöyle sıralayabiliriz:

- Dağılmış membran yapısı (örneğin peroksidasyon) yada membranlara bağlı proteinler ve/veya enzimler kompleks hücre yanıtlarını yönetirler ve birçok hücreyi de etkileyebilirler
- Plazma uygulaması hücrelerarası sinyal yollarını aktive ederler (ikincil mesaj sistemlerini aktif hale getirip plazma etkisini büyütür ve hücre içinde taşırlar)
- MDA oluşumu gibi ikincil etkilerin başlangıcı lipid peroksidasyonunu takiben DNA hasarına neden olur (memeli hücreleri tarafından tamir olunurken, bakteri hücresi bu olumsuzluklara maruz kalır) [223].

2.3.6.5. Plazma Türlerinin Hücrelerdeki Yapılara Seçiciliği

Plazmanın uygulandığı canlı yapılarına özgü değişik bir seçiciliği bulunmaktadır. Bunların içerisinde patojenik canlılara zarar verirken bu canlının bulunduğu konak yapıya zarar vermemesi gibi durumlar da örnek gösterilebilir. Bu amaçla birçok organizma için farklı metabolik yollar açıklanmaktadır:

- Canlı dokuların sterilizasyonu için uygulanacak plazma dozu, dokulara zarar verebilecek (tahrip edebilecek) dozun yarısından azdır (mikroskopik olarak ve histolojik boyalarla belirlenen),
- Bakteri hücreleri memeli hücrelerinden çok daha küçüktür ve seçicilik basit bir şekilde yüzey/hacim oranı farklılığından kaynaklanabilir (Şekil 2.19),
- Organizmalardaki biyokimyasal farklılıklardan kaynaklanabilir (polisakkaritler lipitlerden daha hızlı perokside olabilir),
- Hücreler arasında metabolik hız farklılıkları bulunmaktadır. Örneğin bakteri hücresi, normal hücre ve kanser hücresinin metabolik hızları farklı olduğu için plazma aktif türlerine dirençleri de farklıdır,

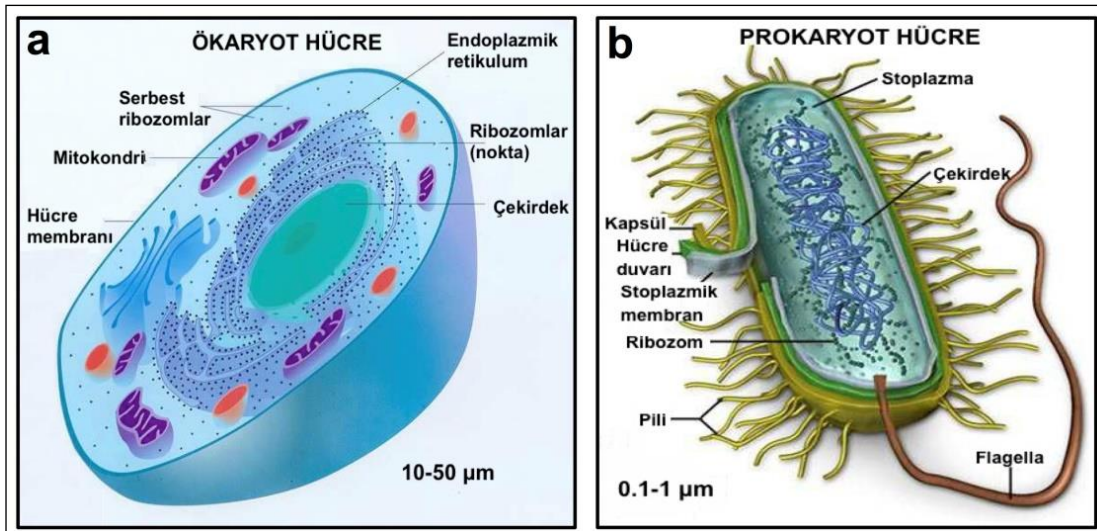
- Hücre döngü farklılıkları: replikasyon sıklığı çok olan kanser ve bakteri hücreleri ve replikasyon yeteneği olmayan statik memeli hücresi karşılaştırıldığında bakteri ve kanser hücrelerinin DNA sarmallarının çok daha kolay açıldığı belirtilmektedir [223].

2.3.6.6. Uygulanan Dozun Etkisi

Plazma dekontaminasyonunda uygulanan doz ve doz oranı büyük önem arz etmektedir.

- düşük plazma dozlarında ($<1 \text{ J/cm}^2$): inaktivasyon/bakteri sterilizasyonu, normal hücreler canlı kalır
- orta seviye dozlarda ($2-6 \text{ J/cm}^2$): düzeltilebilir DNA hasarları, hücre büyüme faktörlerinin salınması proliferasyonu ve hücre göçünü artırır, kanser hücrelerinde kontrollü apoptozun gelişimi gerçekleşir.
- yüksek dozlarda ($>7 \text{ J/cm}^2$): normal hücre ölümü gerçekleşir.
- çok yüksek dozlarda ($>10 \text{ J/cm}^2$): hücre nekrozu gerçekleşir.

Bu sonuçlar termal dengede olmayan plazma boşalımının doku, memeli hücresi ve bakteriler üzerindeki etkilerini kapsamaktadır. Burada belirtilmiş olan doz kavramları plazma türleri ve sağlanan enerjilere göre değişmekte olup doz seviyesi ile hücrelerde meydana gelen değişimleri belirtmektedir [223].



Şekil 2.19 Ökaryot ve prokaryot hücrelerin şematize görünümü

Sonuç olarak plazma türlerinin hücre farklılığı üzerine seçiciliği belirtilecek olunursa;

1. Reaktif oksijen türlerinin prokaryotik (bakteri) ve ökaryotik (memeli hücresi) hücrelerdeki metabolizmaları farklıdır. Örneğin insan hücreleri O^{-2} gibi türlere karşı savunma mekanizmaları bulunurken bakteriler tamamen hücre içine geçirir veya dirençleri çok azdır.

2. Yüksek metabolizmaya sahip organizmalar dış streslere (ozmotik basınç değişimi, ROT, kimyasal ve biyolojik zehirler vb.) daha fazla dayanıklıdırlar. Başka bir ifadeyle bakteriler tek bir hücre gibi davranırken memeli hücreleri özellikle dokularda organize olanlar birbirleriyle iletişim halindedirler ve uygulanan dış etkenlere karşı daha dayanıklıdırlar.

3. Daha önce değinildiği üzere bakteri hücrelerinin memeli hücrelerinden küçük olması yüzey/hacim oranı özelliklerini değiştirmekte dolayısıyla aynı sayıdaki bakteri hücrelerini inaktive etmek için gerekli doz daha düşüktür (Şekil 2.19).

2.4. Plazmanın Gıda Uygulamalarında Kullanımı

Plazmalar temel yapıları itibariyle, hücre fonksiyonlarını etkileyecek şekilde “plazma kaynaklı ölüm” veya “plazma kaynaklı iyileşme” şeklinde etki edebilecek şekilde tasarlanabilmektedir. Pratik uygulamaları medikal sterilizasyon [231-233], cilt bakımı [234,235], kanser terapisi [234,236-238], dişçilik [239] gibi birçok aktivitede uygulama alanı bulurken, gıda dekontaminasyonu [44,240] amacıyla da son yıllarda artan bir oranla araştırma ve uygulama alanı bulmuştur. Toksin, kimyasal ve biyolojik savaş kalıntıları gibi organik bileşiklerin azaltılması amacıyla da plazma sistemleri kullanılmıştır [204,241]. Uzay araştırmalarında kullanılan materyallerin dekontaminasyonu için de plazma sistemleri tercih edilmektedir [242,243].

Gıdaların raf ömürlerinin ısı olmayan plazma sistemleri ile uzatılması ve bazı kalite parametrelerinin geliştirilmesi işlemi hakkında yayınlanmış olan bilimsel yayın sayısı çok azdır. Bu konuda yapılmış olan çalışmalarda da gıdaların kimyasal özellikleri hakkında herhangi bir çalışma yapılmamış, sadece organoleptik analizler üzerinde durulmuştur. Çalışmaların ana hedefi soğuk plazma yönteminin inaktivasyon üzerine etkilerine bakmak olmuştur. Tez kapsamında son yıllarda gerçekleştirilmiş olan plazma gıda uygulamalarının

detaylı araştırması gerçekleştirilmiş olup kullanılan plazma kaynağı ve çalışma gazının yanı sıra, plazmanın ilgili uygulamada hangi amaca yönelik kullanıldığı hakkında bilgi de verilmiştir (Çizelge 2.11).

Çizelge 2. 11 Plazma-gıda etkileşimlerini inceleyen literatür çalışmaları

Gıdanın cinsi	Gıda	Plazma kaynağı/ proses gazı	Test edilen mikroorganizma & incelenen kalite parametreleri	Ref.	
Meyve-sebzeler	Ispanak	DBD/ hava, oksijen	<i>E. coli</i> O157:H7	[244]	
	Çilek- Domates	DBD/ hava	-	[245]	
	Paketlenmiş çeri domates	DBD/hava	Fiziksel kalite parametreleri, solunum hızı	[246]	
	Paketlenmiş çilek	DBD/MAP gazları	Doğal mikroflora, sertlik	[247]	
	Paketlenmiş çilek	DBD/hava	Doğal mikroflora, Fiziksel kalite parametreleri, solunum hızı	[248]	
	Paketlenmiş çeri domates, çilek	DBD/hava	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> <i>Typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	[249]	
	Elma	Işıltılı ark/ hava	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella stanley</i>	[250]	
	Elma, Kavun, Marul	DBD	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>	[39]	
	Kavun kabuğu, Mango kabuğu	Plazma jet/ He+O ₂	<i>E. coli</i> , <i>G. liquefaciens</i> , <i>P. agglomeran</i> , <i>S. cerevisiae</i>	[240]	
	Kavun, Mango	Plazma jet/ He+O ₂	<i>E. coli</i> , <i>G. liquefaciens</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. cerevisiae</i>	[251]	
	Tatlı biber	DBD/ He+O ₂	<i>Pantoea agglomerans</i> , renk	[226]	
	Marul	Plazma jet/argon	<i>E. coli</i> K12	[252]	
	Marul	Düşük basınç plazması/ O ₂	Yüzey morfolojisi ve kimyasal kompozisyon araştırılması	[253]	
	Marul	Atmosferik basınç plazma/ Ar	Yüzey morfolojisi ve kimyasal kompozisyon araştırılması	[254]	
	Hububat ürünleri/fındıklar	Marul, çilek, patates	Atmosferik basınç plazma/ N ₂	Yüzey morfolojisi, mikrobiyal inaktivasyon	[255]
		Ispanak, marul, domates, patates	Düşük basınç plazması/ O ₂	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2, yüzey morfolojisi	[221]
Badem		DBD/ hava	<i>E. coli</i>	[41]	
Fındık, Yer fıstığı, Antep fıstığı		Düşük basınç plazması/ hava, SF ₆	<i>Aspergillus parasiticus</i>	[45]	
Fıstık		Düşük basınç plazması/O ₂ , Ar, O ₂ /Ar	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>E. coli</i>	[256]	

	Kırmızı toz biber	Düşük basınç plazması/ N ₂ , N ₂ -O ₂ , He, He-O ₂	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	[257]
	Tahıl taneleri, Domates tohumu, Bakla tohumu	Düşük basınç plazması/ hava, SF ₆	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penicillium</i> MS1982	[44]
	Tohum (turp, börülce, soya, fasulye, mısır)	Düşük basınç plazması/ CF ₄ , octadecafluorodecalin (ODFD)	Sadece çimlenme etkisine bakıldı	[258]
	Aspir tohumu	Düşük basınç plazması/ Ar, hidrazin, anilin	Sadece çimlenme etkisine bakıldı	[259]
	Uzun taneli kahverengi pirinç	Düşük basınç plazması/ hava	Tekstürel-piştirme özellikleri	[260]
	Kahverengi pirinç	Düşük basınç plazması/ hava	Tekstürel-piştirme özellikleri, renk, yağ asiditesi, enzim aktivitesi	[261]
Hayvansal ürünler	Dilim jambon, Yumuşak peynir (dilim)	İğne düzlem sistemi/ He	<i>L. monocytogenes</i>	[43]
	Tavuk göğsü jambon	Plazma jet/ He, N, O ₂	<i>L. monocytogenes</i>	[262]
	Tavuk göğsü, Tavuk bacağı	DBD/ hava	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Salmonella enterica</i>	[263]
	Somon (Soğuk dumanlanmış)	DBD/ Ar, CO ₂	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i>	[264]
	Domuz pastırması	İğne düzlem sistemi, / He, He+O ₂	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	[265]
	Yumurta (kabuklu)	DBD/ hava+ H ₂ O	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	[266]
	Tavuk eti, Tavuk derisi	Atmosferik basınç plazma/He, O ₂	<i>Listeria innocua</i>	[267]
	Paketli italyan pastırması	DBD/ O ₂ , Ar	<i>Listeria innocua</i>	[268]
	Süt	Korona boşalımı/ hava	<i>E. coli</i> ATCC 25922	[33]
Meyve suları	Elma suyu	Puls plazma/ hava	<i>E. coli</i> O157:H7	[40]
	Portakal suyu	DBD/ hava	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i>	[269]
Organik bileşikler/ makromoleküllerin degradasyonu	Mısır	Düşük basınç plazması/ O ₂	pestisit	[270]
	Çilek	DBD/hava	pestisit	[271]
	-	Mikrodalga atmosferik plazma/ Ar	mikotoksin	[46]
	Nişasta	Düşük basınç plazması/ Ar	modifikasyon	[272]
	Protein (BSA)	Puls plazma/ N ₂	yapısal değişiklik	[273]
	Un	DBD/hava	modifikasyon	[274]
	Domates	DBD/hava	Enzim inaktivasyonu	[275]
-	Atmosferik basınç plazma jet/ Ar, Ar/O ₂	Enzim inaktivasyonu	[276]	

Selcuk ve ark. [44] düşük basınç, düşük sıcaklık plazmasının tohumlarda (buğday ve baklagiller) dekontaminasyon etkinliği üzerine çalışma yapılmıştır. Fungal

kontaminasyonun azalması hakkında veriler alınmasına rağmen plazma uygulaması ve gıda kalitesi (nem, gluten indeksi vs.) arasında herhangi bir ilişki üzerinde durulmamıştır. N₂ ve O₂ plazmasının yüzeydeki polisakkaritlerin degradasyonuna bağlı olarak tohum yüzeyinde renk değişimlerine, gözle görülür hasara ve çimlenme özelliklerinde azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte Ar, hidrazin veya anilin plazmasının bazı çalışmalarda çimlenme özelliklerini artırdığı belirtilmiştir [258,259].

Kırmızıbiberin dekontaminasyonu amacıyla plazma kullanımı literatürde denenmiş bir yöntem olmayıp sadece Kim ve ark. [48] bu konuda kırmızı toz biber üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada da belli başlı bazı fiziksel analizler yapılmış olup sadece *A. flavus* dekontaminasyonu gerçekleştirilmiş ve aflatoksin detoksifikasyonu konusunda herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bai ve ark. [270] O₂ plazması ile organik fosforlu pestisitlerde indirgenme meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Moleküler düzeyde plazma-gıda interaksiyonları hala tam olarak açıklanamamakta ve ısı olmayan plazmanın özellikle yüksek ısı hassasiyete sahip gıda örneklerinin morfolojik ve kimyasal yapılarında meydana getirdiği değişiklikler tam olarak tespit edilememektedir. Bu bağlamda aktif plazma türlerinin gıdalardaki biyoaktif bileşenler üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla Grzegorzewski [188] fenolik asitler üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir.

Vleugels ve ark. [226] atmosferik plazmanın taze biberlerin yüzeylerine yapay olarak kontamine edilmiş biyofilm oluşturan bakteriler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında taze biber kullanmalarının nedeninin bu ürünün tek başına veya tüketime hazır gıda ürünlerinde ve salata karışımlarında sıklıkla kullanılması olarak belirtmişlerdir. Ayrıca bu ürünün yüzeyinde meydana gelebilecek değişimleri görünür bölgede kolayca yansıtılabileceğini belirtmişlerdir.

Park ve ark. [277] yaptıkları çalışmada dört farklı bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ve iki farklı küf türü *A. niger* ve *P. citrinum* üzerine 2.45 GHz, 1 kW çalışma koşullarına sahip plazmanın etkisini araştırmışlardır. Sonuçlara göre türe bağlı olmaksızın bütün bakterilerin 20 saniye içerisinde ve bütün küflerin 1 saniye içerisinde tamamen inhibe edilebildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada dikkat edilmesi gereken husus gaz akış hızının tez

kapsamında kullanılan gaz akış hızının 2 katı (6000 L/saat) olması ve elde edilen sıcaklık değerlerinin çok yüksek olmasıdır. Sıcaklık artış değerleri incelenecek olunursa 1, 5, 10 ve 30. saniyelerde elde edilen sıcaklık değerleri sırasıyla 75, 105, 115 ve 130°C olarak belirtilmiştir. Burada elde edilen dekontaminasyon etkinliğinin hangi etkenlerden kaynaklandığı belirtilmemekle birlikte ortama verilen gazın yüksek akış hızı nedeniyle ve ortamdaki ani sıcaklık yükselmesiyle plazma dışı fiziksel etkenlerin bu sonucu ortaya koyduğu tahmin edilmektedir.

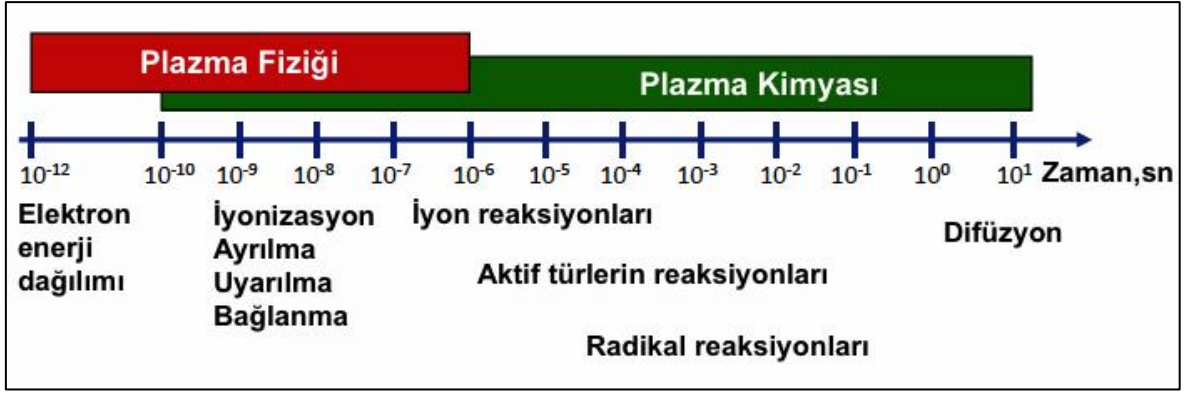
Park ve ark. [46] 3 farklı mikotoksinin [AFB1, deoxynivalenol (DON) ve nivelenol'un (NIV)] atmosferik plazma sistemi (2.45 GHz, 1 kW) kullanılarak degradasyonunu 5 saniyede sağladıklarını belirtmişlerdir.

Daniels ve ark. [278] yaptıkları çalışmada ev içerisindeki havanın plazma kullanılarak iyonlaştırılmasıyla havada bulunan mikroorganizmaların önemli ölçüde azaltıldığı, kötü kokunun nötralize olduğu ve bazı uçucu organik bileşiklerde de azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Tüketiciler açısından bakıldığında etkin ama pahalı bir sistem çok tercih edilemeyeceği gibi kalite kaybına uğramış ürünler de tercih edilmemektedir. Birçok taze gıda, özellikle taze salatalar, ısı uygulamalara karşı çok hassastır. Bu nedenle inaktivasyon işlem sıcaklığı oda sıcaklıklarında gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır. Bu nedenle inaktivasyon etkinliğinin yüksek, gıdalarda meydana gelen hasarların düşük olduğu denge parametrelerinin bulunması gerekmektedir.

Yüksek enerjili türler yüksek aktiviteye ve kısa yaşam ömürlerine sahiptirler. Genellikle 10^{-6} -10 sn aralığında gerçekleşen radikal reaksiyonları tehlikeli gazların uzaklaştırılmasında en etkin olanlarıdır (Şekil 2.20).

Hava plazması kimyası incelenecek olunursa 75'ten fazla türün oluşumu ve farklı zaman dilimlerinde gerçekleşmiş olan neredeyse 500 reaksiyon plazma oluşumunun kompleks yapısını yansıtmaktadır [280]. Şekil 2.20'den de görüleceği üzere meydana gelen reaksiyonlar saniyelerle ifade edilecek zaman diliminde gerçekleşmektedir.



Şekil 2. 20 Plazma aktif türlerinin fiziksel ve kimyasal anlamda oluşum zamanları [279]

Plazma sterilizasyon/dekontaminasyon işlemleri genellikle doğal veya yapay yolla kontamine olmuş yüzey veya gıda materyalleri üzerine gerçekleştirilmiştir. Plazma prosesi paketleme öncesi veya paketleme işleminin bir parçası olarak dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılabilir. Bazı çalışmalarda ise plazma kapalı paket içerisinde de gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyolojik kontrolün kapalı paket içerisinde gerçekleştirilmesi prensibine dayanan bu sistemler hızlı bir şekilde yaygınlaşmaya başlamıştır [195,245,264,268,281-283].

Paket içerisinde plazma fazını oluşturup içerisindeki materyali dekontamine etmek paketleme sonrası kontaminasyon riskini de ortadan kaldırmaktadır. Burada kullanılan ambalaj materyalleri dielektrik malzemeler olup ambalaj sanayisinde sıklıkla kullanılan LDPE, HDPE, polistiren, Tyvek® gibi malzemelerdir [284,285]. Bununla birlikte gama sterilizasyonu gibi paket içerisinde ürünlerin steril edilmesi yaklaşımı sürekli endüstriyel sistemlere uygulanabilirlik açısından da elverişli olduğu için daha büyük önem arz etmektedir. Bu sistemi sanayiye adapte ederken göz ardı edilmemesi gereken en büyük hususlardan biri de paketleme materyalinde meydana gelebilecek bütün risk etmenlerinin belirlenmesidir. Örneğin paketleme materyalinden plazma sırası ve sonrasında geçebilecek katkıların migrasyon limitleri, monomerler, oligomerler ve düşük moleküler ağırlıklı uçucu bileşenler gıda güvenliği çerçevesinde belirlenmelidir. Bununla birlikte paketleme materyalinin su buharı geçirgenliği, gaz geçirgenliği gibi önemli iki özelliğinin de olumsuz yönde etkilenmediği de tespit edilmelidir (soluyabilen ve soluyamayan

gıdaların farklılığı temeli). Çizelge 2.11'de paket içerisinde oluşturulmuş plazma ile gerçekleştirilen çalışmalara da yer verilmiştir.

Literatürde yayınlanmış olan birçok çalışmada gıdaların yanı sıra gıda ile temas eden yüzeylerin sterilizasyonu hakkında da birçok araştırma yapılmıştır [34,194,286-288]. Bu kapsamda birçok yapay yüzey üzerinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Bunlar plastik yüzeyler, cam yüzeyler, paslanmaz çelik ve hidrofobik membranlardır. Bu yüzeyler çok kompleks bir matrikse sahip olan gıda yüzeyini tam olarak temsil edememekle birlikte mikroorganizma-yüzey aktif plazma türleri interaksiyonunun anlaşılmasında büyük yardımları olmuştur.

2.5. Fındığın Ülkemiz İhracatındaki Önemi ve Besinsel Bileşimi

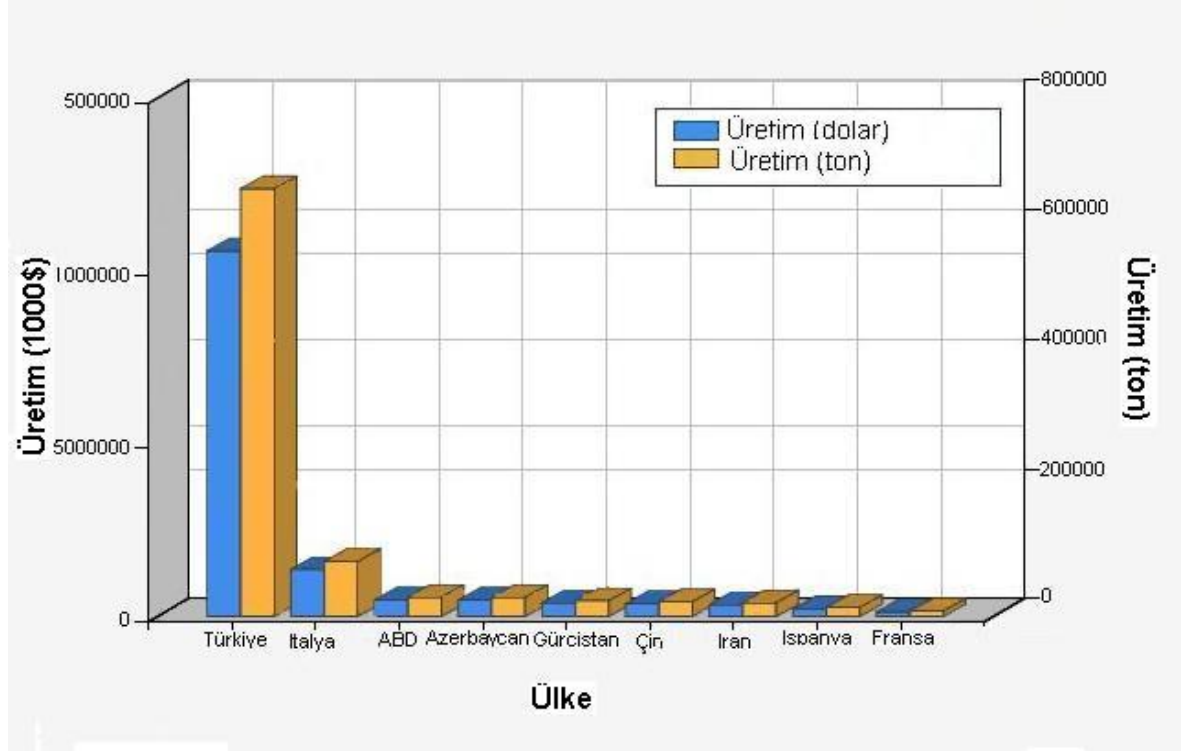
Fındık ülkemiz için büyük bir öneme sahiptir. Ülkemizde yaklaşık 621.000 hektar alanda üretimi yapılan fındıkla ortalama 395.000 aile geçimini sağlamakta ve yaklaşık 8 milyon insan fındığın üretimi, hasadı ve işlenmesinden gelir elde etmektedir. Fındık ülkemiz için tarıma dayalı dışsatımın gelirleri arasında önemli bir yere sahiptir ve bitkisel ürünler içinde en yüksek döviz getiren üründür. Türkiye 115 ülkeye fındık ihraç etmektedir. Ülkemize 2013 yılında 1,8; 2014 yılında ise yaklaşık 2 milyar dolar gelir sağlamıştır [4,289].

Fındık, ülkemiz ekonomisi ve tarımında özel bir yeri olan geleneksel ihraç ürünümüz olmasına ilave olarak, bileşenleri bakımından önemli bir besin maddesidir. Bileşiminde bulunan yüksek orandaki yağ, fındığın depolanması ve işlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Fındık birçok gıda ürünlerinde tat, lezzet ve aroma verici olarak da kullanılmaktadır.

Mikotoksinlerin gıdalardaki mevcudiyeti insan ve hayvan sağlığını uluslararası kapsamda etkilemektedir. FAO'ya göre her yıl dünyadaki ekinlerin % 25'i mikotoksinlerden etkilenmektedir. ABD'de aflatoksin kaynaklı ekin kaybı 100 milyon doların üzerindeyken bunun 26 milyon doları sadece fıstık kaybından ileri gelmektedir [290].

Son 5 yılda Türkiye dünya fındık üretiminin % 70'lik payına sahiptir. Bunu takiben dünyada en önemli fındık üretim bölgeleri olarak İtalya, Amerika ve İspanya gelmektedir. Dünya üretim ve ihracat değerlerini gösteren değerlerde dikkat çekici nokta üretimi olmayan özellikle Almanya'nın yüksek tonajlarda ihracat yaparak büyük gelirler sağlamasıdır [98]. Bununla birlikte Fransa, Hollanda, Belçika ve

İsviçre de üretici olmadıkları halde ihracat yapmaktadırlar. FAO'nun gerçekleştirmiş olduğu araştırmalara göre ülkelerin üretim tonajları ve elde ettikleri gelirlere göre oluşturulmuş grafikten de bu büyük dağılım net şekilde ortaya konulmuştur (Şekil 2.21).



Şekil 2. 21 Dünya 2012 fındık üretimi ve ülkelerin gelir dağılımı [291]

Fındık, ulusal ekonomimize katkı sağlayan ihraç ürünümüz olmasına ilave olarak aynı zamanda bileşenleri bakımından önemli bir besin ögesidir. Fındığın genel bileşimi Çizelge 2.12'de verilmiştir.

Fındığın bu özelliği yapısında bulunan özel yağ bileşimi, protein, karbonhidrat, lif, vitaminler (vitamin E), mineraller, fitositeroller (β -sitositerol) ve antioksidan özellikteki fenolik bileşiklerinden dolayıdır [292]. Fındık yüksek yağ oranı (% 60-65) içeriği ile ayrıca iyi bir enerji kaynağıdır. Fındık tüm elzem amino asitlerle beraber çoğu elzem mineralleri de içermektedir [292,293].

Özellikle fındık yağı tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir [294]. Özellikle tekli doymamış yağ asidi oranı daha yüksek gıdaların kolesterol düzeylerinin düşürülmesi ve dengelenmesinde büyük rol oynadıkları ve kalp-damar hastalıkları riskini azalttığı birçok çalışmada belirtilmiştir [295-297].

Çizelge 2. 12 100 gr fındığın besinsel içeriği [298]

Bileşen	Birim	Miktar	Bileşen	Birim	Miktar
Protein	g	14,96	Çinko	mg	2,43
Toplam yağ	g	60,74	Bakır	mg	1,72
Doymuş yağ	g	4,47	Mangan	mg	6,18
Tekli doymamış yağ	g	45,65	Tiamin	mg	0,64
Çoklu doymamış yağ	g	7,92	Riboflavin	mg	0,11
Kolesterol	mg	0,00	Niasin	mg	1,80
Karbonhidrat	g	16,68	Pantotenik asit	mg	0,92
Lif	g	9,52	Vitamin B6	mg	0,56
Kalsiyum	mg	112,88	Folat	µg	112,88
Demir	mg	4,69	Arjinin	g	2,21
Magnezyum	mg	162,26	Vitamin K	µg	14,11
Fosfor	mg	289,25	Vitamin E	mg	15,03
Potasyum	mg	680,79	Toplam fitosterol	mg	95,24

Fındık özellikle yüksek E vitamini (α -tokoferol) içeriğine sahip olmasının yanında B grubu vitaminleri (tiamin, riboflavin, niasin, B₆, pantotenik asit) de belirli oranlarda ihtiva etmektedir [297].

Vitamin E, antioksidan özelliğine sahip olduğundan, hücre zararında oksidasyonu önler ve hücrede serbest radikal oluşumuna neden olan serbest oksijeni, çoklu doymamış yağ asitlerini okside ederek enzimatik olmayan bir yoldan parçalamasını durdurur.

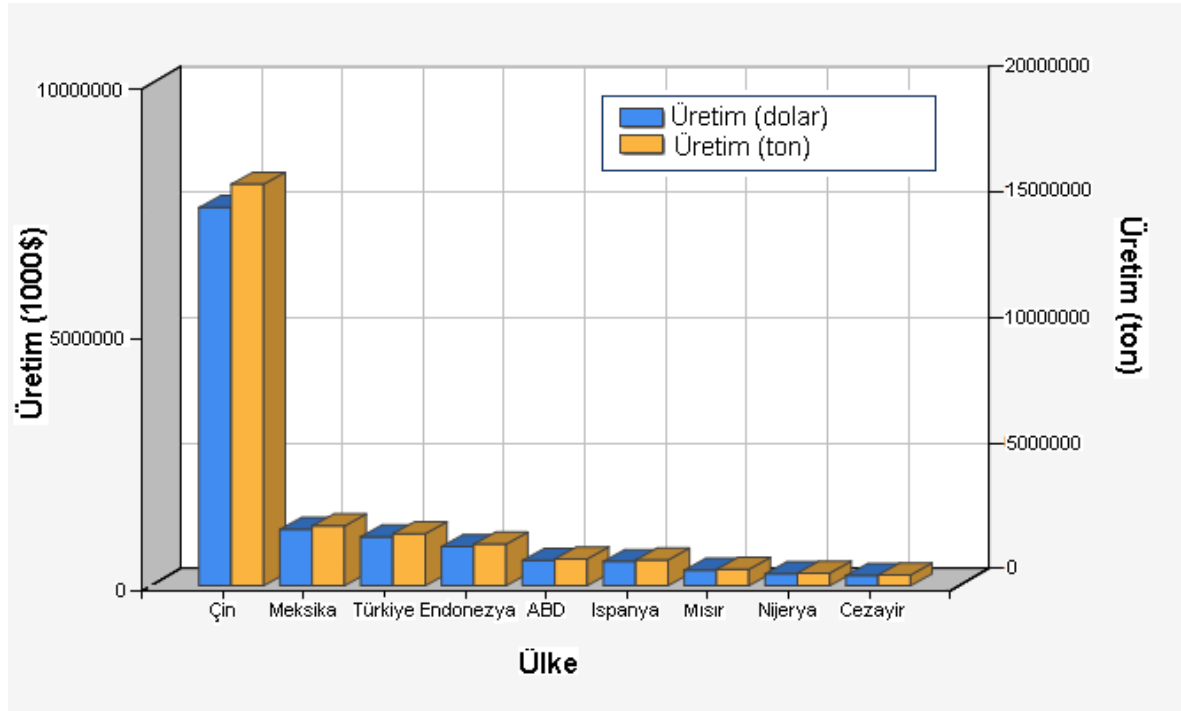
Fındık iyi bir mineral kaynağıdır, özellikle yüksek miktarda kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum, çinko, demir ve selenyum bulunmaktadır. Bu minerallerin kemik gelişiminde ve sağlık üzerine etkileri çok iyi bilinmektedir [299].

Fındık içerdiği besinsel lifler ile diyabet, hiperlipidemi ve obezite gibi hastalıklarda tedavi edici etki gösterir. Hipertansiyon, CHD (kroner kalp hastalıkları), kolesterol kalın bağırsak ve prostat kanseri ve birçok bağırsak hastalıklarını önleyici etkisi olduğu bildirilmiştir. Çizelge 2.12'de belirtilen aktif bileşikler (özellikle aminoasitler ve şekerler) fındığın tat ve aromasını belirleyici önemli rol oynamaktadır [292].

2.6. Kırmızı Biberin Ülkemiz İhracatındaki Önemi ve Besinsel Bileşimi

TSE'nin tanımına göre kırmızı pul biber *Capsicum annum* türüne giren kültür bitkilerinin tam olgunlaşmış acı meyvelerinin iyice kurutulup, saplı veya sapı alındıktan sonra çekirdekli veya çekireksiz yarı öğütülerek pul haline getirilmiş, belli oranda yemeklik sıvı yağ ve tuz ile karıştırılıp su ile tavllanmış halidir [300].

Kırmızı biber günümüzde Antarktika hariç bütün kıtalarda yaygın olarak üretilmektedir. En büyük üretici ülke 16 milyon ile Çin olup, bunu 2,4 milyon ton ile Meksika, 2,1 milyon ton ile de Türkiye izlemektedir. Türkiye, dünya biber üretiminde bazı yıllar Çin'den sonra ikinci sırada, bazı yıllar da ise Meksika ile yer değiştirerek üçüncü sırada yer almaktadır [301]. Türkiye taze biber üretiminde dünyada üçüncü sırayı almasına ve tek başına dünya biber üretiminin % 7-8'ini karşılamasına karşılık, dünya işlenmiş biber üretiminde ne yazık ki iyi bir konumda olmayıp, yaklaşık % 3'lük bir paya sahiptir [6,291]. Türkiye gerçekleştirdiği biber üretimiyle 2012 yılında 98 milyon dolar gelir elde etmiştir [6].



Şekil 2. 22 Dünya 2012 biber üretimi ve ülkelerin gelir dağılımı

Kırmızı biber; gelişim, elde edildikleri bitkilerin yetiştirildiği ortamdan hasat, kurutma ve daha sonraki işleme safhalarında karşı karşıya kaldığı şartlar

nedeniyle aflatoksin oluşumuna hassas ürünlerden birisidir. Kırmızı biber en yüksek oranda aflatoksin içeren baharat türüdür [302].

Bununla beraber biberler genellikle yetersiz hijyenik koşullar altında açık havada kurutulmaktadır. Kırmızı biberler aflatoksinler ile hasat öncesi-sonrası, depolama sırasında ve taşıma esnasında kontamine olabilmektedir.

Gıdalara katılan baharatların birçoğu küfler, mayalar ve bakterilerle farklı miktarlarda kontamine olabilmektedir. Kırmızı biber aflatoksin oluşumu bakımından çok duyarlı bir üründür ve uygun olmayan hasat, depolama ve işleme koşullarında kserofilik küfler (*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*) tarafından kolayca aflatoksin oluşabilir [303,304]. Baharatlar 10^8 (kob/g) gibi oldukça yüksek mikrobiyal yükte kontaminasyona maruz kalabilmektedirler [305]. Kontamine olmuş baharat son ürün mikrobiyolojik kalitesini, bunları tüketen insanların sağlığını (enfeksiyon ve intoksikasyon yoluyla) ve üretim açısından hatalı/kalitesiz ürün oluşumunu etkilemektedir.

Yakın zamanda yapılan bir araştırmada farklı yerlerden temin edilen kırmızı pul biber örneklerinin aflatoksin değerlerinin büyük oranda yasal değerler üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin yaklaşık % 50'sinin Avrupa standartlarının üzerinde olduğu belirtilmiş olup, kontamine olan örneklerin yaklaşık % 90'ının 5 ile 85,55 ng/gr düzeyinde aflatoksin B1 içerdiği belirtilmiştir. Toplam aflatoksin düzeyi en yüksek 144,41 ve ortalama 22,18 ng/gr olarak bulunmuştur [306].

Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkındaki 2008/26 sayılı Türk Gıda Kodeksi Tebliğinde, tüm ve toz kırmızıbiberler için maksimum AFB1 ve total aflatoksin miktarının sırasıyla 5 µg/kg ve 10 µg/kg olduğu belirtilmiştir [77]. Türk Gıda Kodeksi Tebliği, 1881/2006/EC sayılı gıda maddelerindeki belirli bulaşanların maksimum miktarlarının belirlenmesi hakkında komisyon tüzüğü dikkate alınarak Avrupa Birliği'ne uyum süreci çerçevesinde hazırlanmıştır [76]. Bu direktif 2010 yılında çıkan 165/2010 direktifi ile yeniden düzenlenmiştir [307].

Kırmızı biber taze olarak tüketilmekle birlikte; sanayi hammaddesi olarak tarımı başta konserve, salça, turşu, acı sos ve işlenmiş et ürünleri için yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Kırmızı biber üreticiliği genel olarak baharat olarak kullanılmak için yapılmaktadır. Bununla birlikte gıdalara sadece aroma vermek amacıyla değil gıdayı korumak, ürün görüntüsünü güzelleştirmek ve antioksidatif-bakterisidal

etkilerinden dolayı ürün raf ömrünü uzatmak amacıyla da kullanılmaktadır. Kırmızı biberde bulunan askorbik asit ve karotenoidler sahip oldukları antioksidan özellikleri sayesinde, bazı kanser tiplerini, kardiyovasküler hastalıkları, arteriyosklerozisi ve yaşlanmayı önleyici etki göstermektedir. Kırmızı biber içerdiği birçok bileşen ile insan sağlığında önemli bir yere sahiptir. Çizelge 2.13'te 100 gr biberin besinsel bileşimi verilmiştir [308].

Çizelge 2. 13 100 gr kırmızıbiberin besinsel içeriği

Bileşen	Birim	Miktar	Bileşen	Birim	Miktar
Protein	g	12	Su	g	8,1
Yağ	g	17,3	Lif	g	24,9
Karbonhidrat	g	31,7	Demir	mg	8
Vitamin A	IU	41610	Fosfor	mg	293
Tiamin	mg	1	Kalsiyum	mg	148
Riboflavin	mg	2	Magnezyum	mg	152
Niasin	mg	15	Potasyum	mg	2014
Askorbik asit	mg	76	Sodyum	mg	30

Kırmızı biber gibi kurutulmuş gıdalar radyasyona su oranı yüksek olan gıdalara nazaran daha az duyarlıdır. Dolayısıyla bu gıdalarda uygulanan maksimum uygulama dozları daha yüksek olmaktadır. Birçok çalışmada 10 kGy'e kadar uygulanan dozların gıdanın besinsel ve görsel bileşiminde değişime neden olmadan mikroorganizma yükünü indirmediği varsayılmaktadır [309]. Farkas [310], 7,5 kGy dozunun baharat tadında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını belirtmiştir.

2.7. Antioksidan Etkili Gıda Bileşenleri: Fenolik Bileşikler

Gıdalarda bulunan önemli fitokimyasallar tokoferoller, karotenoidler ve diğer antioksidan özellikteki fenolik bileşenlerdir [311].

Spesifik yağ asitleri (omega-3, oleik asit vb.) sağlık açısından birçok fayda sağlamaktadır. Bu bileşenlerin günlük diyetle alımı damar sertliği, kanser, otoimmün rahatsızlıkları ve hipertansiyon risklerini azaltmaktadır [312-314].

Karotenoidler de önemli besinsel bileşenlerdir. Beta karoten ihtiyaç dahilinde A vitaminine dönüşmektedir. Diğer karotenoidler de serbest radikallerle ve serbest

radikal başlatıcısı olan tekli oksijenle etkileşime girerek sönmelenmesini sağlamaktadırlar [315].

Antioksidan vitaminler dışındaki besinsel birçok bileşen de ROT indüklü serbest radikal hasarlarına karşı koruma mekanizmasına sahiptir. Fenolik bileşenler neredeyse her gıdada bulunabilen çok güçlü antioksidanlardır. Bu moleküller kalp krizini, enflamasyonu, kanseri ve diyabeti engelleyici antioksidan maddeler olarak görev alırlar [316-319].

Fenolik bileşenler bitkilerde patojen ve böcek saldırıları, UV radyasyonu ve iyileşme durumları gibi ekolojik ve fizyolojik etkenlere cevap olarak üretilmektedir. En basit ve temel yapıları bir veya daha fazla hidroksil grup içeren aromatik halkalardır. Yapılarındaki fenol birimlerine bağlı olarak isim ve işlevleri değişmektedir. Bitki fenolikleri fenoller, kumarinler, ligninler, liganlar, taninler, fenolik asitler ve flavonoidleri kapsamaktadır.

Flavonoidler en genel fenolikler olmakla birlikte neredeyse bütün bitki dokularında bulunmaktadır. Özellikle karatenoidler ve klorofilin yanısıra mavi, mor, sarı, turuncu ve kırmızı rengin oluşmasını sağlarlar. Flavonoid ailesi flavonlar, flavanoller, izoflavonlar, antosiyaninler, antosiyanidinler, proantosiyanidinler ve kateşinleri içermektedir. Bütün flavonoidler fenilalanin, tirozin ve üç halkalı aromatik aminoasitlerden türemiştir [320].

Fenolik asitler de fenolik bileşiklerin ester, glikozit veya amid formunda bulunan veya nadiren serbest formda bulunan sınıfındandır. Hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asit gibi iki benzer yapıya sahiptirler. Hidroksisinamik asit türevleri ferulik, kafeik, sinapik ve p-kumarik asitten oluşurken; hidroksibenzoik asit türevleri gallik, vanillik, şiringik ve protokateşuik asitten oluşmaktadır.

Diğer ana fenolik bileşenler ise hücre duvarı fenolikleridir. Bunlar çözünmez ve diğer hücre bileşenleriyle kompleks oluşturular. Hücre duvarı fenoliklerinin iki ana grubu ligninler ve hidrokssinamik asitlerdir. Bu bileşenler hücre duvarında enfeksiyon, UV radyasyonu, yaralanma gibi stress unsurlarına karşı koruyucu görev yaparlar [321]. Taninler hidrolize edilebilen ve kondase taninler olarak ikiye ayrılmaktadırlar ve diğer bitki moleküllerine oksidatif bağ yapma potansiyelleri çok güçlüdür.

Fındıkta bulunan fenolikler (polifenoller, tokoferol) gıdayı oksidasyona karşı korumakta ve taze olan fındıklarda hafif buruk ve acımsı tada neden olmaktadır [322]. Bu bileşikler kronik kalp hastalığı, bazı kanser çeşitleri ve birçok hastalık ve fizyolojik durumu engellemektedir [323,324]. Ayrıca yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle hücreleri singlet oksijen, süperoksit, peroksil ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin hücreye verebilecek zararlarını engellerler [325].

Shadidi ve ark. [326] fındık zarının iç fındıktan daha yüksek oranda fenolik bileşen içerdiğini belirtmiştir. Ayrıca radikal süpürme aktivitelerinin (hidrojen peroksit, süperoksit ve DPPH radikallerini süpürme (scavenging)) de normal fındıktan yüksek olduğu belirtilmiştir. Tez kapsamında kullanılan fındıkların da bu bağlamda yüksek fenolik bileşen değerlerinde olmasının sebebi de budur. Ayrıca fındık yüzeyinde bulunan zar inoküle edilen sporlar için iyi bir matriks oluşturmaktadır ve beklenen küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunun sağlanmasına katkıda bulunmaktadır.

Gıda insan gastrointestinal sisteminden geçerek midede (yüksek asidik ortam ve enzimler); ince bağırsakta (hafif bazik ortam ve enzimler) ve son olarak kalın bağırsakta (nötr pH, intestinal mikroflora) sindirime uğramaktadır. Fenolikler gıdalarda hem bağlı hede serbest halde bulunmaktadır. Bağlı fenolikler genellikle β -glikozit formunda bulunurlar, mide ve ince bağırsakta serbest hale gelebilirler ve kalın bağırsağa kadar ulaşıp biyoaktif özellik gösterebilirler [327].

Vitamin E ya da α -tokoferol, fenolik antioksidandır. Fenolik maddelerin antioksidan özellikleri, serbest radikallerindeki donatı hidrojen atomlarına dayanmaktadır. Bu bileşikler serbest radikal tutuculardır ve reaksiyonun başlangıcında veya reaksiyon zincirinin bir aşamasında devreye girer ve tekli oksijeni tutarak transfer reaksiyonunu önler. Buna bağlı olarak kanser, kalp damar hastalıkları ve diyabeti önler. Alfa tokoferol lipid membrandaki doymamış yağ açillerini korumaktadır. Serbest radikal oksidasyonu ve takibinde lipid radikal oluşumunun artıp damar sertliğine neden olması engellenmektedir [311]. Ayrıca polifenoller ve diğer maddelere bağlı olarak fındık yağının stabilitesini sağlarlar ve yağın oksidatif stabilitesinde rol oynarlar [292,328]. Fındık doğal yapısı itibarı ile kırmızı pul biber ise özellikle parlatma amacıyla katılan bitkisel yağ nedeniyle belirli oranlarda tokoferol içeriğine sahiptir.

2.8. Aflatoksin ve Degradasyon Ürünlerinin Sitotoksik Özelliklerinin İncelenmesi

Tez kapsamında gerçekleştirilen plazma işlemleri ile aflatoksin miktarında meydana gelebilecek herhangi bir azalma bu toksinin insan sağlığı açısından daha az tehlike teşkil edebileceğini göstermemektedir. Genellikle literatürde düşünülen en büyük hatalardan bir tanesi aflatoksin miktarının kromatografik bir yöntemle yüzdesel azalma miktarının verilmesi ve uygulanan bu işlemlerin etkin olarak kullanılabileceğinin belirtilmesidir. Aflatoksinler de yapıları itibarıyla parçalandıklarında daha toksik bir bileşene dönüşebilirler veya belirtilen yüzdesel indirgenmelerle doğru orantılı olarak toksisiteleri azalmayabilir. Bu durumun tam olarak belirlenebilmesi adına aflatoksinler ve parçalanma ürünlerinin hücre düzeyinde etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.

Park ve ark. [46] plazmanın toksinlerin sitotoksiteleri üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma plazma-toksin etkileşimi üzerine gerçekleştirilecek çalışmalarda temel niteliği taşımaktadır. Bu çalışmada gıda bazlı herhangi bir işlem gerçekleştirilmemesinin yanında aflatoksin dolüsyonlarına direkt olarak atmosferik plazma uygulaması gerçekleştirilmiş ve ortamdaki uzaklaştırılan toksinlerin aktif plazma türleri kaynaklı veya plazma ucundan çıkan gaz basıncı kaynaklı mı olduğu belirtilmemiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksikite testlerinde 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi uygulanmış olup hedef hücre olarak fare fibroblast hücresi kullanılmıştır. İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile (mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz) renkli, suda/hücre içinde çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir [329,330]. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Formazan asidik izopropanol içerisinde çözünür ve 540 nm dalga boyunda optik yoğunluğu kaydedilir. Bu yöntemde hücrelerin MTT'yi formazana indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru bir orantı

gösterir. MTT yöntemi basit ve tekrarlanabilir sonuçların alındığı kolorimetrik bir yöntemdir [331].

Gıdalar karsinojenik etkilerinin yanısıra antikaserojenik etkiye sahiptirler. Birçok meyve, sebze ve çaylar gerçekleştirilen hayvan deneylerinde kimyasal tümör oluşumunu engellemektedirler. Gescher ve ark. [332] farklı gıdaların atikanserojenik etkilerini üzerine çalışmalar gerçekleştirmiştir. Shirazi ve ark. [333] yaptıkları araştırmada MTT testi kullandıklarında fıstık ekstraktlarının aflatoksinlerin HepG2 hücreleri üzerine etkilerini olumlu yönde değiştirmedeğini belirtmişlerdir. Ekstraktların HepG2 hücreleri için toksik bir etki yaratmadığı gibi AFB1 uygulamasından önce hücrelerle muamele edildiğinde toksinin sitotoksik etkisini artırdığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte aflatoksin ve parçalanma ürünlerinin hücre morfolojisi üzerindeki etkilerini görmek amacıyla hücreler akridin turuncusu ile boyanmış ve floresan mikroskopta değişen aflatoksin konsantrasyonlarına karşı elde edilen canlılık gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

Sunulan çalışmanın temel amacı, düşük ve atmosferik basınç temelli 2 farklı soğuk plazma teknolojisinin dekontaminasyon ve detoksifikasyon etkisinin iki gıda örneği üzerinde ve iki farklı küf suşu kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve performanslarının belirlenmesidir.

Sunulan çalışmayı aşağıdaki ana başlıklar altında özetlemek mümkündür. Bu başlıklar sırasıyla,

- Seçilen gıda örneklerinin başlangıç fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesini belirleyecek parametrelerin belirlenmesi
- Aflatoksin üreten küf suşlarının seçilmesi ve gıda örneklerine kontaminasyonlarının gerçekleştirilmesi
- Örneklerde aflatoksin üreten küflerin gelişmesi ve optimum aflatoksin üretiminin sağlanması
- Küf dekontaminasyonu sağlayan optimum plazma parametrelerinin belirlenmesi ve küf yükünde meydana gelen indirgenmenin belirlenmesi
- Plazma uygulamasının seçilen gıdaların fiziksel ve kimyasal özellikleri ile içerdikleri aflatoksin üzerine etkisinin belirlenmesi
- Günümüzde en etkin sterilizasyon yöntemlerinden biri olarak kabul edilen gama ışınlama yöntemi ile iki soğuk plazma yönteminin karşılaştırılması
- Aflatoksin parçalanma ürünlerinin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksikolojik etkilerinin belirlenmesi
- Plazma uygulamasının mikroorganizmaların yüzey morfolojilerinde meydana getirdiği değişikliklerin tespit edilmesi

Tez kapsamında yer alan tüm kimyasal analizler ve aflatoksin analizlerinde kullanılan analiz metotlarının geliştirilmesi, valide edilmesi veya geçerli kılınmasında kullanılan yöntemler ve geliştirilen stratejiler, uygulanan analiz metotlarına ait işlem basamakları, kromatografik analiz koşulları, elde edilen limit of dedection (LOQ) ve geri kazanım (GK) değerleri TÜBİTAK 111O570 nolu projeden alınmış olup Yrd.Doç.Dr. Baran Önal Ulusoy'un izni ile kullanılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Tez kapsamında kullanılan gıda örnekleri Türkiye'nin ihracatında önemli bir yer tutan ve pazar payı yüksek fındık (Gürsoy Tarımsal Ürünler Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş., Ordu) ve kırmızı pul biber (Bağdat Baharat, Ankara)'dir. Fındık 11 mm Levant kalite natürel fındıktır.

Aflatoksin analizleri için VICAM-aflatest (Watertown, MA, ABD) HPLC kitinde yer alan B1, B2, G1, G2 standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve örnekteki miktarları belirlenmiştir. Sitotoksikoloji testlerinde kullanılan kristal aflatoksin (B1, B2, G1, G2) saf standartları ise Sigma-Aldrich'den (St. Louis, MO, ABD) alınmış ve analiz öncesi metanolde çözülmüştür.

Kimyasal analizlerde kullanılan saf standartlar (Sigma Aldrich Missouri, ABD), Folin-Ciocalteu reaktifi (Merck, Almanya), küflerin SEM görüntülemeleri için mikroorganizmaların yüzeye sabitlenmesinde kullanılan glutraldehit (AppliChem, Almanya) ve Osmium tertaoksit (% 1, Sigma Aldrich, Missouri, ABD), kullanılmıştır. Kullanılan tüm çözücüler analitik saflıkta olup Sigma-aldrich (MO, ABD) ya da Merck-millipore (Almanya) dan satın alınmıştır. Serbest yağ asitliği deneyinde indikatör olarak fenolftalein (Merck, Almanya) ve timol mavisi (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, Missouri, ABD) kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında fare fibroblast hücreleri L929 ((Sigma Aldrich Inc. St. Louis, Missouri, ABD) kullanılmıştır. Hücre kültürü için besiyeri olarak % 10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum-FBS, BIOCHROM, Almanya), % 1 L-glutamin, 100 ünite/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin (Invitrogen, ABD) ile desteklenmiş, Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri (DMEM; Sigma-Aldrich, ABD)

kullanılmıştır. Hücrelerin besi ortamından ayrılmaları % 0,25 tripsin içeren 1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Invitrogen, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında kimyasal ajan olarak; serum içermeyen besi yeri (SFM, Invitrogen, ABD), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT, Applichem, Germany), 0,04 M HCL içeren izopropanol-HCl (izopropanol, Merck, Almanya) kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik analizler kapsamında kullanılan dilüsyon sıvısı % 0,9 (w/v)'luk NaCl (Merck, Germany) içinde çözündürülmüş % 0,1 (v/v)'lik Tween 80 (Merck, Almanya) çözeltilisidir. Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) agar (Merck, Almanya) küflerin spor üretimi ve uygulamalar öncesi ve sonrası sayımlarının gerçekleştirilmesi için; Brain Heart Infusion (BHI) agar ise bakteri sayımı için kullanılmıştır. Fındık örneklerinin ön dekontaminasyonu amacıyla farklı konsantrasyonlarda etanol çözeltileri kullanılmıştır.

Dekontaminasyon çalışmaları için aflatoksin ürettiği bilinen küf suşları TÜBİTAK-MAM Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Küf suşlarına ait kimlik bilgileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Temin edilen saf *A. flavus* ve *A. parasiticus* kültürlerinin kimlik bilgileri

Verilen Bilgiler	I. Kültür	II. Kültür
İzolatin ismi	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
İzolatin alındığı örnek	Fındık	Fındık
İzolatin alındığı şehir	Adapazarı	Giresun
Liyofilize kod no	327	1041
Ürettiği toksinler	Aflatoksin B1, B2	Aflatoksin B1, B2, G1

3.2. Metot

3.2.1. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Fiziksel Analizler

İki gıda örneğinde yapılan fiziksel analizlerin türü ortak olup bunlar; nem, su aktivitesi ve renk tayini analizleridir.

3.2.1.1. Nem Tayini

Nem tayini kırmızı pul biber için TS 2134 [334] ve fındık için TS 1632 EN ISO 665'e [335] göre belirlenmiştir. Buna göre yaklaşık 5 gr öğütülmüş fındık örneği, (>0,2 mm) 105±2°C'deki etüvde sabit ağırlığa ulaşincaya kadar (yaklaşık 4-5 saat)

tutulmuş ve oluşan ağırlık kaybından yararlanarak % nem miktarı saptanmıştır. Buna göre,

$$\text{Nem miktarı (\%)} = ((m_2 - m_3) / (m_2 - m_1)) * 100$$

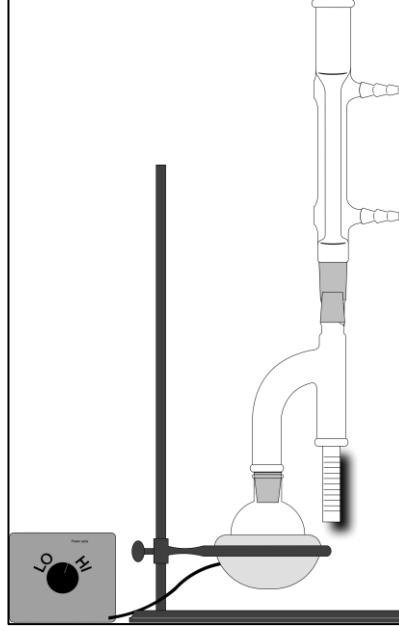
m₁: Kurutulmuş boş kurutma kabı ve kapalı ağırlığı (g)

m₂: Analiz numunesi + kurutma kabı ağırlığı (g) (Kurutmadan önce)

m₃: Analiz numunesi + kurutma kabı ağırlığı (g) (Kurutmadan sonra)

Pul biber için kullanılan yöntem, su ile karışmayan organik bir çözücü kullanılarak, suyun damıtılması ile alınıp dereceli bölümde toplanması ve miktarının belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Pul biber örnekleri için gerçekleştirilen TS 2134 no'lu standarda [334] göre 40 gr örnek tartılmış ve üzerine 75 mL toluen konulup ağzı kapalı bir şekilde 5 dk bekletilmiştir. Sonrasında örnekler önce 50°C'de biraz bekletip (4-5 dk) sonrasında sıcaklık yavaşça 70°C'ye artırılıp işleme devam edilmiştir. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi özel olarak yaptırılan cihazın parçaları yerleştirilmiştir. Cam düzener vasıtasıyla karışımdan skala içeren kısma doğru nem geçişi durana kadar işleme devam edilmiştir. Geri soğutucunun çeperlerinde kalan nemi toplamak için geri soğutucunun içeriği, yaklaşık 5 mL toluen ile yıkanmış ve geri soğutucunun tepesinden sokulan cam baget yardımı ile dereceli kabın içerisinde toplanan suyun toluenden ayrılarak dibe toplanması sağlanmıştır. Su seviyesi değişmeyinceye kadar damıtma işlemi sürdürülmüş ve ısıtıcı kapatılmıştır. Sonra dereceli kısımdaki suyun hacmi ölçülmüştür. Pul biberin nem miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{Nem miktarı (\%)} = (\text{skaladan gözlenen değer} / \text{örnek kütlesi}) * 100$$



Şekil 3. 1 Pul biber nem ölçüm düzeneği

3.2.1.2. Su Aktivitesi Tayini

Örneklerin su aktivitesi ölçümleri AquaLab CX-2 model su aktivitesi ölçüm cihazıyla (Decagon Devices, Inc., ABD) gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örnek paçallarından rastgele alınan örnekler üzerinde deneyler gerçekleştirilmiş olup sonuçlar örneklerin ortalaması alınarak verilmiştir. Her numunede su aktivitesi tayininin aynı sıcaklık derecelerinde yapılmasına özen gösterilmiştir.

3.2.1.3. Renk Analizi

Fındıklarda renk tayini HunterLab (Minolta, Japonya) ile kırmızı pul biberde renk tayini ise hem HunterLab hem de ekstrakte edilebilen renk indeksi (ASTA) olarak Topuz'a göre belirlenmiştir [336].

3.2.1.3.1. Hunterlab Yöntemi Kullanılarak Gerçekleştirilen Renk Analizi

Fındık örneklerinde plazma dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilirken direkt olarak zarlı fındıklarla çalışıldığı için fındıkta renk parametresini zar rengi belirlemektedir. Bu amaçla, alınan fındık örneklerinin renk değeri HunterLab cihazında fındık örneklerinin tam olarak girebileceği başlıklar kullanılarak belirlenmiştir. Pul biberlerde ise cihazın özel kuvvetlerine pul biber doldurularak renk ölçümleri yapılmıştır.

"L" değeri aydınlık derecesi (lightness) olarak tanımlanmakta olup bu değer 0 (siyah), ile 100 (beyaz) arasında değişmekte ve "pozitif a" değerleri kırmızı, "negatif a" değerleri ise yeşil rengi göstermektedir, "b değeri" de 0 ile 60 arasında değişmekte ve "pozitif b" değerleri sarı, "negatif b" değerleri ise mavi rengi göstermektedir. ΔE değeri toplam renk değişim değerini ifade etmekte olup aşağıda belirtilmiş olan formülle hesaplanmaktadır.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_{kontrol}^*)^2 + (a^* - a_{kontrol}^*)^2 + (b^* - b_{kontrol}^*)^2}$$

ΔE değeri başlangıç ve işlem sonrası örneklerin renk değerleri arasındaki farkın büyüklüğünün belirtilmesini sağlamaktadır. Kontrol olarak işlem görmemiş başlangıç fındık ya da pul biber örneğinin ortalama L, a, ve b değerleri kullanılmıştır.

3.2.1.3.2. Ekstrakte Edilebilen Renk İndeksi (ASTA) Yöntemi İle Renk Analizi

Kırmızı pul biberden ekstrakte edilebilen rengi belirlemek amacıyla yaklaşık 0,2 gr örnek balon jöjeye tartılmış ve balon içeriği analitik saflıkta aseton ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Balon ağzı kapatıldıktan sonra çalkalayıcıda 250 rpm'de 5 dk karıştırılmış ve karanlık ortamda 20 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Ekstraksiyon süresi dolduktan sonra balon 1 dk santifrüj edilerek biber parçalarının dibe çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen ekstraktın absorbans değeri spektrofotometrede Perkin Elmer Lambda 3 (Waltham, Massachusetts, USA) 460 nm dalga boyunda okunmuştur. Okunan absorbans değeri aşağıda belirtilen formülde yerine konularak ASTA renk değeri hesaplanmıştır [337].

$$\text{ASTA renk değeri} = (A \cdot 16,4 \cdot If) / W$$

A: Kırmızı pul biber ekstraktının absorbansı

16,4: ASTA renk sabiti (100 ASTA değeri, 460 nm'de absorbansı 1,0 olan kırmızı biber ekstraktının* rengidir)

* Standart kabul edilen 0,164 gr kırmızı biberin 100 mL aseton ile ekstraktı

If: Alet düzeltme faktörü (Hesaplamalar kısmında 1 olarak kabul edilmiştir)

W: Absorbansı okunan çözeltideki örnek miktarı (gr)

3.2.2. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Kimyasal Analizler

3.2.2.1. Yağ Miktarı Tayini

Yağ miktarı tayini için soxhlet ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. 10'ar gr pul biber ve öğütülmüş fındık örnekleri alınmış ve soxhlet kartuşlarına konulmuştur. Ayrıca kartuşlara yaklaşık 2 spatül deniz kumu eklenerek içerik karıştırılmıştır. Soxhlet ekstraktöründe n-hekzan varlığında 60°C'de 6 saat ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Balondaki ekstrakt içindeki n-hekzan, döner buharlaştırıcıda vakum altında 30-40°C'de uzaklaştırılmıştır. Örnekte kalan az miktardaki çözücü ise 105±2°C'deki etüvde 2 saat bekletilerek uçurulmuştur. Balon içeriği desikatörde soğutulduktan sonra tartım farklarından faydalanılarak yağ miktarı yüzde olarak saptanmıştır.

$$\% \text{ Yağ (gr /100 g)} = (M_2 - M_1) / m * 100$$

M₁= Sabit tartıma getirilmiş balonun ağırlığı (g).

M₂=Balonda son tartımda bulunan toplam yağ miktarı (g).

m= Alınan örneğin ağırlığı (g)'dir.

3.2.2.2. Serbest Yağ Asitliği Tayini

Örneklerdeki yağ, soxhlet ekstraksiyonu ile elde edildikten sonra yağda kalan hekzan önce döner buharlaştırıcıda sonra 30°C'deki su banyosunda azot altında uçurulduktan sonra yağın, serbest yağ asitliği AOCS Ca 5a-40'da belirtilen yöntem doğrultusunda titrimetrik olarak saptanmış ve % oleik asit cinsinden verilmiştir [338]. Yöntemde bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Fındık örnekleriyle çalışılırken indikatör olarak fenolftalein çözeltisi kullanılırken, pul biberden elde edilen yağ ekstraktının renginin çok koyu kırmızı olmasından dolayı titrasyonda dönüm noktasını tam belirleyebilmek için indikatör olarak timol mavisi kullanılmıştır.

$$\text{Serbest asitlik (\%oleik asit)} = \text{harcanan NaOH hacmi (mL)} * N * 28,2 / \text{örnek ağırlığı (g)}$$

3.2.2.3. Peroksit Sayısı Tayini

Peroksit sayısı, yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının ölçüsü olup 1 kg yağda bulunan peroksit oksijenin miliekivalentgram olarak miktarıdır. Örneklere ait peroksit sayısı tayini AOCS Cd 8-53 standart metodu kullanılarak yapılmıştır [339].

Bu metoda göre gerçekleştirilen deneylerde, belirlenen miktarlarda yağ örnekleri (fındık için ≈5 g, pul biber için ≈1,4 g) balona tartılmıştır. Fındık örneği için örnek üzerine 30 mL asetik asit-kloroform (3:2 v/v) ve 0,5 mL doymuş potasyum iyodür (KI) ilave edilerek bir dakika karıştırma işleminden sonra üzerine 30 mL su, 0,5 mL % 1'lik nişasta çözeltisi eklenmiştir ve karışım 0,01 N sodyum tiyosülfat çözeltisi ile beyaz renk görülene kadar titre edilmiştir. Ayrıca kör deneme de yapılarak harcanan hacimden çıkarılmıştır ve peroksit sayısı aşağıda verilen formüle göre, meq/kg yağ olarak hesaplanmıştır.

Peroksit sayısı (miliekuvalent peroksit/kg örnek)= $(V(\text{mL}) \cdot N \cdot 1000) / \text{örnek ağırlığı (gr)}$

Standart metot, 0,1 N sodyum tiyosülfat çözeltisi ile yapılan titrasyonda harcanan hacim 0,5 mL'nin altında olması durumunda titrasyonlarda 0,01 N sodyum tiyosülfat çözeltisi kullanılmasının ön görüldüğü için 0,01 N çözelti kullanılmıştır. Pul biber için ekstrakte edilen yağ miktarı metotta verilenin aksine 5 gr altında olduğu için tüm reaktiflerin miktarında örnek ağırlığı ile orantılı olarak azaltılmıştır.

3.2.2.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayininde kolorimetrik Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır [340]. Bu yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu ayırıcını indirgeyip, kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Fenolik bileşiklerden fosfomolibdik/fosfotungistik asit komplekslerine elektron transferi gerçekleşmektedir. Elektron transfer reaksiyonu fenolik bileşenler için spesifik olmayıp, ekstraksiyon prosedürleri genellikle askorbik asit ve diğer interferans yapabilecek maddelerin yaklaşık %85 oranında uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

Toplam fenolik maddelerin belirlenmesinde gallik asitten hazırlanmış çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır ve sonuçlar gallik asit cinsinden verilmiştir [340]. Folin–Ciocalteu reaktif çözeltisi 2 N olup, çalışmada 1/10 oranında saf su ile seyreltilerek 0,2 N'lik çözeltisi kullanılmıştır.

Literatürde sodyum karbonat çözeltisi için iki konsantrasyonun sıklıkla kullanıldığı görülmüştür. Bunlar % 7,5 (w/v)'luk ve doymuş çözeltidir. Çalışma kapsamında bu çözeltilerin her ikisi de kullanılmış ve toplam fenolik madde tayini için hangisinin

daha uygun olduğu tespit edilmiştir. % 7,5'luk çözelti hazırlamak için 75 gr sodyum karbonat 1 L suda çözdürülmüştür.

Doygun sodyum karbonat (% 35) çözeltisi; 87,5 gr sodyum karbonatın saf suda çözdürülüp 250 mL'ye tamamlanması ile elde edilmektedir. Çözelti karıştırma ortamında bir gece bekletilerek, filtre edilmiş ve stoklanmıştır.

En etkin ekstraksiyon verimini elde etmek için uygun çözücülerin seçilmesinin yanında zaman ve sıcaklık parametrelerinin de ayarlanması gerekmektedir. Normalde zaman ve sıcaklık değerlerinin artması analit çözünürlüğünü artırmaktadır. Bununla birlikte fenolik bileşikler genellikle degrade olmakta veya uzamış ekstraksiyon zamanı ve yüksek sıcaklıktan kaynaklanan enzimatik oksidasyon gibi istenmeyen reaksiyonlar gerçekleşmektedir.

Çözücü:örnek oranının artışı fenolik ekstraksiyonunu artırmaktadır fakat en etkin oranın belirlenmesi gerekmektedir. Al-Farsi ve Lee [341] 60:1 oranının bitkilerdeki fenoliklerin ekstraksiyonunu etkili bir şekilde sağladığını belirtmişlerdir. Tez kapsamında bu oran 25:1 olarak gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon çözeltilerine asit eklenmesinin de ekstraksiyon verimini artırdığı belirtilmektedir. Davidov-Pardo ve ark. [342] pH 4-5 civarında kateşinlerin ve izomerlerinin alkali ve yüksek asidik ortamlara göre daha yüksek stabilitede olduklarını belirtmişlerdir. Bu nedenle tez kapsamında ekstraksiyon verimini belirlemek amacıyla asit içeren çözeltiler de test edilmiştir.

3.2.2.4.1. Fındık Örneklerinden Fenolik Madde Ekstraksiyon Yöntemleri

Literatür araştırması sonucunda çalışmada kullanılan örneklere benzer örneklerde kullanılan yöntemlerin pek çoğu denenmiş olup bu yöntemlerin çalışmada kullanılan gıda üzerindeki etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilecek sonuçlardan en etkin ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir.

Yöntem 1: Rio ve ark. [343]'ün fındık zarından fenolik madde ekstraksiyonu için kullandığı yönteme göre farklı paketlerden alınıp paçal yapılan fındık örnekleri parçalayıcı-karıştırıcıdan (blender) geçirilmiş ve homojen olarak karıştırılmıştır. Santifrj tüplerine yaklaşık 1 gr örnek tartılmıştır. Üzerine 10 mL % 1'lik formik asit (v/v) çözeltisi ilave edilmiştir. 15 dk ultrasonik su banyosunda ve sonra ayrıca 70°C'de 1 saat tutulmuştur. Süpernatantın alınması için 3500 rpm'de 10 dk

santifrüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant Whatman No:1 filtre k ĝıdından süzülerek bir balona aktarılmıştır. Kalan kalıntı ise tekrar ekstraksiyon işleminden geçirilerek (kullanılan toplam  zelti miktarının 25 mL'ye tamamlanması amacıyla 2 kere daha (10+5 mL) ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstrakt analiz edileceĝi zamana kadar -20 C'de saklanmıştır. Rio ve ark. [343] tarafından uygulanan yöntemden farklı olarak iki tane fazlaekstraksiyon basamaĝı (10+5 mL) kullanılmıştır.

Yöntem 2: Rio ve ark. [343]' n fındık zarından fenolik madde ekstraksiyonu için kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre santifrüj tüplerine yaklaşık 1 gr  ĝ t lm Ő örnek tartılmıştır.  zerine 10 mL metanol:su (75:25)  zeltisi ilave edilmiştir. 15 dk ultrasonik su banyosunu takiben 15 dk vortekste karıştırılmıştır. Bu işlem 2 kere tekrar edilmiştir. Daha sonrasında süpernatantın alınması için 3500 rpm'de 10 dk santifrüj edilmiştir. Süpernatant Whatman No:1 filtre k ĝıdından süzülerek bir balona aktarılmıştır. Kalan kalıntı tekrar ekstraksiyon işleminden geçirilerek toplanan ekstrakt (kullanılan toplam  zelti miktarının 25 mL'ye tamamlanması amacıyla 2 kere daha (10+5 mL) ekstraksiyon yapılmıştır) analiz edileceĝi zamana kadar muhafaza edilmesi amacıyla -20 C'de saklanmıştır.

Yöntem 3: Artık ve ark. [344] tarafından önerilen yöntem modifiye edilmiştir. Buna göre santifrüj tüplerine yaklaşık 1 g örnek tartılmıştır.  zerine 10 mL % 1 HCl içeren % 80'lik metanol  zeltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklıĝında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra Whatman No:1 filtre k ĝıdı kullanılarak süpernatant kısım alınıp, kalan pellet tekrar ekstraksiyona tabi tutulup 25 mL'lik ekstrakt elde edilene kadar işlemler 2 kere daha (10+5 mL) tekrarlanmıştır.

Yöntem 4: Yöntem 3'te verilen işlemler aynen uygulanmış olup bu yöntemdeki tek farklılık ekstraksiyon için kullanılan  zeltinin % 0,1 HCl içeren % 80'lik metanol olmasıdır. Burada HCl'nin konsantrasyonunun azaltılmasının sebebi, asit  zeltilerinin ekstraksiyon verimini arttırırken bazı fenolik bileşiklerin hidrolizini yol açmasıdır. Yöntem 3 ve Yöntem 4'ten elde edilen veriler karşılaştırılarak asitlerin mevcut fenolik madde bileşimine etkisi tartışılmıştır.

Yöntem 5: Chandrasekara ve Shahidi [345] tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Ekstraksiyon  zeltisi olarak % 80 (v/v)'lik etanol  zeltisi kullanılmıştır. 1 gr örnek erlenlere alınarak üzerine 10 mL % 80 (v/v)'lik etanol

çözeltisi konulmuş ve 60°C de 40 dk su banyosunda çalkalanmıştır. Örnekler 4000 rpm'de 5 dk santifrüj edilmiş Whatman No:1 filtre kâğıdı kullanılarak süpernatant kısım alınıp, kalan kalıntıya sırasıyla 10 mL ve 5 mL etanol eklenip tekrar ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

3.2.2.4.2. Pul Biber Örneklerinden Fenolik Madde Ekstraksiyon Yöntemleri

Literatürde pul biber örneklerinden fenolik maddelerin ekstraksiyonunda genellikle metanol ve aseton tercih edildiği için tez kapsamında her iki çözücü de denenmiştir.

Yöntem 1: Hervetz-Hernandes ve ark. [346]'nın kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu bağlamda yaklaşık 1 grörnek erlene alınmış, üzerine 6,25 mL % 50 (v/v)'lik metanol çözeltisi ilave edilmiştir. 60 dk mekanik çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Süpernatantın alınması için 4000 rpm'de 15 dk santifrüj edilmiştir. Süpernatant Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülerek bir balona aktarılmıştır. Kalan pellet tekrar 6,25 mL metanol ile daha önceki prosedür uygulanarak ekstraksiyon işleminden geçirilmiştir. Süpernatant tekrar uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellete 6,25 mL % 70'lik aseton çözeltisi 2 kere ilave edilerek bu çözelti ile de 2 kere ilk ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Son çözelti hacmi $6,25 \times 4 = 25$ mL olacak şekilde ekstraksiyon tamamlanmıştır.

Yöntem 2: Oboh ve ark. [327]'nin kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Santifrüj tüplerine yaklaşık 1 grörnek tartılmıştır. Üzerine 10 mL aseton:su (80:20) çözeltisi ilave edilmiştir. 5 dk vorteks uygulamasını takiben 5 dk ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrar edilmiştir. Daha sonrasında süpernatantın alınması için 4000 rpm'de 5 dk santifrüj edilmiştir. Süpernatant Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülerek bir balona aktarılmıştır. Kalan pellet tekrar ekstraksiyon işleminden geçirilerek (kullanılan toplam çözelti miktarının 25 mL'ye tamamlanması amacıyla 2 kere daha (10+5 mL) ekstraksiyon yapılmıştır. Örnek analiz edileceği zamana -20°C'de saklanmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için standart stok çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Fındık için ana standart çözelti: 10 mg gallik asit 10 mL % 80 (v/v)'lik etanolde (ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözücü içerisinde) çözündürülerek 1000 mg/L konsantrasyonda gallik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 0,5,

0,75, 1,00, 1,25 ve 1,50 mL alınarak her biri 10 mL'lik ölçü balonlarına aktarılmış, balonlar etanol ile çizgisine tamamlanmıştır. Bu şekilde sırasıyla 50, 75, 100, 125 ve 150 mg gallik asit/L konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.

Pul biber ana standart çözeltisi: 10 mg gallik asit 10 mL % 70'lik asetonda (ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözücü içerisinde) çözündürülerek 1000 mg/L konsantrasyonda gallik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 0,25, 0,5, 0,75, 1,00, ve 1,25 mL alınarak her biri 10 mL'lik ölçü balonlarına aktarılmış, balonlar aseton ile çizgisine tamamlanmıştır. Bu şekilde sırasıyla 25, 50, 75, 100, ve 125 mg gallik asit/L konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.

3.2.2.4.3. Örnek Ekstraktlarının ve Standart Çözeltilerin Toplam Fenolik Madde Miktarının Spektrofotometrik Tayini

Örnek ekstraktlarından 0,5 mL alınarak 2,5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmıştır. Karışıma 5 dk sonra 2 mL % 7,5'lük sodyum karbonat veya doygun sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılmış ve toplam çözelti hacmi 5 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışım 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra 5 mL saf su eklenerek oluşan mavi rengin spektrofotometrede 725 nm'de absorbansı okunmuştur. Absorbansların çok yüksek olduğu durumda (>0,8) Lambert-Beer yasasına uygun olması açısından analiz işlemleri uygulanmış örnekler belirli oranlarda seyreltildikten sonra tekrar okuma yapılmıştır. Elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içeriği yukarıda belirtildiği gibi saptanmıştır.

Kalibrasyon grafiği ise her örnek için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerin absorbans değerlerinin, örnek ekstraktlarına benzer şekilde tayin edilmesi sonrasında okunan absorbans değerlerinin gallik asit konsantrasyonuna bağlı olarak grafiğe geçirilmesi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu absorbans değerleri gallik asit konsantrasyonlarına karşı bir grafiğe aktarılmış ve elde edilen verilere lineer regresyon analizi uygulanarak gallik asit standart doğrusu oluşturulmuş ve bu doğruyu tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

Ayrıca literatürde polifenol ekstraksiyonu ve toplam polifenol tayini yöntemleri için genellikle yağ alınmış örneklerle çalışılmaktadır. Tez kapsamında genellikle göz ardı edilen yağda çözünebilecek veya ortamdan yağın uzaklaştırılması işlemlerinde kayba uğrayan polifenollerin de belirlenmesi amacıyla fındık örneklerinde hem yağ alınmamış örnekler hem de soxhlet ve soğuk ekstraksiyon

yöntemleri ile yağı uzaklaştırılmış örnekler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda yağı alınmış ve alınmamış örneklerden elde edilen polifenoller karşılaştırılarak tez kapsamında bu analiz için kullanılacak olan örnek hazırlama yöntemi belirlenmiştir.

Soğuk ekstraksiyon için yaklaşık 6 gr öğütülmüş fındık behere alınıp üzerine 15 mL n-hekzan konulmuş ve beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 15 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üst faz filtre edildikten sonra kalan alt faz önce 15 mL sonrada 10 mL olacak şekilde hekzan eklenerek ilk seferdeki gibi ekstraksiyon yapılmıştır. Alınan ekstraktlardaki tüm hekzan azot altında uzaklaştırılmıştır.

Genellikle toplam fenolik bileşik miktarı incelenirken hesaba katılan bileşenler ekstrakte edilebilen bileşenler olmakla birlikte ekstrakte edilemeyen fenolik bileşenlerin de yüzdesel olarak önemli bir yer tuttuğunu belirten bazı çalışmalar mevcuttur. Tez kapsamında öncelikli olarak ekstrakte edilebilen fenolik maddeler üzerinde yoğunlaşmıştır.

3.2.2.5. Tokoferol Miktarının Belirlenmesi

Tokoferol analizi için gerekli olan yağın ekstraksiyonu için soğuk ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre yaklaşık 6 gr öğütülmüş fındık behere alınıp üzerine 15 mL n-hekzan konulmuş ve beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 15 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üst faz filtre edildikten sonra kalan alt faz önce 15 mL sonrada 10 mL olacak şekilde hekzan eklenerek ilk seferdeki gibi ekstraksiyon yapılmıştır. Alınan ekstraktlardaki tüm hekzan azot altında uzaklaştırılmıştır.

Elde edilen yağlardaki tokoferol miktarının belirlenmesi için AOCS Ce 8-89 HPLC metodu uygulanmıştır [347]. Ekstrakte edilen yağdan 0,1 gr alınıp mobil faz ile 1mL'ye hekzan ile tamamlanıp enjeksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde Agilent 1100 marka HPLC cihazına verilmiştir. Kromatografik analiz sırasında aşağıdaki koşullar kullanılmıştır:

Kolon: Hypersil 100 (250x4,6mm, 5µm)

Kolon fırın sıcaklığı: 25°C

Kolon akış hızı: 1,3 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Mobil faz: Hekzan: izopropanol (% 99,5:0,5) karışımı

Floresans dedektör: λEx= 290 nm, λEm=330

Kalibrasyon grafiği α, γ ve δ tokoferoller için çizilmiş ve ekstrakte edilen yağlardaki miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar mg/100 gr yağ olarak verilmiştir.

3.2.2.6. Aflatoksin Tayini

Aflatoksinler, metanol, kloroform ve diğer birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. Ancak sudaki çözünürlükleri azdır (10-30 µg/mL). Toksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B1 ve B2 için 425 nm'de; aflatoksin G1 ve G2 için ise 450 nm'de floresan emisyonu oluştururlar.

Fındıktaki aflatoksin miktarının belirlenmesi için AOAC 991.31 nolu immunoafinite kolon sonrası Kobra-cell (kolon ile dedektör arasına takılan, bromür ile kolon çıkışı türevlendirmeyi (PCD) sağlayan düzene) ile türevlendirme ve floresans dedektör kullanımına dayalı HPLC metodu uygulanmıştır [348]. Brominasyon, Kobra cell ile elektrokimyasal olarak Br₂ üretilerek yapılır. Bu işlem aflatoksinlerin floresan özelliklerinin UV ışığında daha kolay saptanmasını sağlamaktadır. Kobra cell türevlendirme ajanı olan bromürü mobil fazdaki potasyum bromidden oluşturan elektrokimyasal bir hücredir. Türevlendirme oda sıcaklığında hızla gerçekleştirilebilmektedir. Buna göre parçalayıcı-karıştırıcı (Philips ev tipi) yardımı ile öğütülmüş 5 gr fındık örneği alınmış üzerine 25 mL metanol:su (% 70:30) karışımı konulmuş ve 1 saat boyunca 250 rpm de otomatik çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Ekstrakt önce kaba filtre kâğıdından sonra da No:1 filtre kâğıdından süzölmüştür. Filtrattan 7,5 mL alınıp 15 mL su ile karıştırılmış ve bu karışımın 15 mL'si 1-2 damla/sn sabit hızla Aflatest P* kolonundan geçirilmiştir. Sonra yaklaşık 2 damla/sn sabit hızla 2x10 mL su geçirilerek kolon yıkanmıştır. Kolondan birkaç saniye hava geçirilip su tamamen çıkarılır. Kolona 1 mL HPLC kalite metanol eklenip yerçekimi ile vialle akması beklenmiş ve vialle 1 mL ultra saf su konularak HPLC ye enjekte edilmiştir (Şekil 3.2).

Kırmızı pul biber için ise AOAC 999.07 nolu [349] metot kullanılarak aflatoksin elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 5 gr kırmızı biber bir erlene konulmuş üzerine 1 gr NaCl ve 30 mL metanol:su (% 80:20) karışımı ilave edildikten sonra 250 rpm de 1 saat çalkalanmıştır. Ekstrakt önce kaba filtre kâğıdından sonra da Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölmüştür. Filtratın 5 mL'si alınıp üzerine 30 mL PBS (NaCl Fosfat tampon) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Numunenin tamamı 1-2 damla/sn sabit hızla Aflatest kolonundan geçirilmiştir. Kolon yaklaşık 2 damla/sn sabit hızla 15 mL suyla yıkanmıştır. Kolondan birkaç saniye hava geçirilip su tamamen çıkarılmıştır. Kolona 0,5 mL metanol aktarılıp yerçekimi ile vial e akması sağlanmış ve 1 dk beklendikten sonra 0,75 mL metanol ile aynı işlem tekrarlanmıştır. Sonrasında vial e 1,75 mL su ilave edilerek toplam hacim 3 mL'ye tamamlanarak HPLC'ye enjekte edilmiştir. HPLC'ye 100 µL enjeksiyon yapılmıştır. HPLC analizinde kullanılan koşullar ise aşağıdaki gibidir:

Sistem: Agilent 1100

Kolon: Hichrom ODS 2 (250x4,6mm, 5µm)

Kolon fırın sıcaklığı: 40°C

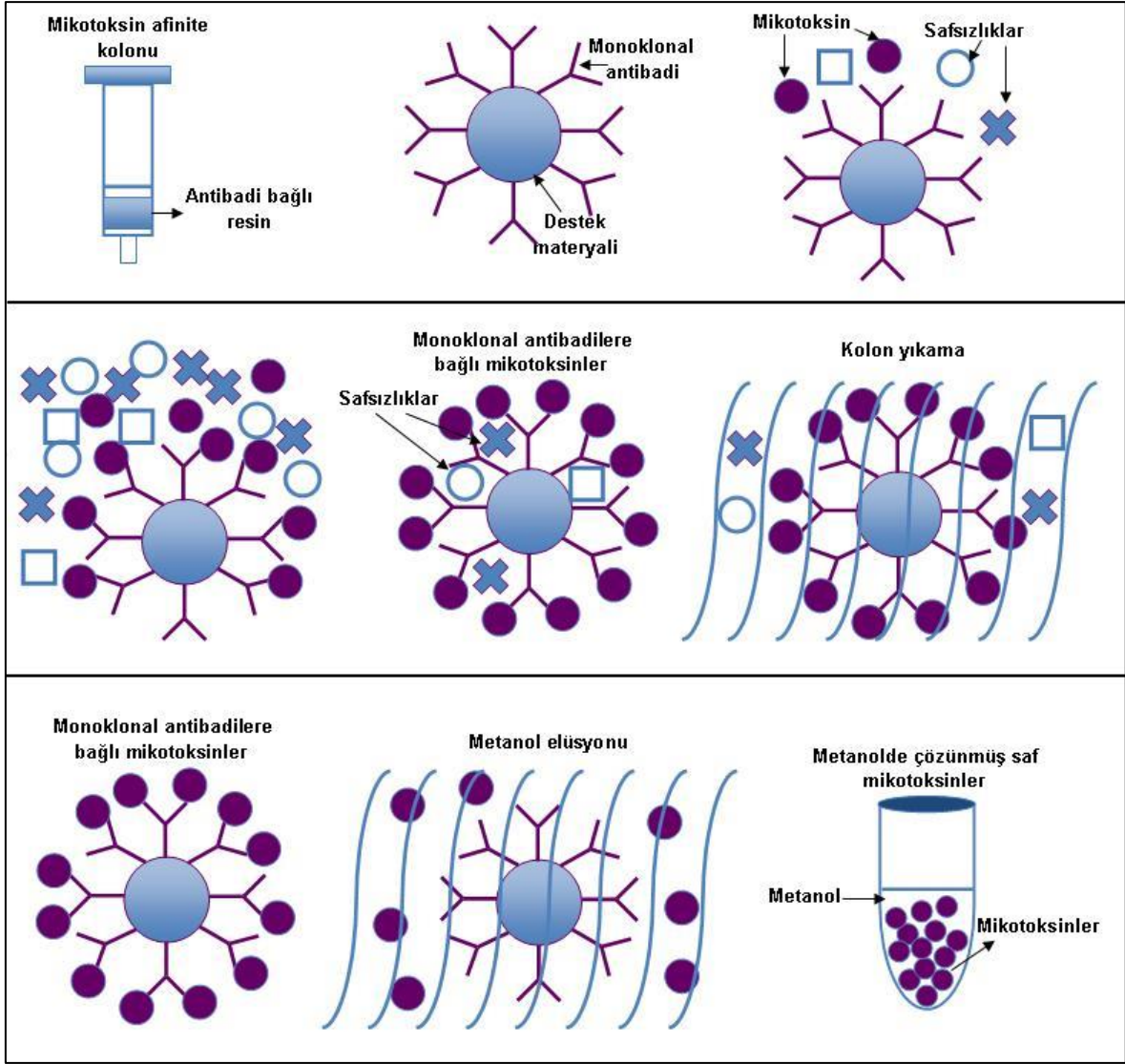
Kolon akış hızı: 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Floresans dedektör: λEx= 360 nm, λEm=440 nm

Mobil faz: Su: asetonitril: metanol (6:2:2)+120mg potasyum bromür+100 µL nitrik asit

Kalibrasyon grafiği VICAM-aflatest HPLC kitinden çıkan aflatoksin B1, B2, G1, G2 karışımı kullanılarak çizilmiş ve örnekteki miktarları belirlenmiştir.



Şekil 3. 2 Aflatest immunoafinite kolonu ile aflatoksin elüsyonunun gerçekleştirilmesinin şematik gösterimi

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan aflatoksin deneylerinde toksinlerle kontamine olmuş laboratuvar malzemelerinin detoksifikasyon işlemi EK1’de belirtilmiştir.

3.2.3. Mikrobiyolojik Analizlerin Gerçekleştirilmesi

3.2.3.1. Düşük Basınç Plazma Uygulaması ile Gerçekleştirilen Ön Deneme Sonuçları

Pul biber [47] ve fındık [49] örnekleriyle daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmalarımızda düşük basınç plazma sistemi kullanılmış olup, işlem sırasında kullanılan gıda materyalleri piyasadan rastgele seçilmiş ve küf düzeyi yüksek olan

örneklerdir. Ayrıca bu çalışmalarda yüzey su aktivitesi değerleri yüksek olmayıp ($a_w < 0,6$) çalışmalarda sadece küf indirgenme derecelerine bakılmıştır. Pul biber ile gerçekleştirilmiş olan çalışmada 100 W-15 dk plazma parametresinde hava plazması uygulanmış pul biber örneklerinde 6 logaritmalık (% 99) bir indirgenme elde edilmiştir [47]. Doğal kontamine fındık örnekleri ile gerçekleştirilmiş olan çalışmada ise 100 W-30 dk oksijen plazması ile % 97'lik indirgenme elde edilmiştir [49].

3.2.3.2. Test Örneklerinin Başlangıç Mikroorganizma Sayılarının Belirlenmesi

10 gr fındık ve 10 gr kırmızı pul biber örnekleri aseptik koşullarda 90 mL % 0,1 Tween 80 içeren serum fizyolojik sıvısı ile stomacher cihazında 5 dk karıştırılıp homojenize edilmiştir. Buradan alınan numuneden gerekli dilüsyonlar yapılarak bakteriler (TAMB) için BHI; küfler için ise YGC agar besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılarak sırasıyla 37 ve 28°C'de inkübe edilmiştir. Bakteriler için 24 saat küfler için ise 5-7 gün inkübasyon sonrası sayımlar alınmıştır.

3.2.3.3. Ön-Dekontaminasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi

Fındık örneklerine kontrollü olarak spor ekimi yapılacağı için fındık yüzeyleri ön dekontaminasyon işlemine tabi tutulmuştur. Çamaşır sularının aktif maddesi olan sodyum hipoklorit ön dekontaminasyon amacıyla birçok çalışmada kullanılmaktadır. Fakat bu etken maddenin yüzeyde yaratabileceği korozif etkiye neden olabileceği oksidatif etkiler göz önüne alındığından, bu madde yerine alkol çözeltilerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde yer alan pek çok araştırmada, kuru gıdaların yüzeyleri su ile yıkama yapıldıktan sonra % 70'lik alkol uygulaması ile tamamen dekontamine edilmektedir. Başaran ve ark. [45] ise % 95'lik alkol çözeltisi kullanarak fındık yüzeylerinin ön dekontaminasyonunu sağladıklarını bildirmiştir. Tez kapsamında, iki farklı konsantrasyonda alkol (% 70 ve % 96) çözeltisi kullanılmıştır.

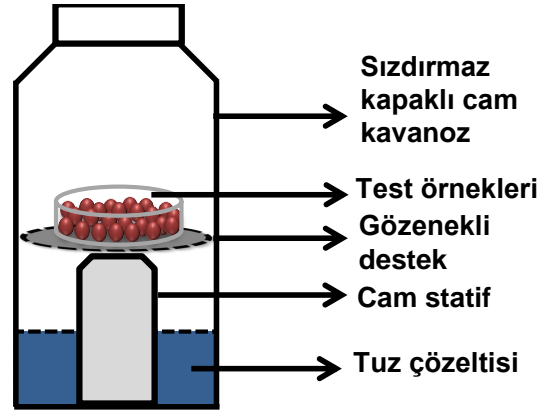
Pul biber örnekleri ise ticari olarak gama sterilizasyonuna tabi tutulan örnekler olduklarından başlangıç mikroorganizma sayısı "sıfır" kabul edilmiş ve ön dekontaminasyon işlemine tabi tutulmamıştır.

3.2.3.4. Gıda Örneklerinde Maksimum Küf Oluşumunun Sağlandığı Su Aktivitesi Değerinin Tespit Edilmesi

Tez kapsamında gerçekleştirilen dekontaminasyon işleminin uygun koşulların belirlenmesi amacıyla literatürde bu konuda kullanılan deney prosedürleri ayrı ayrı izlenmiş, uygulama etkinlikleri ve sürekliliği açısından en uygun prosedür tespit edilmeye çalışılmıştır. Tezin giriş kısmında küflerin su aktivitesi ve sıcaklık parametrelerinde gelişme ve aflatoxin üretme aralıkları hakkında bilgi verilmiştir. Bu bilgiler ışığında deneyler kapsamında çalışılacak olan su aktivitesi aralığı 0,70-0,99 ve sıcaklık aralığı 25-30°C ($\approx 28^{\circ}\text{C}$) olarak belirlenmiştir.

3.2.3.5. Örneklerin Belirlenen Denge Nem Değerine Getirilmesi

Dekontaminasyon ve detoksifikasyon işleminin etkinliği ortamda gelişen küf sayısına bağlı olduğu için öncelikle fındık ve pul biber örneklerinin istenilen denge nem içeriğine getirilmesi gerekmektedir. Şekil 3.3'te belirtilen deney düzeneğinde Çizelge 3.2'de verilen tuz çözeltilerinin varlığında yeterli sürede tutulmuş olan fındık ve pul biberlerin su aktivite değerleri belirlenmiştir. Bu su aktivite değerlerinde yüzeye inoküle edilerek, *Aspergillus* sporlarının maksimum geliştiği ve aflatoxin üretebildiği a_w değeri belirlenilmeye çalışılmıştır. Örneklerin çevresinde, istenilen bağıl nemi ve buna bağlı olarak su aktivitesi (a_w) değerini sağlamak için doygun tuz çözeltilerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla 0,70–0,99 arasındaki su aktivitesi değerlerine ulaşmak için Çizelge 3.2'de verilen doygun tuz çözeltilerinden yararlanılmıştır. Örneklerin sabit denge nemine ulaşmalarını sağlamak için özel bir düzenek kullanılmıştır (Şekil 3.3). Bu düzenek, ağzı hava almayacak şekilde sıkıca kapanabilen lastik contalı 1 L'lik cam kavanoz ile camdan yapılmış bir statif ile bu statif üzerine konulan 25 mL'lik ağzı tıraşlı ve kapağı sıkıca kapanabilen cam örnek kabından oluşmuştur. Çizelge 3.2'de verilen tuz ve su miktarları dikkate alınarak, kavanozların 1/4'ünü dolduracak şekilde önceden hesaplanan miktarlarda tuz ve damıtık su doğrudan kavanozların içine alınmıştır.



Şekil 3. 3 Örneklerin denge nem değerlerinin ayarlanmasında kullanılan sistemin şematik görüntüsü

Örnekler (10 gr) cam statif üzerine yerleştirildikten sonra kavanozların ağzı sıkıca kapatılmıştır. Daha sonra, içinde örnek ve tuz çözeltisinin bulunduğu kavanozlar, sıcaklığı 28°C'deki etüvde (Mettler 854 Schwabach W, Type 540,187 Almanya) konularak örneklerin denge nemine erişmesi beklenmiştir.

Çizelge 3. 2 Tuz çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan tuz ve destile su miktarları

Doygun tuz çözeltisi	a_w (25-30°C verileri)	Suda çözünürlük (gram tuz/100 mL solüsyon)
NaCl	0,750	35,00
KCl	0,840	35,00
NaCl	0,946	9,34
K ₂ SO ₄	0,970	12,00
NaCl	0,974	4,67

3.2.3.6. Spor Süspansiyonunun Elde Edilmesi ve Örneklerle İnokülasyonu

Yatık agardan alınan kültürlerden üç nokta ekimi yapılmıştır. 28±1°C'de 5-7 gün inkübe edilen küfler mikroskopik olarak incelenerek spor-hif oluşumları gözlenmiştir. Bu küflerin yüzeylerinde bulunan küf sporlarının ortamdaki izolasyonu amacıyla petri yüzeylerine 20 mL % 0,1 Tween 80 içeren serum fizyolojik sıvısı dökülmüş ve steril bir cam baget ile hafifçe karıştırılmıştır. Tween 80 çözeltisinin kullanılmasının sebebi Aspergillus cinsi küflerin yüzey özelliklerinin hayli hidrofobik olmasıdır. Kullanılan surfaktan yüzey gerilimini düşürerek sporların yüzeyden daha kolay alınmasını sağlamaktadır.

Petrikkou ve ark. [350] ve Aberkane ve ark. [351] 11 µm gözenek çapına sahip membranların hif-spor süspansiyonundan sporların ayrılmasını sağladığını belirtmişlerdir. Bu ayrımı etkili bir biçimde sağlamak amacıyla 11 µm gözenek çapında olan Whatman No:1 filtre kağıdı kullanılmıştır. Süzüntünün altında kalan spor süspansiyonunun konsantrasyonu mikroskopik (Thoma lamı ile) ve kültürel olarak (YGC agara inoküle edilerek) belirlenmiştir. Spor süspansiyonları ortamdaki hif yoğunluğu yönünden Thoma lamında incelenerek ortamdaki hif yoğunluğu % 5'in üstünde olmayan süspansiyonları çalışma kapsamında kullanılmıştır. Ortamda hif yoğunluğu yüksek olan solüsyonlar tekrar Whatman No: 1 filtreden geçirilmiştir. Bu işlemler sonucu ortamda hala hif kalmakta ise solüsyon bir tüpe aktarılarak 2000 rpm de santifrj edilerek spor solüsyonu saf hale getirilmiştir. Spor sayısı spor/mL olarak belirlenmiş olup her sonuç en az 3 sayımın ortalaması şeklinde verilmiştir. Bu yöntemden elde edilen spor süspansiyonu +4°C'de muhafaza edilmiştir.

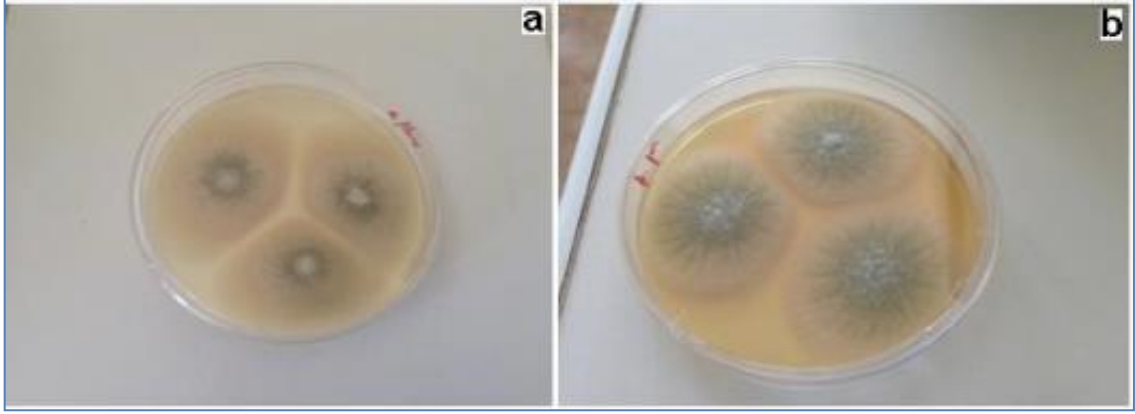
Örneklerin spor solüsyonları ile kontaminasyonu işlemleri için 2 farklı yöntem tasarlanmış ve kullanılmıştır. Bu yöntemlerin çalışma planları aşağıda detaylı şekilde verilmiştir.

Yöntem I: Elde edilen stok spor solüsyon çözeltisinden gıda yüzeylerine absorblanan spor sayısının tespit edilmesi için 10 gr örnek erlene aktarılmıştır. Üzerine 5 mL spor solüsyonu ilave edilmiştir (5 dk çalkalanmıştır). Spor solüsyonu ve örnekler başka bir steril kaba aktarılmıştır. 90 mL % 0,1'lik Tween 80 çözeltisi örneklerin bulunduğu kaba dökülerek 1 dk çalkalanmıştır. Gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra yüzeye yayma yöntemi ile kültürel ve Thoma lamı ile mikroskopik sayımlar gerçekleştirilmiştir.

Yöntem II: 3 nokta ekim yapılarak (Şekil 3.4) 5-7 gün bekletilmiş olan kültürlerin yüzeylerine 10 gr örnek konulmuştur. Küf sporlarının örnek yüzeylerine tutunmasını sağlamak amacıyla 10 dk boyunca laminar flow kabini içerisinde aseptik ortamda karıştırılmıştır. Yüzeyi kontamine edilmiş örnekler steril bir erlene aktarılarak üzerine 90 mL % 0,1'lik Tween 80 çözeltisinden konularak 5 dk çalkalanmıştır.

Pul biber örnekleri ise kullanılan cam yüzeye yapışma eğilimi gösterdikleri ve işlem etkinliğini olumsuz etkiledikleri için kontamine edilmiş pul biber örnekleri direkt

olarak filtreli stomacher poşetine aktarılmış ve üzerine 90 mL % 0,1'lik Tween 80 çözeltisinden konularak 250 rpm'de 2 dk çalkalanmıştır. Buradan gerekli ekimler yapıldıktan sonra YGC agar yüzeylerine yüzeye yayma yöntemiyle tekrar ekimler yapılmıştır. Ayrıca Thoma lamı kullanılarak mikroskobik sayım da yapılarak sayım sonuçları karşılaştırılmıştır.



Şekil 3. 4 Üç nokta ekim yapılmış besiyerleri a) *A. flavus* ve b) *A. parviticus*

Kullanılan iki yöntem, en çok spor kontaminasyonunun sağlandığı metodu bulmaya yönelik olup, toksin üretimini gıda yüzeyinde sağlamak amacıyla örnekler 5 günlük inkübasyon sonrası 2 gün 28°C'lik etüvde bekletilmiştir.

3.2.3.7. Küf İle Kontamine Edilmiş Olan Test Örneklerinde Doğal Aflatoksin Oluşum Limitlerinin Belirlenmesi

Steril gıda örnekleri (fındık, pul biber) daha önceden üç nokta ekim yöntemiyle 4-5 gün inkübe edilmiş farklı küf sporlarıyla inoküle edilerek örneklerde aflatoksin oluşumunun sağlanması için 2 gün daha inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında örneklerde bulunan aflatoksin miktarları tespit edilmiş olup her iki küf cinsi için farklı gıdalarda oluşturabilecekleri aflatoksin aralıkları belirlenmiştir. HPLC analizi ile elde edilen sonuçlara göre tez kapsamında yapılan plazma ve ışınlama işlemlerinin aflatoksin degradasyonu ve sitotoksitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi sırasında kullanılan aflatoksin konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.3.7.1. Fındık Örneklerinde Küf Suşlarının Meydana Getirdiği Aflatoksinlerin Ekstraksiyonu

Petri kaplarının içerisinde bulunan kontamine olmuş 10 gr fındık örneği laminar flow içerisinde filtreli stomacher torbasına alınmıştır. Örnekler yüksek su aktivitesi değerlerine sahip oldukları için kolayca ezilebilmektedirler. Bu nedenle numuneler el yardımı ile parçalandıktan sonra torba içerisine 50 mL 70:30 metanol:su (v/v) çözeltisi konularak 250 rpm'de 1 saat çalkalanarak örneklerde bulunan aflatoksinin çözültüye geçmesi sağlanmıştır. Üst faz Whatman 934 nolu filtre kağıdından süzülerek erlene toplanmıştır. Süzüntü sporların da uzaklaştırılması amacıyla 0,2 mikronluk bir filtreden daha süzölmüştür. Buradan 7,5 mL alınıp, üzerine 15 mL su konulmuştur. Daha sonra fındıktaki aflatoksin ekstraksiyon işlemi Bölüm 3.2.2.6' da belirtildiği gibi uygulanmıştır.

3.2.3.7.2. Pul Biber Örneklerinde Küf Suşlarının Meydana Getirdiği Toksinlerin Ekstraksiyon Prosesi

Petri kaplarının içerisinde bulunan kontamine olmuş 10 gr pul biber örneği laminar flow içerisinde filtreli stomacher torbasına alınmıştır. İçerisine 2 gr NaCl ve 60 mL 80:20 metanol:su (v/v) çözeltisi konularak 250 rpm'de 1 saat çalkalanarak örneklerde bulunan aflatoksinin çözültüye geçmesi sağlanmıştır. Üst faz erlene toplanarak Whatman 934 nolu filtre kağıdından süzölmüştür. Süzüntü sporların da uzaklaştırılması amacıyla 0,2 mikronluk bir filtreden daha süzölmüştür. Buradan 5 mL alınıp, üzerine 30 mL PBS konulmuştur. Daha sonra pul biberdeki aflatoksin ekstraksiyon işlemi Bölüm 3.2.2.6' da belirtildiği gibi uygulanmıştır.

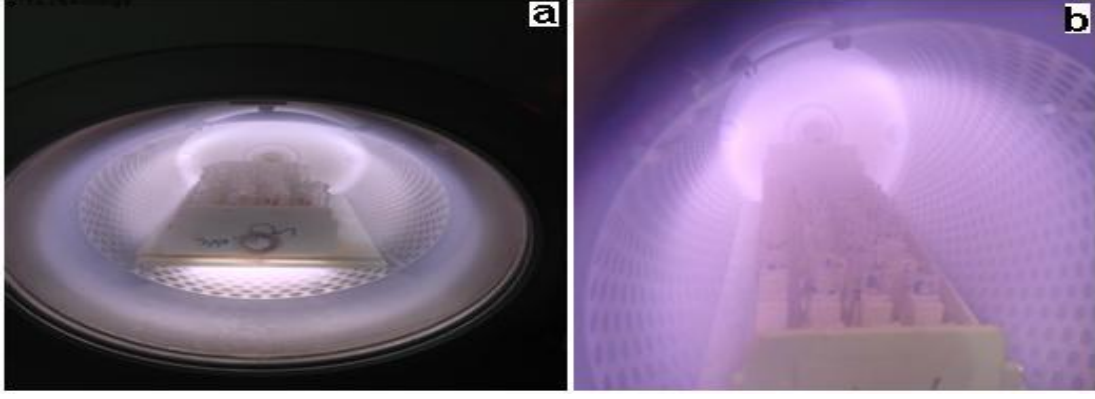
3.2.3.8. Aflatoksin İle Kontamine Edilmiş Örnekler Plazma Uygulanması

Test suşlarının fındık ve pul biber örneklerinde oluşturmuş oldukları aflatoksin miktarlarının sabit olmaması ve sadece toksin hedefli gerçekleştirilen kısımlarda ortamda bulunan sporların ekstra kontaminasyon gibi sıkıntılara neden olabileceğinden örnek yüzeylerine saf aflatoksin karışımları dışarıdan ilave edilmiştir. AFB1 (3 ppb) ve TopAF (6 ppb) çözeltileri yapay kontaminasyon işleminin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. 5'er gramlık örnekler stok toksin standartlarından eklenmiş ve örnekler toksin çözeltilerinin diffüzyonunu ve metanolün uzaklaşması için örnekler çeker ocak altında bir gece bekletilmiştir. Daha sonra örnekler plazma işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.3.9. Plazma Uygulamasının Saf Aflatoksin Çözeltileri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Gıdalar, kompleks bir yapıya sahip oldukları için ihtiva ettikleri mikroorganizma ve toksinler homojen olarak dağılım göstermemektedir. Bu sebeple plazma uygulamasının aflatoksinler üzerine etkisini araştırmak için aflatoksinlerin metanol içerisinde çözeltileri hazırlanmış ve plazma işlemine tabi tutulmuştur. Kullanılan küf suşları en çok AFB1 ve az miktarda da AFB2 üretmekte ve AFG1 ile AFG2 üretmemektedir. Aflatoksin çözeltileri hazırlanırken AFB1 ve toplam aflatoksin (TopAF yani AFB1+AFB2) çözeltileri hazırlanmıştır. Toplam aflatoksin çözeltileri hazırlanırken AFB1/AFB2 oranı belirlenirken, gıda örneklerine küf suşları inoküle edildikten sonra bu suşların üretmiş oldukları aflatoksinlerin miktarları dikkate alınmıştır. Buna göre toplam aflatoksin çözeltisi, içerisinde % 97 AFB1 ve % 3 AFB2 olacak şekilde hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (1-2-5-10-50-100-300-500-1000 ppb) AFB1 ve TopAF çözeltileri HPLC viallerine hazırlanmış ve aflatoksin çözeltileri metanolde hazırlandığı için vialler üzerine Argon gazı püskürtülerek metanolün hızla uzaklaşması sağlanmıştır. Her bir konsantrasyon için en az iki (n=2) örnek hazırlanmıştır. Aflatoksinler düşük basınç ve atmosferik plazma için dekontaminasyon sonuçlarına göre belirlenen optimum koşullarda ve gamma ışınlaması için ise 10 KGy ve 10 dk koşullarında işleme tabi tutulmuştur. Plazma sonrası viallerde kalan örneklerdeki aflatoksinin çözünmesi için viallere 200 µL metanol:su (1:1 v/v) karışımı eklenmiştir. Aflatoksinin tamamen çözünmesi amacıyla vialler iyice karıştırılmıştır ve Bölüm 3.2.2.6'da belirtildiği gibi HPLC de analiz edilmiştir.

Şekil 3.5'te düşük basınç plazma sisteminde degradasyon işlemine tabi tutulan aflatoksin çözeltileri görülmektedir. Atmosferik basınç plazması uygulanırken de aynı vial tutucu tabla tarama alanı içine yerleştirilmiş ve istenilen döngü sayısı kadar tablanın üzerinden geçmesi sağlanmıştır.



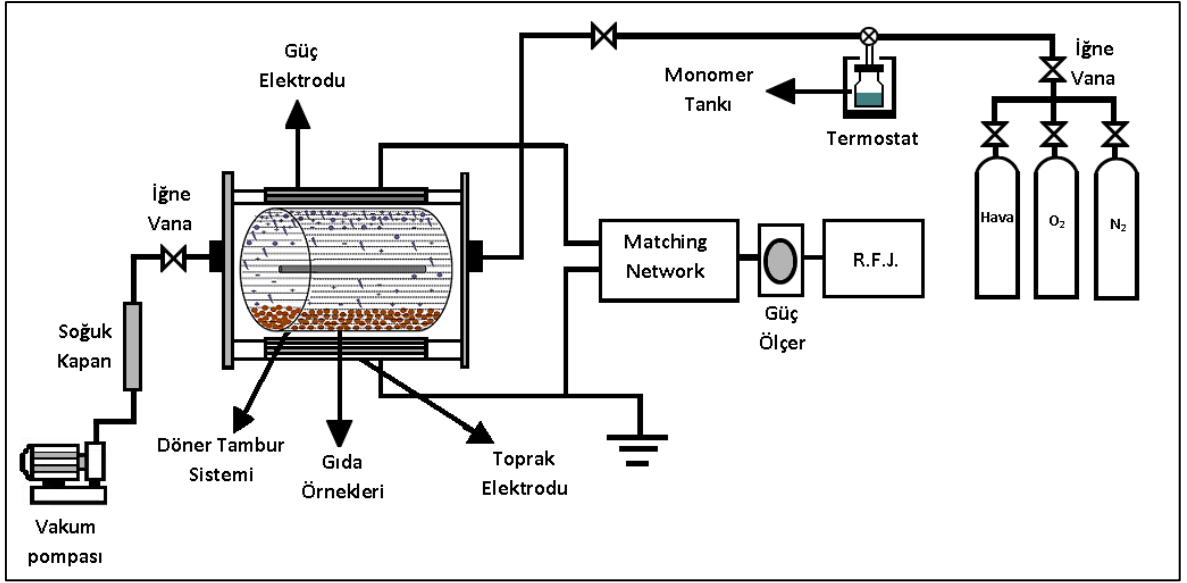
Şekil 3. 5 Aflatoksin çözeltilerine düşük basınç plazma uygulaması

3.2.4. Plazma Dekontaminasyon İşlemi

Plazma dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilirken öncelikle deney kapsamında kullanılacak olan plazma cihazlarının spesifikasyonları göz önünde bulundurulmuştur. Bunun başlıca sebebi plazma sistemlerinin bazı sınırlamalarının ve dezavantajlarının bulunmasıdır. Belirlenen sistem parametrelerine göre sistem dengeye getirildikten sonra küf ile kontamine olmuş test örnekleri plazma işlemine tabi tutulmuştur.

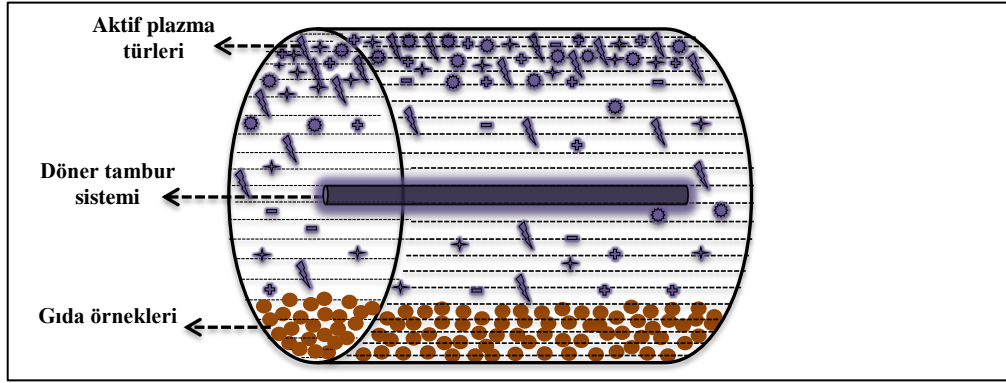
3.2.4.1. Düşük Basınç Plazma Sistemi

Fındık ve pul biber örnekleri ile yapılan çalışmalarda doğal olarak kontamine olmuş örneklerde gerçekleştirilen denemeler sonucunda % 90'ın üzerinde bir mikrobiyal azalma meydana geldiği saptanmıştır [47,49]. Tez kapsamında yapay olarak küf sporlarıyla kontamine edilmiş örnekler kullanılarak sonuçlar bu çalışmayla karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır. Şekil 3.6'da tez kapsamında kullanılan düşük basınç plazma sistem aparatları verilmiştir.



Şekil 3. 6 Düşük basınçlı plazma sisteminin şematik görünümü

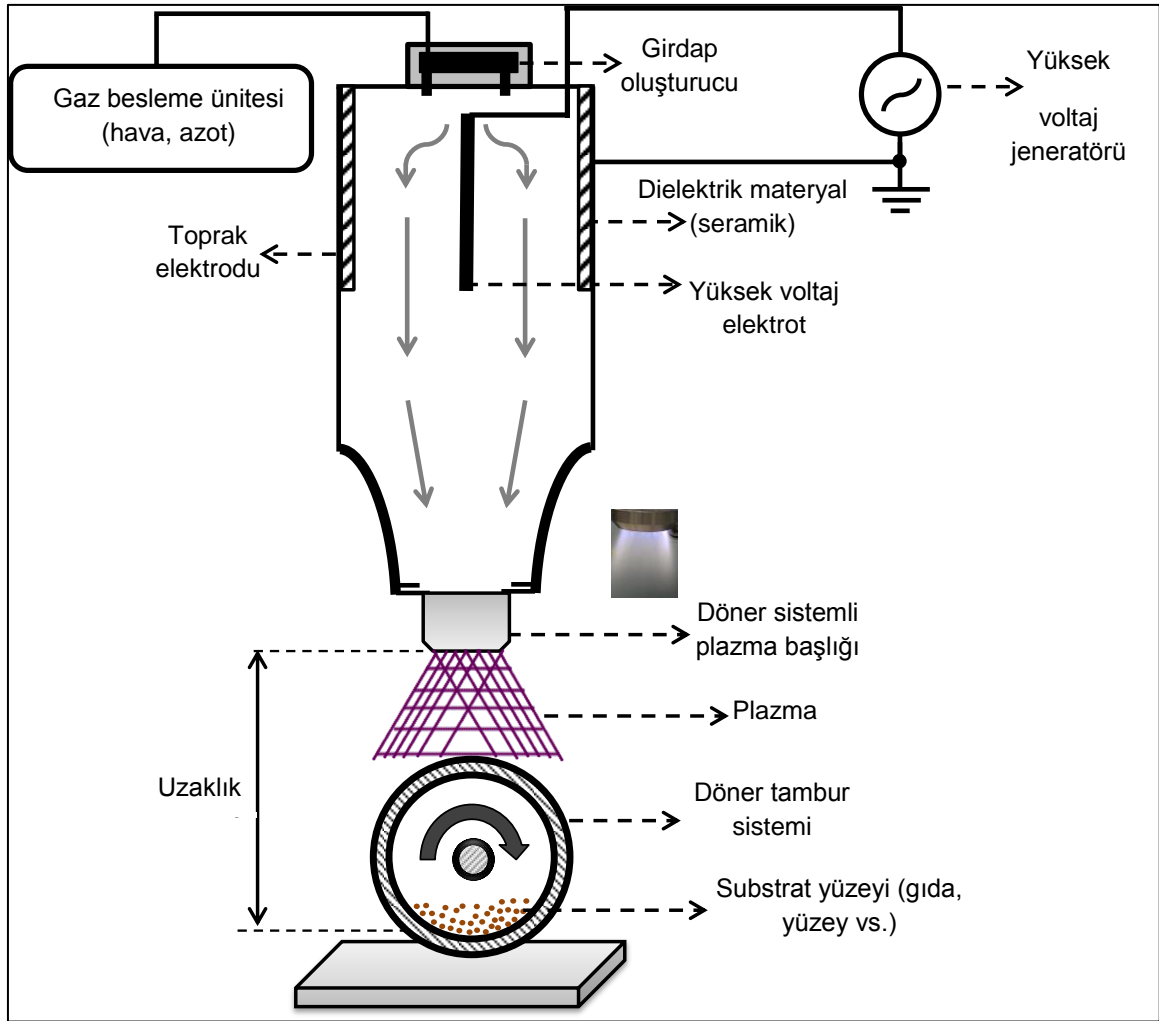
Döner tambur, yığın halindeki gıdalara plazma uygulanmasını sağlamaktadır (Şekil 3.7). Materyali çalkalamak ve döndürmek bütün yüzeye plazmanın homojen uygulama yapılmasına imkan vermektedir.



Şekil 3. 7 Döner tambur sisteminin şematik görünümü

3.2.4.2. Atmosferik Basınç Plazma Sistemi

Tez kapsamında kullanılmış olan plazma cihazı, Plasmatreat GmbH (Almanya) tarafından üretilen, AS400 markalı, x-y düzleminde hareket kabiliyetine sahip bir cihazdır (Şekil 3.8). Patentli rotasyon prensibi plazma etkisini işlenecek malzemeler üzerine homojen olarak dağıtır. Bu işlem sırasında yüzey üzerinden birçok kez kısa süreli, darbe benzeri hareketlerle geçilir, bu da etkili ve aynı zamanda ısı girişinin düşük olduğu bir işlem şeklidir.



Şekil 3. 8 Atmosferik basınçlı plazma sisteminin şematik gösterimi

Sisteme beslenen gaz öncelikle girdap oluşturunca geçerek havanın plazma probunda homojen olarak dolaşması sağlanmaktadır. Girdap oluşturunca çıkan gaz yüksek voltaj gerilimi sağlayan jeneratörden verilen enerji ile plazma fazına

geçirilerek probun uç kısmına doğru ilerlemektedir. Prob içinde oluşan plazmanın sıcaklığı termal hassasiyete sahip ürünler için problem oluşturmaktadır. Bu sebeple plazma probunun ucuna takılmış olan RD1004 döner plazma nozülü sayesinde oluşan plazma fazı homojen olarak dağıtılmaktadır. Bu sistem hem probun ucundan çıkan plazmanın sıcaklığının düşük olmasını sağlamakta hem de aktif plazma türlerinin daha geniş bir yüzeye yayılımını sağlayarak uygulama yüzey alanını artırmaktadır.

Tez kapsamında kullanılan düşük ve atmosferik basınç plazma sistemlerinin spesifikasyonları ve çalışmalarımız sırasında kullandığımız plazma parametreleri Çizelge 3.3.'te detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3. 3 Tez kapsamında kullanılan plazma sistemlerinin özellikleri

PLAZMA PARAMETRELERİ		Cihaz çalışma aralıkları	Tezde çalışılmış olan parametreler
Atmosferik Plazma	Referans voltaj (%)	40-100	40-60-80-100
	Plazma frekansı (kHz)	15-25	16-20-25
	Plazma devir süresi (%)	1-100	100
	Plazma jet hızı (m/dk)	1-100	50-60-70-80-90-100
	Tarama aralığı (mm)	1-250	3-5
	Gaz akış hızı (L/s)	100-5000	3000-4000-5000
	İyonlaştırma gazları	Hava, azot, oksijen	Hava, azot
	Plazma jeti ile örnek arasındaki mesafe (cm)	0-7	5-7
Düşük Basınç Plazması	Plazma gücü (W)	0-100 W	25-75-100
	Plazma frekansı (Low (kHz)-Radio (MHz) frequency)	40 kHz (LF) veya 13,56 MHz (RF)	13,56 MHz
	Kabin basıncı (mbar)	0,1-0,4	0,25
	İyonlaştırma gazları	Hava, azot, oksijen	Hava, azot, oksijen
	Güç elektrotu ile örnek arasındaki mesafe (cm)	0-15	10 (sabit)
	Homojen uygulama sağlayan döner tambur sistemi (0,5 m/dk)	Evet/Hayır	Evet (sabit)

3.2.4.3. Sıcaklık Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi

Sıcaklık ölçümleri TFA ScanTemp 410 marka kızılötesi termometre ile gerçekleştirilmiş olup, örneklerin yüzey sıcaklık değerlerinin 50°C'nin üzerine çıkmaması sağlanmaya çalışılmıştır. Atmosferik plazma sisteminde sıcaklık ölçümleri kolayca alınabilmektedir. Fakat düşük basınç plazma sistemi kapalı bir sistem olduğu ve sisteme ait kapağın kızılötesi ışınları engellemesinden dolayı sıcaklık ölçümü konusunda sorun yaşanmıştır.

3.2.5. Işınlama İşlemi

Tez kapsamında kullanılan iki plazma sisteminin gıdalar üzerindeki dekontaminasyon ve detoksifikasyon etkinliği, literatürde soğuk sterilizasyon diye tabir edilen gama ışınlanması ile karşılaştırılmıştır. Gama ışınlamasının gıda üzerindeki fiziksel, kimyasal ve sitotoksik etkileri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar plazma yöntemiyle karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

Işınlama için paketlenmiş fındık ve kırmızı pul biber örnekleri, aflatoksin ile kontamine edilmiş fındık ve kırmızı pul biber örnekleri (3 ppb B1 ve 6 ppb toplam aflatoksin) ve kapalı HPLC viallerinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki (1-2-5-10-50-100-300-500-1000 ppb) AFB1 ve TopAF çözeltileri (sitotoksisite testleri ve HPLC'de kantitatif olarak parçalanmanın saptanması için) kullanılmıştır.

Işınlama deneyleri Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezinde (SANAEM) Kobalt-60 gama kaynağı kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ışınlanması sırasında rutin dozimetre olarak radiochromic film (Harwell Gammachrome YR, Batch:64), kullanılmış ve absorbans değerleri UV-4 ATI-UNICAM marka spektrofotometre kullanılarak (Fricke centerline determination as the Standard) belirlenmiştir. Örnekler ortalamada 10 kGy doz uygulanmıştır.

3.2.6. Sitotoksisite Testi

Sitotoksisite testleri iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada belirli konsantrasyonlardaki AFB1 ve TopAF çözeltilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla hücrelere floresan boyama yapılmıştır. Daha sonrasında saf aflatoksin çözeltileri ve farklı işlemlere (plazma ve ışınlama işlemi) tabi tutulmuş aflatoksin çözeltileri bu hücrelerle muamele edilerek hücre canlılığı

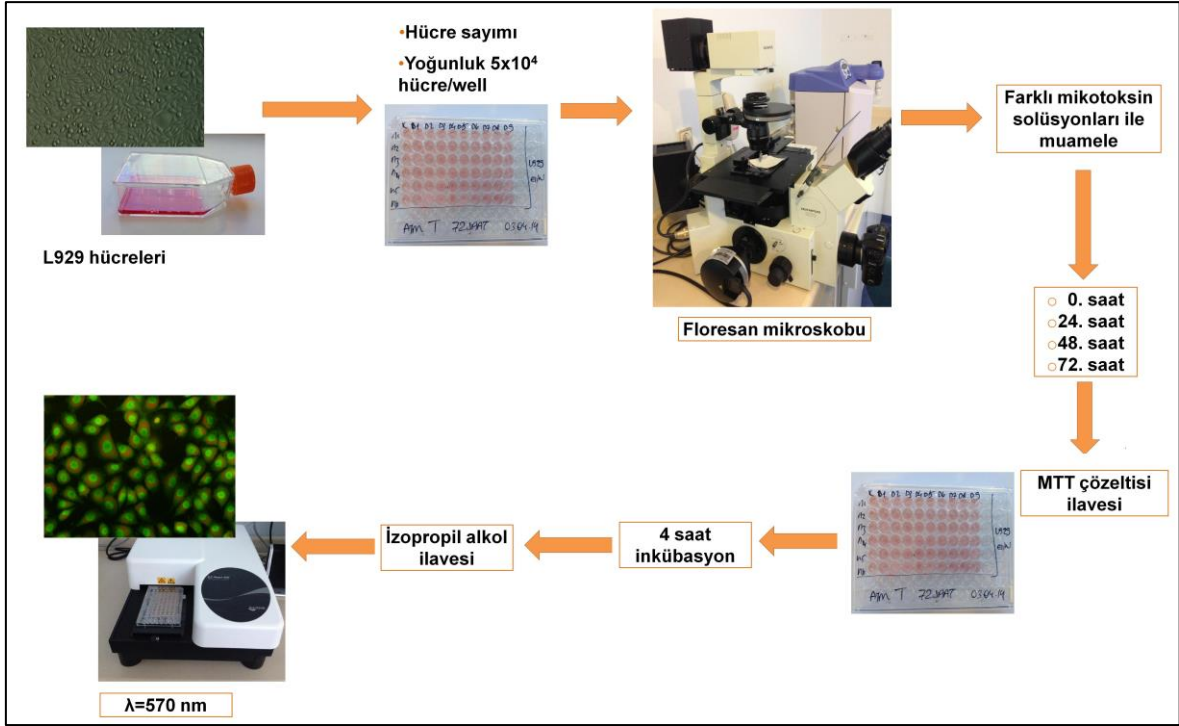
4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile test edilmiştir.

3.2.6.1. MTT Testi

MTT, bir çeşit tetrazolyum tuzudur. Mossman [329]'a göre MTT yöntemi, canlı hücrelerde mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile tetrazolyum türevinin suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmesi ile açığa çıkan renk yoğunluğuna göre canlılığın belirlenmesidir. Formazan kristalleri 570 nm'de ışığı absorbe etmektedirler. Açığa çıkan renk yoğunluğu ile hücre canlılığı arasında doğru bir orantı bulunmaktadır.

Aflatoksin örneklerinin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek üzere MTT analizi yapılmıştır. MTT analizi için P/35'te bulunan L929 fare fibroblast hücreleri öncelikle başlangıç hücre sayısı 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek 24 saat hücrelerin tutunması beklenmiştir. 24. saat sonrasında, başlangıç hücre sayıları 5×10^4 hücre/mL olarak ayarlanmış olup saf aflatoksin standartları ve plazma degradasyon ürünlerine ait çözeltileri farklı zaman aralıklarında (0-24-48-72 saat) L929 hücreleri ile inkübe edilmiştir.

Sitotoksisite testlerinin gerçekleştirilmesi işleminde kullanılan aflatoksin çözeltilerinin hazırlanması Bölüm 3.2.3.9'da belirtilmiş olup herbir konsantrasyon için (n=6) olacak şekilde paralelli çalışılmış olup aflatoksinler daha önceden belirlenen optimum plazma parametrelerine tabi tutulmuştur. Plazma sonrası viallerde kalan örneklerdeki aflatoksin çözeltilerinin alınması amacıyla viallere % 10 FBS (Fetal bovine serum) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) çözeltisi eklenmiştir. Aflatoksinin tamamen % 10 FBS'li DMEM çözeltisine geçmesi amacıyla vialler 5 dk ultrasonik su banyosuna konulmuş ve buradan alınan çözeltiler sitotoksisite deneylerinde kullanılmak üzere 96 kuyulu kültür kaplarına her gözde 200 µL olacak şekilde aktarılmıştır (Şekil 3.9). Sitotoksisite testleri gerçekleştirilirken kullanılan aflatoksin çözeltilerinin oranı da küf suşları inoküle edildikten sonra bu suşların üretmiş oldukları aflatoksinlerin oranı dikkate alınarak belirlenmiştir (bkz. Bölüm 3.2.3.7).



Şekil 3.9 MTT testi prosedürünün şematize gösterimi

Kullanılan MTT deney prosedürü aşağıdaki gibidir (Şekil 3.9):

- 250 mg MTT (Applichem, Germany) 50 mL PBS içinde çözülerek stok MTT (5 mg/mL) hazırlandı. Çözülen MTT solüsyonu, 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Herbir kuyu için 1:10 oranında MTT/serumsuz besi ortamı (DMEM) olacak şekilde MTT çözeltisi hazırlanmıştır.
- Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır.
- Deneylerde herhangi bir toksin eklenmeyen % 10 FBS'li DMEM kültür koşulları kontrol gurubu olarak kullanılmıştır. 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilen ve farklı toksinlerin (AFB1 ve TopAF) farklı konsantrasyonlarıyla (1-2-5-10-50-100-300-500-1000 ppb) karşılaştırılan kültürlerle hedeflenen inkübasyon süresinin sonunda her bir kuyuya µL 200 MTT/ besi ortamı çözeltisinden eklenmiştir.
- Kültür plakları alüminyum folyo ile sarılarak % 5 CO₂'li nemli hava içeren inkübatörde 37°C 'de 4 saat süreyle tutulmuştur.
- 4 saat inkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak ve oluşan formazan kristallerinin görünür hale getirmek için 100 µL izopropil alkol eklenmiştir.
- Kültür plağı ELISA plak okuyucusuna (Biochrom, EZ Read 400, Cambridge) konularak absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda okutulmuştur.

- Uygulanan aflatoksin konsantrasyonlarının kontroldeki hücelere göre yüzde ne kadar hücre ölümüne neden olduğu formül ile hesaplanmıştır.

Hücre canlılığı (%)= (Test gurubunun optik yoğunluğu)/(Kontrol gurubunun optik yoğunluğu)x100

Sitotoksite (%)= (Deneysel değer-kontrol örnek değeri)/(Kontrol örnek değeri)x100

3.2.6.2. Floresan Mikroskopu Altında L929 Fare Fibroblast Hücrelerindeki Apoptozun Değerlendirilmesi

Floresan mikroskop, akridin turuncusu boyasının özelliklerini ortaya çıkarmaktadır. Akridin turuncusu iki tip nükleik asit için spesifiktir. Çekirdekdeki deoksiribonükleik asit (DNA) ile yeşil floresan verirken, sitoplazmadaki ribonükleik asit (RNA) ile, mevcut RNA miktarına göre kahverengi, kırmızı-kahve ve turuncu/parlak kırmızı floresan verebilmektedir. Bu spesifik histokimyasal reaksiyon, hücrede protein senteziyle ilgili olan ribonükleik asitten kaynaklanır. Bölünmeyen veya nadiren bölünen hücreler (az miktarda RNA içeren) yeşilden kahverengine floresan vermektedir. Hücre yenilenmesi gibi bir durumda bölünen hücreler orta seviyede RNA içerir ve kırmızı-kahverengi floresan verir. Malign hücreler gibi çok sık bölünen ve fazla miktarda RNA içeren hücreler ise turuncudan parlak kırmızıya floresan verir [353,354].

3.2.7. Plazma İşlemi Sonrası Aspergillus Küf Sporlarının Morfolojilerinde Meydana Gelen Değişimlerin SEM ile Belirlenmesi

Üç nokta ekim yapılmış petrilerden spor solüsyonları 0,2 µm filtre ile filtre edilerek alınmıştır (Bölüm 3.2.3.6-Yöntem I). İşlem görmemiş ve plazma uygulanmış spor solüsyonları karşılaştırmalı olarak incelenerek plazmanın sporlar üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Buna göre spor solüsyonundan 4 mL alınarak atmosferik ve düşük basınç plazma uygulamalarına tabi tutulmuştur. Atmosferik plazma işlemi spor solüsyonunda herhangi bir sıvı kaybına neden olmamaktadır. Bununla birlikte düşük basınç plazma sistemi ile muamele edilmiş örneklerdeki su, uygulanan vakum ile uzaklaştığı için plazma işlemi sonrası sporlar, steril serum fizyolojik sıvısı ile süspansiyon haline getirilmiştir [355].

3.2.7.1. Hücrelerin SEM Analizi Öncesi Fiksasyon Aşaması

- Birincil Fiksasyon: Plazma uygulamalarından sonra spor süspansiyonlarından eppendorf tüplerine 1mL alınarak 1000 rpm'de 1'er dk santifrüj edilmiştir. Üstteki sıvı kısım atılıp üzerine 1 mL % 2,5 gluteraldehit eklenmiş ve bir gece 4°C'de bekletilmiştir.
- Yıkama: Gluteraldehit ile fikse edilmiş sporlar 1000 rpm'de birer dk santifrüj edilmiştir. Sonrasında 1 mL PBS (fosfat tampon çözeltisi) ile yıkayıp 1000 rpm'de birer dk santifrüj edilmiştir.
- İkincil Fiksasyon: 0,1 M PBS içinde hazırlanan % 1'lik osmiyum tetroksit çözeltisinde 30 dk bekletildikten sonra 1000 rpm'de 1'er dk santifrüj edilmiştir.
- Yıkama: 0,1 M PBS çözeltisinde 10'ar dk bekletilerek 1000 rpm'de 1'er dk santifrüj edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrar edilmiştir. Sonrasında su ile 10'ar dk iki kere yıkama yapılarak santifrüj işlemi tekrar edilmiştir.

3.2.7.2. Hücrelerin Dehidratasyon Aşaması

Fikse edilen hücreler % 30-40-50-60-70-80-90-100'lük etanol çözeltileriyle 15'er dk bekletilip her işlem sonrası 1000 rpm'de birer dk santifrüj edilmiştir. Sonra 1 mL % 100'lük etanol çözeltisi ile 10 dk muamele edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmış olup son alkol içindeki spor süspansiyonu 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7.3. Kaplama Aşaması

Kaplama işlemi öncesinde alkol içerisindeki spor süspansiyonundan 10 µL alınarak bakır yüzeye inoküle edilmiştir ve kurumaya bırakılmıştır. Sporların görüntülenebilmesi ve örneklerin bozulmalara karşı korunması için örnekler elektron yansıtıcı/elektron saptırıcı bir madde olan altın-paladium ile kaplanmıştır. Kaplama sonrası örnekler SEM (FEI QUANTA-400 FEG, Tokyo, Japonya) cihazıyla detaylı olarak incelenmiştir.

Örnek yüzeylerinin kaplanması ve SEM görüntülerinin elde edilmesi ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda (Ankara) gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel değerlendirme tek yönlü ANOVA ile SPSS 22.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklar Scheffe testi kullanılarak $\alpha:0.05$ düzeyi için belirlenmiştir. Gruplar arası farkın olduğu durumda, farklılığın hangi

gruptan kaynaklı olduğunu tespit eden istatistik post-hoc olarak bilinmektedir. Çalışma kapsamında Scheffe testi uygulanmasının temel sebebi, bu testin gruplar arasında mümkün olan bütün doğrusal kombinasyonların karşılaştırmasına olanak sağlamasıdır. Ayrıca, diğer testlere göre en esnek ve α hata payını kontrol altında tutabilen ve gruptaki gözlem sayılarının eşit olması varsayımını dikkate almayan bir post hoc türüdür [356]. Tez kapsamında her bir örnek ve her bir uygulanan işlemin tekrar sayısının eşit olmaması Scheffe testinin kullanılmasını uygun kılmaktadır.

4. SONUÇ VE YORUM

4.1. Fındık Ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

4.1.1. Plazma İşlemi Öncesi Gerçekleştirilen Ön Dekontaminasyon İşlemi Sonuçları

Pul biberlere ön dekontaminasyon için alkol uygulaması yapıldığında alkolün etkisiyle örnekler yapısal olarak bozulmaktadır. Yapılan mikrobiyolojik analizlerde pul biber örneklerinde herhangi bir fungal yük tespit edilmemiştir. Dolayısıyla ön dekontaminasyon işlemi sadece fındık örneklerine yapılmıştır. Fındık örneklerine ait ön dekontaminasyon sonuçları ve örneklerden mikroorganizmaların geri kazanımlarına ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Başlangıç mikroorganizma sayılarına ait değerler firmadan elde edilen verilere yakın değerler bulunmuş olunup kontrol mikroorganizma sayısı olarak bu değer kullanılmıştır.

Çizelge 4. 1 Fındık örneklerinde gerçekleştirilen geri kazanım ve ön dekontaminasyon sonuçları

Yöntem	TAMB sayısı (kob/g)	Toplam küf-maya sayısı (kob/gr)
Tedarikçi firma sonuçları	9100	2000
Yüzey yıkama	540±35	200±26
200 rpm 5 dk (stomacher)	3500±150	1000±100
200 rpm 15 sn % 0,1 Tween 80'li (stomacher)	9500±100	2500±100
% 96 EtOH 5 dk çalkalama	400±50	4±1
% 70 EtOH 5 dk çalkalama	0±1	0±1

n=6

Çizelge 4.1'den görüleceği üzere stomacher cihazıyla homojenizasyon sonrası yapılan seri dilüsyonlardan elde edilen sonuçlarda değişiklik gözlenmiştir. Firmadan temin edilen fındıklar 250 gramlık vakum paketler halinde paketlenmiş olup tümünün homojen olması beklenemez. Sadece su kullanılarak gerçekleştirilen "yüzey yıkama" işlemiyle fındık yüzeylerinde bulunan mikroorganizmaların dilüsyon sıvısına geçirilme işleminin etkin bir yöntem olmadığı tespit edilmiştir. Tween 80'li dilüsyon sıvısı kullanılarak yapılan denemeler ise daha etkin ve tutarlı sonuçlar vermiştir. Fındıkların temin edildiği firmanın kendi bünyesinde bulunan laboratuvardan karşılaştırma amaçlı istenilen

küf-maya ve TAMB analiz sonuçları da göz önüne alındığında tez kapsamında bu solüsyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

Mikrobiyolojik kısımda yapılan testlerin ana amacı plazma işlemi uygulandıktan sonra mikroorganizmaların dilüsyon sıvısına hangi yöntemle daha etkin geçirileceğinin saptanmasıdır. % 70'lik alkol çözeltisi dekontaminasyon açısından daha etkin bulunmuştur. % 96'lık alkol çözeltisinin bu konuda etkinliğinin düşük olmasının sebebi yüksek oranda alkolün mikroorganizma inaktivasyonunun yanı sıra mikroorganizmaların yüzeye fiksasyonunu sağlayarak hayatta kalmalarını sağlamasıdır.

4.1.2. Örneklerin Farklı Küf Sporları ve Farklı Yöntemler ile Kontamine Edilmesi

4.1.2.1. Yöntem l'e Göre Kontamine Edilen Örneklerin Spor Sayım Sonuçları

Fındık ve kırmızı pul biber örneklerinin farklı küf suşları ile Bölüm 3.2.3.6'da belirtilen Yöntem l'e göre kontamine edilmesi sonrası elde edilen sayım sonuçları Çizelge 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4. 2 Fındık yüzeylerine Yöntem l'e göre inoküle edilen *A. parasiticus* ve *A. flavus* sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları

Küf suşu	Başlangıç spor sayısı (mikroskopik)	Başlangıç spor sayısı (kültürel)	Yüzeyde kalan spor sayısı (mikroskopik)	Yüzeyde kalan spor sayısı (kültürel)
<i>A. parasiticus</i>	$2,8 * 10^7$	$3,6 * 10^6$	$5,2 * 10^6$	$2,5 * 10^5$
<i>A. flavus</i>	$3,2 * 10^7$	$3,0 * 10^6$	$6,0 * 10^6$	$2,0 * 10^5$

n=3

Çizelge 4. 3 Pul biber yüzeylerine Yöntem l'e göre inoküle edilen *A. parasiticus* ve *A. flavus* sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları

Küf suşu	Başlangıç spor sayısı (mikroskopik)	Başlangıç spor sayısı (kültürel)	Yüzeyde kalan spor sayısı (mikroskopik)	Yüzeyde kalan spor sayısı (kültürel)
<i>A. parasiticus</i>	$2,6 * 10^7$	$9,2 * 10^6$	$1,8 * 10^7$	$4,0 * 10^6$
<i>A. flavus</i>	$3,2 * 10^7$	$2,7 * 10^6$	$1,3 * 10^7$	$2,0 * 10^6$

n=3

4.1.2.2. Yöntem II'ye Göre Kontamine Edilen Örneklerin Spor Sayım Sonuçları

Fındık ve kırmızı pul biber örneklerinin farklı küf suşları ile Bölüm 3.2.3.6'da belirtilen Yöntem II'ye göre kontamine edilmesi sonrası elde edilen sayım sonuçları Çizelge 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4. 4 Fındık yüzeylerine Yöntem 2'ye göre inoküle edilen *A. parasiticus* ve *A. flavus* sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları

Küf suşu	Başlangıç spor sayısı (mikroskopik)	Başlangıç spor sayısı (kültürel)	Yüzeyde kalan spor sayısı (mikroskopik)	Yüzeyde kalan spor sayısı (kültürel)
<i>A. parasiticus</i>	$3,5 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$9,3 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$
<i>A. flavus</i>	$2,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$

n=3

Çizelge 4. 5 Pul biber yüzeylerine Yöntem II'ye göre inoküle edilen *A. parasiticus* ve *A. flavus* sporlarının mikroskopik ve kültürel sayım sonuçları

Küf suşu	Başlangıç spor sayısı (mikroskopik)	Başlangıç spor sayısı (kültürel)	Yüzeyde kalan spor sayısı (mikroskopik)	Yüzeyde kalan spor sayısı (kültürel)
<i>A. parasiticus</i>	$2,6 \cdot 10^7$	$6,7 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$
<i>A. flavus</i>	$3,2 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^7$

n=3

Bölüm 3.2.3.6'da belirtilen Yöntem I ve Yöntem II karşılaştırıldığında Yöntem II'de denenmiş olan prosedürler sonucu yüzeyde daha çok spor tutulduğu gözlenmektedir. Bu nedenle plazma dekontaminasyon işlemleri gerçekleştirilirken Yöntem II'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

Yüzeye mikroorganizma tutunma deneylerinde özellikle pul biber ile gerçekleştirilen denemelerde daha fazla spor tutulduğu gözlenmiştir. Bunun başlıca sebebi 10 gr pul biber örneğinin aynı ağırlıktaki fındık örneklerinden çok daha fazla yüzey alanına sahip olması ve pul biber örneklerinin ortamdaki bütün sporları hapsedebilecek bir yapı oluşturmasıdır. Fındık yüzeyleri besiyerinde yuvarlanarak küf sporlarının yüzeyden alınması sağlanmıştır. Fakat pul biber örneklerinde kontaminasyon steril bir cam baget yardımıyla karıştırma esasına göre yapıldığı her iki gıda örneği arasında bir farklılık tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan dekontaminasyon denemeleri için Yöntem I'de hazırlanmış olan spor

solüsyonları model gıdaların su aktivitelerini değiştirmekte ve dolayısıyla da üründe kontrolsüz gelişmeye neden olabilmektedir.

Thoma lamı ile sayım işleminde daha yüksek ve kesin sonuçlar elde edilmesine rağmen, sayım yöntemi olarak kültürel sayım yönteminin kullanılması uygun görülmüştür. Bunun nedenleri ise,

- Kültürel sayım yönteminden elde edilen sayım sonuçları diğer sayım sonuçlarından her zaman yüksektir. Bunun başlıca sebebi canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilememesidir. Yani hem canlı hem de ölü hücreler beraber sayılmış olmaktadır.
- İncelenen örnekteki partiküller hücrelerle karıştırılabilir. Bu da sayım sonucunu etkilemektedir.
- Tez kapsamında çok fazla sayıda sayım yapıldığı için inceleme yapılırken göz yorgunluğuna bağlı olarak hatalı sayım vs. yapılabilmektedir.
- Kültürel yöntemi işlemler öncesi ve sonrasında devamlı olarak uygulandığından ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak verildiğinden yöntemden kaynaklanan hatalar elimine edilmektedir.

4.1.3. Küf Suşlarının Dekontaminasyon İşlemi Öncesi Ortalama Spor Sayılarının Belirlenmesi

Küf suşlarına aflatoxin ürettirebilmek için küf suşları 5 gün etüvde gelişmeye bırakılmış sonrasında küfler gıda materyalleri ile Yöntem II'ye göre kontamine edilmiş ve tekrar aynı koşullarda iki gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra laminar kabin içerisinde, gıda örnekleri petriden alınıp reaktör sistemine konulmuş ve plazma işlemi uygulanmıştır.

Yukarıdaki tablodan elde edilen veriler plazma öncesi örneklerdeki toplam spor sayısını göstermektedir. Çizelge 4.6'dan da görüleceği üzere pul biberlerde yaklaşık 10^8 ve fındıklarda 10^7 mertebesinde gelişme gözlenmiştir. Bu deneyler sırasında örneklerin a_w 'sinin yaklaşık 0,90-0,95 aralığında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4. 6 İnkübatörde toplam 7 gün beklemiş örneklerdeki spor sayıları

Test materyali	Küf cinsi	Spor sayısı
Fındık	<i>A. parasiticus</i>	$(8,0 \pm 1,1) \cdot 10^7$
Fındık	<i>A. flavus</i>	$(6,0 \pm 0,8) \cdot 10^7$
Pul biber	<i>A. parasiticus</i>	$(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^8$
Pul biber	<i>A. flavus</i>	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^8$

n=6

Bu sayılar Yöntem II'de elde edilen sayılardan yaklaşık 1 log fazladır. Yani iki gün içerisinde örneklerde 1 log artış meydana gelmiştir. Deneylerin bu kısmında hedeflenen başarı ölçütü sporların test örneklerinde belirlenen koşul (28°C; $\approx 0,95 a_w$) ve sürede (toplam 7 gün) aflatoksin üretimlerinin sağlandığı ortalama spor miktarlarının belirlenmesidir.

4.1.4. Plazma İşlemi Sonrası Ortamda Kalan Spor Sayısının Belirlenmesi

Kontamine olmuş gıda örnekleri optimum plazma parametrelerinin belirlenmesi amacıyla düşük-basınç ve atmosferik plazma sistemlerinde farklı plazma parametrelerine tabi tutulmuştur.

4.1.4.1. Düşük Basınç Plazma Sistemi ile Gerçekleştirilen Dekontaminasyon İşlemi Sonuçları

Düşük basınç plazma sisteminde sıcaklık artışı, güç ve zaman parametrelerinin artışı ile doğru orantılı olarak artarken en yüksek sıcaklık 100 W-30 dk zaman parametresinde görülmüş olup 50°C'nin üzerine çıkmadığı tespit edilmiştir [34]. Dolayısıyla tez kapsamında düşük basınç plazma parametreleri için sıcaklık ölçümü gerçekleştirilmemiştir.

4.1.4.1.1. Fındık Örneklerinde Gerçekleştirilen Dekontaminasyon Denemeleri

Düşük basınç plazma sisteminin çalışma basıncı özellikle bu sistemin hava içeren gıdaların dekontaminasyon işlemlerinde kullanılmasını kısıtlamaktadır. 0,1-10,0 mbar skalaya sahip olan plazma sisteminin plazma fazını oluşturabilmesi için gerekli enerjiyi sağlayacak jeneratörü, basınç 0,4 mbar düzeyine indiğinde otomatik olarak devreye girmektedir. Dolayısıyla kullanılan materyalin (çalışmalarımız kapsamında seçtiğimiz gıda örnekleri) veya materyal yığınının ihtiva ettiği havanın çıkarılması için gereken süre ve pompa maliyeti bu sistemin en önemli dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum özellikle fındık

örneklerinde yapılan çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır. Fındık hücrelerinde bulunan hava, basıncın düşmesini engellediği için bu gıda materyalinin dekontaminasyon işleminin gerçekleştirilmesi yaklaşık 15-20 saat almaktadır. Ayrıca ön deneme niteliği sayılan çalışmalarımızda kullandığımız fındıklar, tez kapsamında kullanılan fındıklar gibi yüzey özellikleri bakımından koşullandırılmadığı için çalışmalar daha hızlı gerçekleştirilmiştir [49]. Bu durum fındıkların düşük basınç plazma sistemiyle dekontaminasyonun sanayiye yönelik olarak etkin bir şekilde gerçekleştirilemeyeceğini göstermektedir. Endüstriyel uygulamalarda fındıklar açısından bu denli bir sistem kurulumu reaktör büyüklüğü, uygulama süresi ve vakum maliyeti göz önüne alındığında göz ardı edilemeyecek kadar büyük sıkıntılara yol açabileceği düşünülmektedir. Tez kapsamındaki çalışmalarımızın, daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarla karşılaştırmalı olarak verilebilmesi amacıyla daha önceki denemelerimizde elde edilen etkin plazma parametresi olan 100 W-30 dk parametresi bu tez kapsamında da test edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8). Elde edilen sonuçlar ayrıca atmosferik plazma sistemi ile de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4. 7 Döner tambur sistemli düşük basınç plazma sistemi kullanılarak *A. parasiticus*'un fındık örneklerinden dekontaminasyonu

Kullanılan gaz		Oksijen	Azot	Hava
Uygulanan Güç (Watt)		100	100	100
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(8,0 \pm 1,1) \cdot 10^7$	$(8,0 \pm 1,1) \cdot 10^7$
		30	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^3$	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^2$

n=3

Çizelge 4. 8 Döner tambur sistemli düşük basınç plazma sistemi kullanılarak *A. flavus*'un fındık örneklerinden dekontaminasyonu

Kullanılan gaz		Oksijen	Azot	Hava
Uygulanan Güç (Watt)		100	100	100
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(6,0 \pm 0,8) \cdot 10^7$	$(6,0 \pm 0,8) \cdot 10^7$
		30	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^3$

n=3

Fındık örneklerinin dekontaminasyon işlemi için sadece 100 W-30 dk parametresinin kullanılması ile yaklaşık 4 logaritmik indirgenme meydana gelmektedir. Bununla birlikte inaktivasyon ajanı olarak hava kullanıldığında fındık yüzeylerinde yaklaşık 5 logaritmik indirgenme meydana gelmektedir. *A. flavus*'ün düşük basınç plazmasına *A. parasiticus*'tan nispeten daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7 ve 4.8).

4.1.4.1.2. Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Dekontaminasyon Denemeleri

Düşük basınç plazma sistemi ile pul biberde gerçekleştirilen denemelerde fındıkta olduğu gibi reaktör iç basıncının 0,4 mbar'a gelmesi için gerekli süre çok uzun olmadığı için dekontaminasyon işlemlerinin zamanla değişimini görmek amacıyla farklı zaman parametreleri denenmiştir. Farklı plazma parametrelerinde göre elde edilen mikroorganizma sayıları aşağıda bulunan tablolarda verilmiştir.

A. parasiticus Sporlarının Pul Biber Örneklerinden Dekontaminasyon Sonuçları

Düşük basınç plazması ile farklı uygulama gazları kullanılarak pul biber örneklerinden *A. parasiticus* dekontaminasyonunu Çizelge 4.9, Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4. 9 Döner tambur sistemli düşük basınç oksijen plazması kullanılarak *A. parasiticus*'un pul biber örneklerinden dekontaminasyon sonuçları

Kullanılan gaz		Oksijen			
Uygulanan Güç (Watt)		25	75	100	
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(1,8\pm0,3)*10^8$	$(1,8\pm0,3)*10^8$	$(1,8\pm0,3)*10^8$
		5	$(3,2\pm0,4)*10^6$	$(3,4\pm0,7)*10^6$	$(3,0\pm0,4)*10^6$
		10	$(1,7\pm0,2)*10^6$	$(1,0\pm0,4)*10^6$	$(8,0\pm0,5)*10^5$
		15	$(8,7\pm0,3)*10^5$	$(5,2\pm0,1)*10^5$	$(3,0\pm0,6)*10^5$
		20	$(5,4\pm0,5)*10^5$	$(3,4\pm0,3)*10^5$	$(2,9\pm0,6)*10^5$
		25	$(5,2\pm0,5)*10^5$	$(3,0\pm0,6)*10^5$	$(2,2\pm0,3)*10^5$
		30	$(3,2\pm0,1)*10^5$	$(3,9\pm0,4)*10^4$	$(1,6\pm0,3)*10^4$

n=3

Çizelge 4. 10 Döner tambur sistemli düşük basınç azot plazması kullanılarak *A. parasiticus*'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu

Kullanılan gaz		Azot				
Uygulanan Güç (Watt)		25	75	100		
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(1,8\pm0,3)*10^8$	$(1,8\pm0,3)*10^8$	$(1,8\pm0,3)*10^8$	
		5	$(4,3\pm0,7)*10^6$	$(3,5\pm1,0)*10^6$	$(3,2\pm0,4)*10^6$	
		10	$(2,7\pm0,3)*10^6$	$(2,3\pm0,6)*10^6$	$(7,6\pm0,7)*10^5$	
		15	$(5,7\pm0,6)*10^5$	$(5,5\pm0,4)*10^5$	$(5,0\pm0,9)*10^5$	
		20	$(5,5\pm0,2)*10^5$	$(4,1\pm0,3)*10^5$	$(4,0\pm0,5)*10^5$	
		25	$(4,8\pm0,5)*10^5$	$(2,6\pm0,6)*10^5$	$(3,2\pm0,3)*10^5$	
		30	$(2,2\pm0,6)*10^5$	$(6,6\pm0,5)*10^4$	$(3,4\pm0,4)*10^4$	

n=3

Çizelge 4. 11 Döner tambur sistemli düşük basınç hava plazması kullanılarak *A. parasiticus*'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu

Kullanılan gaz		Hava				
Uygulanan Güç (Watt)		25	75	100		
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(1,8\pm0,3)*10^8$	$(1,8\pm0,3)*10^8$	$(1,8\pm0,3)*10^8$	
		5	$(2,1\pm0,2)*10^6$	$(1,3\pm0,7)*10^6$	$(1,2\pm0,3)*10^6$	
		10	$(1,3\pm0,2)*10^6$	$(2,9\pm0,3)*10^6$	$(4,0\pm0,5)*10^5$	
		15	$(8,7\pm0,5)*10^5$	$(5,5\pm0,6)*10^5$	$(3,0\pm0,3)*10^5$	
		20	$(4,5\pm0,8)*10^5$	$(3,1\pm0,3)*10^5$	$(2,9\pm0,2)*10^5$	
		25	$(4,8\pm0,7)*10^5$	$(2,0\pm0,2)*10^5$	$(1,3\pm0,1)*10^5$	
		30	$(1,2\pm0,3)*10^5$	$(5,9\pm0,3)*10^4$	$(2,1\pm0,4)*10^4$	

n=3

A. parasiticus'un düşük basınç plazma sistemi ile dekontaminasyon işleminin gerçekleştirilmesinde farklı güç-zaman ve inaktivasyon gazı parametrelerinin denenmesi sonucunda elde edilen veriler ışığında 100 W-30 dk hava plazmasının en etkin plazma parametresi olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.11'den de gözükeceği üzere düşük basınç plazma uygulaması ile yaklaşık 4 logaritmalık *A. parasiticus* indirgenmesi elde edilmiştir.

A.flavus Sporlarının Pul Biber Örneklerinden Dekontaminasyon Sonuçları

Düşük basınç plazması ile farklı uygulama gazları kullanılarak pul biber örneklerinden *A. flavus* dekontaminasyonunu Çizelge 4.12, Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4. 12 Döner tambur sistemli düşük basınç oksijen plazması kullanılarak *A. flavus*'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu

Kullanılan gaz		Oksijen			
Uygulanan Güç (Watt)		25	75	100	
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(1,4\pm 0,4)*10^8$	$(1,4\pm 0,4)*10^8$	$(1,4\pm 0,4)*10^8$
		5	$(3,4\pm 0,3)*10^6$	$(3,8\pm 0,3)*10^6$	$(3,3\pm 0,9)*10^6$
		10	$(1,2\pm 0,1)*10^6$	$(3,4\pm 0,4)*10^6$	$(9,0\pm 0,5)*10^5$
		15	$(7,3\pm 0,3)*10^5$	$(4,6\pm 0,4)*10^5$	$(2,4\pm 0,7)*10^5$
		20	$(6,4\pm 0,2)*10^5$	$(4,3\pm 0,7)*10^5$	$(2,1\pm 0,4)*10^5$
		25	$(6,2\pm 0,6)*10^5$	$(3,4\pm 0,5)*10^5$	$(2,0\pm 0,3)*10^5$
		30	$(2,2\pm 0,3)*10^5$	$(1,8\pm 0,1)*10^5$	$(1,0\pm 0,2)*10^5$

n=3

Çizelge 4. 13 Döner tambur sistemli düşük basınç azot plazması kullanılarak *A. flavus*'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu

Kullanılan gaz		Azot			
Uygulanan Güç (Watt)		25	75	100	
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(1,4\pm 0,4)*10^8$	$(1,4\pm 0,4)*10^8$	$(1,4\pm 0,4)*10^8$
		5	$(5,2\pm 0,2)*10^6$	$(4,4\pm 0,4)*10^6$	$(4,3\pm 0,5)*10^6$
		10	$(2,2\pm 0,5)*10^6$	$(2,4\pm 0,8)*10^6$	$(9,8\pm 1,0)*10^5$
		15	$(1,0\pm 0,2)*10^6$	$(8,7\pm 0,5)*10^5$	$(5,8\pm 0,3)*10^5$
		20	$(8,0\pm 0,6)*10^5$	$(7,2\pm 0,5)*10^5$	$(2,7\pm 0,2)*10^5$
		25	$(7,4\pm 0,4)*10^5$	$(3,2\pm 0,2)*10^5$	$(1,6\pm 0,1)*10^5$
		30	$(2,2\pm 0,6)*10^5$	$(2,5\pm 0,2)*10^5$	$(1,8\pm 0,1)*10^5$

n=3

Çizelge 4. 14 Döner tambur sistemli düşük basınç hava plazması kullanılarak *A. flavus*'un pul biber örneklerinden dekontaminasyonu

Kullanılan gaz		Hava			
Uygulanan Güç (Watt)		25	75	100	
Mikroorganizma sayısı (kob/g)	Zaman (dk)	0	$(1,4\pm 0,4)*10^8$	$(1,4\pm 0,4)*10^8$	$(1,4\pm 0,4)*10^8$
		5	$(2,7\pm 0,3)*10^6$	$(2,7\pm 0,6)*10^6$	$(2,3\pm 0,2)*10^6$
		10	$(1,0\pm 0,7)*10^6$	$(6,7\pm 0,4)*10^5$	$(4,0\pm 0,3)*10^5$
		15	$(6,2\pm 0,9)*10^5$	$(3,7\pm 0,6)*10^5$	$(1,9\pm 0,3)*10^5$
		20	$(4,1\pm 0,2)*10^5$	$(2,7\pm 0,5)*10^5$	$(1,6\pm 0,6)*10^5$
		25	$(3,8\pm 0,7)*10^5$	$(1,7\pm 0,1)*10^5$	$(1,2\pm 0,2)*10^5$
		30	$(0,8\pm 0,1)*10^5$	$(5,0\pm 0,4)*10^4$	$(3,0\pm 0,7)*10^4$

n=3

A. flavus'un inhibisyon verilerine bakıldığında *A. parasiticus*'tan daha dayanıklı olduğu, yalnızca 100 W-30 dk parametresinde yaklaşık 4 logaritmalık indirgenme gözlemlendiği belirlenmiştir. Fındık örneklerinde de *A. flavus*'un daha dirençli bir özellik gösterdiği ve indirgenme oranının daha az olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12, Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14).

Döner tamburlu düşük basınç plazması ile pul biber örneklerinde yüksek dekontaminasyon etkinliği gözlenmemesinin nedenleri kullanılan tambur sisteminin etkin bir şekilde aktif plazma türlerini geçirememesi ve kullanılan reaktörün çalışılan örnek gramajlarına uygun büyüklükte olmamasıdır. Ayrıca $\approx 0,95$ su aktivitesine sahip pul biber örnekleri özellikle reaktör gözeneklerine ve birbirlerine yapışma eğiliminde oldukları için dekontaminasyon etkinliği azalmaktadır. Düşük basınç plazmasının bir diğer dezavantajı ise örnekte bulunan su miktarının plazma işlemine başlanılmadan önce sağlanan vakumla ani şekilde azalması ve dolayısıyla örnekte bulunan sporların kuruma nedeniyle örnek ve reaktör yüzeyine yapışmasıdır. Bu çalışmada kullanılan pul biberin a_w değeri, Sen ve ark. [47]'de kullanılan pul biberlerinin a_w değerinden daha yüksek olduğu için yüzey mikroflorasında daha az inhibisyon gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada yapay kontaminasyon (artificially contaminated) yerine doğal kontamine (naturally contaminated) fındık ve pul biber örnekleriyle çalışılmıştır. Buradan da aynı gıda örneği baz alındığında düşük basınç plazmasında dekontaminasyon etkinliğini etkileyen başlıca faktörlerin, örneğin a_w değeri ile örnek yüzeyinde bulunan mikrobiyal floranın çeşitliliği/özelliği olduğu söylenebilir.

Fındık ve pul biber örneklerinde gerçekleştirilen dekontaminasyon deneylerinde belirlenen farklı indirgenme oranlarının başlıca sebepleri birim yüzey alanda, fındık yüzeyinde aktif plazma türlerine maruz bırakılan spor sayısının az olmasıdır. Ayrıca döner tambur sisteminde fındıkların geometrik yapıları itibariyle yuvarlanmaları birbirine yapışan pul biberlere nazaran daha homojen bir proses gerçekleştirilmesini sağlamıştır.

4.1.4.2. Atmosferik Plazma Sistemi ile Gerçekleştirilen Dekontaminasyon Denemeleri

4.1.4.2.1. Plazma Parametrelerinin Optimizasyonu

Atmosferik basınç plazması düşük basınç plazma sistemi gibi sınırlı parametrelerden oluşmayıp plazma dekontaminasyon etkinliğini belirleyecek parametre sayısı daha fazladır. Atmosferik plazma sisteminin aktif plazma türlerini örnek yüzeylerine en homojen ve en etkin şekilde sağlaması amacıyla hem rotasyonlu jet hem de örneklerin karışmasını sağlayan döner tambur reaktör sistemi kullanılmıştır. Ayrıca belirlenen tarama aralığı da reaktörün baştan sona taranması için en ideal mesafe olarak seçilmiştir.

Gaz akış hızı örneklerin reaktör içinde akışkan hale getirilebilmesi için optimize edilmiştir. Bu amaçla öncelik, örneklerin reaktör içerisinde akışkan bir şekilde karışmasını sağlamakla birlikte plazma jet sistemine beslenen gazın örneklere inoküle edilen sporları direkt olarak uzaklaştırmamasıdır. Dolayısıyla her 2 örnekte optimum akışkanlık ve dekontaminasyonun sağlanabileceği 3000 L/saat akış hızı kullanılmasına karar verilmiştir.

Plazma jeti ile örnek arasındaki mesafe maksimum 7 cm olarak ayarlanabilmektedir. Dolayısıyla örnek yüzeylerinde sıcaklık farklılıklarının minimum tutulması amacıyla örnekle plazma jeti arasındaki mesafenin de maksimum tutulması gerekmektedir. Örnekle jet arasındaki mesafe 3 cm iken örnek yüzeylerindeki sıcaklık değişimi yaklaşık $76\pm 12^{\circ}\text{C}$ olmaktadır.

Tarama aralığı ise plazma jetinin x düzleminde belirtilen tarama alanında hareket ettikten sonra taramaya devam etmek için y düzleminde kaydığı mesafedir. Tarama aralığı ne kadar sık olursa birim yüzeye uygulanmış olan plazma o kadar etkin olmaktadır. Cihazın tarama yapılacak alan seçim özelliği sayesinde reaktör boyutlarında tarama gerçekleştirilmiştir. Böylece hem reaktör dışında plazma oluşumu ve gereksiz enerji ve gaz kullanımı engellenmiş hem de reaktör boyutlarında (45x145 mm) plazma yapılmamış kör noktaların oluşması engellenmiştir. Tez kapsamında 3-5 mm denenmiş olup 3 mm tarama aralığı aktif plazma türlerinin örnek yüzeylerine daha etkin temas edebilmesi adına çalışmalarımızın devamında kullanılmasına karar verilmiştir.

Plazma jet hızı belirlenen tarama aralığının ne kadar hızla taranacağını belirlemektedir. Jet hızının artması plazma etkinliğini azaltırken, gereğinden fazla düşük jet hızlarında çalışmak ise plazmanın gıda materyalleri ile uzun süreli etkileşimine dolayısıyla yüksek sıcaklık artışlarına sebep olmaktadır.

Tarama alanı uygulama sırasında kullanılan reaktörü (145x45 mm) tam olarak tarayacak şekilde seçilmektedir. Bu amaçla tarama aralığı 150x50mm olarak seçilmiştir.

Plazma probu örnek yüzeyine yaklaşımadan plazma fazının oluşumu cihazın plazma hazırlık süresi seçeneği ile ayarlanmaktadır. Bunun başlıca avantajı plazma üretimi öncesi sisteme yollanan yüksek basınçlı havanın yüzeyde bulunan mikroorganizmalara fiziksel bir etki yapmaması ve ürüne kesikli bir plazma yerine stabil bir plazma uygulanmasıdır. Bu amaçla plazma hazırlık süresi 3 sn olarak belirlenmiştir.

Plazma probu atlama uzunluğu (Over run length) parametresi de toplam plazma süresini belirleyen parametrelerden birisidir. Bu parametre kullanıcı tarafından değiştirilememekle birlikte plazma probunun belirlenen tarama alanını belirlenen plazma jet hızında geçebilmesi için gerekli ön hızlanmayı sağlayabileceği mesafeyi ifade etmektedir.

Yukarıda belirtilmiş olan parametreler çerçevesinde atmosferik plazma parametreleri optimize edilmiştir. Etkin ve stabil plazma oluşumu ile plazmanın örneklerde yüksek sıcaklık değişimlerine neden olmamaları kavramları dengelenerek dekontaminasyon prosedürlerinin gerçekleştirileceği optimum plazma parametreleri belirlenmiştir. 15 kHz'de stabil bir plazma oluşumu gözlenmemektedir. Bunun sebebi bu frekansta plazma probuna verilen gücün mevcut gazı iyonlaştıramamasıdır. Dolayısı ile deneylerin optimizasyon aşamalarında 16, 20 ve 25 kHz frekans değerleri kullanılmıştır. Plazma uygulama süresini belirleyen plazma jet hızı, tarama aralığı, tarama alanı ve plazma probu atlama uzunluğu parametreleridir. Plazma jet hızı direkt olarak uygulama zamanını belirlememektedir. İnaktivasyon kinetikleri elde edilirken bu parametre baz alınarak işlem yapıldığında yanlış bir kaniya varılmış olunur. Bunun başlıca nedeni jet hızları değiştiğinde plazma uygulama süreleri jet hızındaki artışla doğru orantılı olarak değişmemekte dolayısıyla doğru sonuçlar elde edilememektedir. Bir diğer

nokta ise plazma jet hızları değiştiğinde birim alana uygulanmış olan plazma miktarı değişmektedir. Bu noktada atmosferik plazmada uygulama süresini belirlemek amacıyla optimum parametre belirlenerek cihazın çoklu uygulama seçeneği kullanılarak aynı plazma özelliklerini belirlenmiş tarama aralığında birden fazla uygulamak en doğru sonucu verecektir. Plazma jet hızlarının değişimiyle (10-100 m/dk) plazma uygulama sürelerinin değişimi Çizelge 4.15’de belirtilmiştir.

Tarama alanının (150x50 mm) belirlenen jet hızlarında 1 tam tur uygulamaya tabi tutulmasına “1 döngü” kavramı denilmiştir. Plazma işleminde kinetik veriler elde etmek amaçlı farklı zamanlarda uygulama yapmak adına 1-5 aralığında döngü gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4. 15 Plazma jet hızının belirli tarama aralığında uygulama süresi üzerine etkisi

Plazma jet hızı (m/dk)	Prob atlama uzunluğu (mm)	1 döngü için gerekli süre (sn)
10	3	28,4
20	5	21,1
30	10	19,9
40	17	20,0
50	24	20,5
60	29	20,7
70	45	22,2
80	57	23,2
90	71	24,3
100	85	25,4

Tez kapsamında 60 m/dk jet hızı seçildiği için plazma uygulama zamanları göz önüne alınırken buradaki döngü zamanı dikkate alınmıştır.

4.1.4.2.1.1. Atmosferik Plazma Sisteminde Farklı Plazma Parametreleri Uygulamalarıyla Sıcaklıkta Meydana Gelen Değişimlerin İzlenmesi

Petri kaplarına konulmuş örnekler belirlenen plazma parametrelerine tabi tutulurken kızılötesi termometreyle yaklaşık 10 örnekten/noktadan plazma uygulaması sırasında ve sonrasında sıcaklık ölçümleri alınmıştır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4. 16 Atmosferik plazmada farklı frekans ve referans voltaj değerleri uygulaması sonrası fındık ve pul biber örneklerinde meydana gelen sıcaklık değişimleri

Frekans (kHz)	Referans voltaj (%)	Fındık yüzeylerindeki sıcaklık değişimi (hava/azot)		Pul biber yüzeylerindeki sıcaklık değişimi (hava/azot)	
16	40	28,2±9,5**	28,5±10,0**	28,9±6,5**	29,3±5,5**
	60	32,4±7,2*	34,9±4,1*	30,4±5,2*	33,0±6,3*
	80	35,6±6,8	38,6±7,6	33,6±4,9	35,6±7,2
	100	40,3±7,2	41,8±8,3	40,6±3,7	39,9±5,3
20	40	30,0±7,3*	32,3±4,2*	30,0±7,3*	32,3±4,2*
	60	39,0±6,2	40,2±4,6	39,0±6,2	40,2±4,6
	80	42,0±5,7	42,0±3,5	42,0±5,7	42,0±3,5
	100	44,0±7,5	42,7±6,4	44,0±7,5	42,7±6,4
25	40	30,4±4,1	32,3±3,5	33,7±5,3	31,3±6,2
	60	37,0±5,0	40,3±4,2	35,3±4,5	38,6±7,1
	80	41,0±4,3	42,4±5,7	40,5±7,2	41,0±5,0
	100	44,9±4,7	43,0±2,7	44,3±5,0	42,5±2,5

*Stabil plazma oluşma olasılığı düşük.

** Stabil plazma oluşma olasılığı düşük, plazma oluşumu genellikle kesikli ve uygulamaya yönelik sorunlar çıkabilir.

Örneklerin başlangıç sıcaklığı, oda sıcaklığıdır. Plazma uygulamasıyla örneklerde meydana gelen sıcaklık değişimlerinin herhangi bir biyoaktif gıda bileşenine zarar verecek ölçüde olmadığı, elde edilen sıcaklıkların 50°C'nin üzerine çıkmadığı tespit edilmiştir. Proben 5 döngü yapılması ile bu sıcaklık değerlerinde ortalama 5-10°C arasında yükselme gözlenmektedir.

Yukarıda belirtilmiş olan bilgiler ışığında atmosferik plazma sisteminin optimum plazma parametreleri Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4. 17 Atmosferik plazma sisteminin çalışma aralığı ve optimum plazma parametreleri

PLAZMA PARAMETRELERİ	Cihaz çalışma aralıkları	Belirlenmiş optimum parametreler
Referans voltaj (%)	40-100	100
Plazma frekansı (kHz)	15-25	25
Plazma devir süresi (%)	1-100	100
Plazma jet hızı (m/dk)	1-100	60
Tarama aralığı (mm)	1-250	3
Gaz akış hızı (L/saat)	100-5000	3000
İyonlaştırma gazları	Hava, azot	Hava
Plazma jeti ile örnek arasındaki mesafe (cm)	0-7	7

4.1.4.2.1.2. Atmosferik Plazma Uygulaması Sonrası Mikrobiyal Yükteki Değişimin Belirlenmesi

Atmosferik plazma sistem parametrelerinin 5 farklı zaman diliminde (5 döngü) pul biber ve fındık örneklerinde logaritmik olarak indirgenmelerine ait veriler Çizelge 4.18, Çizelge 4.19, Çizelge 4.20 ve Çizelge 4.21’de verilmiştir. Mikrobiyal indirgenmenin detaylarıyla görülmesini sağlayacak 3 boyutlu grafikler EK 2, EK 3, EK 4 ve EK 5’te detaylarıyla verilmiştir.

Çizelge 4. 18 Atmosferik plazma uygulanmış fındık örneklerinden *A. parasiticus*'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/g)

Frekans (kHz)	Ref. Voltaj (%)	Plazma gazı	1. döngü	2. döngü	3. döngü	4. döngü	5. döngü
16	40	AZOT	6,57	6,46	6,34	6,24	6,06
	60		6,34	6,26	6,10	5,19	5,22
	80		6,15	6,03	5,07	4,76	4,53
	100		5,57	5,22	5,14	4,51	4,41
16	40	HAVA	6,43	6,26	6,09	6,04	5,86
	60		6,35	5,98	5,88	5,67	5,51
	80		6,01	5,92	5,24	5,27	4,73
	100		5,12	5,05	5,00	4,27	4,08
20	40	AZOT	6,29	6,22	6,08	5,88	5,56
	60		6,26	6,18	5,92	5,41	5,16
	80		5,86	4,81	5,56	5,64	4,23
	100		5,43	5,08	4,82	4,16	4,18
20	40	HAVA	6,49	6,21	6,07	5,45	4,59
	60		5,99	5,87	6,59	5,10	4,15
	80		5,50	5,09	4,84	4,12	3,96
	100		4,47	4,32	4,19	3,14	2,99
25	40	AZOT	6,12	5,94	5,05	5,03	4,65
	60		5,97	5,70	4,43	4,52	4,30
	80		4,43	4,24	3,36	3,17	3,12
	100		4,10	4,13	3,52	3,15	2,89
25	40	HAVA	6,02	5,85	5,22	4,65	4,40
	60		5,37	4,75	4,55	4,02	3,35
	80		4,37	3,22	3,19	2,89	2,75
	100		4,07	3,16	2,81	2,50	2,39

n=3

Çizelge 4. 19 Atmosferik plazma uygulanmış fındık örneklerinden *A. flavus*'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/g)

Frekans (kHz)	Ref. Voltaj (%)	Plazma gazı	1. döngü	2. döngü	3. döngü	4. döngü	5. döngü
16	40	AZOT	6,67	6,50	6,19	6,22	5,87
	60		6,63	6,47	6,34	5,96	4,92
	80		6,42	6,22	6,00	5,07	4,87
	100		5,69	5,48	5,27	4,86	4,77
16	40	HAVA	6,68	6,44	6,34	6,22	6,23
	60		6,43	6,22	6,15	6,03	5,57
	80		6,16	6,12	6,51	5,51	4,93
	100		5,37	5,12	5,10	4,45	4,22
20	40	AZOT	6,59	6,43	6,19	6,22	5,83
	60		6,49	6,18	6,10	5,95	5,52
	80		6,26	6,12	6,05	5,08	4,62
	100		5,25	5,12	4,97	4,67	4,46
20	40	HAVA	6,43	6,11	6,05	5,56	4,65
	60		6,19	6,01	6,49	5,09	4,22
	80		5,52	5,19	4,83	4,30	3,95
	100		5,29	4,30	4,12	3,46	3,04
25	40	AZOT	6,29	5,94	5,87	5,04	4,67
	60		6,59	6,56	5,15	4,76	4,22
	80		4,50	4,24	3,85	3,43	3,07
	100		3,75	3,44	3,30	2,95	2,84
25	40	HAVA	6,21	5,88	5,12	4,89	4,20
	60		5,11	5,14	4,28	4,12	3,34
	80		4,10	3,92	2,94	2,95	2,49
	100		3,90	2,94	2,86	2,37	2,40

n=3

Çizelge 4. 20 Atmosferik plazma uygulanmış pul biber örneklerinden *A. parasiticus*'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/g)

Frekans (kHz)	Ref. Voltaj (%)	Plazma gazı	1. döngü	2. döngü	3. döngü	4. döngü	5. döngü
16	40	AZOT	6,79	6,72	6,43	6,19	6,14
	60		6,76	6,69	6,20	5,93	6,03
	80		6,65	6,65	6,17	6,05	5,91
	100		6,32	6,31	6,17	6,03	5,52
16	40	HAVA	6,66	6,63	6,43	5,89	5,71
	60		6,47	6,47	6,30	5,80	5,56
	80		6,28	6,29	5,97	5,60	5,47
	100		6,25	6,22	5,88	5,50	5,40
20	40	AZOT	6,48	6,41	6,40	6,02	6,86
	60		6,34	6,32	6,25	5,83	5,79
	80		6,10	6,04	5,93	5,65	4,93
	100		6,10	5,95	5,85	5,19	4,86
20	40	HAVA	6,44	6,34	6,07	5,86	5,64
	60		6,31	6,12	5,93	5,74	4,85
	80		6,04	5,90	5,79	5,19	4,74
	100		6,02	5,72	5,12	4,72	4,42
25	40	AZOT	6,43	6,35	6,07	5,58	5,43
	60		6,39	6,27	5,93	5,31	4,73
	80		5,88	5,86	5,83	4,65	4,56
	100		5,85	5,73	5,44	4,42	3,84
25	40	HAVA	6,44	6,30	6,24	5,73	4,73
	60		6,26	5,83	5,14	5,21	4,30
	80		5,78	5,66	4,76	4,40	3,65
	100		5,62	4,88	4,56	3,53	3,35

n=3

Çizelge 4. 21 Atmosferik plazma uygulanmış pul biber örneklerinden *A. flavus*'un dekontaminasyon sonuçları (log kob/g)

Frekans (kHz)	Ref. Voltaj (%)	Plazma gazı	1. döngü	2. döngü	3. döngü	4. döngü	5. döngü
16	40	AZOT	6,77	6,62	6,38	6,01	5,88
	60		6,67	6,55	6,24	5,97	5,62
	80		6,49	6,40	5,96	5,90	5,47
	100		5,86	5,82	5,67	5,24	5,29
16	40	HAVA	6,64	6,54	6,34	6,25	6,20
	60		6,58	6,48	6,12	5,91	5,78
	80		6,41	6,29	5,97	5,51	5,22
	100		6,29	6,19	5,80	5,10	5,07
20	40	AZOT	6,59	6,43	6,19	5,94	5,85
	60		6,49	6,26	6,01	5,79	5,51
	80		6,33	6,17	5,83	5,54	4,87
	100		6,19	6,14	5,70	5,08	4,36
20	40	HAVA	6,43	6,09	5,86	5,44	4,88
	60		6,30	5,94	5,66	5,79	4,63
	80		6,19	5,91	5,23	4,45	4,11
	100		6,11	5,72	4,97	3,93	3,69
25	40	AZOT	6,37	6,02	5,89	4,91	4,85
	60		6,27	5,93	5,88	4,80	4,44
	80		5,97	5,83	5,32	3,87	3,67
	100		5,79	5,51	4,87	3,50	3,49
25	40	HAVA	6,13	6,09	5,87	4,57	4,46
	60		5,96	5,82	5,63	4,19	4,10
	80		5,60	5,24	4,37	3,79	3,54
	100		4,46	4,52	4,22	3,64	3,05

n=3

Atmosferik plazmanın etkinliğini, mikroorganizmanın türü, kullanılan gaz, frekans, referans voltaj ve zaman belirlemektedir. Frekans ve referans voltaj direkt olarak plazma gücünü etkileyen parametrelerdir. Özellikle frekans, plazma oluşumunu direkt olarak etkilemektedir. 16 kHz parametresinde stabil plazma oluşumu sağlanamadığından bu frekans elenmiştir. Bununla birlikte referans voltajda meydana gelen değişim frekans ile kıyaslandığında mikrobiyal inaktivasyondaki

değişimle daha fazla paralellik göstermektedir. Zaman ise literatürde mikrobiyal inaktivasyonun belirlenmesinde her zaman birincil parametredir.

Hava kullanılarak gerçekleştirilen dekontaminasyon işlemlerinin hem fındık hem de pul biber örneklerinde daha fazla indirgenmeye sebep olduğu görülmektedir. Bunun başlıca nedeninin aktif plazma türlerinin oluşumunda havanın hem reaktif oksijen hem de reaktif azot türlerini içermesi olduğu düşünülmektedir. Plazma parametreleriyle dekontaminasyon etkinliğinin doğru orantılı olmamasının başlıca nedeninin ise plazmanın yapısı itibarıyla çok kararlı olmaması ve bazı parametrelerde stabil plazma fazı elde edilememesidir. Düşük basınç plazması ile karşılaştırıldığında atmosferik plazma sisteminde 5 döngü (20,7x5 sn= 103,5 sn) için gerekli süre çok kısadır. Bu kısa süre zarfında elde edilen indirgenme oranı ise hayli yüksektir.

Sonuç olarak atmosferik plazma uygulaması ile fındık örneklerinde yaklaşık 5,5 logaritmalık; pul biber örneklerinde ise 5 logaritmalık indirgenme sağlanmış olup döngü sayısının artırılması ile dekontaminasyon etkinliği de artmıştır. Burada elde edilen toplam indirgenme, aktif plazma türleri dışında plazma çalışma koşullarından da kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.5. Plazma İnaktivasyon Ajanları Dışında Plazma Sistem Özelliklerinden Kaynaklanan Mikroorganizma Kayıplarının Belirlenmesi

Düşük basınç ve atmosferik plazma sistemleri ile belirli sürelerde muamele edilmiş olan gıda örneklerinde meydana gelen mikrobiyal yük azalmasının öncelikli olarak aktif plazma türleri ve UV ışınları kaynaklı olmasının yanı sıra kullanılan sistemlerin yapısı gereği kimyasal dekontaminasyon yanında fiziksel dekontaminasyon da meydana gelmesidir. Bu fiziksel etkiler Çizelge 4.22'de verilmiştir.

Çizelge 4. 22 Plazma sistem özelliklerinden kaynaklanan mikrobiyal indirgenme

Etki şekli	Etkinin gerçekleştiği plazma tipi	Oluşan etkiyi belirleme yöntemi	Etkinin neden olduğu mikrobiyal azalma (log kob/g)			
			Fındık		Pul biber	
			F	P	F	P
Kullanılan reaktör özelliklerinden kaynaklanan etkiler	Düşük basınç & Atmosferik	Reaktöre kontamine örnekler konulmuş ve reaktörden küf sporlarının ne kadarının geri alındığı tespit edilmiştir.	0,57	0,58	0,71	0,69
Vakumdan kaynaklanan etkiler	Düşük basınç	Plazma fazı oluşturmadan sadece vakum yapılarak (0,4 mbar-30 dk) sayım elde edilmiştir.	0,93	0,99	1,18	1,22
İnaktivasyon gazının akış hızından kaynaklanan etkiler	Atmosferik	Plazma fazı oluşturmayacak plazma parametreleri girilip (15 kHz) sistemden 3000 L/s akış geçirilmiştir.	0,64	0,69	0,90	0,82

n=4; F: *A. flavus*; P: *A. paraciticus*

Fiziksel dekontaminasyon parametrelerinin, toplam dekontaminasyon üzerine olan etkisi kullanılan reaktör sisteminin özelliği belirlemektedir. Çünkü hem düşük basınç hem de atmosferik plazma sistemlerinde aynı reaktör tipi kullanılmış olup, reaktör gözeneklerinde veya reaktördeki sıkıştırma noktalarında kalmış olabilecek sporlar, dekontaminasyon sonucu hesaba katılacak indirgenme oranını etkilemektedirler. Ayrıca plazma sonrası test örneklerinde bulunan mikrobiyal yoğunluğu belirlemek amacıyla sadece gıda örnekleri alınmamakta, dilüsyon sıvısıyla reaktörde kalan sporlar da stomacher torbasına geçirilmektedir. Bu deneyler kapsamında, örnekte bulunan spor yoğunluğunun ne kadarının dilüsyon sıvısına geçirilebildiği de tespit edilmiştir. Çizelge 4.22'den de görüleceği üzere reaktör yapısından kaynaklanan yaklaşık 0,5-0,6 logaritmalık bir azalma meydana gelmiştir. Bu azalmanın pul biber örneklerinde daha fazla olmasının sebebi yıkama

esnasında reaktörde birbirine yapışarak sporları hapsedebilen bir miktar pul biberin kalmasıdır.

Vakum etkisi incelendiğinde ise reaktör içinde düşen basıncın örneklerde nem kaybına, dolayısıyla örneğe yapışan sporların reaktör dışına çıkıp vakum pompasıyla atılmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Sistemdeki vakumun düşmesi için gerekli olan süre uzun olduğu için örneklerden nem kaybı ve örneklerin birbiri ve reaktör duvarına sürtünme oranları da artmakta, dolayısıyla sistemden spor kaybı artmaktadır. Düşük basınç plazma ortamı (<0,4 mbar) sağlanırken sistemde meydana gelen ani basınç düşmesi, üründe bulunan suyun ani buharlaşmasına neden olmaktadır. Bu durum ürünün özellikle üst katmanlarında bulunan sporların çeperlerinde deformasyona neden olabileceği düşünülmektedir.

Atmosferik plazma sisteminde plazma probuna beslenen havanın mikroorganizma indirgenmesine etkisini araştırmak amacıyla sisteme 3000 L/saat akış hızında gaz beslemesi yapılmıştır. Bu işlem gerçekleştirilirken sistem güç parametreleri (15 kHz-% 40 Referans Voltajı-5 döngü) plazma oluşturmayacak şekilde ayarlanmıştır. Havanın dekontaminasyon etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen denemelerden edilen veriler gazın etkisinin çok fazla olmadığını göstermektedir. Bunun başlıca nedeni plazma probunun ucunda bulunan döner başlık sisteminin çıkan havayı büyük oranda bloke etmesi ve çalışılan reaktörün çeperlerinin sporların hava uygulaması ile kolayca çıkmasını engelleyecek kadar küçük olmasıdır. Ayrıca atmosferik plazma sisteminde örnekteki nem değeri çok fazla düşmediği için sporların örneklere ve reaktör yüzeyine yapışık olarak kalması da havanın buradaki püskürtücü özelliğini azaltmaktadır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde sisteme beslenen hava kaynaklı spor kaybı, fındık için yaklaşık 0,7; pul biber için de yaklaşık 0,9 logaritmadır.

4.2. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Fiziksel Analiz Sonuçları

4.2.1. Nem Tayini Deney Sonuçları

Fındık ve pul biber örneklerinin başlangıç nem değerleri sırası ile 7,66 ve 12,27 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.23). TS 3075 iç fındık standardına göre fındıkların nem değerinin % 6'nın altında olması beklenmektedir [352]. Uygulamalar (plazma

ve ışınlama) sonrası bu değer % 6'nın altına düşmüş olup, ürün ilgili standartta verilen kalite kriterini sağlamışlardır. Plazma ve ışınlama işlemleri sonrası elde edilen örnekler, kontrol örnek ile karşılaştırıldığında yapılan işlemlerin hepsinin bulunduğu nemi üzerine etkili olduğu bulunmuş ($p \leq 0,05$) fakat başlangıç örnek ile ışınlama arasındaki farkın ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p > 0,05$).

Çizelge 4. 23 Fındık ve pul biber örneklerine ait nem değerleri (%)

	Proses tipi	Fındık	Nem kaybı(%)**	Pul Biber	Nem kaybı(%)*
Kontrol	--	7,66±0,35 ^d	--	12,27±0,63 ^d	-
İşlem sonrası	Düşük basınç plazması	4,09±0,15 ^a	46,5	3,07±0,12 ^a	74,9
	Atmosferik plazma	5,41±0,20 ^b	29,3	8,82±0,14 ^b	28,1
	Işınlama	5,69±0,35 ^{c,d}	25,6	10,53±0,40 ^c	14,4

n=3, ortalama±SD

Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir ($p > 0,05$)

*% Nem kaybında karşılaştırma için referans örnek olarak kontrol örneği(başlangıç) kullanılmıştır.

Nem değerlerindeki değişimin miktarı, işlem çeşidine ve depolama işlemine göre değişmektedir. Düşük basınç plazma uygulaması ve aynı örneğin depolanması sonrası nem değerindeki düşmenin en fazla olmasının nedeni reaktör içinde oluşturulmuş olan vakumdur. Reaktör içinde basıncın istenilen değere (<0,4 mbar) düşmesi için ortamda ve gıdalarda bulunan havanın uzaklaştırılması gerekmektedir. Gıdalarda bulunan hava özellikle fındık örneklerinde fındık yapısının içerisine hapsolmuş şekilde bulunduğu için buradaki havanın uzaklaştırılması sırasında yapıda gevşemeler ve dolayısıyla var olan nemin uzaklaşması söz konusudur. Atmosferik plazma ve ışınlama işlemleri sonrasında ise düşük basınç plazmasındaki durum söz konusu olmadığından bu iki işlem sonrasında nem düşmesi daha az gözlenmektedir. Son iki işlem sonrasında nemde meydana gelen azalmanın yüzeyde meydana gelen sıcaklık değişimleri ve yine yapıda meydana gelen gevşemelerden meydana geldiği düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan pul biberin nem oranı Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği'ne (Tebliğ No: 2013/12) göre uygundur (<% 15) [357]. Uygulanan işlemler sonrasında nem miktarı da belirgin şekilde düşmektedir ve uygulamalar arasındaki fark önemlidir ($p \leq 0,05$). Tebliğde herhangi bir alt sınır belirtilmemekle birlikte fazla nem

kaybının tüketici albenisi ve ürün kalitesi açısından negatif bir etkisi bulunmaktadır. Pul biber örneklerinin neminde meydana gelen değişim daha fazladır. Bunun başlıca nedeni biberin yüzey alanının fındığa göre geniş olması ve nemin yüzeyden difüzyonunu engelleyecek direnç faktörünün daha düşük olmasıdır.

Atmosferik plazma ve ışınlama işlemleri hem pul biber hem de fındık örneklerinde % 15 ile 30 arasında nem kaybına neden olsalar da, düşük basınç plazma uygulanmış fındık ve pul biber örneklerinde meydana gelen yüksek nem kaybı (% 46,5 ve 74,9) örneklerin yapısal olarak değişmesine (kurumasına) neden olmuştur.

4.2.2. Su Aktivitesi Deney Sonuçları

Mikroorganizma faaliyetlerinde önemli bir faktör olan su aktivitesi (a_w), gıdalarda bulunan toplam su miktarının bakteri, küf ve mayaların gelişmeleri ve metabolizmaları için elverişli olan kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle gıdaların mikrobiyolojik kararlılığı, toplam nem miktarından çok a_w değeri ile ölçülmektedir. Su aktivitesinin düşmesi mikroorganizma gelişiminin engellenmesi açısından önemli bir parametredir. Örneklerin su aktivitesi değerlerine bakıldığında a_w değerindeki en yüksek düşüşün hem fındık hem de pul biber örnekleri için düşük basınç plazma uygulaması sonrasında olduğu görülmektedir (Çizelge 4.24). Fındık örneğinin a_w değeri üzerine uygulamaların fark yarattığı, ışınlama ve atmosferik plazma uygulamasının arasındaki farkın önemsiz olduğu; fakat pul biber örneğinde ise uygulamaların önemli fark yarattığı belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

Çizelge 4. 24 Fındık ve pul biber örneklerine ait su aktivitesi değerleri

	Proses tipi	Fındık	% Değişim*	Pul Biber	% Değişim
Kontrol	--	0,58±0,05 ^d	--	0,59±0,01 ^d	--
İşlem sonrası	Düşük basınç plazması	0,30±0,02 ^a	48,3	0,21±0,01 ^a	64,4
	Atmosferik plazma	0,49±0,02 ^c	15,5	0,45±0,01 ^c	23,7
	Işınlama	0,44±0,04 ^{bc}	24,1	0,41±0,01 ^b	30,5

Kontrol fındık (n=6), Kontrol pul biber (n=8), İşlem sonrası n=5, ortalama±SD, Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir ($p > 0,05$)

*% a_w değişiminde karşılaştırma için referans örnek olarak kontrol örneği (başlangıç) kullanılmıştır.

Fındık örnekleri pul biber örnekleri gibi sterilize edilmediği için belirli bir mikrobiyal yüke sahiptir. Bu nedenle fındık örnekleri ön dekontaminasyon işlemine tabi

tutulmaktadır. Dekontaminasyon sonrası elde edilen a_w değeri Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4. 25 Etil alkol uygulaması sonrası fındık örneklerinin a_w değerleri

Uygulanan dekontaminasyon yöntemi	Verilerin ortalaması (%)
% 70 Etil alkol uygulaması	0,41±0,02
% 96 Etil alkol uygulaması	0,35±0,01

n=4

Çizelge 3.28'den de görüleceği üzere ön dekontaminasyon amacıyla fındık örneklerinin etanol çözeltileriyle muamele edilmesi fındık yüzeylerinde mevcut bulunan nem miktarını, dolayısıyla su aktivitesi değerini düşürmektedir. Literatürde bu amaçla % 96 ve % 70'lik etanol çözeltileri kullanılmıştır. Tez kapsamında bu çözeltiler de denenmiş olup alkol oranı yükseldikçe su aktivitesinde düşme meydana gelmiştir. Ön dekontaminasyon amacıyla alkol uygulanması sadece mikrobiyal denemelerde kullanılmış olup fındıkların fiziksel ve kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişikliklerin değerlendirildiği deneylerde ise normal örneklerle çalışılmıştır.

4.2.3. Renk analizi sonuçları

Fındık ve kırmızı pul biber örneklerinin başlangıç ve işlem sonrası elde edilen renk değerleri Çizelge 4.26'da verilmiştir. Ayrıca dekontaminasyon işleminden önce yüzey mikroflorasının azaltılması amacıyla kullanılan alkol çözeltilisinin fındığın yüzey renginde meydana getirdiği değişim aynı tabloda yer almaktadır. L ışık değeri veya parlaklık (aydınlık) derecesini ölçmekte ve 100 (tam beyaz) ile 0 (tam siyah) arasında değişmektedir. a değeri kırmızılık ve yeşilliği vermektedir; değer artı ise kırmızı, sıfır ise gri ve eksi ise yeşildir. b değeri ise sarılık ve maviliği ölçmektedir; değer artı ise sarı, sıfır ise gri ve eksi ise mavidir.

Çizelge 4. 26 Test örneklerinin uygulamalar öncesi ve sonrasına ait HunterLab renk değerleri

	Test örnekleri		Fındık	Pul biber
	Proses tipi		Renk değeri	Renk değeri
Kontrol*		L	45,45±3,45 ^{eabcd}	41,6±0,92 ^b
	---	a	16,32±0,87 ^{lftgh}	7,63±0,94 ^e
		b	23,42±1,84 ^{oklmn}	4,46±0,59 ⁱ
		ΔE	0 ^a	0 ^a

İşlem sonrası	Etil alkol uygulanmış fındık**	L	40,79±1,56 ^{abcde}	-
		a	16,08±1,66 ^{ghijf}	-
		b	20,07±1,86 ^{klmno}	-
		ΔE	5,7±2,9 ^{edbc}	-
	Düşük basınç plazması	L	44,93±3,64 ^{deabc}	40,58±0,38 ^{ab}
		a	16,24±1,25 ^{hijfg}	9,09±0,34 ^{ht}
		b	22,93±3,43 ^{mnokl}	9,70±0,74 ⁱ
		ΔE	4,7±1,7 ^{dcb}	5,5±0,9 ^d
	Atmosferik plazma	L	44,43±3,70 ^{cdeab}	47,32±0,81 ^{dc}
		a	16,61±1,24 ^{jfghi}	8,96±0,40 ^f
		b	22,57±2,65 ^{lmnok}	7,34±0,32 ^k
		ΔE	3,8±2,8 ^{cb}	3,4±0,3 ^{cb}
Işınlama	L	44,27±2,18 ^{bcd ea}	46,37±0,64 ^c	
	a	16,08±1,46 ^{tghij}	9,01±0,50 ^{gth}	
	b	23,16±2,35 ^{nojklm}	6,72±0,26 ^{jk}	
	ΔE	3,4±1,1 ^b	3,0±0,2 ^b	

*n=11; **n=6; Diğer örnekler n=10, ortalama±SD,

Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05)

Alınan sonuçlara göre *L*, *a*, *b* değerleri bakımından plazma ve ışınlanmış fındık yüzeyinde kontrol örneğine göre belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Toplam renk farkı olan ΔE değerine göre alkol uygulaması dahil tüm işlem tipleri, fındığın rengini başlangıç değerine göre değiştirmiştir. ΔE değeri bakımdan işlemler arasındaki fark ise önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Kırmızı biberde düşük basınç plazma uygulamasının hem *a* hemde *b* değerinde artışa neden olması ve nem kaybı istenmeyen ürün kalitesinin oluşmasına neden olmaktadır. Atmosferik plazma ve ışınlama uygulamaları ise *a* ve *b* değerlerinin yanısıra özellikle *L* değerinde artışa neden olduğu için renk açılması ve değişimi gözlenmiştir. *b* değerinde yükselme örnekte sarı rengin hakim olmasına, *L* değerinde yükselme beyazlığın artmasına ve ürünün toplam kalite özelliklerinde düşüşe neden olmaktadır. ΔE değerlerine bakıldığında ise pul biberin başlangıç renk değerlerine göre işlem tiplerinin ΔE değerinde belirgin artışa neden olduğu belirlenmiştir. En fazla artış düşük basınç plazması sonrasında görülürken bunu atmosferik plazma ve ışınlama işlemleri takip etmiştir. Işınlama ve atmosferik plazma uygulamaları arasında ΔE değeri bakımından fark önemsiz bulunmuştur.

Uygulamalar özellikle kırmızı pul biber örneklerinin renk kalitesi üzerine etkili olmuştur. Bunun başlıca nedeni fındık örneklerinin yüzeyini dış etkenlerden (ısı, reaktif türler, UV vb.) koruyacak zara sahip olmalarına karşın pul biber örneklerinin direkt olarak aktif plazma bileşenlerine maruz kalmasıdır. Ayrıca döner tambur sisteminde pul biberler yapıları gereği (birim örnek bazında daha yüksek yüzey alanına sahip, hafif ve küçük) daha homojen bir uygulamaya maruz kalmışlardır. Bu nedenle Hunter *L*, *a* ve *b* değerlerinde daha fazla değişim gözlenmiştir.

Hunter *b* değerindeki artışların sıcaklık etkisiyle yüzeye doğru sızan yağ, rutubet kaybı ile oluşan renk koyulaşması ve uygulamalar sırasında oluşan reaktif türlerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Pul biber örneklerdeki *b* değerlerinin *a* değerlerinden daha fazla artış göstermesinin sebebi kırmızı biber yüzeyinde baskın olan kırmızı rengin sarı renge göre zamana bağlı olarak daha hızlı bozulması, sarı rengin oransal olarak daha yoğun algılanmasından kaynaklanmaktadır.

HunterLab değerleri kırmızı pul biber örneklerinin rengini renk bileşenleri bazında vermektedir. Buna karşın örneklerin ASTA değerleri asetona geçebilen tüm renk bileşenleri hakkında tek bir sonuç vermektedir (Çizelge 4.27).

Çizelge 4. 27 Pul biber örneklerine ait ekstrakte olabilen renk (ASTA) değerleri

Proses tipi	Verilerin ortalaması (%)	Azalma (%)
Kontrol örneği	41,54±1,32 ^d	-
Düşük basınç plazması	22,89±1,99 ^a	44,9
Atmosferik plazma	34,87±0,82 ^b	16,1
Işınlama	34,94±3,02 ^{c,b}	15,8

Kontrol örneği n=6, Diğer örnekler n=7; ortalama±SD, Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05)

Lezzet zenginleştirici, aroma katıcı özelliğinden ziyade kırmızı pul biber özellikle gıdalara doğal renk verici olarak katılmaktadır. Fakat renk vericilik özelliği her zaman ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle bu ürünün renk özelliği en önemli kalite kriterlerinden biri olarak öne çıkmaktadır.

Kurutulmuş kırmızı biberin en önemli kalite kriteri renktir. Kırmızı biberin rengini ketokaratenooidlerden kapsantin, kapsorubin ve kapsantin 5,6 epoksit;

ksantofillerden β -kriptoksantin, zeaksantin, violaksantin ve kapsolutein; karotenlerden de β -karotenin oluşturduğu bildirilmiştir [358]. Bu renk maddelerinden kapsantin ve kapsorubinin kırmızı, diğerleri ise açık sarıdan portakal sarısına değişen tonlarda sarı renk verir. Kırmızı biberdeki toplam karotenoidlerin % 70-80'ini kapsantin ve kapsorubin oluşturmaktadır [358,359]. Karotenoidlerin, doymamış yapıda olması onları oksidatif değişimlere karşı duyarlı kılmaktadır. Bu değişimler neticesinde karotenoidlerin rengi açılmaktadır.

Çizelge 4.27'den de açıkça görüleceği üzere plazma ve ışınlama uygulamalarıyla pul biberin ASTA değerlerinde belirli oranlarda azalma meydana gelmiştir. Uygulamalar arasında düşük basınç plazma sistemi ürün renginde en fazla kayba neden olmuştur. ASTA değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak incelendiğinde $p < 0,05$ düzeyinde plazma ve ışınlama uygulamalarının başlangıç örneğine göre farklı olduğu; atmosferik plazma uygulaması ve ışınlamanın yaratmış olduğu etkinin benzer olduğu tespit edilmiştir.

Düşük basınç plazma sisteminde meydana gelen % 44,9'luk ASTA cinsinden renk kaybının en önemli nedeni reaktör içinde basınç düşmesi için uzun süre beklenmesidir (minimum 6 saat). Bu süre zarfında özellikle ürünün nem değeri düşmekle birlikte plazma fazı oluştuktan sonra üründen nem uzaklaşırken, üründe mevcut bulunan yağ yapıdan sızmaktadır. Kırmızı biberdeki renk maddeleri su içerisinde çözünmeyen lipofilik bileşiklerdir. Sulu ortamlarda yüzeye düzensiz bir şekilde tutunurlar veya yüzeyde dağılmamış şekilde bulunurlar. Bununla birlikte plazma fazında bulunan aktif plazma türlerinin neden olduğu oksidasyon da bu duruma yol açmış olabilir.

Plazma uygulaması ile pul biberde yapısal gevşemeler sonucu reaktöre yağ salması meydana gelmektedir. Bu kayıplar özellikle pul biber renk kaybını etkilese de renk kaybındaki en önemli kayıp nedeni aktif plazma türleridir. Oksidatif ve reaktif stabilitesi düşük olan karotenoidler aktif plazma türlerinin degradasyon etkisine maruz kalmaktadır. Düşük basınç plazmasında bu etki çok yüksek iken atmosferik plazmada plazmanın gıda yüzeyinde devamlı etki etmemesi ve toplam uygulama süresinin çok kısa olması (≈ 100 sn) bu etkinin daha az olmasını sağlamaktadır.

Işınlama sonucu da renkte belli kayıplar olmaktadır. Burada oluşan serbest radikaller ve reaktif türler karotenoidlerdeki çift bağları parçalayarak yapının bozulmasına dolayısıyla renk açılmasına sebep olmuş olabilir. Işınlanmış ve atmosferik plazma yapılmış örneklerde gözle görülür bir değişim olmamakla birlikte düşük basınç plazması örneklerde gözle görülür bir renk değişimine sebep olmaktadır. Topuz [336] yapmış oldukları çalışmada 10 kGy ışınlamanın pul biberlerin ASTA değerlerinde yaklaşık % 10'luk bir kayba neden olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte artan ışınlama dozlarının biberin renk değerlerinde negatif etkiye neden olduklarını göstermişlerdir.

Ayrıca pul biberde bulunan sarı renkli pigmentler (ksantofiller ve karotenler) düşük plazma sıcaklıklarında ($\approx 45^{\circ}\text{C}$) bile stabilitelelerini yitirebilmektedirler.

4.3. Fındık ve Pul Biber Örneklerinde Gerçekleştirilen Kimyasal Analiz Sonuçları

4.3.1. Yağ Miktarı Tayini Sonuçları

Çalışılan fındık boyut olarak küçük olmakla birlikte yüksek yağ içeriğine sahip değildir. Ülkemizde fındık açısından yağ oranı % 66'lara kadar çıkmaktadır [360]. Natürel fındıkta zar kısmında yağ bulunmamakta, yağ direk olarak meyve kısmında bulunmaktadır. Pul biber özelliği itibariyle çok az yağ ihtiva etmektedir. Buradaki yağ oranı pul bibere parlatma işleminde katılan ayçiçek yağından ileri gelmektedir. İşlem öncesi ve sonrasında ürünlere ait yağ miktarı Çizelge 4.28'de verilmiştir.

Çizelge 4. 28 Fındık ve pul biber örneklerine ait yağ miktarları (% kuru maddede)

Test örnekleri	Fındık		Pul biber	
	Verilerin ortalaması (%)	Azalma (%)	Verilerin ortalaması (%)	Artma (%)
Kontrol örneği	47,8 \pm 0,8 ^d	-	16,5 \pm 0,4 ^a	-
Düşük basınç plazması	41,5 \pm 2,1 ^{cb}	13,3	20,3 \pm 0,2 ^b	22,9
Atmosferik plazma	40,6 \pm 1,0 ^{ab}	15,0	21,6 \pm 0,1 ^c	30,9
Işınlama	40,6 \pm 1,7 ^{bac}	15,1	21,8 \pm 0,7 ^{dc}	31,8

Kontrol örneği n=6, Diğer örnekler n=4, ortama \pm SD

Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05)

*% azalma ve artmada karşılaştırma için referans örnek olarak kontrol örneği (başlangıç) kullanılmıştır.

Her üç işlem öncesinde kontrol fındık örneklerinde yağ oranı % 47,8, pul biberde ise % 16,5 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.28). Soxhlet ekstraksiyonunda yağın, örnekten alınmasını etkileyen parametrelerden birisi de örnekteki nem miktarıdır. İşlemler sonrası fındık ve pul biber örneklerinin yağ miktarları başlangıç örneğine göre farklı olmakla birlikte ($p \leq 0,05$); fındık örneklerinde uygulamalar arasında pul biber örneklerinde plazma ve ışınlama işlemleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$).

Uygulamalar sonrası örnekteki nem miktarındaki düşüş, örneklerden yağın daha kolay alınmasını sağlamakta ve örnekte birim gramda bulunan yağ miktarının da artmasına sebep olmaktadır. Bu durum özellikle pul biber sonuçlarında (% 14-75'lik nem kaybı) daha net görülmektedir. Ayrıca uygulamalar sırasında, örneklerin yüzeylerinde bulunan gözenekli yapıyı gevşetmekte ve dolayısıyla yapıdan yağ salınması olayını tetiklemektedir. Kullanılan düşük basınç plazma reaktörü tamburlu bir sistem olduğu için özellikle fındık örnekleri birbirlerine sürtünmekte dolayısıyla da yağ kaybı artmaktadır. Fındıklarda uygulamalar sonrasında kaybolan yağın, zar tabaka (testa) tarafından emilmesi ve sonrasında bu zarın uzaklaşmasıyla beraber yağın az miktarda da olsa reaktör çeperlerine bulaşmasıyla ilintili olduğu düşünülmektedir. Fındıklarda zar tabakanın ayrılmasının, nem kaybını tetikleyen bir unsur olduğu düşünüldüğünde fındıktaki nem kaybının fazla olmaması zar tabakayla ayrılan yağ miktarının da az olmasına neden olmaktadır [361]. Pul biber örneklerinin tamburun dönmeye başlamasıyla birbirlerine yapışma özelliği göstermesi ve reaktör içine konulan aynı gramajdaki pul biberle fındık örneklerinin reaktör içinde kapladıkları hacimlerin farklı olması her iki gıda örneğinde yağ miktarının değişimi açısından farklı sonuçlar elde edilmiştir.

4.3.2. Serbest Yağ Asitliği Tayini Sonuçları

Fındık ve pul biber örneklerine ait serbest asitlik (SA) değerleri Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4. 29 Fındık ve pul biber örneklerine ait serbest yağ asitliği (SA)(% oleik/kg yağ) verileri

Test örnekleri		Fındık		Pul biber	
Proses tipi		SA (% oleik asit)	Artış (%)*	SA (% oleik asit)	Artış (%)*
Kontrol	--	0,54±0,02 ^a	-	0,67±0,20 ^a	-
İşlem sonrası	Düşük basınç plazması	0,96±0,12 ^b	77,8	1,46±0,10 ^{bd}	117,9
	Atmosferik plazma	1,29±0,06 ^d	138,9	1,51±0,02 ^{cd}	125,4
	İşinlama	1,13±0,05 ^c	109,2	1,57±0,07 ^{dbc}	134,3

Kontrol örnekleri n=8, Diğer örnekler n=4 ortalama±SD,

Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05)

*% artışta karşılaştırma için referans örnek olarak kontrol örneği(başlangıç) kullanılmıştır.

Başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında, plazma uygulanmış ve ışınlanmış fındık örneklerinin serbest asitlik değerleri arasında p<0,05 düzeyinde farklılığın olduğu belirlenmiştir. Her iki gıda örneğinin uygulamalar sonrasında serbest asitlik değerleri artmıştır. İşlem görmüş pul biber örnekleri başlangıç örnekleri ile karşılaştırıldığında p<0,05 düzeyinde farklılık görülmüştür, işlem görmüş örnekler arasında ise istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilmemiştir (p>0,05).

Türk Gıda Kodeksi, Bitki Adı ile Anılan Yağlar Tebliği'nde serbest asitliğin soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok % 2 (oleik asit) olması gerektiği belirtilmiştir [362]. Fındık örneği işlemler öncesi ve sonrasında bu kritere uymaktadır.

Plazma ve gama ışınlama işlemi serbest yağ asitliği değerlerinde artışa neden olmuştur ve bu artış fındık ve pul biberde birbirine yakındır. Literatürde plazma uygulamasının lipitler üzerindeki etkileri hakkında herhangi bir araştırmaya rastlanılmamış olup tez çalışmasının bu konuda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Gama ışınlamasına ait bu konuda yapılan çalışmalarda, bu ışınların yağ moleküllerinin oksidasyonuna, dekarboksilasyonuna, dehidrasyon ve polimerizasyonuna neden olarak lipit oksidasyonunu gerçekleştirdikleri belirtilmiştir [363,364].

4.3.3. Peroksit Sayısı Analiz Sonuçları

Fındık ve pul biber örneklerinin plazma ve ışınlama sonrası peroksit değerinde meydana gelen değişim Çizelge 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4. 30 Fındık ve pul biber örneklerine ait peroksit sayısı (PD) (meqO₂/kg yağ) verileri

	Test örnekleri	Fındık		Pul biber	
	Proses tipi	PD (meq O ₂ /kg yağ)	Artış (%)*	PD (meq O ₂ /kg yağ)	Artış (%)*
Kontrol*	---	0,11±0,00 ^a		<LOD ^a	---
İşlem sonrası	Düşük basınç plazması	4,93±0,09 ^c	4382	1,40±0,02 ^b	1400
	Atmosferik plazma	5,26±0,12 ^d	4682	2,18±0,19 ^d	2180
	Işınlama	4,48±0,20 ^b	3973	1,99±0,14 ^{cd}	1990

n=4; ortalama±SD, LOD=0,04 meq O₂/kg yağ

Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05)

*% Artışta kaybında karşılaştırma için referans örnek olarak kontrol örneği(başlangıç) kullanılmıştır.

Fındık ve pul biber örneklerinin başlangıç ve uygulamalar sonrası peroksit değerleri arasında farklılık olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). İşlemler sonrasında fındık ve pul biber örnekleri için en yüksek PD değerine atmosferik plazma uygulamasının yol açtığı bunu fındık örneğinde düşük basınç plazması, pul biber örneğinde ise ışınlama işleminin izlediği görülmüştür. Türk Gıda Kodeksi, Bitki Adı ile Anılan Yağlar Tebliği'nde peroksit sayısının soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok 15 meq O₂/kg; rafine yağlarda ise en çok 10 meq O₂/kg olması gerektiği belirtilmiştir [362]. Fındık ve pul biber (Ayçiçek yağı) örneklerinin işlemler öncesi ve sonrasındaki PD değerleri bu kritere uymaktadır.

Peroksit değeri yağlarda bozulmanın bir göstergesidir. Yağlı ürünlerde peroksit oluşumu acılaşıma ve renk değişimi gibi değişikliklere yol açar. Peroksit sayısı örnekte bulunan yağın oksidasyon derecesini gösteren bir parametredir. Uygulanan işlemler,örneklerdeki yağın peroksit değerlerinde belirli bir artış meydana getirmiştir. Bunun başlıca sebebi ortamda oluşan oksijen radikalleridir. Peroksit sayısında uygulanan işlem çeşidine göre farklı değişimlerin meydana gelmesi, örneklerin yüzey alanı ve su aktivitesinden, yağ asitleri kompozisyonundaki farklılıklardan, içerdikleri doğal antioksidan bileşiklerden (tokoferol, fenolik bileşikler), ayrıca uygulamalar sırasında oluşan reaksiyon

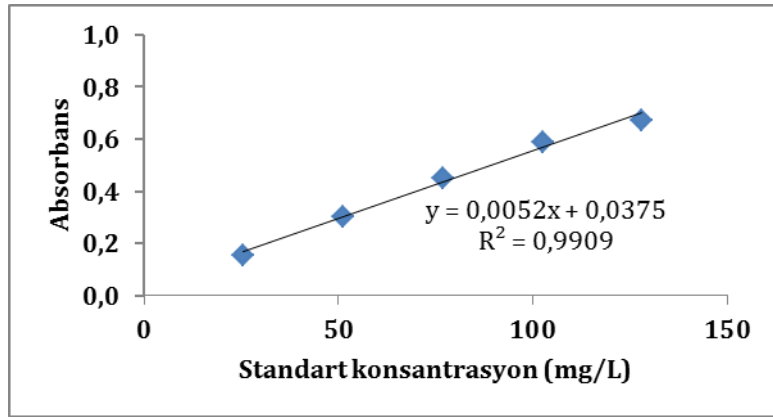
ürünlerinin miktarından, ortamdaki oksijen ve pro-oksidan elementlerin (Cu, Fe, Mn, Ni ve Co) konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır [344].

Plazma ve gama ışınlanması yapılmamış fındıklardaki hücresel yapı (mikrosütrüktürel yapı) oksijenin yağ ile temas etmesini engelleyecek özelliğindedir. Dolayısıyla, fındıkların depolama süresince oksidatif stabilitesi yüksektir. Fakat işlem uygulanmış fındıklarda yağ içeren gözeneklerin ağsı yapısı, işlemlerin etkisi ile bozulmakta ve dolayısıyla fındığı oksidatif acılaşıma karşı daha hassas duruma getirmektedir [365].

Gecgel ve ark. [364] 7 kGy düzeyinde ışınlamanın fındıklardaki peroksit değerlerini 0,7 den 1,6'ya çıkardığı belirtilmiştir. Kontominas ve ark. [366] ise 7 kGy düzeyinde ışınlamanın fındıklardaki peroksit değerinin 0,34'ten 6,80'e çıktığını belirtmiştir. Çalışma kapsamında ise bu iki çalışmada verilen değerler arasında bir değer elde edilmiştir.

4.3.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Kontrol örnekleri ile plazma ve ışınlama işlemlerine tabi tutulmuş örneklerde bulunan toplam fenolik bileşen miktarının spektrofotometrik olarak saptanması amacıyla gallik asit kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4. 1 Toplam fenolik madde tespiti için hazırlanan kalibrasyon eğrisi

4.3.4.1. Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu İçin Kullanılacak Yöntemlerin Belirlenmesi

Buradaki amaç öncelikli olarak en etkin ekstraksiyon yöntemini belirlemek olduğu için literatürde genellikle kullanılmış olan yağı alınmış örnekler üzerinde çalışmalar

gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların devamında yağı alınmamış örnekler üzerinde de denemeler yapılarak yağ ekstraksiyon yönteminin fenolik bileşenler üzerindeki etkisi ve uzaklaştırılan yağ ile kaybolan fenolik miktarları belirlenmiştir.

Fındık örneklerinden fenolik madde ekstraksiyonu için literatürde uygulanan en yaygın beş yöntem karşılaştırmalı olarak denenmiştir. Bu denemelerin sonucunda Yöntem 5'in fındık örneklerinden fenolik madde ekstraksiyonu için en etkin yöntem olduğuna karar verilmiştir. Pul biber örneklerinden fenolik madde ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlerden Yöntem 2'nin daha etkili olduğu görülmüştür.

Ayrıca fındık ve pul biber örneklerinde gerçekleştirilen denemelerde % 7,5'lük Na₂CO₃ çözeltisinin kullanılması öngörülmüştür. Bunun sebebi, doygun çözelti kullanıldığında 1000 µL'lik mikropipetle çekim sırasında sıkıntı yaşanmakta, tuz çözeltisi süzgeç kağıdından süzülmesine rağmen kristalleşme gerçekleşmekteve örnek santrifüjlendiği halde bile spektrofotometre ile ölçüm öncesinde örneğin homojen olması sağlanamamaktadır. Bununla birlikte kullanılan Na₂CO₃'ün konsantrasyonu elde edilen fenolik madde miktarını pozitif yönde etkilememektedir.

4.3.4.2. Yağ Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik Bileşenler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Literatürde polifenol ekstraksiyonu ve toplam polifenol tayini yöntemleri için genellikle yağı alınmış örneklerle çalışılmıştır. Tez kapsamında yağlı fındık, soğuk ekstraksiyon ve soxhlet yöntemleriyle yağı alınmış fındık örneklerinde ayrı ayrı analiz yapılmış, elde sonuçlar (Çizelge 4.31) incelendiğinde yöntemler arasındaki farkın fazla olmadığı görülmüştür. Bundan dolayı çalışmaların devamında tüm fındıkla çalışılmaya karar verilmiştir. Pul biber ile yapılan çalışmalarda da benzer şekilde yağın alınmasından dolayı olabilecek kayıplar düşünülerek pul biberde de direkt olarak yağı alınmamış örneklerle çalışılmıştır.

Çizelge 4. 31 Fındık örneğine uygulanan farklı ekstraksiyon yöntemlerinin fenolik madde miktarı üzerine etkileri

Ekstraksiyon yöntemleri	Ortalama (mg GAE/gr örnek)
Soxhlet ekstraksiyonu	1,52±0,21
Yağlı fındık (tüm fındık)	2,96±0,57
Soğuk ekstraksiyon	2,13±0,28

n=4

Çizelge 4.31'den de görüleceği üzere soxhlet ekstraksiyonunda çözücü sıcaklığının yüksek olması örnekteki fenolik bileşenlerde kayba neden olmaktadır. Burada temel nokta fındık örneği yağı, alınmadan direkt olarak ekstraksiyona tabi tutulduğunda elde edilen fenolik madde miktarının da o kadar artması beklenmektedir.

Çizelge 4. 32 Fındık ve pul biber örneklerine ait toplam fenolik madde miktarı (mgGAE/gr kuru madde)*

	Test örnekleri	Fındık		Pul biber	
	Proses tipi	Toplam fenolik madde	Değişim (%)**	Toplam fenolik madde	Değişim (%)**
Kontrol	--	3,40±0,31 ^d (n=6)	--	7,67±0,15 ^b (n=7)	--
İşlem sonrası	Düşük basınç plazması	2,19±0,09 ^{ab}	35,6	8,01±0,76 ^{db}	4,4***
	Atmosferik plazma	2,37±0,23 ^b	30,2	6,41±0,52 ^a	16,4
	İşinlama	2,50±0,12 ^{cab}	26,5	7,74 ±0,48 ^{cbad}	0,9***

* Geri kazanım(GK)düzeltilmesi yapılmış sonuçlar, Fındık GK:89; Pul biber GK:82, n=3; ortalama±SD

Aynı örnek için aynı kolonda ve aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05)

**% değişimde karşılaştırma için referans örnek olarak kontrol örneği(başlangıç) kullanılmıştır.

*** ile işaretlenmiş olan verilerdeki değişim pozitifdir. Yani yapılan işlem örnekteki toplam fenolik bileşen miktarını artırmaktadır.

Fındıkta başlangıç değeri ile plazma uygulamaları sonrası toplam fenolik madde miktarları bakımından p<0,05 düzeyinde farklılık olduğu tespit edilmiştir. Fakat plazma ve işinlama işlemleri arasında ise önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (p>0,05). Shahidi ve ark. [326] fındık ve yan ürünlerinde yaptıkları araştırmada bunlar içerisinde fındık zarının en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Antioksidan etkileri çoktan aza doğru zar > sert kabuğu > yaprak > yeşil kabuğu > fındık olduğu saptanmıştır. Fındık zarı plazma uygulamasında direkt olarak aktif plazma türlerine maruz kalmaktadır. Plazma uygulaması sırasında yaşanan nem kaybı ve homojen karışımı sağlamak amacıyla kullanılan döner tambur sistemi de fındık zarında bir miktar kayba neden olmaktadır. Dolayısıyla en yüksek fenolik içeriğe sahip kısımda meydana gelen azalma, fındıkta toplam fenolik bileşen miktarındaki azalmanın en önemli sebebidir. Ayrıca doğal antioksidanlar sıcaklık, UV ve reaktif türlerin oluşumları sırasında kısmen kaybedilebilmektedir.

Pul biberde ise başlangıç ve plazma uygulanmış örnekler arasında $p < 0,05$ düzeyinde farklılık olduğu, ışınlanmış örneklerle başlangıç ve plazma uygulanmış örnekler arasında farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Özellikle düşük basınç plazmasında bu oranın yüksek çıkmasının nedeninin basınç düşerken örnekteki nemin uzaklaştırmasının yanında örneğin hücresel yapısını gevşeterek fenolik madde ekstraksiyonunu arttırdığı düşünülmektedir. Atmosferik basınç plazması ile gerçekleşen azalmanın başlıca sebebinin ortamda bulunan oksijenin oksidatif etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Çizelge 4.32).

Barbagallo ve ark. [367] tarafından kırmızı biberin 30 gün oda koşullarında depolanması sırasında başlangıç değeri olan 6,2 mg GAE/gr değerinin ilk 14 günde artarak 7,5 değerine ulaştığı ve 30. gün sonunda ise 4,5 değerine düştüğü bildirilmiştir.

Genel olarak uygulanan işlemler özellikle fındıkların fenolik bileşimini olumsuz yönde etkilemiştir. Özellikle plazma işlemi, yüzeye etki eden bir işlem olduğu için örneğin iç matriksini büyük oranda etkilememektedir. Dolayısıyla toplam fenolik bileşen düzeyinde önemli derecede değişim görülmemiştir.

4.3.5. Tokoferol miktarının belirlenmesi

Uygulamalar sonrasında örneklerde bulunan tokoferol miktarı Çizelge 4.33'te verilmiştir.

Çizelge 4. 33 Fındık ve pul biber örneklerine ait tokoferol miktarları (mg/100 gr yağ)*

Test örnekleri		Tokoferol miktarı (mg/100 gr yağ)			
		Fındık		Pul biber	
Proses tipi		α	γ	α	γ
Kontrol**	--	45,5±3,2 ^c	13,0±1,0 ^{bcda}	78,5±3,8 ^d	28,2±1,5 ^d
İşlem sonrası	Düşük basınç plazması	44,0±1,6 ^{bcd}	11,9±0,6 ^{abcd}	27,9±0,1 ^a	6,9±0,2 ^a
	Atmosferik plazma	47,1±0,0 ^{dc}	15,9±1,5 ^{dabc}	55,9±4,6 ^c	17,4±2,7 ^c
	İşinlama	28,2±32,5 ^a	14,4±2,2 ^{cdab}	29,9±0,7 ^{ba}	12,6±0,1 ^{bac}

n=5, Diğer veriler n=2, ortalama±SD

*Geri kazanım(GK) düzeltmesi yapılmış sonuçlar. GK α= % 78 , γ= % 72

Aynı kolonda, aynı örnek için aynı üst indis ile gösterilen veriler arasındaki fark önemsizdir ($p > 0,05$)

** Kontrol örneklerine ait ̄ tokoferol değerleri LOD'nin (LOD=1,61 mg/100 gr yağ) altında bulunduğu için hesaba katılmamıştır.

Tokoferoller gıdalarda bulunan fenolik antioksidanlardan biridir. Bu tür moleküller serbest radikallerdeki hidroksil radikaline (-OH*) kolayca H vererek aktivitelerini kaybedebilirler. H iyonunu veren fenolik bileşikler nispeten reaktif olmayan serbest radikallere dönüşürler. Çünkü oksijen atomunun üzerindeki eşlenmemiş elektronlar genellikle aromatik halkalara delokalize olurlar ve stabilitelerini artırırlar [368] .

Pul biberden ekstrakte edilen yağlardaki tokoferol miktarları fındıktan elde edilen yağlardan 2 kat daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4.33). Bunun başlıca nedeni pul biberlere katılmış olan bitkisel yağın ayçiçek yağı olmasıdır. Ayçiçek yağı tokoferol içeriği bakımından en zengin yağlardan biridir [368]. Tokoferollerin prosesler sırasında miktarlarında değişimlere neden olan etkenler peroksitler, sıcaklık, UV ışınları, serbest radikaller, oksijen ve nemdir [292]. Tokoferol miktarı ile peroksitlerin oluşumu arasında ters bir ilişki vardır. Antioksidan özellikteki tokoferoller peroksitleri bağlayarak zincirleme oksidasyon olaylarını önlemektedir [369]. Garcia ve ark. [370] kavrulmuş bademler üzerine yaptıkları bir çalışmada peroksit sayısı artışı ile tokoferol miktarının azalışı arasında ters orantılı bir ilişki bulmuşlardır.

Fındık ve pul biber örneklerinin peroksit değerlerinde belirli oranlarda artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Pul biberin tokoferol değerlerinde meydana gelen azalma peroksit değerindeki artışla birlikte yukarıda saymış olduğumuz diğer etkenlere de bağlı olarak belirli oranda azalma göstermiştir. Fındık örneklerinde de her ne kadar peroksit değerlerinde artış meydana gelmiş olsa da bu durum direkt olarak tokoferol değerlerine yansımamıştır. Burada özellikle fındık zarında bulunan antioksidan içerikli fenolik bileşenlerin ortamdaki serbest radikallerle etkileşime girmesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca fındık yağı meyvenin iç kısımlarında olup birkaç mikrometre derinliğe etki edebilen plazma uygulamalarının fındıktaki tüm tokoferolleri etkileyememesi de büyük bir etkindir. Işınlama işleminde ise gama ışınları örneğin içine direk nüfuz etmektedir dolayısıyla fındıkta en yüksek azalmaya yol açmıştır. Pul biberdeki yağ ise yüzeyde bulunmaktadır. Dolayısıyla, tokoferol miktarındaki azalma daha fazla olmuştur.

Başlangıç ve vakum uygulaması sonrası fındık örneklerinin toplam tokoferol içerikleri ile atmosferik ve ışınlanmış örnekler arasında farklılık olduğu belirlenmiştir. Buna karşın pul biber örneklerinde, plazma ve ışınlama işlemlerinin

toplam tokoferol değerinde belirgin azalmaya yol açtığı ve düşük basınç plazma uygulamasının en düşük değere sahip olduğu belirlenmiştir.

4.4. Aflatoksin Deney Sonuçları

Tez kapsamında aflatoksin tayininde kullanılan yöntemine ait LOD değerleri Çizelge 4.34'de verilmiştir.

Çizelge 4. 34 Fındık ve kırmızı pul biber örneğinde kullanılan aflatoksin tayin yönteminin her bir aflatoksin için LOD değerleri*

Test örnekleri	Fındık	Pul biber
	LOD (ppb)	LOD (ppb)
B1	0,15	0,09
B2	0,05	0,09
G1	0,19	0,15
G2	0,09	0,07
Toplam	0,49	0,41

Ayrıca tez kapsamında yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda fındıkta (n=3) geri kazanım düşük konsantrasyonlarda (0,4 ppb) % 70, yüksek konsantrasyonlarda (4 ppb) % 54; pul biberde (n=3) düşük konsantrasyonlarda % 80, yüksek konsantrasyonlarda % 53 olarak bulunmuştur. Taverniers ve ark. [371] ppb düzeyinde çalışma yapıldığında geri kazanım değerinin % 40-120 arasında kabul edilebileceğini belirtmiştir. Aflatoksin değerleri verilirken geri kazanım düzeltilmesi yapılarak verilmiştir. Tez kapsamında çalışılan örneklerle gerçekleştirilen geri kazanım sonuçları Çizelge 4.35'te verilmiştir.

Çizelge 4. 35 Fındık ve kırmızı pul biber örneklerine ait geri kazanım düzeltilmesi yapılmış aflatoksin değerleri

Aflatoksin cinsi (ppb)	B1	B2	G1	G2
Fındık (n=3)	<LOD*	<LOD*	<LOD*	<LOD*
Kırmızı pul biber (n=7)	0,10	1,44	<LOD**	<LOD**

*Fındık için LOD değeri; **Kırmızı pul biber için LOD değeri

Çizelge 4.35'den de görüleceği üzere fındık örneklerinde aflatoksin miktarları oldukça düşük olup LOD'nin altında bulunmuştur. Pul biber örneklerinin aflatoksin

miktarları ise B1 (5 ppb) ve toplam aflatoksin (10 ppb) limitleri dahilinde olup, ulusal ve uluslararası standartlar çerçevesinde kabul edilebilir niteliktedir.

4.4.1. Yapay Olarak Kontamine Edilmiş Örneklerden Elde Edilen Aflatoksin Sonuçları

Bu bölümde hem mevcut küf suşlarının aflatoksin üretme aralıkları belirlenmiş hem de saf toksin ile kontamine edilmiş örneklerin plazma ve ışınlama prosesleri sonrası kalan miktarları belirlenmiştir. Fındık ve pul biber örneklerine yapay olarak kontamine edilmiş olan farklı küf sporlarının belirtilen sıcaklık ve sürelerde üretmiş oldukları aflatoksinler Çizelge 4.36'da verilmiştir.

Çizelge 4. 36 Test örneklerine Yöntem 2'ye göre inoküle edilen küflerin ürettikleri aflatoksin miktarları

Test örneği	Küf suşu	Üretilen aflatoksin miktarı (ppb)				
		G2	G1	B2	B1	Toplam
Fındık	<i>A.parasiticus</i>	0,1-0,3	LOD-1,9	3,0-4,0	89,0-173,7	94,2-177,7
	<i>A.flavus</i>	LOD-0,3	LOD-0,5	3,8-15,1	121,6-1040	125,4-1055
Pul Biber	<i>A.parasiticus</i>	LOD-0,9	LOD	0,9-2,1	19,6-47,6	21,3-49,7
	<i>A.flavus</i>	LOD	LOD	0,8-2,1	16,9-47,6	17,6-49,7

Çalışılan küf solüsyonları AFB1 ve AFB2'yi aynı anda üretebilmektedir. Ayrıca ürün ve küf suşu bazında değişmekle birlikte AFG1 ve AFG2'yi de çok az miktarda üretmektedirler.

Elde edilen sonuçlar ürün ve küf suşu bazında değişkenlik gösterdiği ve tekrarlanabilir sonuçlar alınamadığı için aflatoksin detoksifikasyon oranını belirleme işlemi direkt olarak viallerde hazırlanmış olan çözeltilere uygulanmış ve plazmanın toksinler üzerinde etkileri bu yolla tespit edilmiştir. Küflerin üretmiş oldukları AFG1 ve AFG2 miktarı çok az olduğu için (<% 0,1) toplam aflatoksin miktarının değerlendirilmesinde AFG1-AGF2 hesaba katılmamıştır. Küf suşlarının ortalama aflatoksin üretme oranları (% 97 AFB1/ % 3 AFB2) olarak belirlenmiştir. Toplam aflatoksin çözeltileri hazırlanırken de bu oranlar baz alınmıştır.

Plazma işleminin toksin çözeltileri üzerindeki etkileri incelendiğinde konsantrasyon değişimine göre degradasyon oranlarının da değiştiği gözlenmektedir (Çizelge

4.37). Bununla birlikte kompleks bir matrikse sahip olan gıdalarda bulunan aflatoksinler üzerinde plazma işleminin etkisinin hesaplanması amacıyla küflerin yüzeyde üretmiş oldukları aflatoksinlerin degradasyonunun incelenmesi uygun bulunmamıştır. Bunun sebebi küf suşlarının aflatoksinleri belirlenen inkübasyon süresi zarfında farklı oranlarda üretmiş olmasıdır. Küflerin üretmiş oldukları toksinlerin konsantrasyonları sabit olmadığı için degradasyon oranlarının bu yöntemle sağlıklı bir şekilde tespit edilemeyeceğine karar verilmiştir. Dolayısıyla, gıda örneklerinin konsantrasyonu önceden belirlenmiş toksin çözeltileri ile muamele edilerek plazma işlemine tabi tutulmuştur. Çizelge 4.37'den de görüleceği üzere plazma uygulamaları gıdalara kontamine edilen aflatoksin çözeltilerine gama ışınlanması uygulamasından daha fazla etki etmiş ve aflatoksin çözeltilerini % 70'e varan oranlarda indirgeyebilmiştir.

Çizelge 4. 37 Aflatoksin çözeltileri ile yapay olarak kontamine edilmiş ve işlem uygulanmış test örneklerine ait toksin miktarları

Proses tipi		Düşük basınç plazması		Atmosferik plazma		Işınlama	
Pul biber	Eklenen toksin konst. (ppb)	3,0	6,0	3,0	6,0	3,0	6,0
	Uygulama sonrası konst. (ppb)	2,41	3,59	2,18	4,19	2,90	5,06
	% Azalma	19,5	40,2	27,4	30,2	3,2	15,7
Fındık	Eklenen toksin konst. (ppb)	3,0	6,0	3,0	6,0	3,0	6,0
	Uygulama sonrası konst. (ppb)	0,82	3,27	0,83	1,78	1,60	5,06
	% Azalma	72,8	45,5	72,4	70,3	46,8	15,7

n=2

4.4.2. Saf Aflatoksin Çözeltilerinin Plazma ve Işınlama Sonrası Degradasyon Sonuçları

Hazırlanan toksin çözeltileri, atmosferik ve düşük basınç plazmaları için belirlenen optimum koşullarda uygulanmıştır. Ayrıca örnekler gama ışınlamasına da tabi tutularak sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla 1-2-5-10-50-100-300-500-1000 ppb konsantrasyonlarında aflatoksin konsantrasyonları hazırlanmış ve hem plazma hem de gama ışınlanması uygulamalarına tabi tutulmuştur. AFB1 ve TopAF konsantrasyonları için deneyler ayrı ayrı yapılmış ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Çalışmalar kapsamında kullanılmış olan saf aflatoksin konsantrasyonları belirlenirken Bölüm 4.4.1'den elde edilen veriler baz alınmıştır.

4.4.2.1. Düşük Basınç Plazma Uygulaması Sonrası Toksin Miktarlarındaki Değişim Sonuçları

Düşük basınç plazma sisteminde spor dekontaminasyonunun sağlandığı en optimum parametre olan 100 W-30 dk hava plazma parametresi kullanılmıştır (Çizelge 4.38).

Çizelge 4. 38 AFB1'in düşük basınç plazma uygulaması ile değişimi

Başlangıç toksin (AFB1) konst. (ppb)	Plazma işlemi sonrası AFB1 konst. (ppb)	AFB1 azalma (%)	Plazma işlemi sonrası oluşan AFB2 konst. (ppb)	AFB2 oluşum (%)
1	0,24	76,4	<LOD	0,0
2	0,32	83,8	<LOD	0,0
5	1,55	69,0	0,06	1,1
10	1,04	89,6	0,08	0,8
50	5,44	89,1	0,22	0,4
100	33,57	66,4	0,76	0,8
300	79,81	73,4	2,27	0,8
500	238,93	52,2	3,13	0,6
1000	631,70	36,8	10,29	1,0

n=3; LODB2=0,05 ppb

Plazma işlemiyle meydana gelen mekanizma primer olarak degradasyon işlemidir. Aflatoksin moleküllerinin plazma degradasyon ürünleri arasında AFB2'de bulunmaktadır. Dolayısı ile degradasyon işlemiyle birlikte yeniden oluşum da gerçekleşmiştir. Ayrıca çalışılan dalga boyunda floresan ışığa yapmayan fakat AFB1'in dönüşüm ürünlerinin de oluşması mümkündür. Çalışma kapsamında özellikle yüksek toksisiteye sahip olan AFB1'in degradasyonu önemlidir. Bununla birlikte degradasyon ürünlerinin sitotoksik açıdan daha toksik bir bileşenlere dönüşme olasılığı da göz önüne alınarak tez kapsamında sitotoksikolojik testlerde yapılmıştır.

Saf AFB1'in AFB2'ye dönüşme prosesi bir önceki çizelgeden de görüleceği üzere yaklaşık % 1'lik bir oranda gerçekleşmektedir. Bununla birlikte plazma yapılacak çözeltiliye % 3 oranında AFB2 de katılarak plazma yapıldığında elde edilen veriler Çizelge 4.39'da verilmiştir.

Çizelge 4. 39 TopAF'nin düşük basınç plazma uygulaması ile değişim

Başlangıç AFB1/AFB2 konst. (ppb)	Plazma işlemi sonrası AFB1 konst. (ppb)	AFB1 azalma (%)	Plazma işlemi sonrası AFB2 konst. (ppb)	AFB2 azalma(%)	Toplam azalma(%)
1/0,0309	0,20	80,5	<LOD	100,0	81,1
2/0,0619	0,34	82,9	0,05	52,1	81,0
5/0,1545	1,11	77,9	0,14	47,8	75,8
10/0,309	2,12	78,8	0,22	55,9	77,3
50/1,545	12,36	75,3	0,73	66,8	74,6
100/3,09	57,10	42,9	3,63	21,0	41,1
300/9,27	120,26	59,9	5,02	70,3	59,5
500/15,45	171,42	65,7	3,90	94,9	66,0
1000/30,9	481,33	51,9	19,37	70,6	51,4

n=3; LOB2=0,05 ppb

Burada ana mekanizma hem AFB1'in degrade olarak AFB2'ye ve diğer parçalanma ürünlerine dönüşmesi, hem de eklenmiş olan AFB2'nin degradasyona uğramış olmasıdır. Plazma uygulaması sonucunda AFB1 ve AFB2'nin azalma oranlarını hesaplamak amacıyla Çizelge 4.38'de verilen AFB2 oluşum değerlerinin sabit kaldığı varsayılarak, eklenen AFB2'nin başka ürünlere parçalanma oranları hesap edilmiştir.

4.4.2.2. Atmosferik Basınç Plazması Uygulaması Sonrası Toksin Miktarlarındaki Değişim Sonuçları

Atmosferik plazma sisteminde spor dekontaminasyonunun sağlandığı en optimum parametreler Çizelge 4.17'de verilmiş ve çalışmada bu parametreler kullanılmıştır. Çizelge 4.40'ta atmosferik plazma uygulamasının AFB1 çözeltileri üzerindeki etkileri belirtilmiş olup AFB2 dönüşümü atmosferik plazmada gerçekleşmemiştir. Sadece 500 ppb aflatoksin konsantrasyonunda bir dönüşüm gözlenmektedir. Atmosferik basınç plazması, düşük basınç plazması kadar AFB1 de indirgenmeye sebep olmamaktadır. Bununla birlikte aflatoksin konsantrasyonunun artmasıyla % indirgenme azalmaktadır.

Çizelge 4. 40 AFB1'in atmosferik basınç plazma uygulaması ile değişimi

Başlangıç toksin (AFB1) konst. (ppb)	Plazma işlemi sonrası AFB1 konst. (ppb)	AFB1 azalma (%)	Plazma işlemi sonrası oluşan AFB2 konst. (ppb)	AFB2 oluşum (%)
1	0,32	68,2	<LOD	0,0
2	0,90	55,1	<LOD	0,0
5	1,56	68,8	<LOD	0,0
10	4,48	55,2	<LOD	0,0
50	12,35	75,3	<LOD	0,0
100	34,85	65,2	<LOD	0,0
300	131,20	56,3	<LOD	0,0
500	275,90	44,8	0,50	0,1
1000	832,25	16,8	<LOD	0,0

n=3; LODB2=0,05 ppb

Ayrıca plazma yapılacak çözeltilere % 3 oranında AFB2 de katılarak plazma yapıldığında elde edilen veriler Çizelge 4.41'de verilmiştir.

Çizelge 4. 41 TopAF'nin atmosferik basınç plazma uygulaması ile değişimi

Başlangıç AFB1/AFB2 konst. (ppb)	Plazma işlemi sonrası AFB1 konst. (ppb)	AFB1 azalma (%)	Plazma işlemi sonrası AFB2 konst. (ppb)	AFB2 azalma (%)	Toplam azalma (%)
1/0,0309	0,08	91,9	<LOD	100,0	92,2
2/0,0619	0,50	75,0	<LOD	100,0	75,8
5/0,1545	0,93	81,3	<LOD	100,0	81,9
10/0,309	2,29	77,2	0,08	75,1	77,1
50/1,545	16,30	67,4	0,47	69,9	67,5
100/3,09	38,68	61,3	0,78	74,6	61,7
300/9,27	166,55	44,5	2,80	69,8	45,2
500/15,45	320,00	36,0	3,50	80,6	37,2
1000/30,9	793,90	20,6	8,16	73,6	22,2

n=3; LODB2=0,05 ppb

Atmosferik plazmanın TopAF üzerindeki etkinliği Çizelge 4.41'de belirtilmiştir. Özellikle düşük basınç plazması ile karşılaştırıldığında atmosferik basınç plazma uygulaması yüksek konsantrasyonlarda aflatoksinlerin degradasyonu konusunda pek başarılı değildir. Bunun başlıca sebepleri aflatoksinlerin yüksek stabiliteye sahip moleküller olmaları, dolayısıyla vialerde hazırlanmış olan toksin çözeltilerine

aktif plazma türlerinin toksinin yapısal olarak parçalanabilmesini sağlayacak kadar etki edememeleridir.

Degradasyonu etkileyen en önemli parametrelerden bir diğeri ise UV ışınlarıdır. Aflatoksinler ısıya çok dayanıklı moleküller olup, özellikle fotodegradasyonla parçalanabilmektedirler. Atmosferik plazmalarda düşük basınç plazmalarındaki gibi yüksek dozlarda UV radyasyonu oluşmamaktadır. Bunun başlıca sebebi atmosferik basınçta bulunan gazların (hava) UV ışınlarını absorblamasıdır. Vleugels ve ark. [226] aflatoksinler üzerine UV radyasyonunun etkilerinin kısıtlı olduğunu bildirmişlerdir.

4.4.2.3. Işınlama uygulaması sonrası toksin miktarlarındaki değişim sonuçları

Işınlama uygulaması yüksek aflatoksin konsantrasyonlarında bile toksinleri büyük oranda indirgeyebilmiştir. Ayrıca ışınlama uygulaması da bazı konsantrasyonlarda (>300 ppb) AFB1'i AFB2'ye dönüştürmektedir (Çizelge 4.42).

Çizelge 4. 42 AFB1'in ışınlama uygulaması ile değişimi

Başlangıç toksin (AFB1) konst. (ppb)	Plazma işlemi sonrası oluşan AFB1 konst. (ppb)	AFB1 azalma (%)	Plazma işlemi sonrası oluşan AFB2 konst. (ppb)	AFB2 oluşum (%)
1	0,02	98,3	<LOD	0,0
2	0,02	99,2	<LOD	0,0
5	0,14	97,1	<LOD	0,0
10	0,06	99,4	<LOD	0,0
50	0,02	99,9	<LOD	0,0
100	1,42	98,5	<LOD	0,0
300	93,55	68,8	0,04	0,0
500	268,45	46,3	0,11	0,0
1000	482,65	51,7	0,23	0,0

n=3; LODB2=0,05 ppb

Toplam aflatoksin bazında bakıldığında ışınlama uygulaması saf aflatoksin çözeltilerine daha fazla etki etmiştir (Çizelge 4.43).

Çizelge 4. 43 TopAF'nin ışınlama uygulaması ile değişimi

Başlangıç AFB1/AFB2 konst. (ppb)	Plazma işlemi sonrası AFB1 konst. (ppb)	AFB1 azalma (%)	Plazma işlemi sonrası AFB2 konst. (ppb)	AFB2 azalma (%)	Toplam azalma (%)
1/0,0309	0,08	91,9	<LOD	100,0	92,2
2/0,0619	0,50	75,0	<LOD	100,0	75,8
5/0,1545	0,9	81,3	<LOD	100,0	81,9
10/0,309	2,3	77,2	<LOD	100,0	77,8
50/1,545	3,9	92,2	0,10	94,7	92,2
100/3,09	7,5	92,5	0,10	95,3	92,6
300/9,27	47,3	84,2	1,50	84,8	84,2
500/15,45	15,2	97,0	5,50	65,1	96,0
1000/30,9	524,0	47,6	11,8	62,6	48,0

n=3; LODB2=0,05 ppb

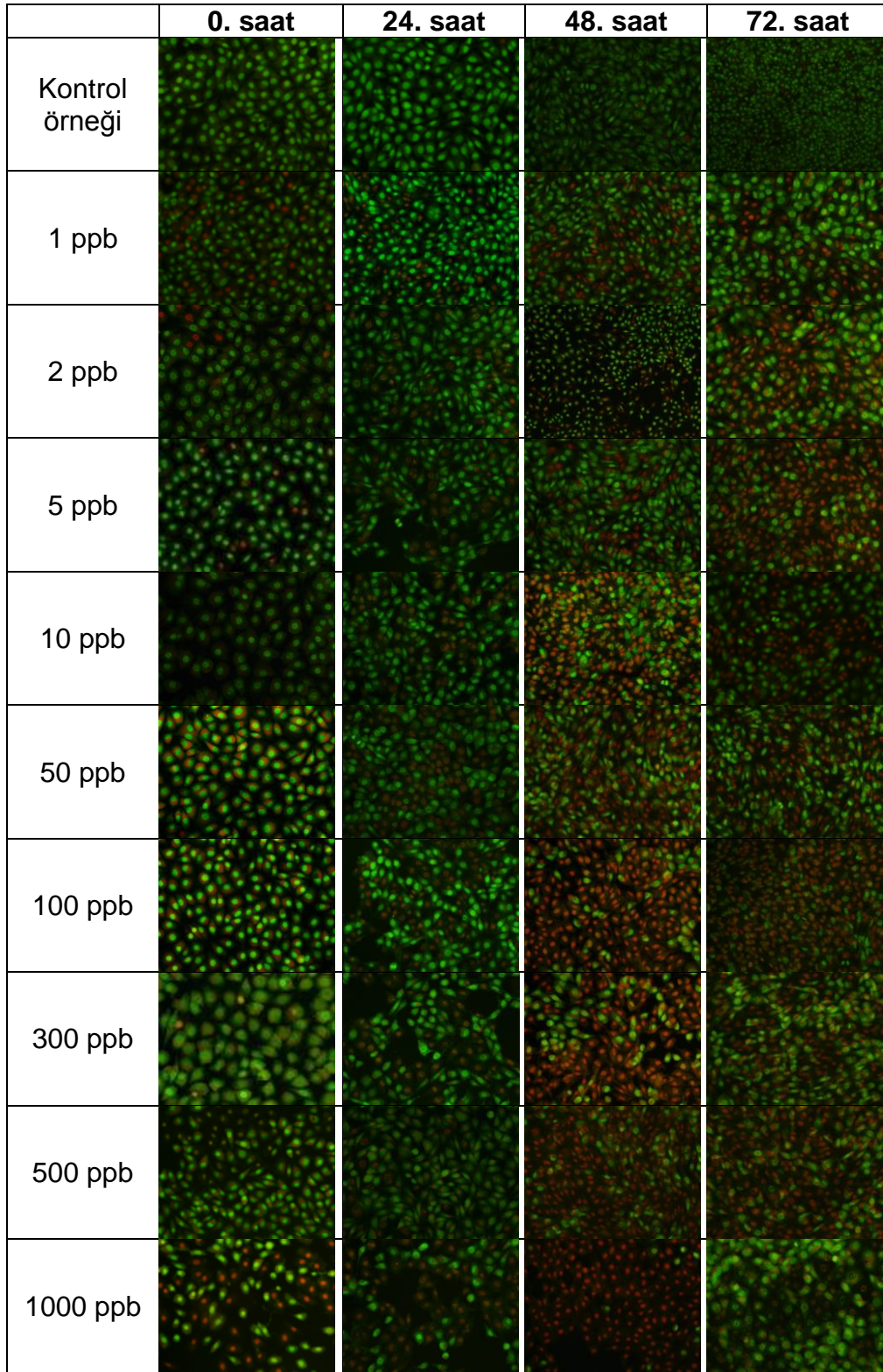
Literatürde gerçekleştirilmiş olan bazı çalışmalarda da bu konuda birçok inceleme yapılmıştır [372-374]. Bunun yanısıra Park ve ark. [46] dışında literatürde 1000 ppb'lik aflatoxin çözeltileri üzerinde geniş kapsamlı bir çalışma yapılmakla birlikte gama ışınlamasında da bu konuda geniş bir aflatoxin konsantrasyonu üzerinde incelemeye rastlanılmamıştır.

4.5. Sitotoksikolojik Deney Sonuçları

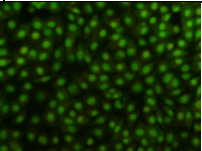
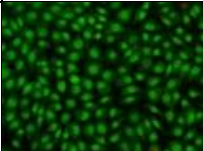
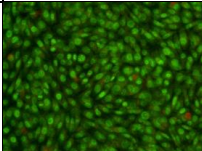
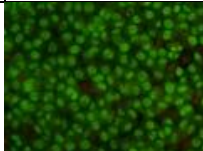
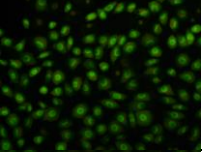
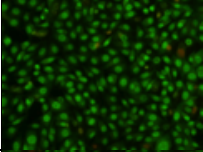
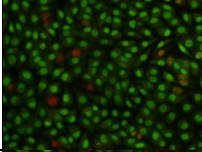
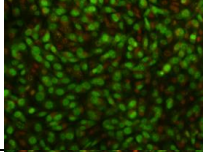
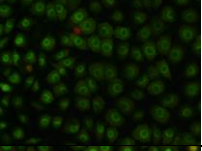
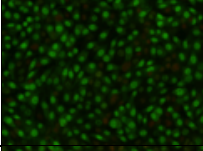
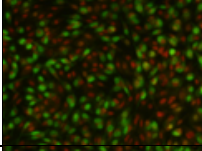
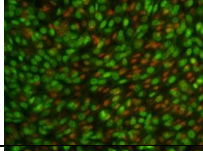
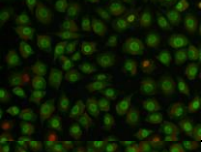
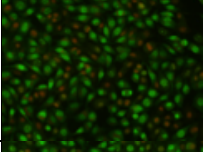
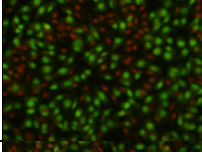
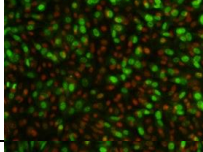
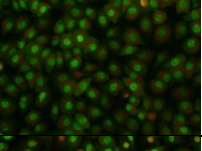
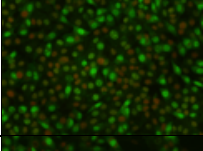
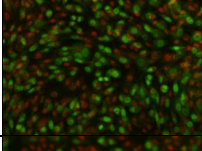
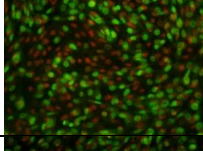
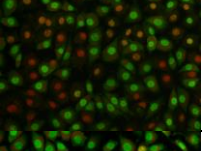
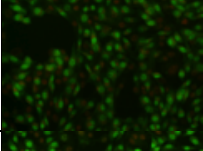
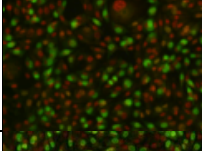
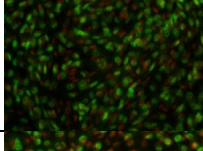
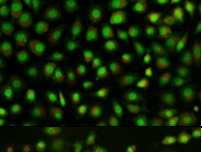
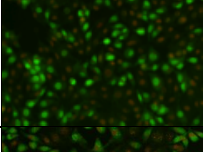
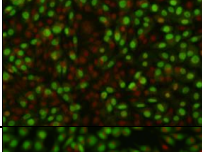
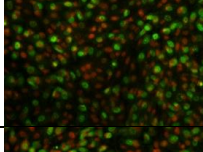
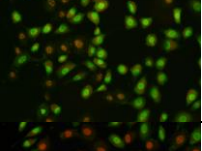
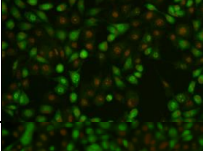
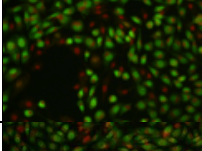
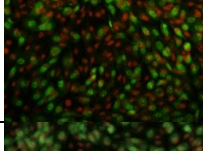
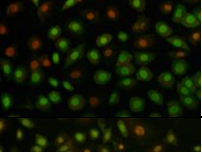
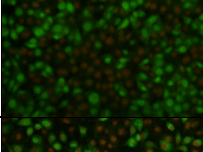
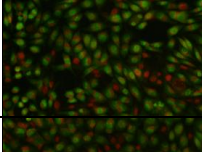
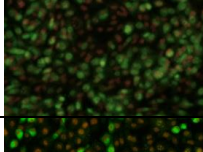

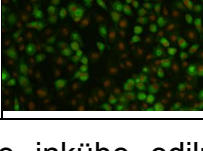

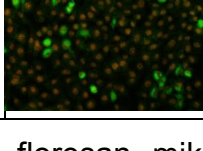
Tez kapsamında sitotoksikolojik çalışmalar iki kısımda gerçekleştirilmiştir. İlk kısımda hücrelerin farklı aflatoxin konsantrasyonlarına karşı davranışları floresan mikroskopunda incelenmiştir. İkinci kısımda ise hücrelerin yüzde canlılık eğrileri oluşturularak oluşan etki sayısal verilere dayandırılmıştır.

4.5.1. Farklı Aflatoxin Konsantrasyonlarına Tabi Tutulmuş Hücrelere Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri

İşlem görmemiş aflatoxin çözeltilerinin fare fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla AFB1 ve TopAF çözeltileri hazırlanarak 0-72 saat zaman aralığında görüntüleme yapılmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4. 2 AFB1 çözeltileri ile inkübe edilmiş hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri

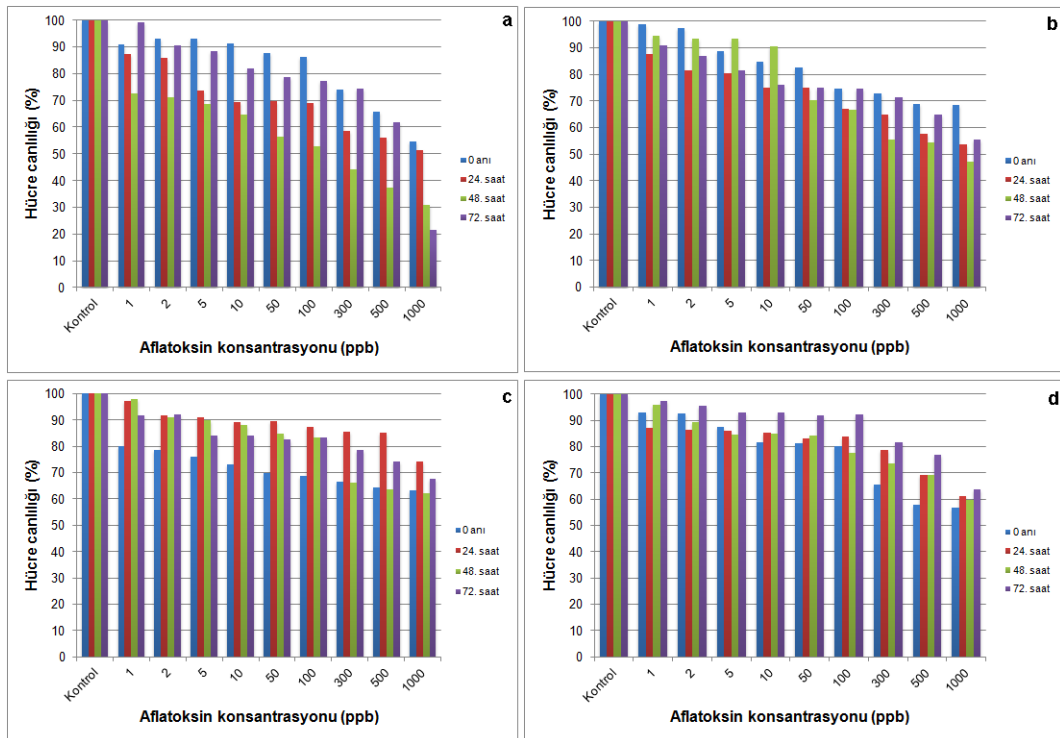
	0. saat	24. saat	48. saat	72. saat
Kontrol örneği				
1 ppb				
2 ppb				
5 ppb				
10 ppb				
50 ppb				
100 ppb				
300 ppb				
500 ppb				
1000 ppb				

Şekil 4. 3 TopAF çözeltileri ile inkübe edilmiş hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te canlı hücreler yeşil gözüklürken, ölü hücreler kırmızı olarak gözükmemektedir. Ölmek üzere olan hücreler ise turuncu renkte gözükmemektedir. Şekillerde siyah boşluk olarak gözükken yerler ise artık hücre ölümlerinin tamamlanıp hücrenin tamamen inaktif olduğunu göstermektedir. Hücrelerin inkübasyon zamanında 72. saate doğru gidildikçe ölü hücrelerin üzerlerinde yeniden gelişmekte olan hücreler gözükmemektedirler.

4.5.2. Sitotoksiste Testi (MTT)

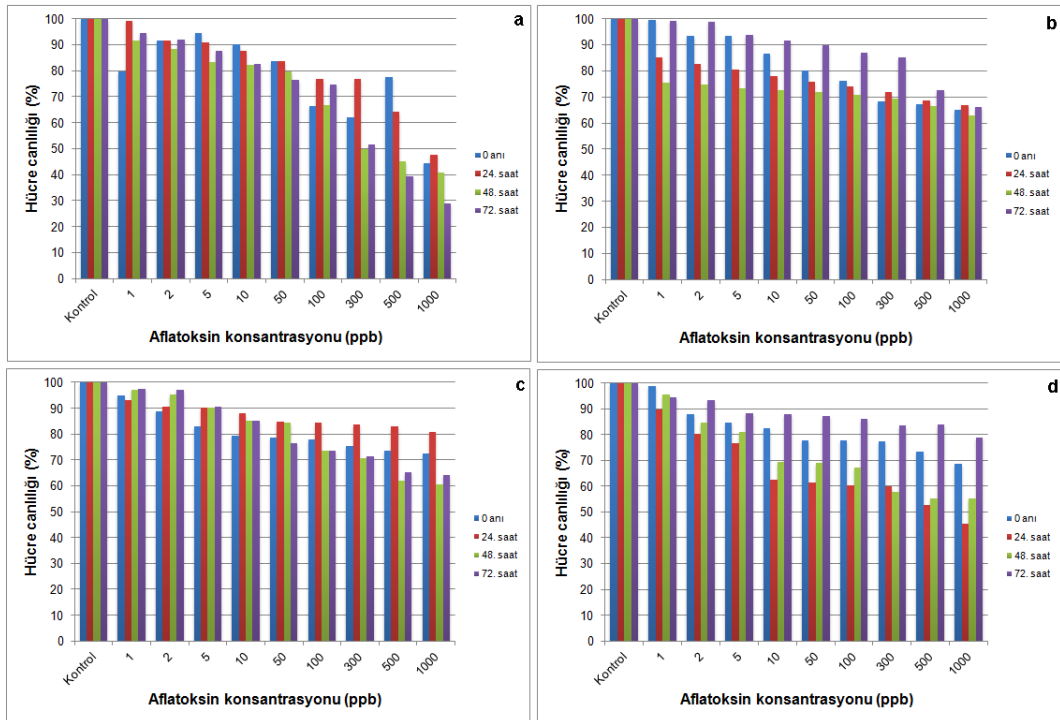
MTT testi ile aflatoksin çözeltilerinin plazma ve ışınlama proseslerine tabi tutulma öncesi ve sonrası sitotoksik olup olmadıkları yani sitotoksiste oranları belirlenmiştir. MTT analiz sonuçlarına göre, kontrol plağından alınan absorbansların ortalaması % 100 kabul edilmiştir. Kontrol plağının absorbansı, test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile karşılaştırılmıştır. Aflatoksinlerin farklı derişimlerdeki toksisite Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'teki grafiklerde gösterilmiştir (n=6).



Şekil 4. 4 Farklı konsantrasyonlardaki AFB1 çözeltilerinin hücre canlılıkları üzerine etkisi (a: kontrol; b: düşük basınç plazması uygulanmış; c: atmosferik plazma uygulanmış; d: ışınlama işlemi uygulanmış aflatoksin çözeltileri)

Aflatoksinler düşük konsantrasyonlarda bile hücre canlılığını % 30-40 oranında etkilemektedirler (Şekil 4.4a). Bu nedenle aflatoksin çözeltileri ve parçalanma ürünlerinin sitotoksik etkilerinin karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amacıyla hücrelerin yarısını öldüren doz baz alınmıştır. Şekil 4.4'e göre tüm aflatoksin konsantrasyonları için 48 saate kadar hücre sayısı önemli oranda azalmış ve 48. saatten sonra inkübasyon süresi artışıyla beraber canlı kalan hücreler tekrar çoğalmıştır.

Şekil 4.4'e göre kontrol örneğinde 300 ppb aflatoksin konsantrasyonu canlılığın % 50 oranında azalmasına neden olmuştur. 300 ppb ve üzeri dozlar özellikle etkin zaman dilimi olan 48. saatte hücre canlılığında büyük oranda azalmaya neden olmaktadır. Şekil 4.4b düşük basınç plazması uygulanmış örnekler için canlılık eğrisine göre 1000 ppb konsantrasyon hariç hücre canlılığının büyük oranda korunduğu görülmüştür. Atmosferik plazma ve ışınlama (Şekil 4.4c, Şekil 4.4d) uygulamaları da aflatoksinleri büyük oranda indirgeyebildiği için hücre ölüm oranları bu uygulamalarda da büyük oranda azalmıştır.



Şekil 4. 5 Farklı konsantrasyonlardaki TopAF çözeltilerinin hücre canlılıkları üzerine etkisi (a: kontrol; b: düşük basınç plazması uygulanmış; c: atmosferik plazma uygulanmış; d: ışınlama işlemi uygulanmış aflatoksin çözeltileri)

TopAF çözeltilerinin kontrol örneklerine ait denemeleri (Şekil 4.5a) bu çözeltinin da 300 ppb ve üzeri konsantrasyonlarda yüksek oranda toksik olduğunu göstermektedir. Düşük basınç ve atmosferik plazma uygulamalarında hücre ölümleri büyük oranda azaltılmış ve özellikle 72. saatte % 60'ların üzerinde bir hücre canlılık oranı elde edilmiştir. Bu durum her iki işlemin aflatoksinleri daha az sitotoksik olan maddelere parçaladıklarının bir göstergesidir.

4.6. Plazma Uygulamalarının Spor Morfolojileri Üzerindeki Etkileri

Hazırlanmış olan spor çözeltileri düşük basınç ve atmosferik plazma sistemlerinde belirlenmiş olan optimum plazma parametrelerine tabi tutulmuştur. Düşük basınç plazması için 100 W-30 dk hava plazması uygulanırken; atmosferik basınç plazmasında uygulanan parametreler şöyledir: % 100 referans voltaj-25 kHz-60 m/min-3000 L/saat-3 mm tarama aralığı-103,5 sn hava plazması uygulanmıştır.

SEM ile incelenen *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarına ait görüntüler Şekil 4.6'da verilmiştir. Her işlem için 3 farklı görüntü bulunmaktadır.

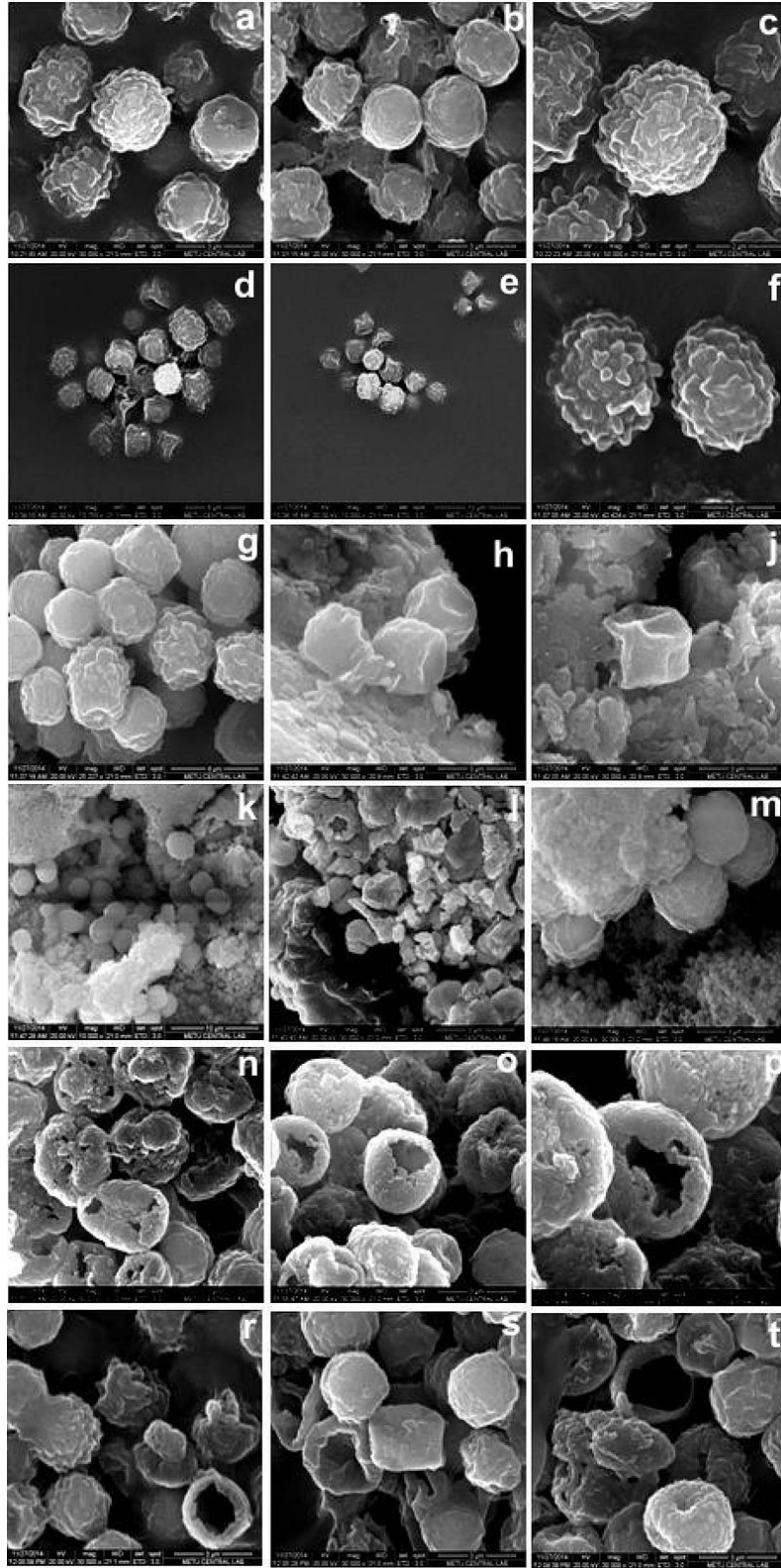
Şekil 4.6 a-c ve Şekil 4.6 d-f'de plazma işlemine tabi tutulmamış sporlara ait görüntülerde, tüm spor yapısı açık şekilde gözükmemektedir. Spor yüzeyleri düz olmamakla birlikte hafif pürüzlü bir yüzeye sahiptirler. Bu pürüzlülüğün bir kısmının SEM görüntüsü alınmadan önce spor fiksasyon aşamalarında kullanılan alkol çözeltilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.6 g-j ve Şekil 4.6 k-m'de atmosferik basınç plazma sistemi ile muamele edilmiş *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarına ait SEM görüntülerine göre plazma uygulanmamış sporlarla karşılaştırıldığında atmosferik plazma uygulamasının spor dış yapılarında meydana getirdiği deformasyon açıkça belli olmaktadır. Özellikle hücre duvarının parçalanması sonucunda ortama dağılmış olan stoplazmik yapılar açıkça bellidir.

Şekil 4.6 n-p ve Şekil 4.6 r-t'de düşük basınç plazma sistemi ile muamele edilmiş *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarına ait SEM görüntüleri görülmektedir. Düşük basınç plazma sisteminin spor dış yüzeylerinde daha büyük oranda deformasyona neden olduğu görülmektedir. Düşük basınç plazma sisteminin çalışma koşulları 0,4 mbar'dan düşük olduğu için spor dış yüzeylerinde dehidratasyon kaynaklı büzüşmelere de neden olmaktadır. Atmosferik plazma sisteminde hücre duvarına etki eden fiziksel etmenler aktif plazma türlerinin yanında plazma probundan çıkan

gazın basıncıdır. Düşük basınç plazma sisteminde ise aktif plazma türleri ve vakum ortamı hücre bütünlüğünü bozan başlıca etmenler olarak karşımıza çıkmaktadır. Düşük basınç sisteminde vakum etkisiyle zayıflamış olan hücre duvarına aktif plazma türleri daha fazla penetre olabilmektedirler. Düşük basınç sisteminde inaktivasyonun sadece reaktördeki vakum etkisinden kaynaklanmadığı Çizelge 4.6'dan elde edilen verilerle de doğrulanmıştır. Bununla birlikte çalışma kapsamında plazma uygulaması sonrası gerçekleştirilen fiziksel ve kimyasal analizlerin, yüksek oranda uygulanan vakum etkisinin gıdanın besinsel ve tekstürel özellikleri üzerinde meydana getirebileceği olumsuz etkilerinden bahsedilmiştir.

Plazma degradasyon mekanizması göz önüne alındığında yüzeydeki sporlar, plazma uygulamasıyla degrade olmakta ve sonrasında aktif plazma türleri alt katmanlarda bulunan sporlara etki etmektedir (Şekil 2.15). Her iki plazma türünde de aynı inaktivasyon mekanizması gerçekleşmiş ve spor yüzeylerinde mikron seviyesinde tahribat sonrası, hücre duvarı geçirgenliği artışı ve parçalanması gözükmemektedir. Bu mekanizmalarla birlikte UV ışınları, serbest radikaller ve diğer aktif plazma türleri tahribata uğramış hücre duvarına rahatça etki etmektedirler.



Şekil 4. 6 *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının SEM görüntüleri: a-c: İşlem görmemiş *A. flavus*; d-f: İşlem görmemiş *A. parasiticus*; g-j: Atmosferik plazma uygulanmış *A. flavus*; k-m: Atmosferik plazma uygulanmış *A. parasiticus*; n-p: Düşük basınç uygulanmış *A. flavus*; r-t: Düşük basınç uygulanmış *A. parasiticus*

5. TARTIŞMA

Tezin temel amaçlarından biri olan küf sporlarının dekontaminasyonu işlemi, yaratılan zorlu çalışma koşullarında ($a_w > 0,85$, düşük uygulama zamanı) bile başarı ile gerçekleştirilerek yaklaşık 5 logaritmalık bir indirgenme sağlanmıştır. Küf sporları başarılı şekilde besiyerinden alınarak test örneklerine yapay olarak inoküle edilmiş ve aflatoksin üretimi için gerekli optimum koşullar sağlanmıştır. İnokülasyondan sonra gerçekleştirilen optimum aflatoksin üretimi için gerekli inkübasyon süresi yaklaşık olarak literatürde verilmiş olup, hem küflerin maksimum çoğaldığı hem de aflatoksinlerin maksimum üretiminin sağlandığı koşullarda dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İki farklı plazma uygulamasından sonra spor miktarında büyük oranda düşme görülürken, bu sporların doğal olarak üretebilecekleri maksimum aflatoksin konsantrasyonlarında plazma ile dekontaminasyonun da sağlanabildiğini göstermek amacıyla 1-1000 ppb konsantrasyon aralıklarında saf aflatoksin çözeltileri ile çalışılmıştır.

Tezin bir diğer amacı olan detoksifikasyon kapsamında yapılan çalışmalar, fındığın, pul bibere göre aflatoksin üretimi için daha elverişli bir gıda materyali olduğunu göstermiştir. Ayrıca yapay olarak aflatoksin solüsyonları ile kontamine edilmiş örneklerden aflatoksin detoksifikasyonu, fındıklarda daha başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebinin pul biber örneklerinin yüksek su aktivitesi değerlerinde birbirine yapışarak aktif plazma türlerinin sporlara etki etmesini önlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Düşük basınç plazma sistemi, kapalı bir reaktör sistemi olduğu için dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilirken oluşan reaktif türler ile sistemden dışarı çıkabilecek organik atıkların vakum pompası tarafından sistemden uzaklaştırılabilir olması, bu sistemin daha güvenli olmasını sağlamaktadır. Atmosferik basınç plazmaları bu bağlamda çevreye olumsuz etki edebilecek reaktif türler ve mikrobiyolojik kalıntıları uzaklaştırabilecek bir sistem dizinine sahip değildir. Buna karşın atmosferik plazmalar, sanayi ortamında ilgili sisteme kolayca adapte edilebilir olması yanında son zamanlarda paket materyalinin içerisinde de plazma fazını oluşturabilecek sistemler geliştirilmesine olanak sağlaması gibi avantajlara sahiptir.

Yüksek toksisiteye sahip, küflerin sekonder metabolitlerden olan aflatoksinler, uygulanan plazma ve ışınlama işlemleri sonucu yapısal bazı değişikliklere maruz kalabilmektedirler. Plazmalar doğal yapısı gereği, içerdiği radikaller ve UV ışınları sayesinde kimyasal bozulma ve fotodegradasyon yoluyla aflatoksinlerin parçalanmasına neden olmaktadır. Oluşan bu ikincil ürünlerin, hücre metabolizmasındaki etkilerinin incelenmesi amacıyla fare fibroblast hücreleri ile MTT testleri gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar neticesinde kantitatif olarak miktarının azaldığı belirlenen aflatoksinlerin daha az toksisiteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Dolayısıyla plazma uygulamaları, azalan spor sayısı, düşen aflatoksin konsantrasyonu ve daha az zararlı kimyasal bileşene sahip ürün elde edilmesini sağlamıştır. Plazma, nano düzeyden birkaç mikron düzeye kadar etki edebilen özelliği ile örnek yüzeyine büyük tahribat vermeden yüzeydeki sporları inaktive etmiştir. Plazmanın sporlar üzerindeki etkileri SEM görüntüleriyle de belirlenmiştir. Bu görüntülerde, plazma uygulaması sonrasında spor hücre duvarının yapısal olarak bozulduğu ve sitoplazmik materyalin dışarı çıktığı açıkça görüntülenmiştir. Dolayısıyla, tez kapsamında hedeflenen dekontaminasyon ve detoksifikasyon ana çıktılarına ulaşılmıştır.

Tezin bir diğer ana hedefi de plazma ve ışınlama işlemi uygulanan fındık ve pul biber örneklerinin fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimin belirlenmesidir. Buna göre nem ile a_w değeri en düşük olan örnekler düşük basınç plazması uygulanan fındık ve pul biber örnekleri olurken, HunterLab parametreleri bakımından fındık örneği için uygulamalar arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Buna karşın pul biber örneğinde atmosferik plazma ve ışınlama uygulaması sonrasında renkte karar olmuştur. Düşük basınç plazması çalışma koşulları 0,4 mbar düzeyinde olduğu için gıdalarda bulunan özellikle serbest suyun buharlaşarak gıdadan uzaklaşmasına neden olmaktadır. Matriks yapıdan dışarıya doğru çıkan su, örnek yüzeyinde gözle görülemeyecek düzeyde kapiler genişlemelere neden olmakta ve dolayısıyla örneklerin aktif plazma türlerine daha çok maruz kalmasını sağlamaktadır.

Plazma ve ışınlama sonrası fındık örneklerinde yağ miktarı düşerken pul biber örneklerinde yağ miktarı artmıştır. Bunun pul biberin yaprak/pul (flake) şeklinde olması ve uygulama direncinin (gıdanın aktif plazma türlerini engelleme kapasitesi) düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Reaktör bazlı bakıldığında ise

yüzey alanı/ hacim oranı pul biberde fındığa göre çok daha fazladır. Dolayısıyla nem kaybı daha fazla olmakta ve örnekte birim ağırlıktaki yağ miktarı da artmaktadır.

Serbest asitlik (SA) değeri uygulamalar sonrasında fındık ve pul biber örneklerinde artmıştır. Serbest asitler, yağların hidrolizi ve oksidasyonu sonucu oluşurlar. Uygulanan yöntemler okside edici ortamlar oluşturdukları için belirli oranlarda örneklerin SA değerlerini yükseltmiştir. Her iki gıda örneği için üç uygulama sonrasında peroksit değeri (PD) artarken, en yüksek PD değerine atmosferik plazma uygulanmış örnek ulaşmıştır. Atmosferik plazma ve gama ışınlamasının atmosferik plazma koşullarında gerçekleştirilmesi ve dolayısıyla ortamda bulunan atmosferik oksijenin yanında plazma uygulamasının neden olduğu ekstra oksidasyon, PD değerinin daha da yükselmesine neden olmaktadır. Düşük basınç plazmasında bu durum, kapalı düşük basınç plazma reaktöründe daha kontrollü gerçekleşmekte ve meydana gelen kayıp minimuma indirgenmektedir.

Fındık örneğinde uygulamalar sonrasında toplam fenolik madde içeriği düşerken, pul biber örneğinde atmosferik plazma hariç artış görülmüştür. Işınlanmış fındık örneği hariç, düşük ve atmosferik basınç uygulanmış örneklerin tokoferol içeriği değişmezken, pul biber örneğinde her üç uygulama sonrası tokoferol içeriği düşmüş ve en yüksek tokoferol içeriğine atmosferik plazma uygulanmış örnek ulaşmıştır. Pul biber de ise aynı örnek için % 10'luk bir azalma gerçekleşmiştir.

Yapılan fiziksel ve kimyasal analizler neticesinde örneklerde özellikle bazı biyoaktif bileşenlerde azalma gözlenirken, tüketici beğenisini olumlu/olumsuz etkileyebilecek fizikokimyasal değişimler de belirli oranlarda meydana gelmiştir. Gıdalarda meydana gelen bu değişimler, plazma uygulaması sırasında oluşan aktif türler, UV radyasyonu ve sıcaklık parametrelerine; örneklerin döner reaktörün dönüşü esnasında reaktör duvarı ve birbirlerine sürtünmelerine; düşük basınç plazmasında vakum, atmosferik plazmada atmosferik basınçta plazma oluşumu için üflenen gaza bağlı olarak gerçekleşmektedir. Plazmanın küf dekontaminasyon ve aflatoksin detoksifikasyonu konusunda gelecek vadeden bir teknoloji olduğu tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerle kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Tunail, N., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, **2000**.
- [2] Çakır, İ., Dogan, H.B., *Biyolojik Stabilité. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, **2000**.
- [3] Çetintaş, G., *Fındık Yağı İşleme Aşamalarında Kalite Kriterlerinde ve Aflatoksin Konsantrasyonunda Olan Değişimler*, Y.Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, **2005**.
- [4] Anonim, <http://www.ftg.org.tr/tr/turk-findigi-findik-ihracati.html>(Kasım, **2013**).
- [5] Şimşek, A., Aslantaş, R., Fındığın Bileşimi ve İnsan Beslenmesi Açısından Önemi, *Gıda*, 24(3), 209-16, **1999**.
- [6] Anonim, http://www.ers.usda.gov/datafiles/Phytosanitary_Regulation/Individual_Commodity_Files/Vegetables/veg-bellpepper.xls, (Aralık, **2014**).
- [7] Erdoğan, A., The Aflatoxin Contamination of Some Pepper Types Sold in Turkey, *Chemosphere*, 56(4), 321–25, **2004**.
- [8] Dokuzlu, C., Aflatoxin in Red Pepper, *Uludag University Journal Of The Faculty Of Veterinary Medicine*, 20, 19–23, **2001**.
- [9] Kanbur, M., Liman, B.C., Eraslan, G., Altinordulu, S., Quantitative Analysis of Aflatoxin B1 by Enzyme Immuno Assay (EIA) in Red Pepper Marketed in Kayseri, *Erciyes University Journal Of The Faculty Of Veterinary Medicine*, 3(1), 21–24, **2006**.
- [10] Aydın, A., Erkan, M.E., Baskaya, R., Ciftcioglu, G., Determination of Aflatoxin B1 Levels in Powdered Red Pepper, *Food Control*, 18, 1015–18, **2007**.
- [11] Fazekas, B., Tar, A., Kovacs, M., Aflatoxin and Ochratoxin a Content of Spices in Hungary, *Food Additives & Contaminants*, 22, 856–863, **2005**.
- [12] Romagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., Bergamini, C., Aflatoxins in Spices, Aromatic Herbs, Herb-Teas and Medicinal Plants Marketed in Italy, *Food Control*, 18, 697–701, **2007**.
- [13] Reddy, D.V.R., Aflatoxins B1 in Different Grades of Chillies (*Capsicum annum* L.) in India as Determined by Indirect Competitive-ELISA, *Food Additives & Contaminants*, 18, 553–58, **2001**.
- [14] Hu, Y., Zhang, Z., He, Y., Determination of Aflatoxin in High-Pigment Content Samples by Matrix Solid-Phase Dispersion and High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4126–30, **2006**.
- [15] Patel, S., Hazel, C.M., Winterton, A.G.M., Mortby, E., Survey of Ethnic Foods for Mycotoxins, *Food Additives & Contaminants*, 13, 833–41, **1996**.
- [16] Lee, L.S., Stanley, J.B., Cucullu, A.F., Pons Jr., W.A., Goldblatt, L.A., Ammoniation of Aflatoxin B1: Isolation and Identification of The Major Reaction Product, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 57, 626, **1974**.
- [17] Cazzaniga, D., Basilico, J.C., Gonzalez, R.J., Torres, R.L., De Greef, D.M., Mycotoxins Inactivation by Extrusion Cooking of Corn Flour, *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 144-47, **2001**.

- [18] Phillips, T.D., Clement, B.A., Park, D.L., *Approaches to Reduction of Aflatoxin in Foods and Feeds*, in *The toxicology of Aflatoxins*. (Editor: Eaton D.L., Groopman J.D.), New York: Academic Press, 383-406, **1994**.
- [19] Maeba, H., Takamoto, Y., Kamimura, M., Miura, T., Destruction and Detoxification of Allatoxins with Ozone, *Journal of Food Science*, 53, 667-68, **1988**.
- [20] Pluyer, H.R., Ahmed, E.M., Wei, C.I., Destruction of Aflatoxin on Peanuts by Oven-roasting and Microwave-roasting, *Journal of Food Protection*, 50(6), 504-508, **1987**.
- [21] Beaver, R.W., Wilson, D.M., James, M.A., Haydon, K.D., Colvin, B.M., Sangster, L.T., Pikul, A.H., Groopman, J.D., Distribution of Aflatoxins in Tissues of Growing Pigs Feed an Aflatoxin-contaminated Diet Amended with a High Affinity Aluminosilicate Sorbent, *Veterinary and human toxicology*, 32(1),16-18, **1990**.
- [22] Line, J.E., Brackett, R.E., Wilkinson, R.E., Evidence for degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium urantiacum*, *Journal of Food Protection*, 57, 788–791, **1994**.
- [23] Ünlütürk, A., *Gıda Mikrobiyolojisi*. Mengi Tan Basımevi, İzmir, **1999**.
- [24] Cooper, M., *Spacecraft Sterilization Using Non-equilibrium Atmospheric Pressure Plasma*, NATO: Advanced Study Institute, Plasma Assisted Decontamination of Biological&Chemical Agents, Cesme, **2007**.
- [25] Li, R., Ya, L., Mai, Y.-W., Application of Plasma Technologies in Fibre-reinforced Polymer Composites:A Review of Recent Developments, *Composites Part A, Applied Science and Manufacturing*, 28(1),73-86, **1997**.
- [26] Tusek, L., Nitschke, M., Werner, C., Stana-Kleinschek, K., Ribitsch, V., Surface characterisation of NH₃ plasma treated polyamide 6 foils, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195, 81-95, **2001**.
- [27] 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(1-2), 1-21, **2001**.
- [28] Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B., Plasma Sterilization: Methods and Mechanisms, *Pure and Applied Chemistry*, 74, 349-358, **2002**.
- [29] Menashi, W.P., *Effect of Dielectric and Liquid on Plasma Sterilization Using Dielectric Barrier Discharge Plasma*, U S Patent No. 3383163. Washington, DC: U S Patent and Trademark Office, **1968**.
- [30] Ashman, L.E., Menashi, W.P., *Treatment of surface with low-pressure plasmas*, U.S. Patent 3,701,628, **1972**.
- [31] Gut Boucher, R.M., *Seeded gas plasma sterilization method*, U.S Patent 4,207,286, **1980**.
- [32] Bithell RM., *Package and sterilization process for samed*. US Patent 4321232, **1982**.
- [33] Gürol, C., Ekinci, F.Y., Aslan, N., Korachi, M., Low Temperature Plasma for decontamination of *E. coli* in milk, *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 1–5, **2012**.
- [34] 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(12): 3295-3304, **2013**.
- [35] Nagatsu, M., Terashita, F., Koide, Y., Low Temperature Sterilisation with Surface-Wave-Excited Oxygen Plasma, *Japanese Journal of Applied Physics*, 42 (7B), 856-59, **2003**.
- [36] Vlckery, K., Deva, A.K., Zou, J., Kumaradeva, P., Bissett, L., Cossart, Y.E., Inactivation of Duck Hepatitis B Virus by A Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilization System: Laboratory and 'in use' Testing", *The Journal of Hospital Infection*, 41(4), 317-22, **1999**.
- [37] Kyenam, L., Paek, K., Ju, W., Lee, Y., Sterilization of Bacteria, Yeast, and Bacterial Endospores by Atmospheric-Pressure Cold Plasma Using Helium and Oxygen, *The Journal of Microbiology*, 44(3), 269-75, **2006**.
- [38] Moisan, M., Moreau, S., Tabrizian, M., Pelletier, J., Barbeau, J., Yahia, L'.H., *High-Performance System And Process For Low-Temperature Gas Plasma Sterilization*, Canadian patent, 2395659, **2000**.
- [39] Critzer, F.J., Kelly-Wintenberg, K.; South, S.; Roth, J.R.; Golden, D.A., Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. *J. Food Prot.*, 70, 2290, **2007**.
- [40] Montenegro, J., Ruan, R., Ma, H., Chen, P., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 Using a Pulsed Non-thermal Plasma System, *Journal of Food Science*, 67(2), 646-48, **2002**.
- [41] Deng, S., Ruan, R., Mok, C.K., Huang, G., Lin, X., Chen, P., Inactivation of *Escherichia coli* on Almonds Using Nonthermal Plasma, *Journal of Food Protection*, 72(2), M62-M66, **2007**.
- [42] Niemira, B.A., Cold plasma reduction of Salmonella and *Escherichia coli* O157:H7 on almonds using ambient pressure gases, *Journal of Food Science*, 77, 171-175, **2012**.
- [43] 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, 432-6, **2009**.
- [44] Selçuk, M., Öksüz, L., Basaran, P., Decontamination of Grains and Legumes Infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by Cold Plasma, *Bioresource Technology*, 99(11), 5104-09, **2008**.
- [45] Basaran, P.; Akgul, N.; Oksuz, L., Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment, *Food Microbiology*, 25(4), 626, **2008**.
- [46] Park, B. J. Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Kim, I.-H., Lee, M.H., Han, D.W., Chung, K.H., Hyun, S.O., Park, J.C., Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure, *Surface and Coatings Technology*, 201, 5733, **2007**.
- [47] Sen, Y., Layık, E., Alpsoy, P., Mutlu, M., *Plasma Processing of Powdered Food Materials: Decontamination Studies of Red Pepper*, 6th International Food Congress - "Novel Approaches in Food Industry" Cesme, **2011**.
- [48] Kim, J.E., Lee, D.U., Min, S.C., Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma, *Food Microbiology*, 38, 128-136, **2014**.
- [49] Sen, Y., Mutlu, M., Güleç, H.A., *Bio-decontamination of Nut Surfaces Using Non-thermal Plasma Technologies*, 3rd International Congress on Food and Nutrition, Antalya, **2009**.

- [50] Halkman, K., *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Başak Matbaacılık, 358s, Ankara, **2005**.
- [51] Bullerman, L.B., *Fungi in Food-An Overview*. Elsevier Science, 5511-5522, **2003**.
- [52] Durlu-Özkaya, F. ve Kuleaşan, H., *Maya ve Küf. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 329, **2000**.
- [53] Anonim, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillusde.svg?uselang=tr> (Kasım, **2014**).
- [54] Raper KB, Fennell D.I., *The genus Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, **1965**.
- [55] Samson, R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O., *Introduction to food and airborne fungi*. Sixth Ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures-Utrecht, 389, **2002**.
- [56] Klich, M.A., *Identification of common Aspergillus species*. First Ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 122, **2002**.
- [57] Gül, E. Ç., *Sağlam Kabuklu Fındıkta Aspergillus flavus Gelişimi*, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Van, **2007**.
- [58] ICMSF, *Microorganisms in Food 5*, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, New York, **1996**.
- [59] Boyacıoğlu, D., *Çekirdeksiz Kuru üzümelerde Aflatoksin B1,B2,G1,G2 tayini için mevcut bazı metotların karşılaştırılması üzerine bir araştırma*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, **1985**.
- [60] Anklam, E., Stoka, J., *The European perspective of mycotoxins and food safety*. In Int. Workshop on Mycotoxin. July, 22-26. FDA and JIFSAN, Univ.of Maryland, **2002**.
- [61] Twiddy, D.R., *Spoilage of Plant Products/Cereals and Cereal Flours*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. (eds: Robinson, R.K., Batt C.A., Patel, P.) Elsevier Academic Press, 2045-2050, UK., **1999**.
- [62] Galvez, F.C.F, Francisco, M.L.D.L, Villarino, B.J., LustreA.O., Resurreccion, A.V.A., *Manual Sorting To Eliminate Aflatoxin from Peanuts*, *Journal of Food Protection*, 66,1879-1884, **2003**.
- [63] Smith, J.E., *Mycotoxins*, (Edited by David H. Watson) Food Chemical Safety, CRC Press, 234-255, **2001**.
- [64] Zorlügenç, B., *Çeşitli Gıda Maddelerinden Flavobacterium Aurantiacum ile Aflatoksin B1 Miktarının Azaltılması Üzerine Bir Araştırma*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2009**.
- [65] Jay, J.M., *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall, London, 675, **1992**.
- [66] Moss, M.O., *Secondary Metabolism and Food Intoxification, Moulds*. *The Journal of applied bacteriology, Symposium Supplement*, 73:80-88, **1992**.
- [67] Deacon, J.W., *Modern Mycology*. 3rd ed., Blackwell Science, **2001**.
- [68] Pitt, J.I., *Toxicogenic fungi: Which are Important?* *Medical Mycology*, 38: 17-22, **2000**.
- [69] Van Genderen, H., *Adverse Effects of Naturally Occurring Nonnutritive Substances*, (Edited by John De Vries). Food Safety and Toxicity, CRC Press, 153-168, **1997**.

- [70] Erkmen, O., Bozoglu, T.F., *Food Microbiology 1: Microorganisms in Foods, Microbial Growth, Foodborne Diseases and Detection of Microorganisms and their Toxins*. Ilke Publishing Company, Ankara, **2008**.
- [71] Omaye, S.T., *Food and Nutritional Toxicology*. CRC Press, 308, **2004**.
- [72] Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W., Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141–158, **1998**.
- [73] McLean, M., Dutton, M.F., Cellular Interactions and Metabolism of Aflatoxin: an Update. *Pharmacology & Therapeutics*, 65, 163-192, **1995**.
- [74] Kuiper-Goodman T., *Risk assessment and risk management of mycotoxins in food*. In: *Mycotoxins in food Detection and control*, (eds: Magan N. and Olsen M.). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 3-31, **2004**.
- [75] IARC (International Agency for Research on Cancer), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 82. Lyon, International Agency for Research on Cancer, **2002**.
- [76] Anonim, Amending Regulation (EC) No 1881/2006 *setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins*, **2010**.
- [77] Anonim, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, R.G.: 29.12.2011-28157, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm>, (Ocak, **2015**).
- [78] Commission Regulation (EC) No 165/2010, 26 February 2010, Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs as Regards Aflatoxins, **2010**.
- [79] Commission Regulation (EC) No 1525/98, 16 July 1998, de la Commission sur les Teneurs Maximales en Aflatoxines, Luxembourg, **1998**.
- [80] Ellis W.O., *Effect of modified atmosphere packaging on the growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus under tropical environmental storage conditions*, Doktora Tezi, McGill Üniversitesi, Gıda Bilimi ve Ziraat Kimyası Bölümü, Kanada, **1993**.
- [81] Moreau, C., Moss, M., *In Moulds, Toxins and Foods*. John Wiley and Sons. Chichester. pp. 43, **1979**.
- [82] Moss, M. O., Smith, J. E., *Mycotoxins: Formulation; Analysis and Significance*. John Wiley and Sons. Chichester, United Kingdom, **1985**.
- [83] Clifford, J.L, Rees, K.K., Steven, M.E.M., Effect of aflatoxin BI' G1 and G2 on protein and nucleic acid synthesis in rat liver, *Biochemistry*, 103,258, **1967**.
- [84] Swensen, D.H., Lin, J.K., Miller, J.A., Miller, E.C., Aflatoxin BI-2,3 epoxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins BI and B2 to rat liver DNA and rRNA in-vivo, *Cancer Research*, 37, 172, **1977**.
- [85] Sabbioni, G., Chemical and physical properties of major serum albumin adduct of aflatoxin BI and their implications for the quantification in biological samples, *Chemico-Biological Interactions*, 75, 1, **1990**.
- [86] Groopman, J.D., Cain, L.G., Kensler, T.W., Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer, *Critical Reviews in Toxicology*, 19:113-146, **1988**.

- [87] Ueno, Y., The Toxicology of Mycotoxins, *Critical Reviews in Toxicology*, 14(2):99-132, **1985**.
- [88] Stark, A.A., Mechanisms of Action of Aflatoxin B1 at the Biochemical and Molecular Levels, (Edited by Charles L. Wilson and Samir Droby.), *Microbial Food Contamination*, CRC Press, ISBN 0-8493-2229-4, p:81-94, **2001**.
- [89] Anonim, Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Aflatoxins <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm071020.htm> (Ocak, **2015**).
- [90] Müller, G., Weber, H., Mikrobiologie der Grundlagen, *Behr's Verlag, Hamburgs*, 562, **1996**.
- [91] D'Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C., Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69:155–166, **1997**.
- [92] Bennett, J.W., Klich, M., Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16:497–516, **2003**.
- [93] Hussein, H.S., Brasel, J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 167:101–134, **2001**.
- [94] Carvajal, M., Castillo, P., Effects of aflatoxins contaminating food on human health, *Tropical Biological and Conservation Management*, 3, 1-6, **2002**.
- [95] Yu, J., Mohawed, S.M., Bhatnager, D., Cleveland, T.E., Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*, *Journal of Applied Microbiology*, 95(6): 1334, **2003**.
- [96] Wilson, D.M., Abramson, D., Mycotoxins, *Storage Of Cereal Grains And Their Products*, (eds: Sauer, D.B.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, **1992**.
- [97] Çelikay, A.G., *Kurutulmuş Kırmızı Biberin Mikrobiyolojik Kalitesi ve Aflatoksin Aranması*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniveristesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, **2003**.
- [98] Özçakmak, S., Dervişoğlu, M., Fındıkta Aflatoksin Oluşumuna Etkili Faktörler, Avrupa Birliği'nin Limit Değerlerle İlgili Düzenlemeleri ve Türk Fındığının İhracatına Etkileri, *Gıda Dergisi*, 32(1): 33- 40, **2007**.
- [99] Akpınar, Ş., Aflatoksinin Fındık İhracatına Etkisi, *Ordu'da Gıda Güvenliği Dergisi*, 2(5): 26-27, **2008**.
- [100] Diao E., Hou H., Dong H., Ozonolysis mechanism and influencing factors of aflatoxin B1: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 33, 21-26, **2013**.
- [101] Alencar, E. R. D., Faroni, L. R. D., Soares, N. F. F., Silva, W. A., Carvalho, M. C. S., Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 92(4), 899-905, **2012**.
- [102] 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**.
- [103] Center for Applied Special Technology, *Aflatoxins and Other Mycotoxins: An Agricultural Perspective*. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, USA., CAST Report No. 80, **1979**.

- [104] Vandegrift, E.E., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Grain preservatives: effects on aflatoxin and ochratoxin production, *Cereal Chemistry*, 52, 79, **1975**.
- [105] Yousef, A.E., Marth, E.H., Growth and synthesis of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* in the presence of sorbic acid, *Journal of Food Protection*, 44, 736, **1981**.
- [106] Heathcote, J.G., Hibbert, J.R., *Aflatoxin Chemical and Biological Aspects*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, **1978**.
- [107] Davies, N.D., Diener, U.L., *Food and Beverage Mycology*, (ed:Beuchat L. R.), Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 517, **1987**.
- [108] Bata, A., Lasztity, R., Detoxification of Mycotoxin-Contaminated Food and Feed By Microorganisms, *Trends in Food Science & Technology*, 10: 223-228, **1999**.
- [109] Park, D.L., Controlling aflatoxin in food and feed, *Food Technology*, 47, 92-96, **1993**.
- [110] Beaver, R.W., Decontamination of mycotoxin-containing foods and feedstuffs, *Trends in Food Science & Technology*, July, 170-173, **1991**.
- [111] Basappa S.C., Santha T., Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds—a critical appraisal, *Journal of Food Science and Technology*, 33: 2, 95–107, **1996**.
- [112] Mishra H. N., Das C., A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3):245–264, **2003**.
- [113] Goldblatt, L.A., Dollear, F.G., *Detoxification of Contaminated Crops: Mycotoxins in Human and Animal Health*. (eds.: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehلمان, M.A.), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. p:139-150, **1977**.
- [114] Yılmaz, A., Özay, G., Gıda ve Yemlerde Mikotoksin Detoksifikasyonu. *Gıda Dergisi*, 7:80-84, **2001**.
- [115] Karadeniz, F., Ekşi, A., Gıdalarda Mikotoksin Oluşumu ve Azaltılması. *Dünya Gıda Dergisi*, 7-8: 104-110, **2002**.
- [116] Anonim, Discussion Paper on Aflatoxins in Pistachios. Codex Alimentarius Commission. CX/FAC 02/22. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Rotterdam, Netherlands, **2002**.
- [117] Özay, G. Gıdalarda Mikotoksinler ve Detoksifikasyonu, *Gıda* (13) 137-141, **1988**.
- [118] Hocking, A.D., Toxigenic *Aspergillus* species. (eds.: Doyle M. P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J.) *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, ASM press, Washington DC., 393–405, **1997**.
- [119] 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*, Volume 46, Issue 8, **2006**.
- [120] Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Mac Donalds, 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**.
- [121] Scott, P.M. *Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins*, (eds.: Le Bars, J., and Galtier, P.), Mycotox'98 International symposium. 2-4 July, Toulouse, France, 543–548, **1998**.

- [122] Acar, J., Gökmen, V., Taydaş, E.E., The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207:328–331, **1998**.
- [123] Rustom, I.Y.S., Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods, *Food Chemistry*, 59:57–67, **1997**.
- [124] Rayner, E.T., Koltun, S.P., Dollear, F.G., Solvent extraction of aflatoxins from contaminated agricultural products, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54:242, **1977**.
- [125] Kadakal, C., Nas, S., *Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice*, *Nahrung*, 1:31–33, **2002**.
- [126] Doyle, M.P., Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Marth, E.M., Physical, chemical and biological degradation mycotoxins in foods and agricultural commodities, *Journal of Food Protection*, 45:964–971, **1982**.
- [127] Artık, N., Cemeroğlu, B., Aydar, G., Sağlam, N., Elma suyu konsantresinde aktif kömür kullanımı üzerinde araştırmalar, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 19:259–265, **1995**.
- [128] Kane, A., Ba Diop, N., Diack, T.S., Philips, T.D. Different technological processes of removing AFB1 from crude peanut oil, (eds.: Le Bars, J., and Galtier, P.), *Mycotox'98. International Symposium*, 2–4 July, Toulouse France, **1998**.
- [129] Scott, P.M. Effects of food processing on mycotoxins, *Journal of Food Protection*, 47:489–499, **1984**.
- [130] 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(6):489-501, **1990**.
- [131] Ryu, D., Hanna, M.A., and Bullerman, L.B., Stability of zearalenone during extrusion of corn grits, *Journal of Food Protection*, 62:1482–1484, **1999**.
- [132] Karaca H., Nas S., Combined Effect of pH and Heat Treatment on Degradation of Aflatoxins in Dried Figs, *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 329–339, **2009**.
- [133] Molins, R.A., Motarjemi, Y., K'äferstein, F.K., Irradiation: a critical control point in ensuring the microbiological safety of raw foods, *Food Control*, 12:347–356, **2001**.
- [134] Altuğ, T., Yousef, A.E., Marth, E.H., Degradation of aflatoxin B1 in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, 53:581–582, **1990**.
- [135] Temcharoen, P., Thilly, W.G., Removal of aflatoxin B1 toxicity but not mutagenicity by 1 megarad gamma radiation of peanut meal, *Journal of Food Safety*, 4, 199-205, **1982**.
- [136] Chiou, R. Y. Y., Lin, C. M. & Shyu, S. L., Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, *Journal of Food Science*, 55, 21-23, **1990**.
- [137] Adegoke, G.O., Allamu, A.E., Akingbala, J.O., Akanni, A.O., Influence of sundrying on the chemical composition, aflatoxin content and fungal counts of two pepper varieties-*Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*, *Plant Foods for Human Nutrition*, 49:113–117, **1996**.

- [138] Tabata, S., Kamimura, H., Ibe, A., Hashimoto, H., Tamura, Y., Degradation of aflatoxins by food additives, *Journal of Food Protection*, 57:42–47, **1994**.
- [139] Gomaa, M.N.E., Ayesh, A.M., Abdel Galil, M.M., Naguib, K., Effect of pressure ammoniation procedure on the detoxification of aflatoxins. *Mycotoxin Research*, 13:23–34, **1997**.
- [140] Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., Piva, A., Detoxification methods of aflatoxins, *Nutrition Research*, 15:767–776, **1995**.
- [141] 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 using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 35:807–820, **1997**.
- [142] Beuchat, L.R., Chmielewski, R., Keswani, J., Law, S.E., Frank, J.F., Inactivation of aflatoxigenic *Aspergillus* by treatment with ozone, *Letters in Applied Microbiology*, 29:202–205, **1999**.
- [143] 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 B1 in dried figs, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3593-3597, **2008**.
- [144] Karaca, H., Velioglu, Y.S., Ozone applications in fruit and vegetable processing, *Food Reviews International*, 23, 91-106, **2007**.
- [145] FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Food and Nutrition Paper 81 Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed. Available at: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>, (Ocak, **2015**).
- [146] FDA (Food and Drug Administration), Code of federal regulations, Title 21, Part 173, Section 173.368, **2012**.
- [147] WHO (World Health Organization). Food safety and foodborne illness fact sheet no 237, 2007, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>, (Ocak, **2015**).
- [148] Scussel V.M., Giordano B.N., Simao V., Manfio D., Galvao S., Rodrigues M.N.F., Effect of Oxygen-Reducing Atmospheres on the Safety of Packaged Shelled Brazil Nuts during Storage, *International Journal of Analytical Chemistry*, , Article ID 813591, **2011**.
- [149] Inan F., Pala, M., Doymaz I., Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper, *Journal of Stored Products Research*, 43, 425–429, **2007**
- [150] Akbas, M.Y., Ozdemir, M., Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers, *International Journal of Food Science & Technology*, 43(9), 1657–1662, **2008**.
- [151] 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**.
- [152] Fouler, S.G., Triverdi, A.B., Kitabatake, N., Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide, *Journal of AOAC International*, 77:631–636, **1994**.
- [153] Içibal, N., Altuğ, T., Degradation of aflatoxins in dried figs by sulphur dioxide alone and in combination with heat, ultraviolet energy and hydrogen peroxide, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 25:294–296, **1992**.

- [154] Sen, A.C., Wei, C.I., Fernando, S.Y., Toth, J., Ahmed, E.M., Reduction of mutagenicity and toxicity of aflatoxin B1 by chlorine gas treatment, *Food and Chemical Toxicology*, 26:745–752, **1988**.
- [155] Yazıcı, S., Velioglu, Y.S., Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-d-pantothenate on the patulin content of apple juice concentrate, *Nahrung*, 4:256–257, **2002**.
- [156] Suzuki T., Noro T., Kawamura Y., Fukunaga K., Watanabe M., Ohta M., Sugiue H., Sato Y., Kohno M., Hotta K., Decontamination of Aflatoxin-Forming Fungus and Elimination of Aflatoxin Mutagenicity with Electrolyzed NaCl Anode Solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 633-641, **2002**.
- [157] Karlovsky, P., Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed, and food production, *Natural Toxins*, 7:1–23, **1999**.
- [158] Peltonen, K., El-Nezami, H., Pierides, M., Salminen, S., Ahokas, J.T., Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1942–1945, **2000**.
- [159] Özkaya, S., *Ülkemizde aflatoksin sorunu yaşanan bazı gıdalarda aflatoksin B1'in azaltılması veya giderilmesinde Flavobacterium aurantiacum'un etkinliğinin araştırılması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2001**.
- [160] Park, D.L., Liang, B., Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed, *Trends in Food Science and Technology*, 4, 334-342, **1993**.
- [161] D'Souza, D.H., Brackett, R.E., The role of trace metal ions in aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum*, *Journal of Food Protection*, 61:1666–1669, **1998**.
- [162] Liu, D., Yao, D., Liang, Y.O., Zhou, T.H., Song, Y.P., Zhao, L., Ma, L., Production, purification and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20), *Food and Chemical Toxicology*, 39(5):461-6, **2001**.
- [163] Nakazato M., Morozumi S., Saito K., Fujinuma K., Nishima T., Kasaoi N., Interconversion of aflatoxin B1 and aflatoxicol by several fungi, *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 5, 1465-1470, **1990**.
- [164] Maing H.Y., Ayers J.C., Koehler P.E., Persistence of aflatoxin during fermentation of soy sauce, *Applied Microbiology*, 25: 1015–1017, **1973**.
- [165] Park, D.L., Effect of processing on aflatoxin, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504, 173–179, **2002**.
- [166] Yazdanpanah, H., Mohammadi, T., Abouhossain, G., Cheraghali, A.M., Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts, *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1135–1139, **2005**.
- [167] Kussak, A., Andersson, B., Andersson, K., Nilsson, C.A., Determination of aflatoxicol in human urine by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography, *Chemosphere*, 36, 1841–1848, **1998**.
- [168] Abdel-Wahhab, M.A., Nada, S.A., Khalil, F.A. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials, *Animal Feed Science and Technology*, 97: 209–219, **2002**.
- [169] Ramos, A.J., Hernández, E., Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to

- feedstuffs: a review, *Animal Feed Science and Technology*, 65:197–206, **1997**.
- [170] Nageswara Rao, S.B., Chopra, R.C., Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats, *Small Ruminant Research*, 41:203–213, **2001**.
- [171] Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents, *Toxicology Letters*, 122:179–188, **2001**.
- [172] 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**.
- [173] 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**.
- [174] Kankaanpaa, P., Tuomala, E., El-Nezami, H., Ahokas, J., Salminen, S.J., Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a caco-2 model, *Journal of Food Protection*, 63:412–414, **2000**.
- [175] El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J., Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1, *Food and Chemical Toxicology*, 36:321–326, **1998**.
- [176] Kaleli, D., Durlu-Özkaya, F., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 17. Bölüm, Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası, Ankara. s. 522, **2000**.
- [177] Bammler T.K, Slone D.H., Eton D.L., Effects of dietary oltipraz and ethoxyquin on aflatoxins B1 biotransformation in non-human primates, *Toxicology Sciences*. 54:30–41, **2000**.
- [178] Murphy, P. A., Suzanne Hendrich, Cindy Landgren, Cory M. Bryant, Food Mycotoxins: An Update, *Journal of Food Science*, Volume 71, Issue 5, p.R51–R65, **2006**.
- [179] Sabuncuoğlu, S.A., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G., Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması, *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28(1), 63-92, **2008**.
- [180] Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M.H., Le Bon, A.M., Mechanisms of Protection Against Aflatoxin B(1) Genotoxicity in Rats Treated by Organosulfur Compounds from Garlic, *Carcinogenesis*, 23(8), 1335, **2002**.
- [181] Özkaya, S., Temiz, A., Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 01 (01), 1-21, **2003**.
- [182] Manson, M.M., Ball, H.W., Barrett, M.C., Clark, H.L., Judah, D.J., Williamson, G., Neal, G.E., Mechanism of Action of Dietary Chemoprotective Agents in Rat Liver: Induction of Phase I And II Drug Metabolizing Enzymes and Aflatoxin B1 Metabolism, *Carcinogenesis*, 18(9), 1729, **1997**.
- [183] Cavin, C., Mace, K., Offord, E.A., Schilter, B., Protective Effects of Coffee Diterpenes Against Aflatoxin B1 –Induced Genotoxicity: Mechanism in Rat and Human Cells, *Food and Chemical Toxicology*, 39, 546, **2001**.

- [184] Wild, C.P., Turner, P.C., The Toxicology of Aflatoxins as a Basis for Public Health Decisions, *Mutagenesis*, 17(6), 471, **2002**.
- [185] Nehra, V., Kumar, A., Dwivedi, H.K., Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources, *International Journal of Engineering*, 53-68, vol 2(1), **2008**.
- [186] Conrads H., Schmidt M., Plasma generation and plasma sources, *Plasma Sources Science and Technology*, 9: 441–454, **2000**.
- [187] Langmuir, I., Oscillations in Ionized Gases. *PNAS*, 14, 627, **1928**.
- [188] Grzegorzewski, F., Influence of Non-Thermal Plasma Species on the Structure and Functionality of Isolated and Plant-based 1,4-Benzopyrone Derivatives and Phenolic Acids, PhD thesis, Prozesswissenschaften der Technischen Universität, Berlin, **2011**.
- [189] Lieberman M.A. ve Lichtenberg A.J., *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing*, 2nd edn (New York: Wiley), **2005**.
- [190] Niemira, B.A., Cold Plasma Decontamination of Foods, *Food Science and Technology*, 3:15.1–15.18, **2012**.
- [191] Nehra, V., Kumar A., Dwivedi, H.K., Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources, *International Journal of Engineering*, 2(1), 53-68, **2008**.
- [192] Braithwaite, N.J., Introduction to gas discharges, *Plasma Sources Science and Technology*, 9:517-527, **2000**.
- [193] Şen, Y., *Polimerik ve Metalik Malzemelerin Isıl Olmayan Plazma Yöntemiyle Farklı Gaz Kompozisyonları Kullanılarak Sterilizasyonunun İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2010**.
- [194] Yun, H., Kim B., Jung S., Kruk Z.A., Kim D.B., Choe W., Jo C., Inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on disposable plastic tray, aluminum foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma, *Food Control*, 21:1182–1186, **2010**.
- [195] Klockow, P., Keener, K.M., Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone generation system, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 42(6):1047–1053, **2009**.
- [196] Mathew, T., Datta, R.N., Dierkes, W.K., Noordermeer, J.W.M., Van-Ooij, W.J., Mechanistic Investigations of Surface Modification of Carbon Black and Silica by Plasma Polymerisation, *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 28, 273, **2008**.
- [197] Raballand, V., Benedikt, J., Wunderlich, J., Von Keudell, A., Inactivation of *Bacillus atrophaeus* and of *Aspergillus niger* using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41, 115207, **2008**.
- [198] Ünver, A., Plasma induced solid state polymerization of n-isopropylacrylamide (NIPAM), Doktora Tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [199] Anonim, Examples of different Plasmamatreat® nozzle heads, http://www.plasmamatreat.com.tr/plazma_tesisleri_bilesenleri/plazma_agizlari_soguk_plazma_uretme.html (Aralık, **2014**).
- [200] Shama, G., Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 1–8, **2007**.
- [201] 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**.

- [202] Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A.H., Spilimbergo S., Elst K., Van Ginneken L., Debevere J., Van Impe J.F., Devlieghere F., High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future, *International Journal of Food Microbiology*, 117: 1–28, **2007**.
- [203] Brendan, A.N., Joseph, S., Cold plasma inactivation *Salmonella Stanley* and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on golden delicious apples, *Journal of Food Protection*, 71, 1357–1365, **2008**.
- [204] 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(5), 2284, **1999**.
- [205] Pankaj S.K., Bueno-Ferrer C., Misra N.N., Milosavljević V., O'Donnell C.P., Bourke P., Keener K.M., Cullen P.J., Applications of cold plasma technology in food packaging, *Trends in Food Science & Technology*, 35(1): 5–17, **2014**.
- [206] Lee, J.H., Sung, T.H., Lee, K.T., Kim, M.R., Effect of gamma-irradiation on color, pungency, and volatiles of Korean red pepper powder, *Journal of Food Science*, Vol. 69, 8, **2004**.
- [207] Ito, H., Bunnak, J., Aflatoxin production by microorganisms of the *Aspergillus flavus* group in species and effect of irradiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(2):141-142, **1994**.
- [208] Cemeroğlu, B., Acar, J., *Meyve ve Sebze Teknolojisi*. Literatür Yayıncılık, Ankara, 496s., **1986**.
- [209] Fellow, P., *Food processing technology*, Camelout Press, Southampton, UK, **1986**.
- [210] Venugopal, V., Doke S.N., Thomas, P., Radiation processing to improve the quality of fishery products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39 (5), 391-440, **1999**.
- [211] Ayhan, H., İyonize Işıkların Gıda Bileşenleri Üzerine Etkileri, *Gıda*, 18 (4), 265-268, **1993**.
- [212] Von Sonntag, C., Free-Radical Reactions of Carbohydrates as Studied by Radiation Techniques, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Volume 37, Pages 7–77, **1980**.
- [213] Josephson E.S., Peterson M.S., *Preservation of food by ionizing radiation (II)*, Boca Raton, FL, CRC Press.102-103, **2000**.
- [214] Diehl, J.F., *Safety of Irradiated Foods*. Marcel Dekker, INC., New York, USA 41, 196 s, **1990**.
- [215] Sirajuddin, D., Plasma Sterilization, <http://itcanbeshown.com/NERS590/Project/Final%20Report/David%20Sirajuddin%20%20Plasma%20Sterilization.pdf>, (**2007**).
- [216] Lerouge, S., Wertheimer, M.R., Yahia, L'H., Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations, *Plasmas and Polymers*, 6(3), **2001**.
- [217] Lee, K., Paek, K., Ju, W., Lee, Y., Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric pressure cold plasma using helium and oxygen, *Journal of Microbiology*, 44, 269–275, **2006**.
- [218] Ermolaeva, S.A., Varfolomeev, A.F., Chernukha, M.Y., Yurov, D.S., Vasiliev, M.M., Kaminskaya, A.A., Moisenovich, M.M., Romanova, J.M., Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and

- in the animal model of infected wounds, *Journal of Medical Microbiology*, 60:75–83, **2011**.
- [219] Lerouge, S., Wertheimer, M.R., Marchand, R., Tabrizian, M., Yahia, L.H., Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization, *Journal of Biomedical Materials Research*, 51:128–135, **2000**.
- [220] Purevdorj, D., Igura, N., Ariyada, O., Hayakawa, I., Effect of feed gas composition of gas discharge plasmas on *Bacillus pumilus* spore mortality. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 31–34, **2003**.
- [221] Zhang, M., Oh, J.K., Cisneros-Zevallos, L., Akbulut, M., Bactericidal effects of nonthermal low-pressure oxygen plasma on *S. typhimurium* LT2 attached to fresh produce surfaces, *Journal of Food Engineering*, 119, 425–432, **2013**.
- [222] Joshi, S.G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U.K., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A., Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 55, 1053–1062, **2011**.
- [223] Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A., Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue, *New Journal of Physics*, 11, **2009**.
- [224] Laroussi, M., Alexeff, I., Kang, W., Biological decontamination by non-thermal plasmas, *IEEE Transactions on Plasma Sciences*, 28, pp.184-188, **2000**.
- [225] Rezai, R.F., *Inactivation of Bacteria by Non-Thermal Plasmas*, ISBN 978-953-307-309-5, Publisher: InTech, 386 pages, 25-54, **2011**.
- [226] Vleugels M, Shama G, Deng XT, Greenacre E, Brocklehurst T, Kong MG., Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 33(2): 824-828, **2005**.
- [227] Kong, M., Laroussi, M., *About plasmas; Destroying biological hazards*, http://www.plasmacoalition.org/plasma_writeups/destroying-biohazards.pdf. (Kasım, **2014**).
- [228] Torkamani, A.E., Niakousari, M., Impact of UV-C light on orange juice quality and shelf life, *International Food Research Journal*, 18(4): 1265-1268, **2011**.
- [229] Montgomery, J. M., *Water Treatment: Principles and Design*, New York: John Wiley, **1985**.
- [230] Miller, R., Jeffrey, W., Mitchell, D., Elasri, M., Bacteria responses to ultraviolet light, *American Society for Microbiology*, 65: 535– 541, **1999**.
- [231] Laroussi, M., Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 24 (3), 1188 – 1191, **1996**.
- [232] Deng, X. T., Shi, J., Kong, M. G., *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34 1310, **2006**.
- [233] Perni, S., Shama, G. Hobman, L., Lund, P.A., Kershaw, C.J., Hidalgo-Arroyo, G.A., Penn, C.W., Deng, X.T., Walsh, J.L., Kong, M.G., Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with *Escherichia coli* mutants, *Applied Physics Letters*, 90 (7), 073902, **2007**.

- [234] Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A.B, Vasilets, V.N., Fridman, A., Applied plasma medicine, *Plasma Processes Polymers*, 5, 503, **2008**.
- [235] Morfill, G.E., *The Munich plasma medicine project: results and current status*, Presented at 2nd Int. Conf., **2009**.
- [236] Stoffels E., Flikweert A.J., Stoffels W.W., Kroesen G.M.W., Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials, *Plasma Sources Science and Technology*, 11 383, **2002**.
- [237] Kim G.C., Kim G.J., Park S.R., Jeon S.M., Seo S.J., Iza F., Lee, J.K., Air Plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42 032005, **2009**.
- [238] Lee H.J., Shon C.H., Kim Y.S., Kim S., Kim G.C., Kong M.G., Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma, *New Journal of Physics*, 11, 115026 doi:10.1088/1367-2630/11/11/115026, **2009**.
- [239] Jiang C., Chen M.T., Schaudinn C., Gorur A., Vernier P.T., Costerton J.W., Jaramillo D.E., Sedghizadeh P.P., Gundersen M.A., Pulsed Atmospheric-Pressure Cold Plasma for Endodontic Disinfection, *IEEE Transactions on Plasma Sciences*, 37, 1190, **2009**.
- [240] Perni S., Liu D.W., Shama G., Kong M.G., Cold atmospheric plasma decontamination of the pericarps of fruit, *Journal of Food Protection*, 71: 302-308, **2008**.
- [241] Herrmann, H.W., Selwyn, G.S., Henins, I., Park, J., Jeffery, M., Williams, J. M., Chemical Warfare Agent Decontamination Studies in the Plasma Decon Chamber, *IEEE Transactions on Plasma Sciences*, 30(4), 1460, **2002**.
- [242] Bol'shakov, A.A., Cruden, B.A., Mogul, R., Rao, M.V.V.S., Sharma, S.P., Khare, B.N., Meyyappan, M., Radio-frequency oxygen plasma as a sterilization source, *The American Institute of Aeronautics and Astronautics*, 42, 823-832, **2004**.
- [243] Schuerger, A.C., Trigwell, S. and Calle, C.I., Use of non-thermal atmospheric plasmas to reduce the viability of *Bacillus subtilis* on spacecraft surfaces, *International Journal of Astrobiology*, 7, 47-57, **2008**.
- [244] Klockow P.A., Keener K.M., *Quality and Safety Assessment of Packaged Spinach Treated with a Novel Atmospheric, Non-Equilibrium Plasma System*. Presented at ASABE Annual Meeting, **2008**.
- [245] Schwabedissen, A., Lacinski, P., Chen, X., Engemann, J., PlasmaLabel – a new method to disinfect goods inside a closed package using dielectric barrier discharges, *Contributions to Plasma Physics*, 47, 551–558, **2007**.
- [246] Misra N.N., Keener K.M., Bourke P., Mosnier J.P., Cullen P.J., In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2): 177-182, **2014**.
- [247] Misra N.N., Moiseev T., Patil S., Pankaj S. K., Bourke P., Mosnier J. P., Keener K. M., Cullen P. J., Cold Plasma in Modified Atmospheres for Post-harvest Treatment of Strawberries, *Food and Bioprocess Technology*, 7(10): 3045-3054, **2014**.

- [248] Misra, N.N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J.P., Keener, K. M., Cullen, P.J., In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries, *Journal of Food Engineering*, 125, 131-138, **2014**.
- [249] Ziuzina D., Patil S., Cullen P.J., Keener K.M., Bourke P., Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce, *Food Microbiology*, 42:109-116, **2014**.
- [250] Niemira B.A., Sites J., Cold plasma inactivates *Salmonella stanley* and *Escherichia coli* O157: H7 inoculated on Golden Delicious apples, *Journal of Food Protection*, 71: 1357-65, **2008**.
- [251] Perni, S., Shama, G., Kong, M.G., Cold Atmospheric Plasma Disinfection of Cut Fruit Surfaces Contaminated with Migrating Microorganisms, *Journal of Food Protection*, 71(8), 1619, **2008**.
- [252] Baier, M., Foerster, J., Schnabel, U., Knorr, D., Ehlbeck, J., Herppich, W.B., Schlüter, 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**.
- [253] Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L.W., Geyer, M., Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma, *Food Chemistry*, 122, 1145–1152, **2010**.
- [254] Grzegorzewski, F., Ehlbeck, J., Schluter, O., Kroh, L.W., Treating lamb's lettuce with a cold plasma – Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2285–2289, **2011**.
- [255] Fernandez A., Noriega E., Thompson A., Inactivation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology, *Food Microbiology*, 33:24–9, **2013**.
- [256] 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(5), 1137–1148, **2014**.
- [257] Kim, J.E., Lee, D.U., Min, S.C., Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma, *Food Microbiology*, 38:128-136, **2014**.
- [258] Volin, J.C., Denes, F.S., Young, R.A., Park, S.M., Modification of Seed germination Performance through Cold Plasma Technology, *Crop Science*, 40, 1706, **2000**.
- [259] Dhayal, M., Lee, S.Y., Park, S.U., Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorium* L. seed surface modification, *Vacuum*, 80, 499, **2006**.
- [260] Chen, H.H, Investigation of Properties of Long-grain Brown Rice Treated by Low-pressure Plasma, *Food and Bioprocess Technology*, 7(9):2484-2491, **2014**.
- [261] Chen, H.H., Hung, C.L., Lin, S.Y., Liou G.J., Effect of Low-Pressure Plasma Exposure on the Storage Characteristics of Brown Rice, *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 471-477, **2015**.
- [262] Lee, H.J., Jung, H., Choe, W., Ham, J.S., Lee, J.H., Jo, C., Inactivation of *Listeria monocytogenes* on agar and processed meat surfaces by

- atmospheric pressure plasma jets, *Food Microbiology*, 28, 1468–1471, **2011**.
- [263] Dirks, B. P., Dobrynin, D., Fridman, G., Mukhin, Y., Treatment of raw poultry with nonthermal dielectric barrier discharge plasma to reduce *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*, *Journal of Food Protection*, 75, 22–28, **2012**.
- [264] Chiper, A.S., Chen, W., Mejlholm, O., Dalgaard, P., Stamate, E., Atmospheric pressure plasma produced inside a closed package by dielectric barrier discharge in Ar/CO₂ for bacterial inactivation of biological samples, *Plasma Sources Science and Technology*, 20, 1-10, **2011**.
- [265] Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W. and Jo, C. Effect of atmospheric pressure plasma on activation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiology*, 28, 9–13, **2011**.
- [266] Ragni, L., Berardinelli, A., Vannini, L., Montanari, C., Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *Journal of Food Engineering*, 100, 125–132, **2010**.
- [267] Noriega, E., Shama, G., Laca, A., Diaz, M., Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*, *Food Microbiology*, 28, 1293–1300, **2011**.
- [268] Rod, S. K., Hansen, F., Leipold, F., Knochel, S., Cold atmospheric pressure plasma treatment of ready-to-eat meat: inactivation of *Listeria innocua* and changes in product quality, *Food Microbiology*, 30, 233–238, **2012**.
- [269] Shi, X.M., Zhang, G.J., Wu, X.L., Li, Y.X., Effect of low-temperature plasma on microorganism inactivation and quality of freshly squeezed orange juice, *IEEE Transactions on Plasma Sciences*, 39, 1591–1597, **2011**.
- [270] Bai, Y., Chen, J., Mu, H., Zhang, C., Li, B., Reduction of Dichlorvos and Omeathe Residues by O₂ Plasma Treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6238, **2009**.
- [271] Misra N.N., Pankaj S.K., Walsh T., O'Regan F., Bourke P., Cullen P.J., In-package nonthermal plasma degradation of pesticides on fresh produce, *Journal of Hazardous Materials*, 271:33–40, **2014**.
- [272] Zou, J.J., Liu, C.J., Eliasson, B., Modification of starch by glow-discharge, Plasma, *Carbohydrate Polymers*, 55, 23, **2004**.
- [273] Sakudo A., Higa M., Maeda K., Shimizu N., Imanishi Y., Shintani H., Sterilization mechanism of nitrogen gas plasma: induction of secondary structural change in protein, *Microbiology and Immunology*, 57(7):536-42, **2013**.
- [274] Misra N.N., Kaur S., Tiwari B.K., Kaur A., Singh N, Cullen P.J., Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour, *Food Hydrocolloids* 44:115-121, **2015**.
- [275] Pankaj, S.K., Misra, N.N., Cullen, P.J., Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 153–157, **2013**.

- [276] Surowsky, B., Fischer, A., Schlueter, O., Knorr, D., Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 146–152, **2013**.
- [277] Park, B.J., Lee, D.H., Park, J., Lee, I., Lee, K., Hyun, S.O., Chun, M., Chung, K., Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure, *Physics of Plasmas*, 10(11), 4539-4544, **2003**.
- [278] Daniels, S.L., Laroussi, M., Bebe, S.J., On the ionization of air for removal of noxious effluvia (air ionization of air indoor environments for control of volatile and particulate contaminants with nonthermal plasmas generated by dielectric-barrier discharge, *IEEE Transaction on Plasma Science*, 30(4), 1471-1481, **2002**.
- [279] Jōgi, I., *Characteristics and classification of plasmas*, PlasTEP trainings course and Summer school, Warsaw, **2011**.
- [280] Gordillo-Vázquez, F.J., Air plasma kinetics under the influence of sprites, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41, 234016, **2008**.
- [281] Eto, H., Ono, Y., Ogino, A., Nagatsu, M., Low-temperature sterilisation of wrapped materials using flexible sheet-type dielectric barrier discharge, *Applied Physics Letters*, 93, 221502, **2008**.
- [282] Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K.M., Bourke, P., Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside a sealed package, *Journal of Applied Microbiology*, 114 (3):778-87, **2013**.
- [283] Leipold, F., Schultz-Jensen N., Kusano Y., Bindslev H., Jacobsen T., Decontamination of objects in a sealed container by means of atmospheric pressure plasmas, *Food Control*, 12(8):1296–1301, **2011**.
- [284] Keener, K. M., Jensen, J., Valdramidis, V., Byrne, E., Connolly, J., Mosnier, J., Decontamination of Bacillus subtilis spores in a sealed package using a non-thermal plasma system, (Eds: In K. Hensel, & Z. Machala), NATO Advanced Research Workshop: plasma for bio-decontamination, medicine and food security (pp. 445-455), Jasna, Slovakia, **2012**.
- [285] Misra, N.N., Tiwari, B.K., Raghavarao, K.S.M.S., Cullen, P.J., Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens, *Food Engineering Reviews*, 3, 159-170, **2011**.
- [286] Leipold, F., Kusano, Y., Hansen, F., Jacobsen, T., Decontamination of a rotating cutting tool during operation by means of atmospheric pressure plasmas, *Food Control*, 21:1194–1198, **2010**.
- [287] Schneider, J.T., Baumgartner K.M., Feichtinger J., Krüger J., Muranyic 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 and Coatings Technology*, 200(1–4), 962–966, **2005**.
- [288] Fernandez, A., Shearer N., Wilson D.R., Thompson A., Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of Salmonella enterica serovar Typhimurium, *International Journal of Food Microbiology*, 152 (3):175-80, **2011**.
- [289] Anonim, Findik İstatistikleri, <http://www.kib.org.tr/tr/istatistikler-findik-istatistikleri.html> (Aralık, **2014**).
- [290] Anonim, Properties of aflatoxin and it producing fungi <http://www.icrisat.org/aflatoxin/aflatoxin.asp>. (Aralık, **2014**).

- [291] Anonim, Food and Agricultural commodities production, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Kasım, **2014**).
- [292] Alasalvar, C., Shahidi, F., Ohshima, T., Wanasundara, U., Yurttas, H.C., Liyanapathirana, C.M., Rodrigues, F.B., Turkish Tömbul Hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid Characteristics and Oxidative Stability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3797-3805, **2003**.
- [293] Özdemir, M., Devres, O., Turkish hazelnuts: properties and effect of microbiological and chemical changes on quality, *Food Reviews International*, 15, 309-333, **1999**.
- [294] Parcerisa, J., Richardson, D. G., Rafecas, M., Codony, R., Boatella, J., Fatty acid distribution in polar and nonpolar lipid classes of hazelnut oil (*Corylus avellana* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3887-3890, **1997**.
- [295] Hu, F.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Hennekens, C. H., Willett, W.C., Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study, *British Medical Journal*, 317, 1341-1345, **1998**.
- [296] Fraser, G.E., Nut consumption, lipids, and risk of a coronary event. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. Volume 9 Issue Suppl. Page S28.
- [297] Bada, J.C., León-Camacho, M., Prieto, M., Alanso, L., Characterization of oils of hazelnuts from Austrias, Spain. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 294–300, **2004**.
- [298] USDA National Nutrient Database for Standard Reference, <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/> **2014**.
- [299] O'Dell, B. L.; Sunde, R. A. *Introduction. In Handbook of Nutritionally Essential Minerals*, (eds.; O'Dell, B. L.; Sunde, R. A., Marcel Dekker), New York, 1-12, **1997**.
- [300] Anonim, *Kırmızı Biber-Acı, Pul (Yaprak)*. TS 3706, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, **1986**.
- [301] Santos, L., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., *Capsicum* and mycotoxin contamination: state of the art in a global context, *Food Science and Technology International*, 14, 5–20, **2008**.
- [302] Marin S., Colom C., Sanchis V., Ramos A.J., Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability, *International Journal of Food Microbiology*, 128 (3), 491–6, **2009**.
- [303] Freire, F.C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R., Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts, *Mycopathologia*, 149 (1), 13–19, **2000**.
- [304] Vrabcheva, T.M., *Mycotoxin in spices*, *Voprosy Pitaniia*, 69:40-43, **2000**.
- [305] Coşkun F., Tekirdağ Piyasasında Satılan Bazı Baharatların Mikrobiyolojik Özellikleri, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7(1), **2010**.
- [306] Basaran P., Bektes A., Monitoring aflatoxin contamination risks in red pepper spice produced in Turkey, *Vidyodaya Journal of Science*, 5,17-26, **2010**.
- [307] Anonymous, Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Commission Regulation (EU) No 165/2010. Official Journal of the European Union, **2010**.

- [308] Akgül, A., *Baharat Bilimi ve Teknolojisi*. Gıda Teknolojisi Derneği. No: 15, Ankara, 451s, **1993**.
- [309] Set E., Erkmen O., The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey, *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2532–2537, **2010**.
- [310] Farkas J., Radiation processing of dry food ingredients—a review, *Radiation Physics and Chemistry*, 25:271–80, **1985**.
- [311] Li H., Parry J.W., Phytochemical Compositions, Antioxidant Properties, and Colon Cancer Antiproliferation Effects of Turkish and Oregon Hazelnut, *Food and Nutrition Sciences*, 2, 1142-1149, **2011**.
- [312] Connor, W.E., Importance of n-3 Fatty Acids in Health and Disease, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 71, 171-175, **2000**.
- [313] Aronson, W.J., Glaspy, J.A., Reddy, S.T., Reese, D., Heber, D., Bagga, D., Modulation of Omega-3/Omega-6 Polyunsaturated Ratios with Dietary Fish Oils in Men with Prostate Cancer, *Urology*, Vol. 58, No. 2, 283-288, **2001**.
- [314] Iso, H., Sato, S., Umemura, U., Kudo, M., Koike, K., Kitamura, A., Imano, H., Okamura, T., Naito Y., Shi-mamoto, T., Linoleic Acid, Other Fatty Acids, and the Risk of Stroke, *Stroke*, Vol. 33, 2086-2093, **2002**.
- [315] Oshima S., Ojima F., Sakamoto H., Ishiguro Y., Terao J., Supplementation with Carotenoids Inhibits Singlet Oxygen-Mediated Oxidation of Human Plasma Low-Density Lipoprotein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44, No. 8, 2306-2309, **1996**.
- [316] Jin, D., Mumper, R.J., Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352, **2010**.
- [317] Zhang, L., Ravipati, A.S., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S., Reddy, N., Smith, P.T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Münch, G., Wu, M.J., Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59,12361–12367, **2011**.
- [318] Sawadogo, W.R.; Maciuk, A.; Banzouzi, J.T.; Champy, P.; Figadere, B.; Guissou, I.P.; Nacoulma, O.G., Mutagenic effect, Antioxidant and anticancer activities of six medicinal plants from Burkina Faso, *Natural Product Research*, 26, 575–579, **2012**.
- [319] Kusirisin, W., Srichairatanakool, S., Lerttrakarnnon, P., Lailerd, N., Suttajit, M., Jaikang, C., Chaiyasut, C., Antioxidative activity, Polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients, *Medicinal Chemistry*, 5, 139–147, **2009**.
- [320] Routray, W., Orsat, V., Review: Microwave-assisted extraction of flavonoids, *Food and Bioprocess Technology*, 5, 409–424, **2012**.
- [321] Naczki, M., Shahidi, F., Review: Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111, **2004**.
- [322] Bignami, C., Bertazza, G., Cristofori, V., Troso, D., Kernel quality and composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Acta Horticulturae* (ISHS), 686, 477–484, **2005**.
- [323] Richardson, D.G., The health benefits of eating hazelnuts: Implications for blood lipid profiles, coronary heart disease, and cancer risks, *Acta Horticulturae* (ISHS), 445, 295–300, **1997**.

- [324] Yurttas, H.C., Schafer, H.W., Warthesen J.J., Antioxidant Activity of Nontocopherol Hazelnut (*Corylus spp.*) Phenolics, *Journal of Food Science*, Volume 65, 2, 276–280, **2000**.
- [325] Cheynier, V., Polyphenols in foods are more complex than often thought, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223, **2005**.
- [326] Shahidi F., Alasalvar C., Liyana-Pathirana C.M., Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4):1212-1220, **2007**.
- [327] Oboh, G., Batista, J., Rocha, T., Polyphenols in red pepper [*Capsicum annum* var. *Aviculare* (Tepin)] and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver, *European Food Research and Technology*, 225:239–247, **2007**.
- [328] Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C.M., Ohshima, T., Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1 Compositional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3790–3796, **2003**.
- [329] Mosmann T., Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63, **1983**.
- [330] Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R., Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Research*, 48:589-601, **1988**.
- [331] Öztopçu, P., Kabadere, S., Uyar, R., K-3 Vitamininin Sıçan Glioma (C6) ve İnsan Glioblastoma Multiforme Hücre Çoğalmasına İn-vitro Etkileri, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 6(1): 21–25, **2005**.
- [332] Gescher, A.J., Sharma R.A., Steward W.P., Cancer chemoprevention by dietary constituents: A tale of failure and promise, *The Lancet Oncology*, 2: 371-379, **2001**.
- [333] Shirazi, F.H., Hassan, Y., Felor, K., Laila, H., Pistachio Extracts Effects on the Aflatoxin B1 Cytotoxicity in HepG2 Cells, *International Journal of Pharmacology*, 2 (2): 233-239, **2006**.
- [334] TS 2134, *Baharat Rutubet Miktarının Tayini (Toluen Metodu)*, **1975**.
- [335] TS 1632 EN ISO 665, *Yağlı tohumlar- Rutubet ve uçucu madde muhtevasının tayini*, **2001**.
- [336] Topuz, A., *Farklı Gamma Işınlama Dozlarının ve Depolamanın Kırmızı Pul Biberin (*Capsicum annum* L.) Bazı Kimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Kalitesi Üzerine Etkisi*, (Doktora Tezi), Akdeniz Üniveristesii Fen Bilimleri Enstitüsü, **2002**.
- [337] ASTA, *Official analytical methods of the merican Spices Tade Association*. 2nd Ed. Amer. Spices Trade Assn. Englewood Cliffs, New Jersey, **1968**.
- [338] AOCS Ca 5a-40, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th edn., (Etd: D. Firestone), *American Oil Chemists' Society*, Champaign, Ca 5a-40, **1989**.
- [339] AOCS Method Cd 8-53, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Peroxide Value, Acetic Acid – Chloroform Method, *American Oil Chemists' Society*, Champaign, **1992**.

- [340] Arcan, I., Yemenicioğlu, A., Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 ,184–188, **2009**.
- [341] Al-Farsi, M., Lee, C.Y., Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds, *Food Chemistry*, 108, 977–985, **2008**.
- [342] Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., Marín-Arroyo, M.R., Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments, *European Food Research Technology*, Vol.232, 211-220, **2011**.
- [343] Rio, D.D., Calani, L., Dall’Asta, M., Brighenti, F., Polyphenolic Composition of Hazelnut Skin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9935–9941, **2011**.
- [344] Artık, N., *Türk Fındıklarının Fenolik Bileşik Dağılımı ve Kavurma Prosesinde Değişimi*, Ankara üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi sonuç raporu, proje No: 2001-07-11-045, **2004**.
- [345] Chandrasekara, K., Shahidi, F., Effect of Roasting on Phenolic Content and Antioxidant Activities of Whole Cashew Nuts, Kernels, and Testa, Neel, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5006–5014, **2011**.
- [346] Hervert-Hernandez, D.G., Sayago-Ayerdi, S., Goni, I., Bioactive Compounds of Four Hot Pepper Varieties (*Capsicum annum* L.), Antioxidant Capacity, Intestinal Bioaccessibility, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3399–406, **2010**.
- [347] AOCS Ce 8-89,(Edt: Frankel, E.) Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists’ Society (AOCS), 4th ed.; *American Oil Chemists’ Society:Champaign*, **1998**.
- [348] AOAC, 991.31, Aflatoxins determination in corn, raw peanut and peanut butter, **1994**.
- [349] Stroka, J.A.E., Jorissen, U., Gilbert, J., AOAC Official Method 999.07, Immunoaffinity column cleanup with liquidchromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study." *Journal of AOAC International*, 83, 320-40, **2000**.
- [350] Petrikkou, E., Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., Gómez, A., Molleja, A., Mellado, E., Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4): 1345–1347, **2001**.
- [351] Aberkane, A., Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Petrikkou, E., Mellado, Monzón, A., Rodriguez-Tudela J.L., the Eurofung Network, Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 719–722, **2002**.
- [352] TS 3075, Hazelnut Kernels Standard, <http://www.turkish-hazelnut.org/hazelnut/pdf/3075.pdf>, (Ocak, **2012**).
- [353] Bertalanffy F.D., Cytodiagnosis of Cancer Using Acridine Orange with Fluoresence Microscopy, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; 10; 118-123, **1960**.
- [354] Göktürk, I., *Acridine Orange İçeren Phema Nanopartiküller ile L929 Fibroblast Hücre Hattının Etkileşimi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.

- [355] Güven B., Basaran-Akgul N., Temur E., Tamer U. Boyaci I.H., SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic particles for Escherichia coli enumeration, *Analyst*, 136,740-748, **2011**,
- [356] Scheffe, H., A method of judging all contrasts in the analysis of variance, *Biometrika*, 40, 87-104, **1953**.
- [357] *Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği* (TEBLİĞ NO: 2013/12) <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=9.5.17268&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=baharat>, (Ocak, **2014**).
- [358] Minguez-Mosquera, M.I., Hornero-Mendez, D., Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of Capsicum annum cv. Bola and Agridulce, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 38–44, **1994**.
- [359] Jaren-Galan, M., Minguez-Mosquera, M.I., Effect of pepper lipoxygenase activity and its linked reactions on pigments of the pepper fruit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (11): 4532-4536, **1999**.
- [360] Matthaus, B., Ozcan, M.M., The comparison of properties of the oil and kernels of various hazelnuts from Germany and Turkey, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 801–806, **2012**.
- [361] Krysiak, W., Effects of convective and microwave roasting on the physicochemical properties of cocoa beans and cocoa butter extracted from this material, *Grasas Aceites*, 62, 467–478, **2011**.
- [362] Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı İle Anılan Yağlar Tebliği (tebliğ no: 2012/29) <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=9.5.16053&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=ya%C4%9Flar>, (Ocak, **2013**).
- [363] Golge, E., Ova, G., The effects of food irradiation on quality of pine nut kernels. *Radiation Physics and Chemistry*, 77,365–369, **2008**.
- [364] Gecgel, U., Gumus, T., Tasan, M., Daglioglu, O., Arici, M., Determination of fatty acid composition of g-irradiated hazelnuts, walnuts, almonds, and pistachios, *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 578–581, **2011**.
- [365] Perren, R., Schweiz, A., Handschin, S., Escher, F., Veränderung der mikrostruktur von hasselnüssen während der rostung, *Verfahrenstechnik*, 2:68-71, **1996**.
- [366] Mexis, S.F., Kontominas, M.G., Effect of g-irradiation on the physicochemical and sensory properties of hazelnuts (*Corylusavellana*L.), *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 407–413, **2009**.
- [367] Barbagallo, R.N., Chisari, M., Patané, C., Polyphenol oxidase, total phenolics and ascorbic acid changes during storage of minimally processed 'California Wonder' and 'Quadrato d'Asti' sweet peppers, *LWT - Food Science and Technology*, 49, 192-196, **2012**.
- [368] Scott, G., *Antioxidants in science, technology, medicine and nutrition*, Chichester: Albion Publishing, **1997**.
- [369] Kayahan, M., *Modifiye yağlar ve üretim teknolojileri*. Ankara: ODTÜ Geliştirme VakfıYayıncılık ve İletişim A.Ş. Yayınları, **2002**.
- [370] Garcia-Pascual, P., Mateos, M., Carbonell, V., Salazar, D. M., Influence of storage conditions on the quality of shelled and roasted almonds, *Biosystems Engineering*, 84(2), 201-209, **2003**.

- [371] Taverniers , I., Loose, M. D., Van Bockstaele, E., Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 8, 535-552, **2004**.
- [372] Patel, U.D., Govindarajan, P., Dave, P.J., Inactivation of Aflatoxin B1 by Using the Synergistic Effect of Hydrogen Peroxide and Gamma Radiation, *Applied and Environmental Microbiology*, 465-467, **1989**.
- [373] Ghanem,I., Orfil, M., Shamma, M., Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B1 in food and feed crops, *Brazilian Journal of Microbiology*,39, 4, **2008**.
- [374] Van Dyck, P.J., Tobback, P.,Feys, M., Van De Voorde H., Sensitivity of Aflatoxin B1 to Ionizing Radiation, *Applied And Environmental Microbiology*, 1317-1319, **1982**.

EK-1

AFLATOKSİN İLE KONTAMİNE OLMUŞ LABORATUVAR MALZEMESİNİN DEKONTAMİNASYONU

Aflatoksinler son derece toksik maddeler olduklarından bu maddeler çok dikkatle ele alınmalıdır. Mümkün olan her aşamayı çeker ocak altında yapmaya gayret edilmelidir. Koruyucu eldiven kullanmaya özen gösterilmelidir. Eğer kristal aflatoksinlerle çalışılıyorsa, elektrostatik yapılarından ötürü çalışma alanına dağılma olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Eğer aflatoksin içeren çözelti çalışma alanına dökülürse, üzerine %1 NaOCl ilave edilmelidir. 10 dk bekledikten sonra üzerine % 5 aseton ilave edilmelidir.

Aflatoksinle temas eden bütün cam malzeme metanol ile çalkalanır, su dolu kovaya su hacminin % 1'i kadar NaOCl (çamaşır suyu) ilave edilir, cam malzemeler kovaya atılır, 2 saat sonra toplam hacmin % 5'i kadar aseton ilave edilir. 30 dk beklenir ve malzemeler iyice yıkanır. Aflatoksin içerme ihtimali olduğundan her iki filtrenin de altında kalan numune ekstraktları çamaşır suyu ilave edilmiş su dolu kovaya dökülür.

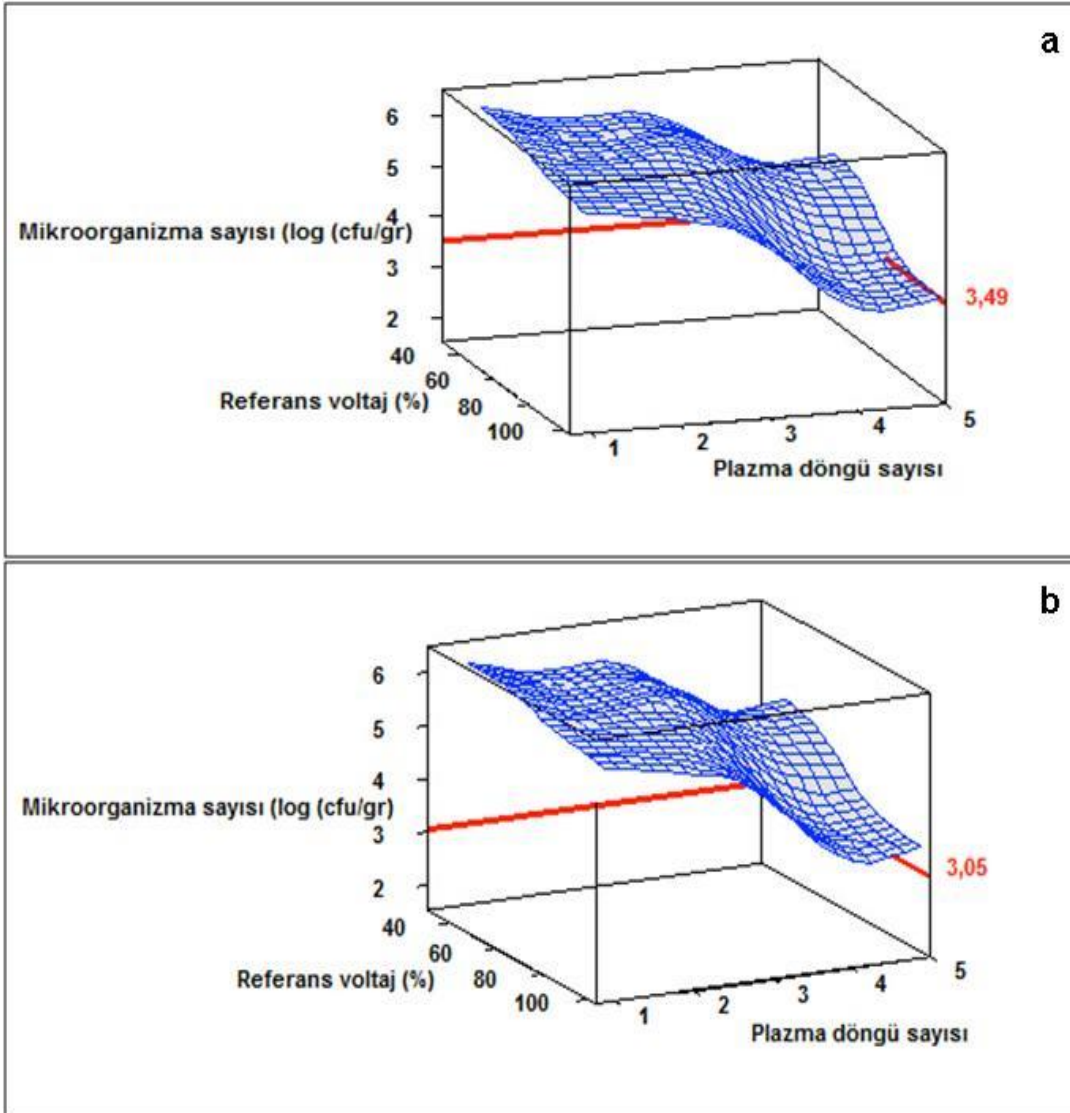
Metanol içeren atıklar bağlı bulunulan enstitünün/tesisın atık politikasına göre değerlendirilmek üzere ayrı bir atık toplama kabında biriktirilir.

Malzemelerdeki çamaşır suyu ve deterjan kalıntıları iyi durulanmadıkları takdirde floresans yayılım yapabilirler. Bu durum florometreden alınan sonuçların hatalı pozitif olmasına yol açabilir. Bunu önlemek için çamaşır suyu ve deterjanla temas eden cam malzemeler durularken azami özen gösterilmelidir.

AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.

EK-2

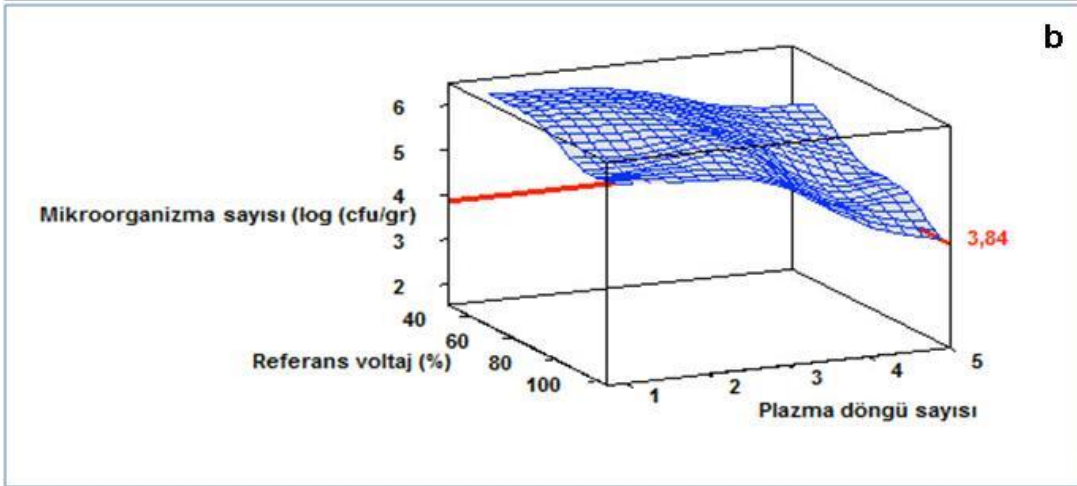
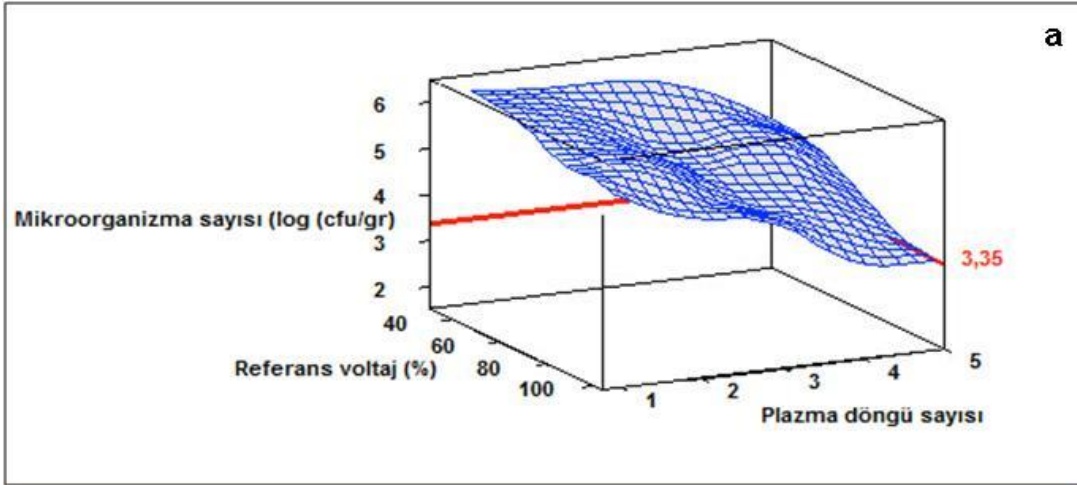
Atmosferik plazma uygulanmış pul biber örneklerine ait üç boyutlu grafik



(a: azot b: hava plazması uygulanmış *A.flavus*)

EK-3

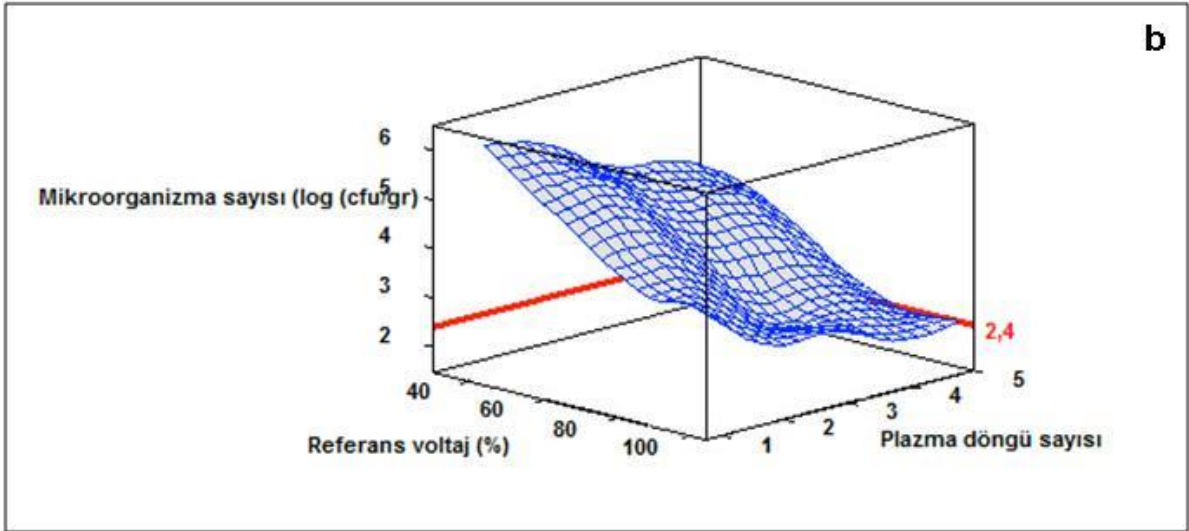
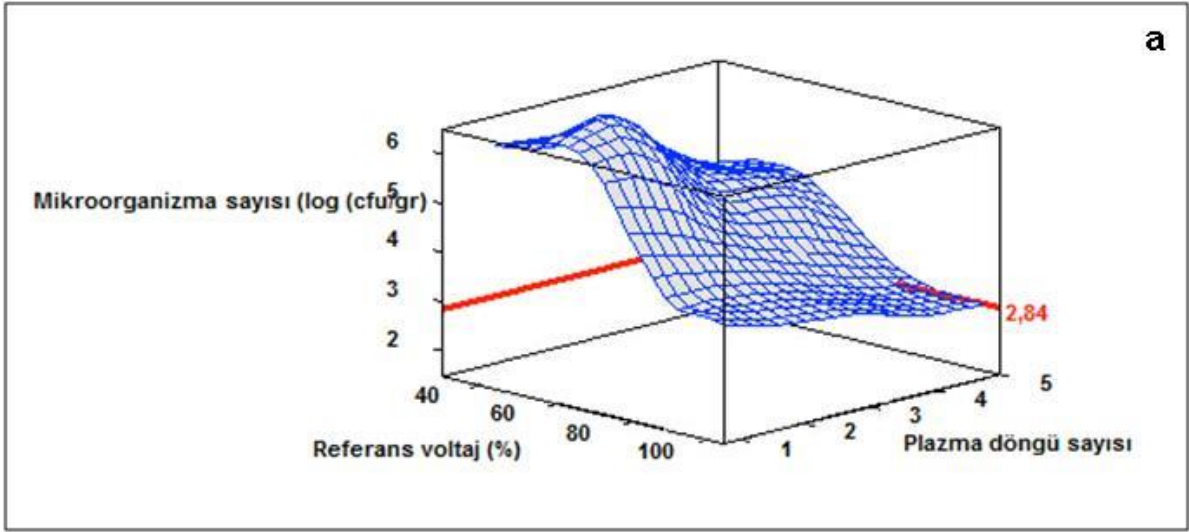
Atmosferik plazma uygulanmış pul biber örneklerine ait üç boyutlu grafik



(a: azot b: hava plazması uygulanmış *A.parasiticus*)

EK-4

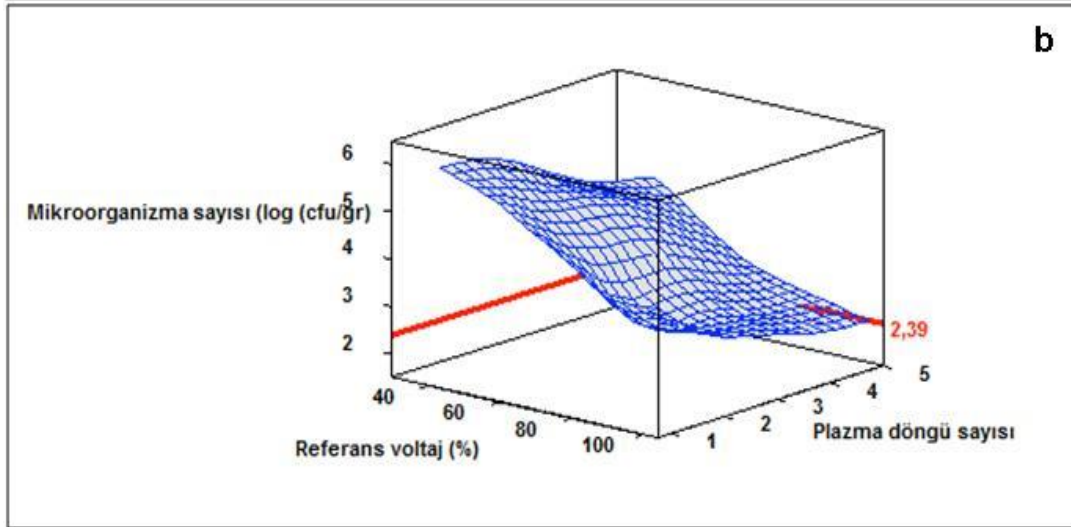
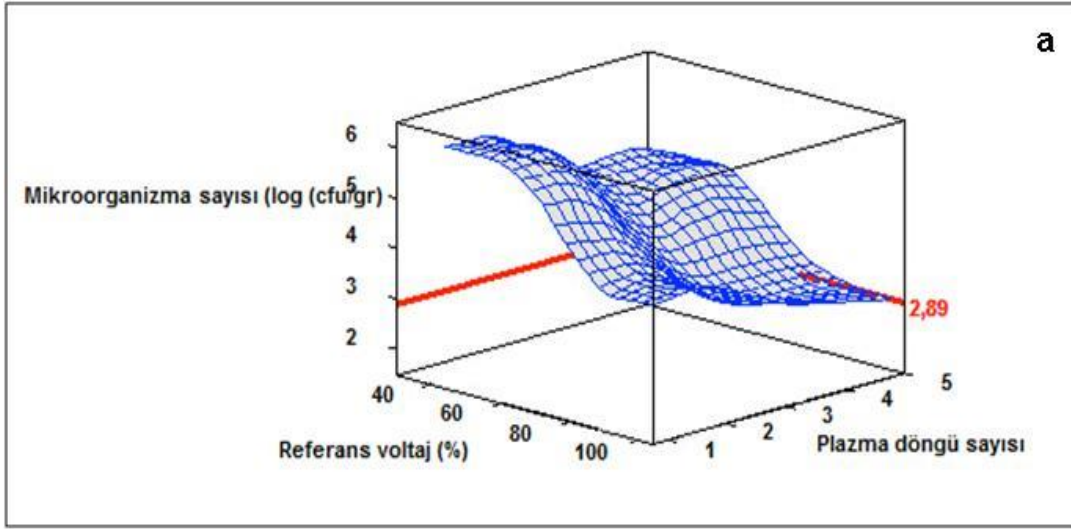
Atmosferik plazma uygulanmış fındık örneklerine ait üç boyutlu grafik



(a: azot b: hava plazması uygulanmış *A.flavus*)

EK-5

Atmosferik plazma uygulanmış fındık örneklerine ait üç boyutlu grafik



(a: azot b: hava plazması uygulanmış *A.parasiticus*)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı :Yasin ŞEN
Doğum Yeri :İZMİR
Medeni Hali :Evli
E-posta :yasinsen@hacettepe.edu.tr
Adresi :Yenimahalle/ANKARA

Eğitim

Lisans 2003-2008: Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara
Y.Lisans 2008-2010: Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik ABD, Ankara,
Doktora 2010-2015: Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, İyi

İş Deneyimi

2008-2011, Ar-Ge Mühendisi, Deltamed Yaşam Bilimleri ve Plazma Teknolojileri
Ar-Ge San. A.Ş. Hacettepe Üniversitesi Teknokent, Ankara

2011-8/2014, Aksaray Üniversitesi, Öğretim Görevlisi, Güzelyurt Meslek
Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Güzelyurt, Aksaray

2013- 8/2014, TC. Cumhurbaşkanlığı, Beslenme ve Besin Güvenliği Şube
Müdürlüğü, Gıda Uzmanı, Ankara

8/2014 - TC. Cumhurbaşkanlığı, Sosyal Hizmetler Müdürlüğü, Gıda
Mühendisi, Ankara

Deneyim Alanları

Gıda muhafaza, Gıda hijyeni, Gıda mikrobiyolojisi, Gıda kalite kontrol, Plazma sterilizasyonu, Plazma polimerizasyonu

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Bu tez çalışması “Gıda Endüstrisi için Yeni ve Etkin Bir Dekontaminasyon ve Detoksifikasyon Yöntemi: Atmosferik Basınç Plazma Uygulaması” adlı TÜBİTAK-TOVAG destek grubu 111O570 nolu proje ile desteklenmiştir. Proje bütçesi 292,262 TL’dir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-

