

**TRABZON EKMEĞİ ÜRETİMİNİN AFLATOKSİNLER VE
FUSARIUM TOKSİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**EFFECT OF TRABZON BREAD MAKING ON AFLATOXINS
AND *FUSARIUM* TOXINS**

PINAR YILMAZ

**Prof. Dr. Ümran Uygun
Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2014

Pınar YILMAZ'ın hazırladığı “Trabzon Ekmeği Üretimini Aflatoksinler ve *Fusarium* Toksinleri Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan
(Prof. Dr. Hamit KÖKSEL)

Üye (Danışman)
(Prof. Dr. Ümran UYGUN)

Üye
(Prof. Dr. Berrin ÖZKAYA)

Üye
(Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY)

Üye
(Doç. Dr. Arzu BAŞMAN)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Ailem'e

ETİK

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik 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.

08/01/2014

İmza

Öğrencinin Adı Soyadı

ÖZET

TRABZON EKMEĞİ ÜRETİMİNİN AFLATOKSİNLER VE *FUSARIUM* TOKSİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Pınar YILMAZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ümran UYGUN

Ocak 2014, 67 sayfa

Küfler uygun koşullar altında mikotoksin adı verilen, insan ve hayvan sağlığına zararlı ikincil metabolitleri üretirler. Yürürlükteki düzenlemelerle tanımlanmış mikotoksinler için sınır değerler belirlenmiş olsa da, mikotoksinlerin diyetle maruz kalınan düzeyleri hala tartışma konusudur. Bu nedenle son yıllarda çeşitli gıda işlemlerinin mikotoksinler üzerine etkisini araştıran pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında, ülkemize özgü geleneksel bir ekmek üretim yöntemi olan Trabzon ekmeği üretiminin her kademesinin, aflatoksinler ve *Fusarium* toksinleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Trabzon ekmeği, önce uzun süren laktik asit fermantasyonu ve ardından kısa süren maya fermantasyonuna bırakılarak olgunlaştırılan hamurun 220°C'den 175°C'ye değişen fırın sıcaklıklarında pişirilmesiyle elde edilmektedir. Aflatoksinler (B₁, B₂, G₁, G₂), deoksinivalenol (DON) ve zearalenon (ZEA) içeren buğday unu örnekleriyle hazırlanan hamur ve Trabzon ekmeklerinin mikotoksin miktarı, fermantasyon öncesi ve sonrası hamur örneklerinde ve pişme sonrası ekmek kabuğu ve ekmek içinde belirlenmiştir.

Laktik asit fermantasyonu sonunda hamur örneklerinin AFLB₁, DON ve ZEA miktarında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmezken; AFLB₂, AFLG₁ ve AFLG₂ miktarında istatistiksel olarak önemli azalma meydana gelmiştir. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) fermantasyonu sonunda ise özellikle aflatoksinlerin miktarında olmak üzere (% 5.4 – 16.7 aralığında) tüm mikotoksinler için istatistiksel olarak önemli artışlar meydana gelmiştir. Trabzon ekmeği üretiminin mikotoksinler üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise ekmeğ kabuğu örneklerinde tüm mikotoksinler için istatistiksel olarak önemli azalmalar gözlenmiştir. Ekmeğ kabuğu örneklerinde en yüksek azalma AFLG₂ için bulunmuştur (% 29.5 – 30.4). Ekmeğ içi örneklerinde ise, DON miktarında önemli bir değişim gözlenmezken, ZEA ve aflatoksinlerin miktarında istatistiksel olarak önemli azalmalar gerçekleşmiştir. Ekmeğ içi örneklerinde en yüksek azalma yine AFLG₂ için bulunmuştur (% 18.5 – 19.4).

ANAHTAR SÖZCÜKLER: aflatoksinler, deoksinivalenol, zearalenon, ekşi hamur fermantasyonu, maya fermantasyonu, Trabzon ekmeği

ABSTRACT

EFFECT OF TRABZON BREAD MAKING ON AFLATOXINS AND *FUSARIUM* TOXINS

Pınar YILMAZ

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ümran UYGUN

January 2014, 67 pages

Under suitable conditions moulds produce secondary metabolites called mycotoxins that can damage both human's and animal's health. Regulatory limits for identified mycotoxins have been determined by current legislations. However, the exposure doses of various mycotoxins taken with daily diet are still under debate. Therefore, in recent years many researches have been conducted on the purpose of elucidating the effects of some food processes on mycotoxin levels in food samples.

The aim of this study was to investigate the fate of aflatoxins and *Fusarium* toxins during the Trabzon bread-making process. Trabzon bread was prepared by baking of fermented dough at 175 - 220°C. During this process, wheat flour samples including aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) were used. Fermentation process is based on two-stage fermentation; the long-term lactic acid fermentation and the short-term yeast fermentation. The mycotoxin levels were determined in dough samples before and after each fermentation step

and in bread samples (in both crumb and crust). Significant changes in AFLB₁, DON and ZEA levels were not observed while AFLB₂, AFLG₁ and AFLG₂ levels were reduced significantly after the lactic acid fermentation. After yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fermentation, it was observed that all mycotoxin levels significantly increased in dough samples, especially for aflatoxins (5.4 – 16.7 %). With respect to the effect of Trabzon bread making process on mycotoxins, statistically significant reductions were observed for all mycotoxin levels in crust samples. The highest reduction in crust samples was found for AFLG₂ levels (29.5 – 30.4 %). In crumb samples, significant changes were not observed in DON levels while aflatoxins and ZEA levels were significantly reduced. The highest reductions were observed in crumb samples for AFLG₂ (18.5 – 19.4 %).

Keywords: aflatoxins, deoxynivalenol, zearalenone, sourdough fermentation, yeast fermentation, Trabzon bread

TEŞEKKÜR

Tezimin planlaması ve değerlendirilmesi boyunca her türlü bilgi birikimini benimle paylaşan değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ümran UYGUN'a,

Tez izleme komitesi üyeleri olarak; tezimin her aşamasında değerli önerileri ile bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hamit KÖKSEL'e,

Tez çalışmalarımın her aşamasının planlanması ve yürütülmesinde bilgisi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her zaman yanımda olan değerli hocam Sayın Dr. Eren Numanoğlu'na,

Tezim boyunca kullandığım ekşi hamur ve unu temin etmemde bana yardımcı olan YEPAŞ Ekmek Fabrikası çalışanlarına ve Halk Ekmek'e ve yine tez çalışmamda kullandığım doğal kontamine buğday unun temininde bana yardımcı olan değerli Ankara İl Kontrol çalışanlarından Sayın Mustafa Atak'a,

Yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Arzu BAŞMAN, Sayın Prof. Dr. Berrin ÖZKAYA ve Sayın Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY'a,

Tez çalışmamda karşılaştığım her sıkıntıda benden yardımlarını esirgemeyen ve bana her türlü desteği sağlayan değerli hocalarım Sayın Dr. Tuğrul MASATÇIOĞLU, Sayın Uzm. Meltem ZENCİR YILDIRIM, Sayın Uzm. Yelda ZENCİR, Sayın Dr. İlknur GÖNENÇ, Sayın Uzm. Selin HEYBELİ'ye,

Tezimin yürütülmesinde bana destek olan değerli arkadaşlarım Beyza KIVANÇ ve Reza JAFARZADEH'e,

Tez döneminde bana destek olan sevgili arkadaşlarım Miray Gökçe TAR, Görkem ÖZÜLKÜ, Selin UYSAL, Aslıhan ÜNÜVAR, Didar ÜÇÜNCÜOĞLU, Hilal ÖZCAN, Gözde HOSTA, Nilgün ÜNSAL, Kerem İLASAN, Şebnem AÇIKBAŞ, Yeşim KARADEMİR, Elmira HATAMI, Yük. Gıda Müh. Kadir TURAN, Yük. Gıda Müh. Servet KIVANÇ, Yük. Gıda Müh. Demet KÖROĞLU'na,

Hayatımın her aşamasında yanımda olduklarını bildiğim, eğitim hayatım boyunca bana her konuda destek olan ve güç veren, hoşgörü ve anlayışlarını esirgemeyen aileme içtenliğimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikotoksinler ile ilgili genel bilgiler	3
2.2. Maskelenmiş veya gıda matriksine gömülü mikotoksinler	6
2.3. Çeşitli İşlemlerin Mikotoksinler Üzerine Etkileri	8
2.3.1. Fermantasyonun mikotoksinler üzerine etkisi	8
2.3.2. Isıl işlemin mikotoksinler üzerine etkisi.....	11
2.4. Ekşi Hamur ve Trabzon Ekmeği Üretimi.....	13
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Kimyasallar ve malzemeler.....	15
3.1.2. Buğday unu ve ekşi hamur örnekleri	15

3.2. Metot	16
3.2.1. Fiziksel analizler	16
3.2.2. Ekşi hamur modeli	16
3.2.3. Ekmek üretimi	17
3.2.4. Mikotoksin analizleri	21
3.2.4.1. DON analizi	21
3.2.4.2. ZEA analizi	21
3.2.4.3. Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂ analizi	22
3.3. Validasyon Çalışmaları	23
3.3.1. Kalibrasyon çalışmaları	23
3.3.2. Geri kazanım çalışmaları	23
3.3.3. Tayin ve tespit sınırı	24
3.3.4. İstatistiksel analizler	24
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Trabzon Ekmeği üretimi	25
4.2. Buğday unu örneklerinin aflatoksin, DON ve ZEA içerikleri	26
4.3. Validasyon çalışmaları	27
4.3.1. Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması	27
4.3.2. Geri kazanım	27
4.3.3. Tespit sınırı ve tayin sınırı	28
4.4. Ekşi Hamur Modelinde ZEA Miktarında Değişim	28

4.4.1. ZEA ilave edilmiş unla hazırlanan ekşi hamur modeli	28
4.4.2. ZEA ilave edilmemiş ekşi hamur modeli	31
4. 5. Trabzon Ekmeği Üretiminin ZEA, DON ve Aflatoksinler Üzerine Etkisi	33
4.5.1. Trabzon ekmeği üretiminin ZEA üzerine etkisi	35
4.5.2. Trabzon ekmeği üretiminin DON üzerine etkisi	39
4.5.3. Trabzon ekmeği üretiminin aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂ üzerine etkisi.....	44
5. YORUM VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	58
EKLER	65
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Aflatoksinler (B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂).....	4
Şekil 2.2. Deoksinivalenol (DON)	5
Şekil 2.3. Zearalenon (ZEA)	5
Şekil 2.4. ZEA'dan doğal yolla oluşan α '-ZOL ve β -ZOL derivatları.....	9
Şekil 3.1. ZEA ve aflatoksin için Trabzon ekmeği üretimi akış şeması	19
Şekil 3.2. DON için Trabzon ekmeği üretimi akış şeması	20
Şekil 4.1. Üretilen Trabzon ekmekleri	25
Şekil 4.2. Trabzon ekmeği üretimi boyunca ZEA miktarındaki değişim.....	36
Şekil 4.3. Trabzon ekmeği üretimi boyunca DON miktarındaki değişim.....	41
Şekil 4.4. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLB ₁ miktarındaki değişim	45
Şekil 4.5. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLB ₂ miktarındaki değişim	46
Şekil 4.6. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLG ₁ miktarındaki değişim	48
Şekil 4.7. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLG ₂ miktarındaki değişim	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Ekşi hamurdan izole edilen bakteri ve maya türleri	14
Çizelge 4.1. Trabzon ekmeği üretiminde kullanılan buğday unu örneklerinin mikotoksin içerikleri.....	26
Çizelge 4.2. Buğday unu örneklerinde aflatoksinler, DON ve ZEA için belirlenen geri kazanım değerleri.....	27
Çizelge 4.3. DON ve ZEA için belirlenen tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri	28
Çizelge 4.4. Aflatoksinler için belirlenen tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri	29
Çizelge 4.5. Ekşi hamur modelinde fermantasyon boyunca ZEA miktarları.....	29
Çizelge 4.6. ZEA ilave edilmeyen ekşi hamurda fermantasyon boyunca ZEA miktarları.....	32
Çizelge 4.7. Farklı sürelerde fermantasyona bırakılmış hamur, ekmek kabuğu ve içi örnekleri için kısaltmalar ve açıklamaları.....	34
Çizelge 4.8. Fermantasyonlar öncesi ve sonrası hamur örneklerinin pH değerleri.....	34
Çizelge 4.9. ZEA analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri.....	35
Çizelge 4.10. DON analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri.....	39
Çizelge 4.11. AFLB ₁ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri.....	44
Çizelge 4.12. AFLB ₂ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri.....	46
Çizelge 4.13. AFLG ₁ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri.....	47
Çizelge 4.14. AFLG ₂ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AFLB ₁	aflatoksin B ₁
AFLB ₂	aflatoksin B ₂
AFLG ₁	aflatoksin G ₁
AFLG ₂	aflatoksin G ₂
α '-ZOL	α '-zearelenol
β -ZOL	β -zearelenol
DAD	diyot dizini (diode array) dedektör
DON	deoksinivalenol
DON-3G	DON-3-glikozid
EC	European Commission
FLD	floresans dedektör
FRM	Fermantasyon
GF/A	cam mikrofiber filtre
HCl	hidroklorik asit
HMR	Hamur karışımı
HPLC	yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LAB	laktik asit bakterileri
LOD	tespit sınırı
LOQ	tain sınırı
OTA	okratoksin
OTA A	okratoksin A
PBS	fosfat tamponu (pH = 7.4)
RSD	relatif standart sapma
SD	standart sapma
ZEA	zearelenon
ZEA-4G	ZEA-4-glikozid

1. GİRİŞ

Buğday, ülkemizde en çok tüketilen gıdalardan biri olan ekmeğin hammaddesi olarak ekonomik açıdan büyük önem taşır. Küf gelişimini destekleyen iklim ve depolama koşullarında buğdayda mikotoksin kontaminasyonu ciddi boyutlarda ortaya çıkabilmektedir. İşlenmiş veya işlenmemiş tahıl ürünlerindeki mikotoksin varlığı, önemli sağlık sorunlarına ve ürün kalitesini bozarak ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Tüm dünyada ve ülkemizde tarlada veya hasattan sonra tahılların *Fusarium* cinsi küflerle bulaşması önemli bir sorundur ve bu bulaşının önüne geçilmesi çok zordur. Önemli sağlık sorunlarına ve ekonomik kayıplara neden olabilen bu sorun; fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle aşmaya çalışılmaktadır. Mikotoksin varlığının azaltılmasında biyolojik yöntemlerin kullanılması fikri son yıllarda önem kazanmaktadır. Bu nedenle çeşitli gıda işlemlerinin mikotoksinlere etkisinin anlaşılmasına katkı sağlayacak verilerin toplanması için son yıllarda daha fazla araştırma yapılmaktadır.

Mikotoksin miktarının biyolojik yöntemlerle azaltılması son yıllarda önem kazanmış olsa da, bu yöntemlerin gerçek etkilerini değerlendiren çalışmalar hala sınırlıdır. Literatürdeki çalışmalar ise mayaların ve laktik asit bakterilerinin mikotoksinleri azaltma etkisi üzerine yoğunlaşmaktadır. Ancak maya ve LAB'ların çoğaltıldığı kültür ortamlarının ya da bunlardan elde edilen hücre ekstraktlarının mikotoksinle muamelesi sonucu sağlanan miktarsal azalmalar, aynı mikroorganizmaların sorumlu olduğu fermantasyon işlemleri sonunda gözlenememektedir. Bu nedenle gıda işlemlerinin mikotoksinler üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar, maruz kalınan gerçek mikotoksin düzeyinin ve mikotoksin içeren gıdalarda uygulanabilecek en etkin detoksifikasyon yönteminin belirlenmesinde önem taşır.

Trabzon ekmeği üretimi uzun süren fermantasyon (laktik asit ve maya fermantasyonu) ve pişirme işlemleri ile gerçekleştirildiğinden, bu geleneksel yöntemin mikotoksin düzeyinde önemli azalma sağlayabileceği düşünülmüş ve bu tez kapsamında mikotoksinler üzerine etkisi araştırılmıştır.

Trabzon ekmeği; ilk aşamada un, su ve ekşi hamur karışımının belli bir süre doğal fermantasyona bırakılmasıyla olgunlaşan hamura ekmeğin mayasının da katılmasıyla elde edilen ikinci hamurun yine belli bir süre fermantasyona

bırakılmasından sonra elde edilen hamurun belli sıcaklık ve sürede pişirilmesiyle elde edilir. Trabzon ekmeği üretimi boyunca; fermantasyon öncesi ve sonrası hamur örneklerinde ve pişirme işleminden sonra ekmeğin örneklerinde olmak üzere aşama aşama aflatoksinler (B₁, B₂, G₁ ve G₂), deoksinivalenol (DON) ve zearalenon (ZEA) düzeyleri izlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında, DON ve ZEA azalışını izlemek üzere tarlada buğdaya *Fusarium graminearum* kültürü inoküle edilerek üretilen doğal kontamine buğdaydan elde edilen un kullanılmıştır. Aflatoksinle doğal kontamine un örneği bulunamadığı için, aflatoksin denemeleri una toksin ilave edilerek gerçekleştirilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılanlar özetlenirse; ekşi hamurda laktik asit bakterilerinin, ikinci hamurda ekmeğin mayasının ve pişirme boyunca ısı işleminin mikotoksin riskini azaltma etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler ile ilgili genel bilgiler

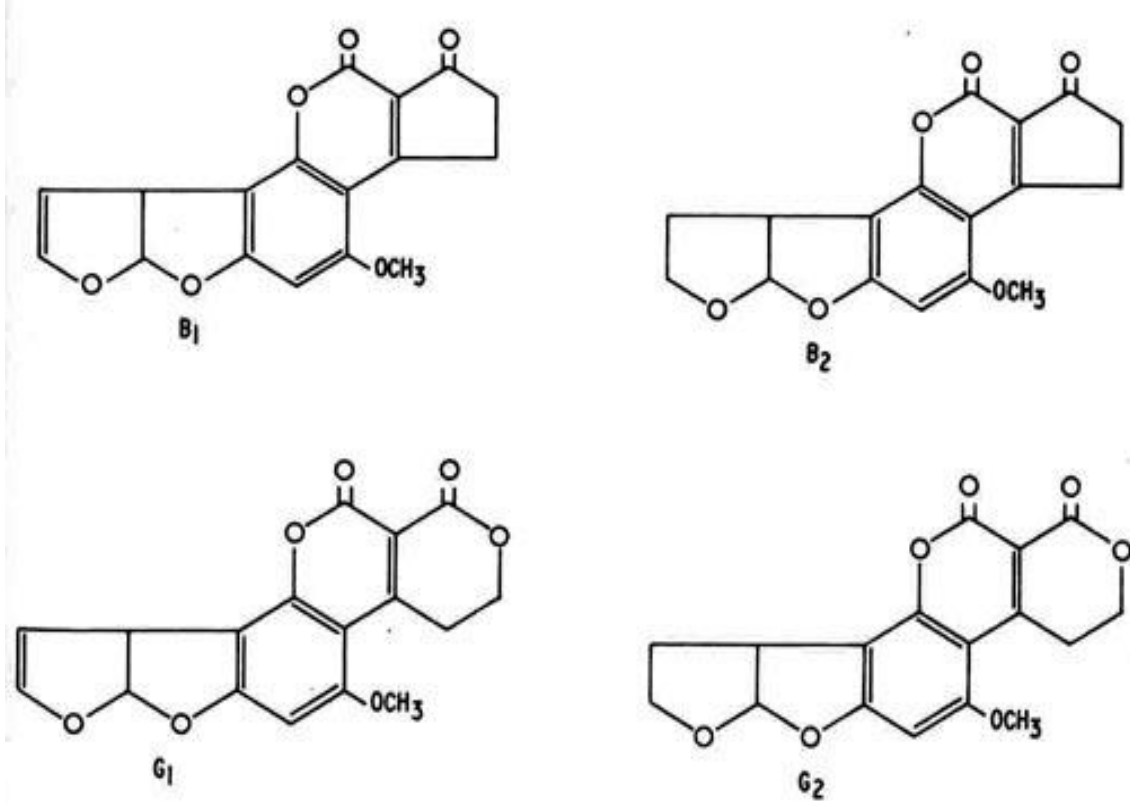
Mikotoksinleri birkaç kelime ile tanımlamak oldukça güçtür. Tüm mikotoksinler en kısa ve temel olarak, “lifsi mantarların ikincil metabolit olarak ürettiği, düşük moleküler ağırlıklı bileşikler” olarak tanımlanabilir. Mikotoksin terimi, 1962 yılında “gizemli hindi hastalığı (turkey x disease)” olarak adlandırılan yaklaşık 100.000 kümes hayvanının ölümüyle sonuçlanan vakanın, *Aspergillus flavus* ‘un ürettiği ikincil metabolitlerle (aflatoksinler) kontamine olmuş yer fıstığı ile ilişkilendirilmesi üzerine ilk defa kullanılmıştır. Konuyla ilgili ilerleyen çalışmalar antibiyotik olarak kullanılan patulin gibi pek çok küf metabolitinin toksik etkilerini ortaya çıkarmıştır. Özellikle 1960 ve 1975 yılları arasındaki dönemde yapılan yoğun çalışmalar sonucu pek çok yeni mikotoksin tanımlanmıştır. Günümüzde kimyasal yapıları benzer yaklaşık 300-400 kadar madde mikotoksin olarak tanımlanmakta ve bunlardan 30 kadarı sağlık üzerine olumsuz etkileri nedeniyle üzerinde en çok çalışılan grubu oluşturmaktadır.

Tüm mikotoksinler küfler tarafından üretilse de, küflerin ürettiği tüm toksinler mikotoksin olarak nitelendirilmez. Burada önemli olan, metabolitin hedefi ve etki gösterdiği konsantrasyondur. Etanol gibi ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösteren fungal metabolitlerin aksine, mikotoksinler çok düşük konsantrasyonlarda bile omurgalılara ve diğer hayvan türlerine zarar vermektedir [1].

Mikotoksinler, gıda ve yemlerde sıkça rastlanan bulaşanların başında gelmektedir. Gıdalarda küf gelişiminin ve buna bağlı olarak mikotoksin kontaminasyonunun meydana geldiği en uygun koşullar ılıman sıcaklıklardır. Gıdalarda mikotoksin oluşumu en fazla 20 - 30°C arasında, 3.5 - 5.5 pH aralığında ve 0.85 - 0.90 veya üzerindeki su aktivitesinde gerçekleşmektedir. Buna karşın kimi *Penicillium* türlerinde belirgin olmak üzere, buzdolabı sıcaklığında mikotoksin oluşumu az da olsa görülebilir [2]. Gıda maddelerinde en sık rastlanan mikotoksinler; aflatoksinler, fumonisinler, okratoksinler (OTA), patulin, trikotesenler ve ZEA’dır [3].

Aflatoksinler, birçok gıda ve yemde yetiştirme, hasat, depolama ve taşıma sırasında *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nominus* gibi küf türleri

tarafından üretilir [4; 5]. Aflatoksinlerin, aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere dört ana türevi bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B₁ ve B₂'nin mavi, aflatoksin G₁ ve G₂'nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir [6].

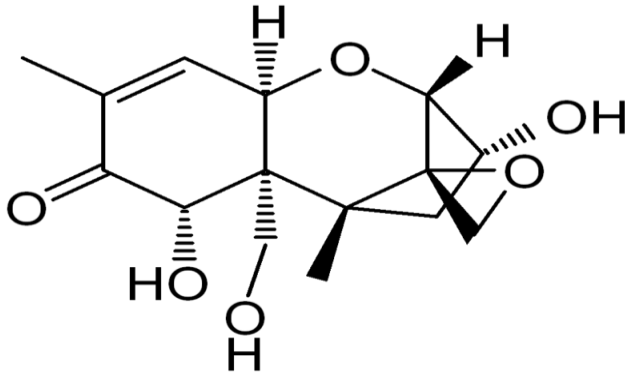


Şekil 2. 1. Aflatoksinler (B₁, B₂, G₁ ve G₂) [6]

Trikotesenler ise hububat ve ürünlerinde sıklıkla karşılaşılan, ürünlerde başak yanığı hastalığına sebep olan *Fusarium* türlerince üretilir. Tarım ürünlerinde trikotesenlerin oluşumu, iklim koşullarına ve tarımsal uygulamalara bağlı olarak yıldan yıla dalgalanma göstermektedir [7]. Bu mikotoksinler, 190 tane yapıca benzer molekülden oluşur ve tümü uçucu olmayan, düşük moleküler ağırlıklı seskiterpen epoksitlerdir [8]. Trikotesenler kendilerini üreten küf türüne ve kimyasal yapılarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört gruba ayrılırlar. A ve B grubu trikotesenler en sık rastlanan türleridir. A grubu trikotesenlerin en bilinen üyeleri T-2 ve HT-2 toksinleri ve B grubu trikotesenlerin en bilinenleri ise DON,

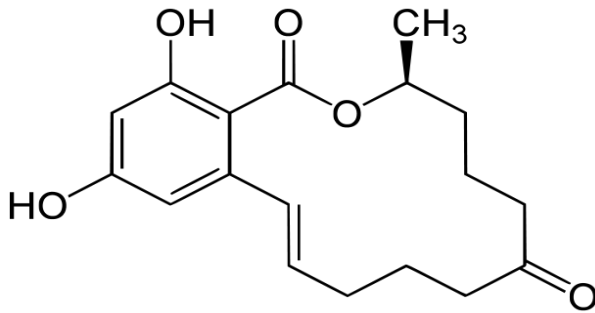
nivalenol (NIV) ve fusarenon X (FUS-X)'tir [9].

DON, *Fusarium graminearum* cinsi küfçe üretilen ve "vomitoksin" olarak da bilinen, dünya genelinde en sık rastlanan mikotoksinlerden biridir. Bu mikotoksin buğday, arpa ve mısır örneklerinde sıkça rastlanmaktadır [10; 11]. Bu bileşikler uçucu olmayan ve yapılarında ortak olarak trikotesen adı verilen üç halkalı çekirdek yapıyı bulunduran, düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Bu bileşikler, 12. ve 13. karbon atomlarında genellikle bir epoksit ihtiva ederler (Şekil 2.2) [10].



Şekil 2. 2. Deoksinivalenol (DON) [10]

Zearalenon (ZEA), steroid yapıda olmayan östrojenik etkili bir mikotoksindir. Bir resorsiklik asit lakton olan ZEA (Şekil 2.3), *Fusarium* cinsi küflerce üretildiğinden DON ve NIV gibi diğer *Fusarium* toksinleriyle bir arada bulunabilir [9; 12]. DON üreten *Fusarium graminearum* tarafından da oluşturulabilen ZEA, çoğunlukla mısırdaki bulunmakta, ancak pek çok ülkede buğday, arpa, darı ve çavdar gibi diğer önemli tahıllarda da varlığı tespit edilmektedir [13].



Şekil 2. 3. Zearalenon (ZEA) [13]

Birçok mikotoksin, insanlarda ve besi hayvanlarında çeşitli düzeylerde zehirlenmelere yol açabilmektedir [14]. Mikotoksinlerin neden olduğu zehirlenmelere “mikotoksikoz” adı verilir ve bu durum, gelişmiş ülkelere kıyasla gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülmektedir. Mikotoksikoz insandan insana geçmez fakat bilinen etkin bir tedavisi de yoktur [1]. Mikotoksinlerin düşük miktarları uzun süre alındığında ise mikotoksinler vücutta birikirler ve kanserojenik, immünotoksik, teratojenik, nörotoksik, nefrotoksik ve hepatotoksik etkiler göstererek halk sağlığı açısından tehlike oluştururlar [3].

Mikotoksinlerin vücuda alımı genellikle kontamine olmuş gıdaların tüketilmesiyle gerçekleşmektedir. Yine küflerle kontamine olmuş materyallere temas etmek ve bunların tozlarını solumak da diğer önemli alım yollarıdır [1].

Aflatoksinler mutajenik, kanserojenik, teratojenik ve hepatotoksik özellikler gösteren bir grup mikotoksindir [4; 5]. Birçok gıda ürünüde doğal olarak oluşan, mutajen ve kanserojen mikotoksinlerden biri olan AFLB₁, bilinen en toksik aflatoksin türüdür (Şekil 2.1) [6]. Yürürlükteki düzenlemelere göre aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ toplamının hububat ve ürünlerinde izin verilen maksimum düzeyi 4 µg/kg olarak belirlenmiştir [15].

DON'un kümes hayvanlarında kusma ve yemi reddetme gibi semptomlardan sorumlu olduğu belirlenmiştir [10]. Yürürlükteki düzenlemelere göre DON'un çeşitli ürünlerde izin verilen maksimum düzeyleri hububat için 1250 µg/kg, un için 750 µg/kg ve ekmek için 500 µg/kg olarak belirlenmiştir [16].

ZEA'nın en dikkat çekici özelliği östrojenik etkili olması ve östrojen reseptörlerine bağlanarak hormonal değişikliklere yol açmasıdır [17]. Yürürlükteki düzenlemelere göre ZEA'nın çeşitli ürünlerde izin verilen maksimum düzeyleri hububat için 100 µg/kg, un için 75 µg/kg ve ekmek için 50 µg/kg olarak belirlenmiştir [15].

2.2. Maskelenmiş veya gıda matriksine gömülü mikotoksinler

Son yıllarda yapılan çalışmalar, mikotoksinlerin bitki, mantar ve hayvan metabolizmasından veya gıda proseslerinden kaynaklanan etkilerle, kimyasal olarak farklı formlara dönüşebileceğini göstermektedir. Oluşan bu yeni formlar

genellikle ortamdaki serbest şekerler veya diğer biyolojik bileşenlerle mikotoksinlerin bağlanması sonucu ortaya çıkmaktadır [18]. Kimyasal olarak dönüşüme uğramış mikotoksinler, kütlelerinin ve polaritelerinin değişmesi sonucu rutin analizlerle ölçülemez hale gelirler ve bu nedenle “maskelenmiş (*masked*) mikotoksinler” adını alırlar [19].

Bitkiler, bir detoksifikasyon mekanizması olarak, kısmen polar olan trikotesenleri ve ZEA'yı serbest şekerler, aminoasitler ya da sülfat gruplarıyla bağlayarak daha polar yapılara dönüştürmekte ve vakuollerinde ayrıştırmaktadır. Bu nedenle *F. graminearum* tarafından enfekte edilmiş buğdaylarda özellikle DON-3-glikozid (DON-3G) ve ZEA-4-glikozid (ZEA-4G) türevlerine rastlanmaktadır [20].

Mikotoksin analizlerinde karşılaşılan başka bir sorun ise, mikotoksinlerin gıda matriksindeki makromoleküllerle güçlü etkileşimler, birleşmeler veya bağlanmalar yapmasıyla ortaya çıkan analiz hatalarıdır. Makromoleküllere bağlanan mikotoksinlere, “saklı (*hidden*)”, “bağlı (*bound*)” bazen de “gömülü (*embed*)” mikotoksinler adı verilmektedir. Bu durum, analizde kullanılan ekstraksiyon sıvısının ekstraksiyon gücünü azalttığından hatalı analiz sonuçlarına neden olabilmektedir. Çünkü analiz edilen üründe gerçekte var olan mikotoksin düzeyleri, uygulanan ekstraksiyon basamağının yetersiz kalması (mikotoksinleri bağlandığı yerden koparamaması) nedeniyle tam olarak ölçülememektedir [18; 21].

Galaverna ve ark. [22]'nin yaptığı bir çalışmada, *Fusarium* ile kontamine olmuş buğday örneklerinde, DON miktarının yaklaşık % 2 – 30 'u kadar DON-3G varlığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, çeşitli teknolojik proseslerin DON, ZEA ve bunların türevleri üzerine etkisi de değerlendirilmiştir. Gıda işlemleri sonucu mikotoksin miktarında meydana gelen artış, bu konjuge formların bozulması ile mikotoksinlerin serbest hale geçmesi olarak yorumlanmıştır.

Çimlendirme basamağının ZEA üzerine etkisini araştıran bir çalışmada ise ZEA miktarı, çimlenmiş buğdayda ham buğdaya göre yaklaşık 20 kat yüksek bulunmuştur. Çimlendirme işlemi boyunca meydana gelen artışlar yine ZEA'nın glikozid formlarından ya da bağlı olduğu makromoleküllerden kopması olarak yorumlanmıştır. Ekstrüde buğday ürünlerinin üretiminde mikotoksin miktarının son üründe artış göstermesi de, benzer şekilde mikotoksinlerin bağlandıkları yerden ısı işlemi boyunca koparak serbest hale geçmesi sonucu ölçülebilir mikotoksin miktarını arttırması olarak değerlendirilmektedir [23].

Şimşek ve ark. [21]'nin konuyla ilgili yaptığı çalışmalarda, fermantasyon işlemi boyunca hamurdaki DON miktarı artışının, DON-3G varlığı ile doğrudan ilişkili olmadığı anlaşılmıştır. Çünkü elde edilen sonuçlar, fermantasyon boyunca DON-3G miktarında meydana gelen azalışın, DON miktarındaki artışı miktarsal olarak karşılamadığını göstermiştir.

2.3. Çeşitli İşlemlerin Mikotoksinler Üzerine Etkileri

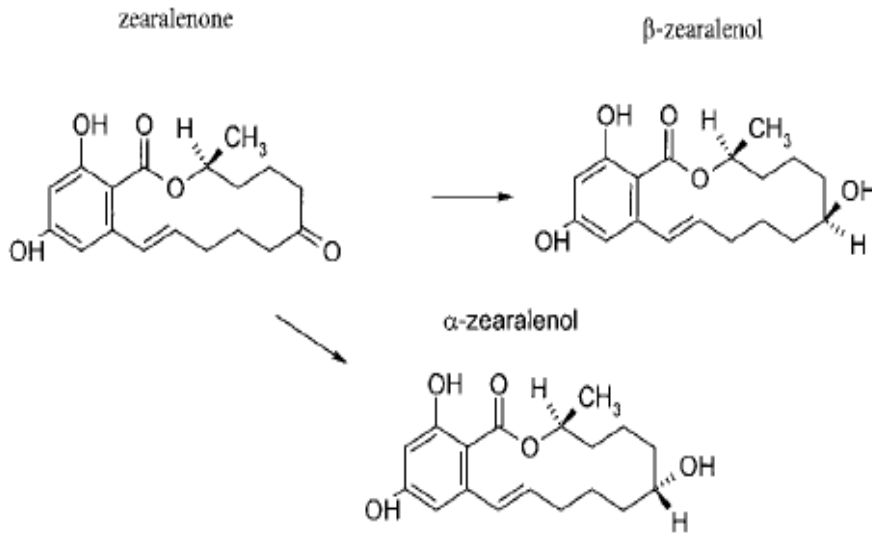
Mikotoksinler gıdalardan mevcut gıda işlemleriyle tamamen uzaklaştırılmadığından, son üründe mikotoksin varlığını engellemek için gıda üretim zincirinin her aşamasında koruyucu önlemlerin alınması gerekmektedir [7]. Ancak tüm önlemlere rağmen *Aspergillus* ve *Fusarium* cinsi küflerin ürettiği mikotoksinlere (aflatoksin, ZEA, DON) hububat ürünlerinde sıklıkla rastlanmaktadır. Bu nedenle gıdalarda mevcut ve dolayısıyla diyetle maruz kalınan mikotoksin düzeyinin belirlenmesi önem kazanmakta ve son yıllarda konuyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Gıdalarda mikotoksin düzeyinin en doğru tahmini için mikotoksinlerin uygulanan gıda işlemleri boyunca uğradıkları değişiklikler tam olarak ortaya konulmalıdır. Bu amaçla tarım ürünlerinde başlangıçta var olan mikotoksin düzeyi belirlenmeli ve bu tarım ürünlerinin işlenmesi boyunca mikotoksin düzeyinde meydana gelen değişim izlenmelidir [16].

Konuyla ilgili çalışmalar genellikle gıdalarda mikotoksin düzeyini azaltan veya mikotoksini gıdadan tamamen uzaklaştıran yöntemlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Mikotoksinlerin azaltılması üzerine pek çok farklı yöntem geliştirilse de bu yöntemler, yüksek maliyetler ve uygulamadaki güçlükler nedeniyle önem kazanamamıştır [14].

2.3.1. Fermantasyonun mikotoksinler üzerine etkisi

Gıdanın matriksi, pH'sı, nem içeriği, proses sıcaklığı, mikotoksin bulaşısının doğal veya aşılama yoluyla olması ve en önemlisi toksin konsantrasyonu gibi pek çok parametre, fermantasyon işleminin mikotoksin varlığı üzerine etkisini değiştirmektedir [25]. Son yıllarda mikotoksinlerin çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak gıdalardan uzaklaştırılabildiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu

çalışmalarda *Flavobacterium aurantiacum*, *Corynebacterium rubrum*, *Candida lipolitica*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Armillariella tabescens*, *Nurospora spp.*, *Rhizopus spp.*, *Mucor spp* gibi pek çok bakteri ve küf türünün enzim sistemleriyle mikotoksinleri geri dönüşümsüz parçalayabildiği anlaşılmıştır. Ancak enzimatik parçalanmayla açığa çıkan ürünlerin toksik olmaları ve kullanılan mikroorganizmaların gıdanın doğal mikro florasına ait olmaması, bu mikroorganizmaların insan tüketimine sunulacak gıdalarda kullanımını sınırlamaktadır. Konuyla ilgili bir çalışmada, ZEA'yı farklı bileşiklere çevirebilen 23 farklı cins mikroorganizma tanımlanmıştır. Bu parçalanma ürünleri arasında α' -zearelenon (α' -ZOL), β -zearelenon (β -ZOL) ve bir diğer polar metabolit olan zearelenon-4-O-sülfat bulunmaktadır [28]. Ancak bu parçalanma ürünlerinin en az ZEA kadar, hatta bazılarının daha yüksek toksik özellik gösterdiği bildirilmektedir [27].



Şekil 2. 4. ZEA'dan doğal yolla oluşan α' -ZOL ve β -ZOL derivatları [26]

Çeşitli gıdalarda fermantasyondan sorumlu maya ve LAB'ın hücre duvarı ekstraktları ile mikotoksinlerin bağlanması, mikotoksinlerin gıda ve yemlerle alımını azaltacak bir yöntem olarak son yıllarda önem kazanmıştır [28]. *L. rhamnosus* GG ve *L. rhamnosus* LC705 suşlarının sıvı kültür ortamında ZEA ve α' -ZOL ile bağlanmasının araştırıldığı bir çalışmada, bu iki toksinin konsantrasyonunda

önemli düşüş gözlenirse de, bunun hızlı bir reaksiyon olduğu, fermantasyon sürdürüldüğünde toksinlerin sıvı kültüre tekrar salındığı ve bir süre sonra bakteri tarafından tekrar bağlandığı gözlenmiştir. Aynı çalışmadan elde edilen sonuçlara göre sıcaklık uygulamaları ve asitlik artışıyla bakteri hücre duvarının yapısı bozulmakta ve mikotoksini bağlayan ancak yapı içine gömülü bölgelerin açığa çıkması sağlanarak mikotoksin-bakteri bağlanması artmaktadır. Ayrıca bakterinin çoğaltıldığı kültür ortamına ilave edilen ZEA ve türevlerinin ancak bir kısmı çözeltide tespit edilirken, geriye kalan kısmı bakteri hücrelerinin oluşturduğu pellette ölçülmüştür. Bu durum, bakterilerin inkübasyon boyunca ZEA ve türevlerini parçalamadığını ve toksinlerin inkübasyon koşullarına oldukça dayanıklı olduğunu göstermiştir. Toksinlerin önemli bir kısmının bakteri hücresiyle etkileşime girdiği de kanıtlanmıştır. Benzer sonuçlar, aynı metot ve bakteri suşlarının kullanıldığı başka bir çalışmada AFLB₁ için de elde edilmiştir [26].

Yiannikounis ve ark. [28]'nin yaptığı bir çalışmada ZEA'nın maya hücre duvarındaki yapılarla bağlanma mekanizması moleküler düzeyde açıklanmıştır. Buna göre, α -(1,3)-D glukoz molekülüne ait tek sarmal yapı ile ZEA molekülü arasında stabil hidrojen bağları kurulmakta, glukoz sarmalının uzunluğundaki artışa bağlı olarak bağlanma daha stabil hale gelmektedir. Yapısal bağlanmaların ötesinde, ZEA'daki hidroksil ve keton grupları ile α -(1,3)-D glukozun 4. ve 6. karbon atomundaki ve daha zayıf olmak üzere 2. karbon atomundaki hidroksil grupları arasında moleküller arası stabil hidrojen köprüleri kurulmaktadır.

Sıvı kültür ortamında gerçekleştirilen çalışmalar, LAB-AFLB₁ bağlanmasının bakteri suş türüne ve konsantrasyonuna bağlı olduğunu, ancak bakterinin canlı veya cansız olmasının bağlanmayı etkilemediğini ortaya koymaktadır. Bu sonuç, seçilen bakteri suşuna özgü hücresel maddelerin mikotoksin-bakteri bağlanmasından sorumlu olduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir. Aynı çalışmada AFLB₁'in *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *L. rhamnosus* Lc-705 suşları ile bağlanması toksinin yaklaşık % 80'ini ortamdan uzaklaştıran anlık bir proses olarak tanımlanmaktadır [29].

Mikotoksinlerin biyolojik yolla azaltılması üzerine yapılan çalışmalar, en eski ve en bilinen gıda muhafaza yöntemlerinden biri olan fermantasyonun, mikotoksin miktarını azaltmada kolay ve ekonomik bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir [14]. Gıdanın doğal mikro florasını oluşturan çeşitli mayaların ve

laktik asit bakterilerinin (LAB) fermantasyon sırasında ortamdaki mikotoksinleri bağlayabildiğini gösteren çalışmalar mevcut olsa da, konuyla ilgili çalışmaların bir çoğu fermantasyon sonunda mikotoksin miktarında artış olduğunu ortaya koymaktadır. Cecchini ve ark. [30], şarapta alkol fermantasyonu boyunca OTA miktarında azalma gözlerken, Scudamore ve ark. [23], hamur fermantasyonu boyunca OTA miktarında azalma olmadığını bildirmektedir.

Mısır ekmeği üretimindeki fermantasyon ve pişirme basamağının DON miktarına etkisini araştıran bir çalışmada, başlangıç miktarına göre fermente hamur ve ekmek örneklerinde DON konsantrasyonunun azalmadığı anlaşılmıştır [31]. Tatlı çöreklerde maya fermantasyonunun DON miktarına etkisini değerlendiren bir diğer çalışmada ise fermantasyon sonunda, başlangıç miktarına göre DON düzeyinde artış gözlenmiştir [32]. Araştırmacılar, başlangıç unundaki DON öncü bileşiğinin fermantasyondan sorumlu mayaların aktivitesi sonucu DON'a çevrilmiş olduğunu ve bunun ölçülebilir DON miktarını arttırdığını düşünmektedir [23].

Viyana ve Fransız ekmeği üretiminin DON üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, farklı maya suşları kullanılarak 30 ve 50°C'de gerçekleştirilen fermantasyonun DON miktarına etkisi araştırılmıştır. Fransız ekmeğine ait hamur örneklerinde DON miktarının, 30°C'de 60 dakika süren fermantasyon sonunda başlangıç değerine göre azalmadığı, 50°C'de 40 dakika süren fermantasyon sonunda ise % 41 oranında azaldığı gözlenmiştir. Viyana ekmeği hamur örneklerinin DON miktarında ise, 30°C'de gerçekleştirilen fermantasyon sonunda % 25 azalma sağlanırken, 50°C'de gerçekleştirilen fermantasyon sonunda maksimum azalma % 56 oranında sağlanmıştır. İki ekmek modeli için örneklerin DON miktarında gerçekleşen farklı azalmalar, hamur formülasyonlarının farklı oranlarda maya içermesi ile ilişkilendirilmektedir [25].

Sorgum bitkisi fermantasyonunun mikotoksinler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 24 saatlik maya fermantasyonunun AFLB₁ miktarında bir değişiklik meydana getirmediği, ancak 36 saatlik fermantasyon sonunda toksin miktarının ölçülebilir düzeyin altına indiği tespit edilmiştir [33].

2.3.2. Isıl işlemin mikotoksinler üzerine etkisi

Literatürde mikotoksinlerin fırında pişirme ile azaltılabildiğini bildiren çalışmalar

mevcut olsa da, bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar mikotoksin miktarında kayda değer azalmanın sağlanması için bu bileşiklerin 250°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda birkaç dakika boyunca tutulması gerektiğini göstermektedir [34]. Bununla birlikte gıdanın ısıı işlem öncesi asit, alkali veya hücre duvarını yıkan enzimler ile muamele edilmesi, ısıyla temas alanını arttırdığından mikotoksin miktarında daha yüksek oranlarda azalma sağlamaktadır [11].

Ekstrüzyonla pişirmenin mikotoksinler üzerine etkisini araştıran bir çalışmada, mısır örneklerinin fumonisin, aflatoksin ve ZEA miktarında gerçekleşen azalmalar sırasıyla % 100, % 95 ve % 83 olarak saptanmıştır. Aynı alışmada DON ve OTA A için daha düşük azalma gözlenmiş, maksimum azalma değerleri DON ve OTA A için sırasıyla % 55 ve % 40 olarak llmştr [35].

Çok sayıda alışma DON'un ısıya karşı yüksek dayanıklılıkta olduğunu ortaya koymaktadır. DON, 170 - 350°C'de fırında pişirmeye karşı oldukça dayanıklıdır. DON miktarında 170°C'de 30 dakika pişirme sonucu önemli bir azalma olmadığı saptanmıştır [10]. Literatürde haşlama işlemi sonrası makarna ve erişte rneklerinin DON miktarında önemli azalmanın gerçekleştiğini bildiren çalışmalar mevcuttur [36; 37]. Diğer pişirme yöntemlerine göre haşlama ile daha yüksek azalmanın sağlanması, DON'un suda yüksek çözünme özelliğine sahip olmasıyla ve ısıyla birlikte haşlama suyuna geçişin artmasıyla açıklanmaktadır. Geleneksel pişirme ve kızartma işlemleri ile DON miktarının azalmadığını bildiren çalışmaların aksine, fırında pişirmenin DON miktarını önemli oranda azaltabildiğini ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır [12].

Isıl işlemin ZEA zerine etkisini araştıran bir alışma, ZEA miktarında ekmek üretimiyle % 34 - 40, erişte üretimiyle % 48 - 62 ve bisküvi üretimiyle % 16 - 27 oranında azalma meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca ZEA'nın ısıı yolla parçalanmasıyla açığa çıkan maddelerin östrojenik etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir [38].

Farklı sıcaklık derecelerinde uygulanan ısıı işlemin DON, NIV ve ZEA zerine etkisini; toksin standardı, tahıl unu ve tahıl tanesinde inceleyen bir çalışmada, en yüksek H (yarılanma süresi) ve D (% 90 azalma için gerekli süre) değerleri ZEA için saptanmıştır. ZEA için en yüksek parçalanma düzeyi % 85'lik azalma ile toksin standardında (220°C'de 60 dakika) belirlenmiş, aynı örneklerin 140 - 160°C'de ısıı işlem görmesiyle ise, toksin standardında önemli bir değişiklik meydana gelmediği

gözlenmiştir. Farklı örneklerin ZEA bozunma hızı karşılaştırıldığında ise, 220°C'de % 80 oranında ZEA'nın bozunması için gerekli süre tahıl ununda 18 ve standart çözeltide 60 dakika bulunmuştur. Tahıl tanelerinin ısıtılmasıyla, yüksek miktarda ZEA ile kirlenmiş olmasına rağmen, tanenin dış kısmının ZEA miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir [39].

Konuyla ilgili başka bir çalışmada ısıtılmanın AFLB₁ varlığına etkisi, yıkanmış buğday örneklerinde incelenmiş ve buğday örnekleri 100, 150 ve 200°C fırın sıcaklıklarında 30, 60 ve 90 dakika bekletilmiştir. Çalışmada, 100°C ve altındaki sıcaklıklarda uygulanan ısıtılmanın AFLB₁ miktarını değiştirmediği, kayda değer azalmanın ancak 150°C'den itibaren gerçekleştiği gözlenmiştir. 150°C'de azalmalar 30, 60 ve 90 dakika süren ısıtılma işlemleri sonunda sırasıyla; % 60, % 75 ve % 82 olarak gerçekleşmiş, 200°C'de gerçekleşen azalmaların hepsi ise % 90'ı geçmiştir [40]. Tam buğday ekmeği üretiminin AFLB₁ üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, fermantasyon sonrası tam buğday ekmeği hamurunun AFLB₁ miktarında % 50 azalma olduğu, 120°C'de 30 dakika boyunca pişirme sonunda ise toksin düzeyinde önemli bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir [41].

2.4. Ekşi Hamur ve Trabzon Ekmeği Üretimi

Ekşi hamur yöntemi geçmiş dönemlerden beri kullanılan bir metottur. Ekşi hamur fermantasyonu doğal floraya ait maya ve bakterilerin birlikte faaliyet göstermeleriyle gerçekleşmektedir. Hiç maya katılmadan kendi haline bırakılan hamur bir süre sonra değişime uğrar, içinde gaz kabarcıklarının oluşmasıyla hacmi genişler, yumuşar, kendini salar ve kokusu fenalaşır. Hamurda meydana gelen bu değişikliklere un, su ve havadan gelen mikroorganizmalar sebep olmaktadır ve en etkin olanı genellikle bakterilerdir. Kendiliğinden fermente olan hamura, mayaların yanı sıra laktik asit (süt asidi) ve asetik asit (sirke asidi) bakterilerini de içermesi ve tadının ekşi olması nedeniyle ekşi hamur adı verilmiştir [42].

Ekşi hamur yönteminin esası; normal kültür mayalarının yanı sıra havadan ve kullanılan hamur unsurlarından gelen yabancı mayaların, laktik, asetik ve sitrik asit bakterilerinin faaliyet gösterdiği bir hamur parçasını, bir sonraki hamurda maya olarak kullanmaktır [43].

Çizelge 2. 1. Ekşi hamurdan izole edilen bakteri ve maya türleri [44]

Laktik asit bakterileri	Mayalar
<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. brevis subsp. lindneri</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus spp.</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. pontis</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. krusei</i> , <i>T. holmii</i> , <i>P. saitoi</i> , <i>C. stellata</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>S. inusitatus</i> , <i>C. guillermondii</i> , <i>C. holmii</i> , <i>H. anomala</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>C. krusei</i>

Fermente bir ürün olan ekmeğin, antik çağdan günümüze kadar her kültürde beslenmenin temelini oluşturmuştur. Ekmekte bir mayalama metodu olarak uygulanmakta olan ekşi hamur mayası; normal kültür mayalarının yanı sıra laktik, sitrik ve asetik asit bakterilerinden oluşmaktadır [45]. Ekşi hamur, mayalanmış ekmeklerin en eski ve en özgün şeklidir.

Trabzon ekmeği, ekşi hamur yöntemiyle (indirekt hamur metodu, sponge) üretilen ve ülke genelinde yaygın olarak tüketilen bir ekmeğin tipik özellikleri; kalın sert kabuklu, iri gözenekli, işlem süresinin uzun ve toleransının yüksek olması, daha aromatik, daha kaliteli, yüksek hacim ve gramajda üretilmesi, geç bayatlaması ve pişirme sıcaklığının düşük olmasıdır [46].

Bu çalışmada Trabzon ekmeği üretiminin (ekşi hamur fermantasyonu, maya fermantasyonu ve pişirme olmak üzere) aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂, DON ve ZEA üzerine etkisi her bir basamakta incelenmiş, hangi basamağın azalmada daha etkili olduğu açıklanmaya çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan materyal ve malzemeler aşağıda özetlenmiştir.

3.1.1. Kimyasallar ve malzemeler

Asetonitril ve metanol Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) sağlanmış olup, HPLC'de kullanım için uygun saflıktadır. Fosfat tamponu (PBS, pH 7,4), nitrik asit, sodyum klorür (NaCl) ve potasyum bromür (KBr) Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır (Diesenhofen, Almanya). DON, ZEA, aflatoksin standartları ve immünoaffinite kolonları R-Biopharm'dan (Germstadt, Almanya) sağlanmıştır. Whatman no.4 ve GF/A (cam mikrofiber) filtreler Whatman firmasından (Maidstone, UK) temin edilmiştir.

Ekstraksiyonda kullanılan bıçaklı karıştırıcı Waring (model 32BL79) markadır (Waldbronn, Almanya). Analizlerde kullanılan HPLC sistemi Agilent marka olup, kuarterner pompa (1100 Series G1312A), kolon fırını (1100 Series G1316A), otomatik örnekleyici, floresan (FLD) dedektör (Agilent 1200 AGT-G1321A) ve Diode Array (DAD) dedektörden (1200 Series G1315B) oluşmaktadır. HPLC'de kullanılan kromatografik kolon Lichrospher RP-18 (4 x 250 mm, 5µm) ters faz kolon olup, Agilent'dan alınmıştır (Waldbronn, Almanya).

3.1.2. Buğday unu ve ekşi hamur örnekleri

Türkiye'nin farklı illerinden (Ankara, Samsun, Hatay, Trabzon) sağlanan 9 buğday unu örneğinde DON, ZEA ve aflatoksinlerin varlığı araştırılmıştır. DON içerdiği bilinen yaklaşık 500 g kadar buğday unu da Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarları Mikotoksin Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır. Ayrıca Macaristan'daki bir araştırma enstitüsünden (Cereal Research Non-Profit Ltd., Szeged-Macaristan) sağlanan, DON ve ZEA içerdiği bilinen, doğal kontamine buğday kullanılmıştır. Macaristan'dan gelen buğday örneği, tarlada buğdaya *Fusarium greminearum* kültürü inoküle edilerek üretilmiştir. Bu örnekler, laboratuvar ölçeğinde çekiçli bir değirmende (HD-703 model, Şimşek Labortechnik, Ankara) öğütülmüş, kaba kepeği ayrılacak şekilde 1 mm'lik elekten geçirilerek 4°C'de

muhafaza edilmiştir. Aflatoksinle doğal kontamine un örneği bulunamadığı için, aflatoksin denemeleri toksin içermediği bilinen una aflatoksin ilave edilerek gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada kullanılan ekşi hamur, toksin içermediği belirlenen unla hazırlanan Trabzon ekmeği hamurunun bir kısmının ayrılıp oda sıcaklığında, 15 saat fermantasyona bırakılmasıyla elde edilmiştir. Bu işlem Trabzon ekmeği üreten lokal bir fırında (Ankara) gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Fiziksel analizler

Öğütülmüş model çalışması ve buğday unu örneklerinde rutubet analizleri AACCI Metot No: 44.19'a göre gerçekleştirilmiştir [47].

Hamur örneklerinde pH analizi

Trabzon ekmeği üretimi için hazırlanan ekşi hamur örneklerinde, 6 saatlik laktik asit fermantasyonunun başı ve sonu, 130 dakikalık maya fermantasyonunun başı ve sonu olmak üzere dört kademede pH ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde Hanna marka HI 221 pH metre (Ronchi di Villafranca, İtalya) kullanılmış olup analizler pH metre probunun hamur örneklerine batırılması yöntemiyle yapılmıştır.

3.2.2. Ekşi hamur modeli

Ekşi hamur modeli Corsetti ve Settanni [48]'nin önerdiği geleneksel ekşi hamur prosesine göre hazırlanmıştır. Toksin içermediği bilinen 300 g un örneğine 250 µg/kg olacak şekilde (3 ml, 25 ppm) ZEA standart çözeltisi eklenerek çözücünün uzaklaşması için 1 saat beklenmiştir. Homojenizasyonun gerçekleştirilmesi amacıyla un örneği 30 dakika spatül ile karıştırılmıştır. Una 300 ml su eklenerek gevşek yapıda hamur hazırlanmıştır. Fermantasyon sürelerinin toksin düzeyine etkisinin belirlenmesi için 6, 12 ve 24 saat süresince hamur örnekleri oda sıcaklığında (25°C±2) fermantasyona bırakılmıştır. Bu süreler sonunda alınan örneklerde üç tekrarlı olarak ZEA analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar geri kazanım

değerine göre düzeltme yapılarak kuru madde üzerinden verilmiştir.

Aynı işlemler, ZEA düzeyi tespit edilebilir sınırların altında olan ancak fermantasyon sırasında açığa çıkması muhtemel toksin düzeyini belirlemek için aynı un örneğinden toksin ilavesi yapılmaksızın hamur modeli hazırlanmış olup, bu hamurda da ZEA analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Ekmek üretimi

Trabzon ekmeği üretimi Kotancılar ve ark. [49] ve Gerçekaslan [46]'nın üretim metodu modifiye edilerek H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Hububat laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan ekşi hamur örnekleri oda sıcaklığında, 15 saatlik fermantasyon süresi sonunda elde edilmiş olup, Ankara Yepaş Ekmek Fabrikası'ndan temin edilmiştir.

ZEA ve aflatoksin analizleri için yaklaşık 350 gramlık ve DON analizleri için yaklaşık 250 gramlık ekmekler üretilerek denemeler gerçekleştirilmiştir.

Trabzon ekmeği üretimi akış şeması Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmiştir. 15 saat süreyle fermantasyona bırakılan ekşi hamurlardan ZEA ve aflatoksin için 85 g, DON için 64,1 g alınıp, bu örnekler 2,5 katı un (212 g ve 160 g) ve yaklaşık % 50 su (32-40 ml ve 25-30 ml) ilave edilip 5 dakika yoğrulmuştur.

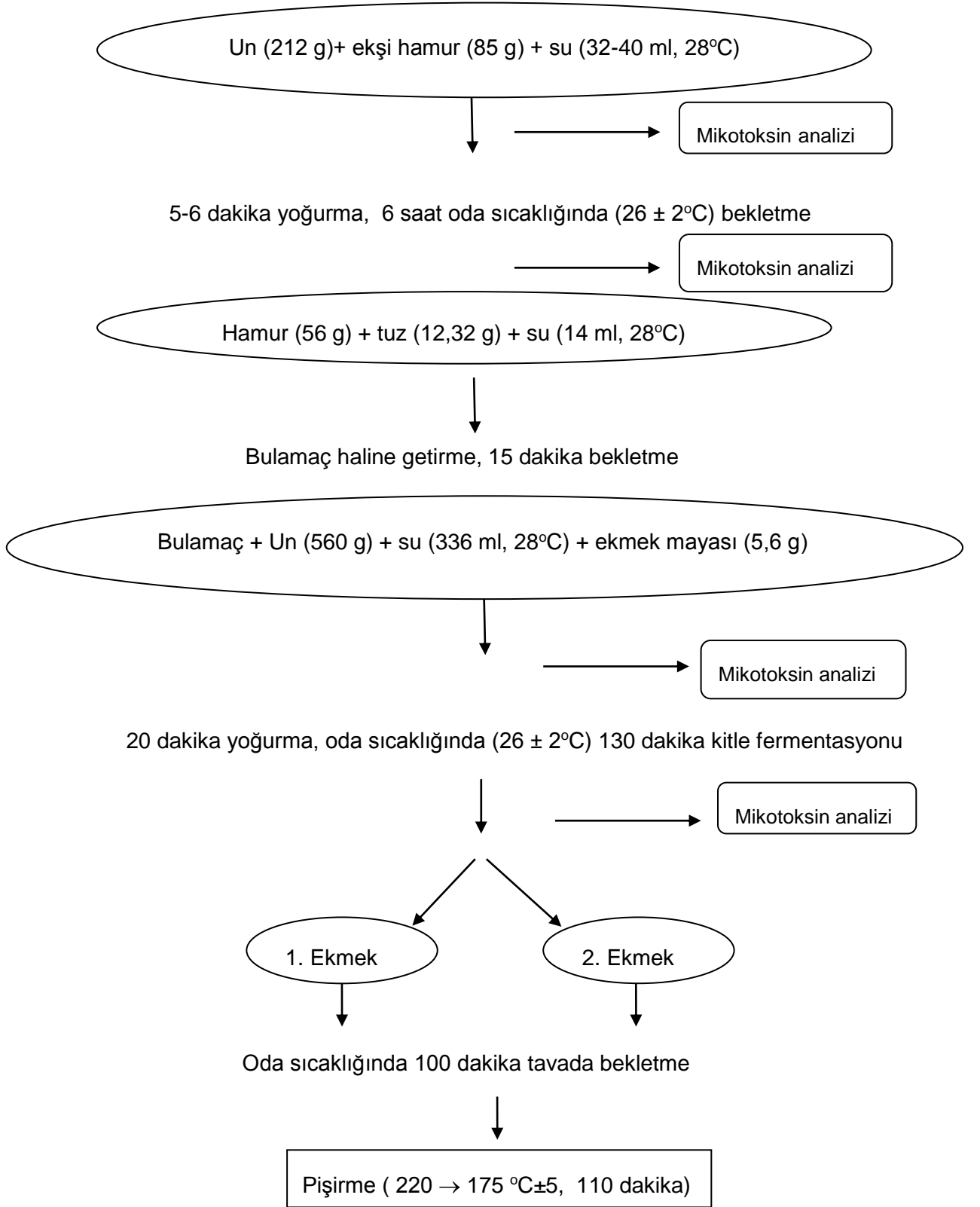
1. Fermantasyon: Sert yapıdaki hamur oda sıcaklığında ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemini korumak için üzerine ıslak bez kapatılarak 6 saat bekletilmiştir.

Süre sonunda ZEA ve aflatoksin için 56 g ekşi hamura 12,32 g tuz ve 14 ml su ilave edilerek bulamaç hazırlanmış ve 15 dakika sonra üzerine, 560 g un, 336 ml su (28°C), 5,6 g yaş maya ilave edilerek 20 dakika yoğrulmuştur. DON için ise 40 g ekşi hamura 8,8 g tuz ve 10 ml su (28°C) ilave edilerek bulamaç hazırlanmış ve yine aynı süre sonunda üzerine, 400 g un, 240 ml su (28°C) ve 4 g yaş maya ilave edilerek aynı süre boyunca yoğrulmuştur.

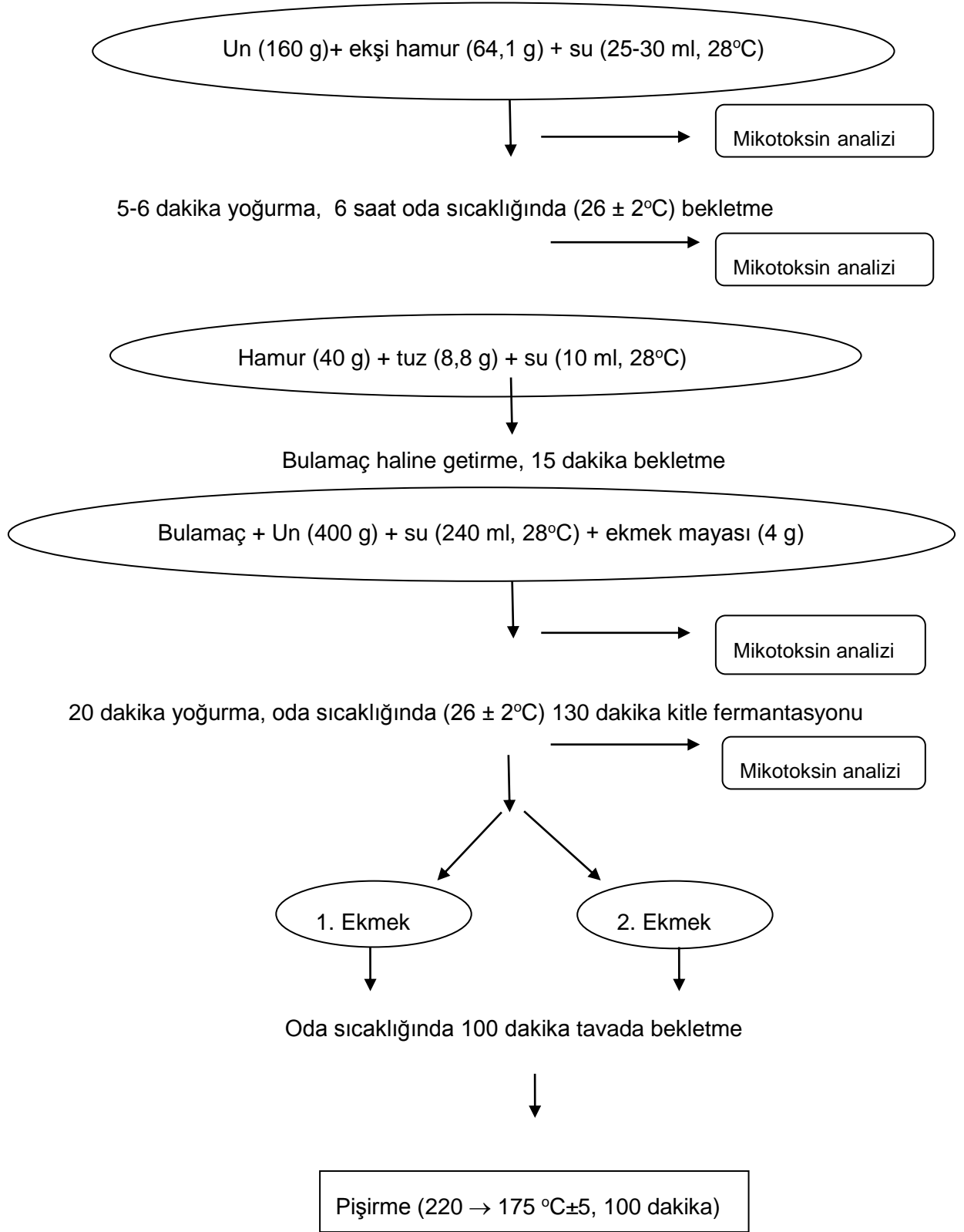
2. Fermantasyon: Daha sonra hamur tepsiye alınarak ve nemi korumak için hamurun üzerine ıslak bez kapatılarak oda sıcaklığında ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 130 dakika kitle fermantasyonuna bırakılmıştır.

Hamur, ekme  gramajı ZEA ve aflatoxinler için yaklaşık 350 g, DON için ise yaklaşık 250 g olacak şekilde kesildikten sonra oda sıcaklığında ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) 100 dakika son fermentasyona bırakılmıştır. İlk sıcaklığı 220°C olan ve pişirmenin sonlarına doğru sıcaklığın $175 \pm 5^\circ\text{C}$ 'ye düştüğü fırında, ekme  gramajları da dikkate alınarak ZEA ve aflatoxinli hamur örnekleri 110 dakika ve DON'lu hamur örnekleri ise 100 dakika boyunca pişirilmiştir.

Trabzon ekmeği geleneksel olarak odun ateşinde pişirildiği için bu fırınlarda sabit bir sıcaklık söz konusu değildir. Bu bağlamda konuyla ilgili yapılmış çalışmalar ([46]; [49]) referans alınarak, uygulamadaki fırın koşullarının sağlanması amacıyla, fırın ilk sıcaklığı 220°C 'ye ayarlanmış ve pişme süresince sıcaklık kademeli olarak ve sonuna doğru $175 \pm 5^\circ\text{C}$ 'ye kadar düşürülmüştür. Fermente hamur örnekleri, önceden ısıtılmış laboratuvar tipi bir fırında (Memmert, UNE 400, Almanya) pişirilmiştir. Üretilen ekme ler  ekil 3.1 ve 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3. 1. ZEA ve aflatoksin için Trabzon ekmeği üretimi akış şeması [46]



Şekil 3. 2. DON için Trabzon ekmeği üretimi akış şeması [46]

3.2.4. Mikotoksin analizleri

Trabzon ekmeği örnekleri iç ve kabuk kısmın ayrılması sırasında elden kaynaklanacak hataların elemine edilmesi amacıyla her mikotoksin için iki tekrarlı yapılmıştır. Fermantasyon aşamalarında elde edilen örnekler ve her ekmek içi ve kabuğu örneklerinde mikotoksin analizleri 3 paralel gerçekleştirilmiştir. Buğday unu, hamur ve ekmek örneklerinin mikotoksin analizleri için aşağıda verilen yöntemler kullanılmıştır. Ekmekler analize alınmadan önce kabuk ve iç kısımları birbirinden ayrılmıştır. Hamur ve ekmek örnekleri liyofilizatörde (0,05 atm) 24 saat boyunca kurutulmuştur. Örnekler liyofilizatörde kurutuluncaya kadar ve kurutulup öğütüldükten sonra analize kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.1. DON analizi

25 g un 200 ml saf su ile 2 dakika yüksek hızlı bıçaklı karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sıvı kısım Whatman no:4 filtre kağıdından ve GF/A filtreden süzölmüştür. Ekstraktın 2 ml'si DON immunoafinite kolonundan 1 damla/s hızında geçirilmiştir. DON immunoafinite kolonu 5 ml fosfat tamponu (PBS) ile 1damla/s hızda yıkandıktan sonra kolonda kalan PBS, su trombu ile oluşturulan vakumla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra DON kolondan 1 damla/s hızında 1.5 ml metanol geçirilerek alınmış ve kolondan ayrılan fraksiyon 4 ml'lik cam viallerde toplanmıştır. 60°C sıcaklıktaki azot altında metanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı 1000 µl ACN+su (10:90) (HPLC mobil faz) içerisinde çözündürölmüş ve 1 dakika vorteks ile karıştırılmıştır [50].

Miktar tayini için UV/DAD dedektörlü HPLC cihazı kullanılmış ve 218 nm'de ölçüm yapılmıştır. Mobil faz olarak 1 ml/dk akış hızında su:asetonitril (90:10, v/v) karışımı kullanılmıştır. Enjeksiyon 100 µl hacminde gerçekleştirilmiş ve her bir ekstraksiyon için üç enjeksiyon yapılmıştır.

3.2.4.2. ZEA analizi

ZEA analizi için MacDonald ve ark. [51] tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. 25 g un 125ml asetonitril:su (75:25, v/v) ile 2 dakika yüksek hızlı karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sıvı kısım Whatman no:4 filtre kâğıdından süzölmüştür. Toplanan

ekstraktan 20 ml alınarak 80 ml PBS ile seyreltilmiştir. Sırasıyla 25 ml örnek ve 20 ml PBS immunoafinite kolondan 1 damla/s hızla geçirilmiştir. Kolonlarda kalan su, su trombu ile oluşturulan vakum ile uzaklaştırılmıştır. Toksin, kolondan 1.5 ml asetonitril geçirilerek 4 ml'lik cam viallerde toplanmıştır. Örnekler, 55°C'de azot gazında kurutulup 1 ml asetonitril-15 mM amonyum asetat tamponu (50:50, v/v) eklenerek çözündürülmüştür.

Miktar tayini için FLD dedektörlü HPLC cihazı kullanılmış ve emisyon dalga boyu 440 nm, uyarma dalga boyu 274 nm olacak şekilde ölçüm yapılmıştır. Mobil faz olarak 1 ml/dk akış hızında ACN:15 mM amonyum asetat (43:57, v/v) kullanılmıştır. Enjeksiyon 100 µl hacminde gerçekleştirilmiş ve her bir ekstraksiyon için üç enjeksiyon yapılmıştır.

3.2.4.3. Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ analizi

Aflatoksinlerin analizi için 991.31 nolu AOAC Resmi yöntemi bazı modifikasyonlarla kullanılmıştır [52]. Bu yöntemde 25 g örnek, 2 g NaCl ve 125 ml metanol-su (60:40, v:v) çözeltisi ile homojenize edilerek ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt filtre edildikten sonra su ile 1:1 oranında seyreltilerek, GF/A filtreden geçirilmiş ve immünoafinite kolonlarda saflaştırılmıştır. Örnekler kolonlara 10 ml hacminde yüklenmiş, yıkama işlemi 10 ml PBS ile yapılmıştır. Vakumla kurutulan kolonlardan toksin 1 ml metanol ile alınmıştır. Daha sonra kolonlardan 1ml deiyonize su geçirilmiştir. Kolonlarda kalan su, su trompu ile oluşturulan vakum ile uzaklaştırılmıştır.

Elde edilen metanol-su karışımındaki örnek HPLC'ye 100 µl hacminde enjekte edilmiştir. Miktar tayini FLD dedektörde HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kolon sonrası türevlendirme amacıyla Coring-Cell sistemi kullanılmıştır. İmmünoafinite kolondan saflaştırılmış olarak elde edilen aflatoksinlerin, C18 kolonda ayrımları gerçekleştirildikten sonra floresan dedektör öncesi Coring-Cell'de brom halojenürü ile türevlendirilmesi gerçekleştirilerek floresan özelliğinin artırılması sağlanmıştır. Floresan dedektörde 365 nm uyarma dalgaboyu ve 430 nm emisyon dalgaboyu olarak ayarlanarak kromatografik ayırım C-18 ters faz HPLC kolonunda, 35°C'de gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 100 µl olup mobil faz olarak 1.0 ml/dk akış hızında, içerisinde 119.6 mg KBr ve 100 µl HNO₃ (65%) çözündürülmüş olan

su:metanol:asetonitril (64:23:13, v:v:v) karışımı kullanılmıştır.

3.3. Validasyon Çalışmaları

Bu tez kapsamında validasyon çalışmaları için doğrusallığın belirlenmesinde kalibrasyon eğrileri oluşturularak, geri kazanım (recovery) ve tekrarlanabilirlik (repeatability) değerleri hesaplanmıştır. Kullanılan analitik cihaz için tayin sınırı (limit of detection-LOD) ve tespit sınırı (limit of quantification-LOQ) belirlenmiştir.

3.3.1. Kalibrasyon çalışmaları

Farklı konsantrasyonlardaki aflatoksinler, DON ve ZEA standart çözeltileri hazırlanarak her mikotoksin için ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Her bir aflatoksin için 0.25 ng/ml'den 5 ng/ml'ye kadar değişen aralıkta yedi farklı konsantrasyonda, DON için 0.125 µg/ml'den 2 µg/ml'ye kadar değişen aralıkta beş farklı konsantrasyonda ve ZEA için 0.015 µg/ml'den 1 µg/ml'ye kadar değişen aralıkta altı farklı konsantrasyonda hazırlanmış standart çözeltiler kullanılmıştır. Kalibrasyon doğrularını belirleme katsayıları (r^2) aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve ZEA için 0.9998, aflatoksin G₂ ve DON için ise sırasıyla 0.9996 ve 0.9999 olarak bulunmuştur ([Ek-1], [Ek-2], [Ek-3]).

3.3.2. Geri kazanım çalışmaları

Un, hamur ve ekmek örneklerinde aflatoksin, DON ve ZEA için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım değerlerinin belirlenmesi için toksin içermediği tespit edilen un örnekleri kullanılarak gerçek örnekleri temsil eden fermente hamur ve Trabzon ekmeği örnekleri üretilmiştir. Hamur örnekleri ve ekmek örneklerinin kabuk ve iç kısımları liyofilizatörde kurutulmuş, mikotoksin analizleri gerçekleştirilinceye kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Un, hamur ve ekmek örneklerine, gerçek örneklerin mikotoksin düzeylerine yakın değerlerde aflatoksin, DON ve ZEA ilavesi yapılmıştır. Bu amaçla un, hamur ve ekmek örneklerine DON için 1000 ng/g ve ZEA için 200 ng/g düzeyinde toksin ilave edilmiştir. Aflatoksinlerin herbiri için ise hamur örneklerine 1 ng/g ve ekmek örneklerine 0,833 ng/g düzeyinde ilave yapılmıştır. Çözücünün (metanol)

uzaklaşması için 1 saat beklendikten sonra örnekler yukarıda verilen yöntemlerle üç paralelli olarak analiz edilmiş ve her paralel için üç enjeksiyon yapılmıştır. Geri kazanım değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır ve standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir.

$$\% \text{ Geri kazanım} = (b / a) \times 100$$

a: eklenen mikotoksin miktarı

b: belirlenen mikotoksin miktarı

*Sonuçlar geri kazanım değerleriyle düzeltilerek verilmiştir.

3.3.3. Tayin ve tespit sınırı

Kullanılan analiz yöntemleri için tespit sınırı (LOD: Limit of Detection) ve tayin sınırı (LOQ: Limit of Quantification) değerlerinin belirlenmesinde, sinyal / gürültü oranı sırasıyla 3 ve 10 olarak alınmıştır [53].

3.3.4. İstatistiksel analizler

Proje kapsamındaki analizler üç paralelli gerçekleştirilmiş, HPLC analizlerinde de üçer enjeksiyon yapılmıştır. Ortalama sonuçlar standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (RSD) değerleri ile beraber verilmiştir. Araştırma sonuçları SPSS 15.0 istatistik paket programı (SPSS, Chicago, IL, USA) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İşlemler öncesi ve sonrası mikotoksin düzeyleri arasındaki farkın önem kontrolü %95 güven aralığında ve non-parametrik testlerle (Friedman, Mann-Whitney ve Kruskal Wallis testleri) gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Trabzon Ekmeği üretimi

Trabzon ekmeğinin kalite özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada geleneksel ekmeğin küçük (1000 g), orta (1500 g) ve büyük (3000 g) olmak üzere 3 gramajda yapıldığı belirtilmekle birlikte, gramajın 500 g'a düşürülmesinin, ekmeğ kalitesini olumsuz etkilemediği rapor edilmektedir [46]. Bu nedenle ekmeğ gramajları, mikotoksin analizlerinde ihtiyaç duyulacak asgari miktarı karşılamak üzere, ZEA ve aflatoksin için yaklaşık 350 gram ve DON için yaklaşık 250 gram olarak belirlenmiştir. Üretilen ekmeğler Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 1. Üretilen Trabzon ekmeğleri

4.2. Buğday unu örneklerinin aflatoksin, DON ve ZEA içerikleri

Çalışmalarda kullanılmak üzere farklı illerden temin edilen 9 buğday unu örneğinin hiçbirinde tespit edilebilir sınırların üzerinde mikotoksin saptanmamıştır. Ankara İl Kontrol Laboratuvarları Mikotoksin Laboratuvarı'ndan sağlanan örneğin DON, Macaristan'dan sağlanan örneğin DON ve ZEA içerdiği tespit edilmiştir. Mikotoksin varlığı tespit edilen tüm buğday unu örnekleri karıştırılarak paçal yapılmıştır. Mikotoksinli un miktarını arttırmak için doğal kontamine buğday unu örneklerinin karıştırılmasıyla oluşan paçal, toksin içermediği bilinen buğday unu ile karıştırılarak ikinci kez paçal yapılmıştır. Her bir toksin düzeyinin fermantasyon boyunca rahat izlenebilmesi için un örneklerinin toksin düzeyinin kabul edilebilir sınırlar üzerinde olmasına dikkat edilmiştir. Örnekler iyice homojenize edildikten sonra DON ve ZEA içerikleri tespit edilmiştir.

Aflatoksin analizlerinde kullanılmak üzere aflatoksinlerle doğal kontamine buğday unu sağlanamadığı için kuru maddesi bilinen ve mikotoksin içermeyen 850 g buğday unu örneğine, her bir aflatoksinin konsantrasyonu 1 µg/kg olacak şekilde B₁, B₂, G₁ ve G₂ aflatoksinlerini içeren standart çözelti (4 ml, 1 ppm) ilave edilmiş ve aflatoksin içeriği belirlenmiştir. Trabzon ekmeği çalışmalarında kullanılan buğday unu örneklerindeki mikotoksin düzeyleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Trabzon ekmeği üretiminde kullanılan buğday unu örneklerinin mikotoksin içerikleri [15].

Mikotoksin	Kons. (µg/Kg)*	RSD†	Maksimum Limit (µg/Kg)*
AFLB ₁	1.1 ± 0.02	1.793	4 (B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)
AFLB ₂	1.2 ± 0.04	2.869	
AFLG ₁	1.4 ± 0.03	1.824	
AFLG ₂	1.7 ± 0.08	4.483	
DON	1576.3 ± 8.27	0.525	750
ZEA	294.0 ± 0.92	0.313	75

Analiz sonuçları, kurumadde düzeltmeleri yapılarak verilmiştir.

† RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

4.3. Validasyon çalışmaları

4.3.1. Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

Aflatoksin, DON ve ZEA için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin R² değerleri (0.999) oluşturulan grafiklerin çalışılan konsantrasyon aralıklarında lineer olduğunu göstermektedir. Enjekte edilen standart çözeltideki mikotoksin miktarını gösteren skala (x eksen) enjeksiyon hacminin 100 µl olması sebebiyle DON [Ek-2] ve ZEA [Ek-3] için 0.1 ve dört aflatoksinin standart çözelti içindeki konsantrasyonlarının eşit olması sebebiyle aflatoksinler için 0.025 katsayısıyla çarpılmıştır [Ek-1].

4.3.2. Geri kazanım

Aflatoksinler, DON ve ZEA analizleri için hazırlanan buğday unu örneklerinde bulunan geri kazanım değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Buğday unu örneklerinde aflatoksinler, DON ve ZEA için belirlenen geri kazanım değerleri (n=3)

Mikotoksin	Geri kazanım (%)	RSD [†]
AFLB ₁	99.7 ± 2.24	2.25
AFLB ₂	106.4 ± 0.74	0.70
AFLG ₁	84.7 ± 0.00	0.00
AFLG ₂	79.2 ± 2.13	2.69
DON	101.2 ± 0.57	0.57
ZEA	103.5 ± 0.95	0.92

[†] RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Avrupa Birliği (EC) yönetmeliğinde [54], mikotoksinler için bildirilen analitik metod kriterlerine göre 1 µg/kg'a kadar aflatoksin (B₁ + B₂ + G₁ + G₂) içeren örneklerde geri kazanım değeri 50-120 ve 1-10 µg/kg içerenlerde 70-110 arasında olmalıyken, 500 µg/kg'dan fazla DON ve 50 µg/kg'dan fazla ZEA içeriğine sahip örneklerde ise, 70-120 arasında olmalıdır. Buğday unu örneklerinde aflatoksinler, DON ve ZEA için bulunan geri kazanım değerleri sınır değerler arasında saptanmıştır. Hesaplanan relatif standart sapma değerlerinin düşük olması, elde

edilen sonuçların kabul edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir. Tez kapsamında yapılan mikotoksin analizlerine ait sonuçlar geri kazanım değerlerine göre düzeltilmiştir.

4.3.3. Tespit sınırı ve tayin sınırı

Aflatoksin, DON ve ZEA için tespit sınırı ve tayin sınırı değerleri cihazdaki elektronik gürültünün 3 ve 10 katı alınarak hesaplanmıştır. DON, ZEA ve aflatoksinlere ait tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri Çizelge 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. DON ve ZEA için belirlenen tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri

Mikotoksin	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
DON	16.9	56.3
ZEA	2.6	8.7

Çizelge 4.4. Aflatoksinler için belirlenen tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri

Mikotoksin	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)
AFLB ₁	0.033	0.110
AFLB ₂	0.015	0.050
AFLG ₁	0.043	0.143
AFLG ₂	0.014	0.047

4.4. Ekşi Hamur Modelinde ZEA Miktarında Değişim

4.4.1. ZEA ilave edilmiş unla hazırlanan ekşi hamur modeli

Tespit edilebilir düzeyde ZEA saptanmamış una 0.25 mg/kg olacak şekilde zenginleştirme yapılmış ve bu unun kuru madde üzerinden ZEA içeriği 0.268 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Bu unla hazırlanan hamur, oda sıcaklığında 24 saat süresince fermantasyona bırakılmıştır. Hamurdan 0, 6, 12 ve 24. saatlerde alınan

örneklerde ZEA analizleri gerçekleştirilmiştir. ZEA miktarları Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. Ekşi hamur modelinde fermantasyon boyunca ZEA miktarları

Fermantasyon süresi (saat)	ZEA (mg/kg)*	RSD†	Una göre % azalma
un	0.268	-	-
0	0.172 ± 0.008 ^b	4.55	35.8
6	0.164 ± 0.008 ^a	4.90	38.6
12	0.236 ± 0.017 ^d	7.00	12.0
24	0.211 ± 0.004 ^c	1.97	21.2

Analiz sonuçları, kurumadde düzeltmeleri yapılarak verilmiştir.

(† RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Hamur için geri kazanım değeri ilk hazırlanan hamurda gerçekleştirilmiş ve % 99.0 ± 0.63 olarak bulunmuştur. Fermantasyon süresince una göre hamur örneklerinin ZEA miktarlarında gözlenen azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). Başlangıç hamuruna göre fermantasyonun 6. saatinde alınan hamur örneğinde ZEA miktarı % 4.7'lik bir azalma göstermiştir. Fermantasyonun 12. saatinde alınan hamur örneğinde tespit edilen ZEA miktarı, başlangıç hamurunda ölçülen ZEA değerine göre % 37.2'lik bir artış göstermiştir. Fermantasyonun 24. saatinde tespit edilen ZEA miktarı, başlangıç hamuruna göre yüksek bulunsa da bir önceki basamak olan 12. saatte ölçülen değere göre % 10.6'lık azalma bulunmuştur.

Fusarium cinsi patojen küflerle kontamine olmuş hububat danelerinde oluşan ZEA ve DON mikotoksinleri, yine patojen küfler ve konakçı bitki tarafından (bitkinin bir savunma mekanizması olarak); asetilasyon, glukozidasyon ve kükürtleme gibi biyokimyasal mekanizmalarla daha az zararlı formlara dönüştürülmektedir. Bu biyokimyasal dönüşümler söz konusu mikotoksinin belirli fonksiyonel gruplarla ya da moleküllerle konjugasyonu sonucu meydana gelmekte ve bu konjugatlar maskelenmiş mikotoksinler olarak adlandırılmaktadır. ZEA'nın glukozla konjugasyonu sonucu ZEA-4G (ZEA-4-glikozid) formu meydana gelmektedir. Bazen fermantasyondan sorumlu mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu ZEA, kendisini oluşturan α' -ZOL (α' -zearelenol) ve β -ZOL (β -zearelenol) formlarına

parçalanmaktadır [19]. Tüm bu oluşumlar fermantasyon boyunca dinamik bir yapı olan ekşi hamur ortamında ZEA miktarını etkileyen parametreler olarak değerlendirilebilir.

Gıda maddelerindeki konjuge mikotoksinlerin çözünürlük ve polarite gibi fizikokimyasal özellikleri, serbest haldeki mikotoksinlerden farklıdır. Bu nedenle konjuge mikotoksinler, ekstraksiyon ve kromatografik ayırmada tespit edilemezler. Bu konjugatlar, gıda matriksindeki nişasta ve protein gibi makromoleküllere kovalent bağlarla bağlanırlar. Analiz öncesinde bu bağları kırarak uygun yöntemlerin (kimyasal ya da enzimatik hidroliz) uygulanması gerekir. Bu yapılar genellikle metanol/su ya da asetonitril/su ile kısmen ekstrakte edilebilmekte ya da hiç ekstrakte edilememektedir. Bu durum hedef mikotoksinin nicelik olarak yanlış belirlenmesine neden olmaktadır. Benzer şekilde, mikotoksinler gıda matriksindeki makromoleküllere kovalent olmayan bağlarla da bağlanabilmektedir. Bu yapılar da, kimyasal ya da enzimatik işlemler olmadan, mikotoksinin serbest halde tespit edilmesini engellemektedir [18].

El-Nezami ve ark. [26] yaptıkları çalışmada, ekşi hamur fermantasyonundan sorumlu olan *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinsi mikroorganizmaların (LAB), kültür ortamında ZEA miktarını azalttıklarını gözlemlemiştir. Bu azalmanın, mikroorganizmanın peptidoglukan ve polisakkarit gibi hücresel yapılarıyla ZEA'yı bağlaması sonucu gerçekleştiği anlaşılmıştır. Fermantasyon boyunca asitliğin artmasıyla LAB hücre duvarının peptidoglukan ve polisakkarit yapılarında yer alan peptid ve glikozidik bağlar kırılmakta ve yapısı bozulan LAB hücrelerinde ZEA ve α -ZOL'u bağlayabilecek daha fazla yapı ortaya çıkmaktadır. Çalışmada ZEA ve α -ZOL'un ortama ilave edildiği anda kültür ortamında çoğaltılmış *L. rhamnosus* GG ve *L. rhamnosus* LC705 suşlarıyla yüksek miktarda bağlanma gösterdiği ancak inkübasyona devam edildiğinde ZEA ve türevlerinin tekrar kültür ortamına salındığı ve daha sonra tekrar bakteri yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir. Benzer şekilde ZEA ekşi hamur modelinde de fermantasyon boyunca ZEA miktarının dalgalandığı gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Yiannikouris ve ark. [28], *Saccharomyces cerevisiae*'den izole edilmiş β -D-glukan gibi sarmal yapıların ZEA'yı *in vitro* koşullarda bağladığını göstermiş ve bu bağlanmayı moleküler düzeyde açıklamıştır. Bu bilgiye dayanarak, ZEA model

çalışmasının 6. ve 24. saatlerinde mikotoksin miktarında gözlenen azalmaların doğal floraya ait yabani mayaların çoğalmasıyla meydana geldiği düşünülebilir. Aynı çalışmaya göre β -D-glukan ile ZEA arasındaki bağlanmanın asidik ve nötral koşullar altında stabil olduğu, oysa alkali koşullarda β -D-glukan yapısının bozulmasıyla bağlanmanın azaldığı bildirilmektedir [28].

Yukarıda bahsedilen mikotoksin - β -D-glukan bağlanması ile pH ilişkisi üzerine bulgular, oluşan mikotoksin- β -D-glukan yapısının fermantasyon gibi ortam pH'sını düşüren bir işlem boyunca dayanıklı kalacağına işaret etmektedir. Undan gelen LAB ve yabani mayaların oda koşullarında (26 ± 1), 24 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirdiği ZEA model çalışmasında, hamur örneklerinin pH düzeyinde önemli azalma beklenmiş olsa da hamur örneklerinin pH değeri $5,5 \pm 0,2$ olarak ölçülmüş ve istatistiksel olarak önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Sonuç olarak, hamurdaki yabani mayaların ölçülebilir ZEA miktarını tek başına azaltacak kadar çoğalmadığı ve dolayısıyla ZEA - β -D-glukan bağlanmasının diğer parametrelerin varlığında baskın olmayan bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Bir başka çalışmada, fermentatif bakterilerin ZEA, DON ve FB'yi bağlama ve parçalama düzeylerinin belirlenmesi amacıyla 202 farklı türde bakteri, mısırdan hazırlanmış bir sıvı ortama inoküle edilmiştir. 30-37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılan sıvı kültür örneklerindeki ZEA'nın bir kısmı (% 5.5), 8'i *Lactobacilli* ve 3'ü *Leuconostoc* cinsinden olan 11 tür bakteri tarafından α '-ZOL'a dönüştürülmüştür. Aynı çalışmada inkübasyon sonunda *Streptococcus thermophilus* hücrelerinin de ZEA'nın yaklaşık % 47'sini bağladığı bildirilmiştir [55].

4.4.2. ZEA ilave edilmemiş ekşi hamur modeli

ZEA ilave edilmiş ekşi hamur modelinde 12. ve 24. saatte gözlenen artışların unda maskelenmiş ZEA varlığı ile ilgili olabileceği düşünülerek yukarıda belirtilen fermantasyon, toksin ilave edilmeyen aynı unla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ZEA değerleri Çizelge 4.6'te verilmektedir.

Çizelge 4.6. ZEA ilave edilmeyen ekşi hamurda fermantasyon boyunca ZEA miktarları

Fermantasyon süresi (saat)	ZEA (mg/kg)*	RSD†
0	0.000	
6	0.007 ± 0.0004	5.033
12	0.009 ± 0.0006	6.974
24	0.007 ± 0.0002	2.574

* ZEA düzeyleri ortalama ± SD şeklinde verilmiştir.

† RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Bu model çalışmasında fermantasyon boyunca ölçülen ZEA değerleri, bu çalışma kapsamında ZEA için belirlenen tespit sınırının (LOD) altında bulunmuştur. ZEA tespit edilmeyen unla hazırlanan hamurda 6, 12 ve 24 saatlik fermantasyon sonunda ppb düzeyinde ZEA açığa çıkmıştır. Belirtilen zaman aralıklarında alınan hamur örneklerine ait analiz sonuçları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar, az miktardaki gömülü veya bağlı toksinin fermantasyon süresince enzimler tarafından açığa çıkarıldığı görüşünü desteklemektedir.

Şimşek ve ark. [21], ekmeğin üretiminin DON üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hamurdaki DON miktarının 30°C'de ve % 85 nemde gerçekleştirilen fermantasyon sonunda 1.96 µg/kg arttığını belirtmektedir (p<0.05). Ekmeğin üretiminde kullanılan buğday unu DON ile birlikte DON-3G (DON-3-glikozid)'yi de içerdiğinden bu artışın DON-3G'nin DON'a dönüşümü sonucu meydana geldiği düşünülmüş, fakat her iki bileşiğin fermantasyon boyunca miktarsal değişimi takip edildiğinde, DON-3G miktarında meydana gelen azalmanın DON miktarında meydana gelen artışı karşılamadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle fermantasyon boyunca makromoleküllere gömülü DON'un enzimatik reaksiyonlar sonucu serbest hale geçmesiyle hamurdaki DON miktarının arttığı düşünülmüş, enzim aktivitesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, *Fusarium* ile kontamine olmuş buğdayda ksilanaz aktivitesinin normal una göre

yüksek olduğunu, fermantasyon boyunca da bu aktivitenin artmaya devam ettiğini göstermiştir. Ksilanaz enzim aktivitesi ile hücre duvarı yapı taşları hidrolizinin hızlandığı ve bağlı DON'un serbest hale geçtiği kabul edilmektedir.

ZEA içermediği tespit edilen unla hazırlanan ekşi hamurda, fermantasyon boyunca bir miktar saklı ZEA'nın açığa çıkması, Şimşek ve ark. [21]'nin bulgularıyla paralellik göstermektedir. Her iki model çalışmasında da ZEA miktarında ilk 12 saat içinde bir artış, sonraki 12 saat içinde ise bir azalış meydana gelmektedir. 24. saat sonunda meydana gelen azalışın, ZEA'nın laktik asit bakterileri ve undaki doğal maya hücreleriyle kısmen bağlanmasıyla ya da fermantasyon boyunca ZEA'nın farklı formlarının oluşmasıyla (α -ZOL ve β -ZOL) veya ZEA'nın yeniden gıda matriksindeki makromoleküllere bağlanmış olmasıyla meydana geldiği düşünülmektedir.

Özetle, fermantasyon boyunca ZEA miktarında meydana gelen dalgalanma genel olarak her iki model çalışması için de benzerlik göstermiştir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen ZEA model çalışmalarına ait sonuçlar, fermantasyon boyunca ZEA miktarında meydana gelen dalgalanmaların sadece ZEA'nın türevlerine dönüşmesi veya ZEA'nın gıda matriksindeki makromoleküllere ve mikroorganizmalara bağlanması ile açıklanamayacağını göstermektedir. Çünkü fermantasyon boyunca ekşi hamurda son derece dinamik bir yapı oluşmakta ve aynı anda pek çok parametre ZEA'yı nicel olarak etkilemektedir. Yukarıda sayılan nedenler dışında fermantasyon boyunca hamurun kimyasal yapısında meydana gelen değişimler (pH vb.) de mikotoksin miktarındaki dalgalanmaları etkilemektedir. Bu nedenle sadece belli bir etkinin azalmayı veya artışı sağladığı yönündeki yorumlar, diğerlerinin göz ardı edilmesine ve hatalara neden olacaktır.

4. 5. Trabzon Ekmeği Üretimine ZEA, DON ve Aflatoksinler Üzerine Etkisi

Trabzon ekmeği üretim akış şeması (Şekil 3.1 ve 3.2) incelendiğinde, farklı ingrediyenlerle hazırlanan iki ayrı hamur karışımının olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle her hamur karışımı kendisinden sonra gerçekleşen fermantasyon sonrası örnekler ile ve birbirlerinden bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Ekmekte elde edilen sonuçlar ise; pişirmenin etkisini değerlendirmek üzere ikinci fermantasyon sonrası hamur örnekleriyle ve Trabzon ekmeği üretimine mikotoksinler üzerine

etkisini değerlendirmek üzere ikinci fermantasyon öncesi hamur örnekleriyle karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4. 7. Farklı sürelerde fermantasyona bırakılmış hamur, ekmek kabuğu ve içi örnekleri için kısaltmalar ve açıklamaları

Örnek Kodu	Açıklama
HMR1	1. hamur (un + ekşi hamur)
FRM1	1. fermantasyon sonrası hamur (6 saat)
HMR2	2. hamur (un + fermente 1. hamur + ekmek mayası)
FRM2	2. fermantasyon sonrası hamur (130 dakika)
EKMİÇ	Ekmek içi
EKMKB	Ekmek kabuğu

Çizelge 4. 8. Fermantasyonlar öncesi ve sonrası hamur örneklerinin pH değerleri

Örnek	pH	RSD†
HMR1	4.56	0.22
FRM1	4.24	0.14
HMR2	5.30	0.50
FRM2	5.23	1.61

† RSD: relatif standart sapma ($RSD = (\text{standart sapma} / \text{ortalama}) * 100$)

* Fermantasyon boyunca sıcaklık $26 \pm 1^\circ\text{C}$ olarak ölçülmüştür.

Trabzon ekmeği üretiminde birinci ve ikinci fermantasyona ait hamur örneklerinin pH değişimi Çizelge 4.8'de verilmiştir. Trabzon ekmeği üretiminde kullanılan ekşi hamur, bir önceki günün ekmek hamurundan alınan parçanın 15 saatlik fermantasyonuyla elde edildiği için bir miktar ekmek mayası da içermektedir. Ancak asitlik artışı, bu 15 saat boyunca ortama LAB'ın hakim olduğunu düşündürmektedir. HMR1'in yaklaşık 6 saatlik ilk fermantasyonu boyunca pH'da düşüş devam etmiştir. Literatürde LAB'ların ürettiği organik asitlerin daha etkili olmak üzere ve mayaların ürettiği CO_2 'nin hamurda çözünmesinin de fermantasyon boyunca gözlenen asitlik artışından sorumlu olduğu bildirilmektedir [56].

Ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) katılarak gerçekleştirilen 130 dakikalık fermantasyon sonunda pH'daki düşüş birinci fermantasyona göre nispeten azdır. İkinci fermantasyonun ilk fermantasyona göre daha kısa sürmesi asitlik artışını azaltan bir faktör olsa da, literatürde LAB'ların maya ile birlikte buldukları kültür ortamında saf kültür ortamına göre daha yavaş çoğalarak ve dolayısıyla daha az laktik ve asetik asit ürettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. *Saccharomyces cerevisiae*'ye ait enzim aktivitesinin LAB'a göre yüksek olması ve ortamdaki serbest şekeri daha hızlı kullanmasıyla, LAB fermantasyonu ve asit oluşumu da yavaşlamaktadır [56].

4.5.1. Trabzon ekmeği üretiminin ZEA üzerine etkisi

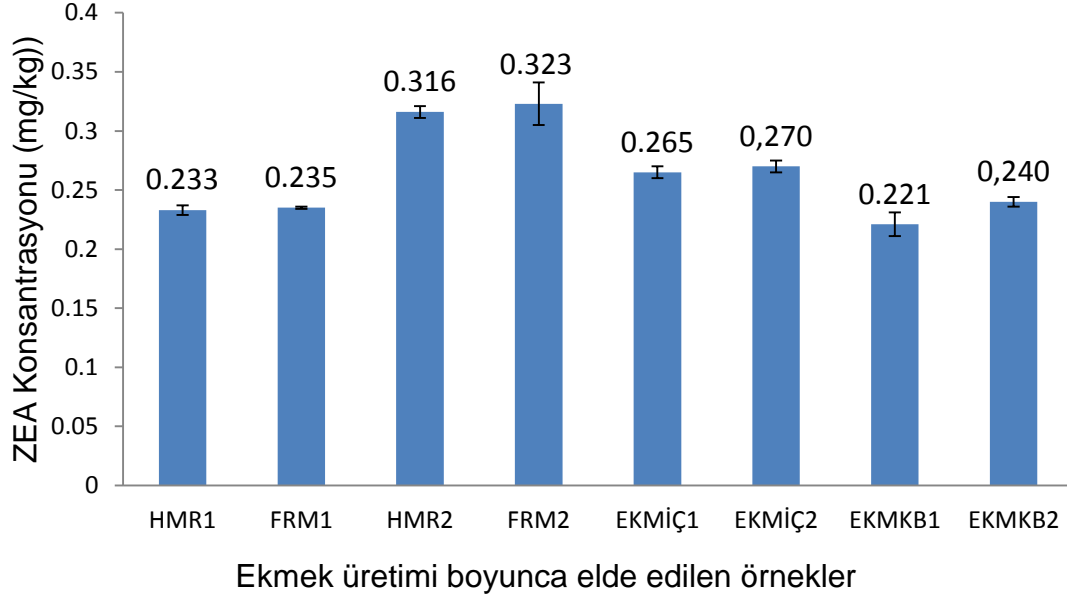
ZEA analiz yönteminin her bir matriksteki geri kazanım değerleri Çizelge 4.9'da verilmektedir. Elde edilen geri kazanımlar, mikotoksinler için Avrupa Komisyonu tarafından 401/2006 nolu yönetmelikte bildirilen analitik metot kriterlerine uygun bulunmuştur [54].

Çizelge 4. 9. ZEA analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri (n=3)

Örnek	% Geri Kazanım	RSD [†]
UN	103.5 ± 0.95	0.92
HMR1	107.4 ± 1.43	1.33
FRM1	104.4 ± 3.40	3.26
HMR2	99.0 ± 0.63	0.63
FRM2	104.4 ± 0.96	0.92
EKMİÇ	110.4 ± 1.75	1.59
EKMKB	114.3 ± 1.64	1.44

[†] RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Kuru madde cinsinden 0.294 ± 0.01 µg/g ZEA içerdiği bilinen buğday unu ile gerçekleştirilen Trabzon ekmeği üretimi boyunca ZEA miktarında meydana gelen değişim Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. Trabzon ekmeği üretimi boyunca ZEA miktarındaki değişim
(† Hata çubukları \pm standart sapma değerlerini göstermektedir.)

Üretim akış şemasından anlaşılacağı üzere (Şekil 3.1) farklı formülasyona sahip iki hamur karışımı söz konusu olduğundan, fermantasyonlar kendi içlerinde değerlendirilmiştir. Ekmek örneklerinden elde edilen sonuçlar ise ikinci fermantasyonun hem öncesi hem de sonrasına ait hamur örnekleriyle karşılaştırılmıştır.

Sadece ekşi maya katılarak gerçekleştirilen 6 saatlik ilk fermantasyon sonunda başlangıç hamurunun ZEA miktarı değişmemiştir ($p>0.05$). İlk fermantasyondan sonra hamur örneklerinin ZEA miktarında meydana gelen artış, ikinci hamur karışımına un ilave edilmiş olmasıyla açıklanmaktadır.

ZEA miktarında 130 dakikalık maya fermantasyonu sonrası meydana gelen % 2.2'lik artış (Şekil 4.2) ile ekmek kabuğu (% 25.7 – 31.6) ve ekmek içi örneklerinde (% 16.4 - 21.9) meydana gelen azalışlar önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Ekmek örneklerinin sonuçları istatistiksel olarak kendi içinde uyumludur ($p>0.05$). Bu da, ekmek örneklerinin iç ve kabuk kısımlarının ayrılması sırasında elden kaynaklanan hataların ve fırın içi konumdan kaynaklanan farkların elimine edilebildiğini göstermektedir. Trabzon ekmeği üretiminin ZEA üzerine etkisi, 2. hamur (HMR2) sonuçlarının ekmek kabuğu ve içinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmasıyla incelenmiştir. Buna göre tüm işlem sonunda ekmek içinde % 14.5 - 16.1 ve ekmek

kabuğunda % 24.1 - 30.1 aralığında azalma gerçekleşmiştir.

İlk fermantasyon boyunca ZEA miktarında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Buradan elde edilen sonuçlar, asitliğin hızla arttığı LAB fermantasyonu ve ısıtma işlemi boyunca ZEA'nın büyük oranda dayanıklı kalabildiğini göstermektedir ($p>0.05$).

İkinci fermantasyon boyunca tüm örneklerde ölçülen ZEA miktarının undaki değerden yüksek olması dikkat çekicidir. Bu durum, ilk fermantasyon sırasında artan bakteriyel ve enzimatik faaliyetler ile ZEA'nın gıda matriksinden kopması ve serbest hale geçmesi şeklinde yorumlanabilir. Ancak literatürde yoğurma gibi mekanik işlemlerin de mikotoksinleri açığa çıkarabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Lancova ve ark. [16], DON ile doğal kontamine buğday unu kullanılarak hazırlanan ekmek hamurundaki DON miktarının yoğurma işlemi sırasında % 21 - 40 oranında arttığını gözlemlemiştir.

Bu tez kapsamında, doğal kontamine unla hazırlanan Trabzon ekmeği hamurunda (özellikle 2. fermantasyon sonunda) gözlenen ZEA'daki artışın bir kısmının yoğurma gibi mekanik işlemlerle de açığa çıkabileceği düşünülmektedir.

Ancak bu önemli artışın, ZEA model çalışmasında olduğu gibi ortamda çoğalan mikroorganizmaların ve undan gelen enzimlerin gıda matriksini bozmasıyla ZEA'nın değişik formlarının ölçülebilir ZEA'ya dönüşmesi sonucu ortaya çıktığı kabul edilebilir. Ekşi hamur ortamında fermantasyon boyunca meydana gelen değişimleri açıklayan literatürdeki çalışmalar bu durumu daha iyi aydınlatmaktadır. Ekşi hamur ortamında fermantasyon süresi uzadıkça LAB'lar ve doğal olarak bulunan mayalar arasında beslenme rekabeti de artmaktadır. Fermantasyon boyunca enzim faaliyetleri artsa da, nişasta gibi makromoleküllerin hidrolize olma hızı, mayaların çözümler şekerleri tüketme hızından yavaş gerçekleşmekte ve bu rekabete bağlı olarak çözümler şekerler hızla tüketilmektedir. Dolayısıyla ekmek mayasının ekşi hamur ortamına ilavesi, bu rekabeti daha da arttırmakta ve buna bağlı olarak asitlik artış hızı da artan LAB - maya rekabeti nedeniyle düşmektedir [56]. Bu durum konjuge ZEA'nın hidrolizini arttıran bir etken olarak değerlendirilebilir. Zira literatürde fermantasyon gibi proseslerin sonunda maskelenmiş (konjuge) mikotoksinlerden serbest mikotoksin formlarının açığa çıktığını bildiren çalışmalar mevcuttur ([22]; [19]).

Sindirim konjuge ZEA üzerine etkisini araştıran bir çalışmanın sonuçları, kümes

hayvanlarının mide ortamında ZEA-4G'nin parçalanmasıyla ZEA'nın serbest formlarının açığa çıktığını ortaya koymaktadır [57].

İkinci fermantasyon sonrası hamur örneklerinin ZEA miktarı ile karşılaştırıldığında ekmek örneklerinin ZEA miktarının daha düşük bulunması, sıcaklık uygulamalarının da ZEA varlığını etkilediğini göstermektedir. Ancak bu sonuçları literatürdeki benzer çalışmalarla desteklemek oldukça güçtür. Çünkü Trabzon ekmeği üretimi, fermantasyon aşaması bakımından uzun ve kademeli bir prosestir. Ayrıca uygulanan pişirme sıcaklığı ve süresi de normal ekmeğe uygulanan normlara göre farklılık göstermektedir. Zira ısı işlemin mikotoksinler üzerine etkisi; fermantasyon ve pişirme işlemlerinin koşulları ve süresine bağlı olarak değişiklik göstermekte ve bu nedenle literatürde yer alan bulgular da birbirleriyle çelişmektedir [24].

Literatürde ısı işlemler sırasında gıdanın iç sıcaklığının fırın içi sıcaklığına ulaşamaması ya da mikotoksinlerin örnek içindeki diğer bileşenlere bağlanarak uygulanan sıcaklıktan korunmaları sonucu mikotoksinlerin bozunmadan kalabildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur [58].

Matsuura ve ark. [38], ZEA ilave edilmiş buğday unu ile hazırlanan hamurun 200°C'de 30 dakika pişmesiyle hazırlanan ekmekte ZEA miktarının % 34 - 40 azaldığını bildirmektedir. Bu tez çalışmasında da 220 - 175 ± 5°C 'de 109 dakika uygulanan ısı işlem sonrası kaydedilen en yüksek azalmanın % 31.6 (ekmek kabuğunda) (Şekil 4.2) düzeyinde gerçekleşmesi, Matsuura ve ark. [38]'nin bulgularıyla paralellik gösterse de, ısı işlem sürelerinin ve uygulanan fermantasyon koşullarının farklı olması benzer oranlardaki azalışların tek başına ısı işlemle açıklanmasını güçleştirmektedir.

Numanoğlu [53]'nun mısır ve ürünlerinde ısı işlemin *Fusarium* toksinleri üzerine etkisini araştırdığı bir çalışmada, ZEA miktarında kayda değer bir azalmanın ancak 150°C ve üzerindeki sıcaklıklarda meydana geldiği gözlenmiş ve 200°C'de 30 dakika tutulan hamur disklerinin ZEA miktarında % 31.7 oranında azalma belirlenmiştir. Model çalışmada gözlenen ZEA'nın termal bozunma davranışı, ekmek üretiminde de benzer sıcaklık ve süreler seçilerek araştırılmış ve mısır ekmeği üretiminde 250°C'de 70 dakika pişirme uygulanmıştır. ZEA düzeyindeki azalma, ekmek kabuğunda % 15.5 ve ekmek içinde % 1.2 olarak saptanmıştır. Trabzon ekmeği kabuk ve iç örneklerinde saptanan azalmaların bu çalışmaya göre

daha yüksek olması; her iki çalışmada sıcaklık, süre ve gıda matrislerinin farklı olması ve mısır ekmeği üretiminde bir fermantasyon basamağının olmamasıyla açıklanabilir. Zira, fermantasyon boyunca ZEA'nın serbest hale geçmesinin, ZEA'nın sıcaklığa temas eden yüzey alanında artışa sebep olarak uygulanan ısı işlemin etkinliğini arttırdığı düşünülmektedir.

4.5.2. Trabzon ekmeği üretiminin DON üzerine etkisi

DON için yapılan geri kazanım çalışmasında, 6 saat fermantasyon sonrası hamur örnekleri hariç tüm örneklerde hesaplanan geri kazanım değerleri Avrupa Komisyonu'nun (EC) belirlediği limit değerler içerisinde (Çizelge 4.10). Geri kazanım değerleri ilk fermantasyon sonrası elde edilen hamur örnekleri için limit değerinin altında bulunmuştur [54].

Çizelge 4.10. DON analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri (n=3)

Örnek	% Geri Kazanım	RSD†
UN	101.2 ± 0.57	0.57
HMR1	95.6 ± 3.08	3.22
FRM1	38.3 ± 6.56	17.14
HMR2	100.3 ± 1.67	1.66
FRM2	99.8 ± 1.81	1.81
EKMİÇ	93.8 ± 1,72	1.83
EKMKB	94.5 ± 1.52	1.61

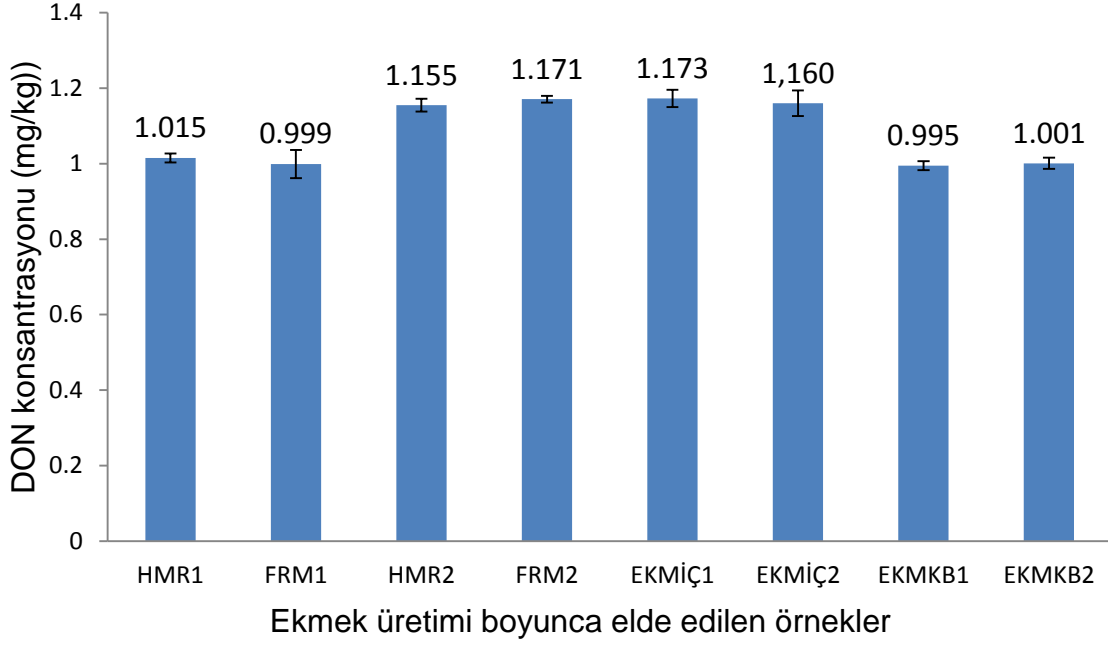
† RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Geri kazanım çalışmalarında 6 saatlik fermantasyon sonunda alınan hamur örneği mikotoksin analizinde kullanılmak üzere liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Bütün geri kazanım analizleri kurutulmuş örneklerde gerçekleştirildiğinden burada başlangıç ununa ilave edilen toksinin yalnızca % 38'sinin geri alınabilmesi oldukça ilginç bir sonuçtur. DON'un suda çözünürlüğünün çok yüksek olduğu bilindiğinden dondurarak kurutma sırasında uzaklaşan suyla bir miktar DON'un kaybedildiği düşünülebilir (Şekil 4.3). Ancak bu durum, aynı şekilde liyofilize edilen hamur örneklerinde gözlenmemiştir. 1. fermantasyon sonrası hamur örneğinin, diğer

hamur örneklerinden LAB hücrelerince daha zengin olduğu tahmin edildiğinden (pH değeri en düşük örnek), azalmanın DON-LAB arasındaki bağlanmaya bağlı olduğu söylenebilmektedir. Tekrarlanan deneylerde de yine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Başka bir ifadeyle DON, LAB'ce zengin bir ortama ilave edildiğinde anlık bir DON-LAB bağlanması gerçekleşmiş ve toksinin önemli bir kısmı ölçülememiştir. Oysa hamurun DON içeriğinde fermantasyon sonrası benzer bir azalma gerçekleşmemiştir. Bu durum, DON-LAB bağlanmasının ilave edilen serbest DON ile ortamdaki LAB'ın anlık etkileşimi sonucu gerçekleştiğini ve toksin miktarında ciddi bir azalmaya yol açtığını düşündürmektedir.

Nitekim literatürde söz konusu durumu güçlendiren çalışmalar mevcuttur. Lancova ve ark. [16], ekmek üretiminin DON düzeyine etkisini fermantasyon ve ısıtma işlemlerinde incelemişlerdir. Fermente hamur örneklerinde yapılan geri kazanım çalışmaları, benzer şekilde EC'nun belirlediği limit değerlerin altında bulunmuş ve bu durum, DON'un kanıtlanamayan şekilde maya hücrelerine anlık bağlanması olarak yorumlanmıştır. LAB-mikotoksin etkileşiminin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, ZEA ve α -ZOL'un LAB kültür ortamına ilave edildiği anda azaldığını ancak inkübasyon devam ettikçe bağlı mikotoksinlerin tekrar ortama salınmasıyla artış meydana geldiği bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumu, mikotoksin-LAB bağlanmasının anlık bir proses olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Aynı çalışmada, kültür sıvısında ölçülemeyen ZEA ve α -ZOL'un % 50'sinin etanol ekstraksiyonuyla bakteriyel pelletten geri kazanılmış olması, mikotoksinin bakteri hücresiyle etkileşime girdiğini gösteren bir başka kanıttır [26].

Kuru madde cinsinden 1.576 ± 0.008 ppm DON içerdiği bilinen doğal kontamine buğday unu kullanılarak üretilen Trabzon ekmeğinin üretim aşamalarında DON miktarı değişimi Şekil 4.3'te verilmektedir.



Şekil 4.3. Trabzon ekmeği üretimi boyunca DON miktarındaki değişim
(† Hata çubukları \pm standart sapma değerlerini göstermektedir.)

DON konsantrasyonunda 6 saat fermantasyon sonunda önemli bir değişim gözlenmemiş olup ($p>0.05$), 130 dakika fermantasyon sonunda ise % 1.4'lük önemli bir artış meydana gelmiştir ($p<0.05$).

Ekmek örneklerinde bulunan sonuçlar istatistiksel olarak kendi aralarında paralellik göstermektedir ($p>0.05$). Ekmek içi örneklerindeki azalma ve artışlar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuş ($p>0.05$), ekmek kabuğu örneklerindeki azalmalar % 14.5-15 aralığında ve istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Trabzon ekmeği üretiminin DON üzerine etkisi, 2. hamur karışımından itibaren ekmek kabuğu ve içinden elde edilen sonuçlarda incelenmiştir. Buna göre tüm proses sonunda ekmek içinde % 0.4 - 1.4 oranında artış ve ekmek kabuğunda % 13.3 - 13.8 aralığında azalma gerçekleşmiştir.

Young ve ark. [32], mayalanmış fırıncılık ürünleri üretiminin mikotoksinler üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, proses boyunca örneklerdeki DON miktarının arttığını gözlemlemiş ve bunu, DON'un öncüllerinin enzimatik reaksiyonlar sonucu DON'a dönüşmesi olarak açıklamışlardır.

Lancova ve ark. [16] da, ekmek üretiminin trikotesenler üzerine etkisini araştırmışlar; *Saccharomyces cerevisiae* katılmış hamur örneklerinde DON

miktarının, 30°C'de 50 dakika süren fermantasyon sonrası % 38 – 46 azaldığı, ancak fermantasyonun devamında (45 dakika sonunda) % 32 – 45 artış meydana geldiğini gözlemişlerdir. Örneklerin DON miktarında meydana gelen bu dalgalanmalar, kontaminasyon düzeyi ne olursa olsun tüm örneklerde aynı desende gerçekleşmiştir (azalış-artış).

Benzer şekilde Trabzon ekmeği üretiminin fermantasyon aşaması boyunca hamur örneklerinin DON miktarında gözlenen dalgalanma deseni de azalış-artış şeklindedir. Fermantasyondaki sıcaklık ve süre parametreleri her iki çalışma için farklı olsa da, DON-maya ya da DON-LAB bağlanmalarının fermantasyon başında olduğu ancak fermantasyon ilerledikçe DON'un serbest kalarak ortama salındığı her iki çalışmanın sonuçlarından da anlaşılmaktadır. Aynı çalışmada fermente hamur örneklerinin 210°C fırında 14 dakika pişirilmesinden sonra ise DON miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir ($P>0.05$). Trabzon ekmeği üretimi sırasında ise, kullanılan sıcaklık değerleri bu çalışmadakine yakın olup (220 – 175°C), pişme süresi çok daha uzun olmasına rağmen (109 dakika) ekmeğin DON miktarında yine benzer şekilde önemli bir değişim gerçekleşmemiştir.

Yumbe-Guevara ve ark. [11], 220°C'de tutulan çözelti içindeki DON'un, aynı sıcaklıkta tutulan öğütülmüş doğal kontamine arpa örneklerindeki DON'a göre 2 kat daha hızlı bozunduğunu gözlemlemiştir. Bu sonuçlar, küf ile doğal kontamine hububat tanesinde üretilmiş DON'un, DON ilave edilmiş örneklerin yüzeyinde bulunan DON'a göre sıcaklık uygulamalarına daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. Çünkü mikotoksinler, ekmeğin sıcaklığının fırın sıcaklığına ulaşamaması ya da mikotoksinin gıda bileşenleriyle etkileşmesi gibi nedenlerle ısı işlemler boyunca bozulmadan kalabilmektedir [58]. Trabzon ekmeği üretimi boyunca örneklerdeki DON'un pişirme koşullarına bu kadar dayanıklı olması, üretimde kullanılan buğday ununun doğal kontamine olması ve mikotoksinlerin sıcaklığa dayanıklılığıyla açıklanmaktadır.

Düşük, orta ve yüksek düzeyde DON içeren buğday unu örneklerinin ekmeğin üretiminde kullanıldığı bir çalışmada, fermantasyon aşaması *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak gerçekleştirilmiş ve düşük ve orta düzeyde DON içeren örneklerin DON miktarında önemli artış meydana gelmiştir (sırasıyla % 46 ve % 31) ($p<0.05$). Yüksek düzeyde DON içeren örnekte ise önemli bir değişim

olmamıştır ($p>0.05$). Yüksek düzeyde DON içeren örnekte meydana gelen artışın istatistiksel olarak önemsiz bulunması, bu artışın örneğin içerdiği toplam DON miktarına oranla ihmal edilebilir düzeyde olması ile açıklanmıştır. Trabzon ekmeği üretiminin 2. fermantasyonu sonrası istatistiksel olarak önemli olan ancak görece ciddi olmayan bir artışın (% 1.4) meydana gelmiş olması da yukarıda bahsedilen çalışmada kullanılan un ile hemen hemen aynı DON düzeyine sahip un kullanıldığı göz önüne alınarak aynı nedenle açıklanabilmektedir. Aynı çalışmada ekmekler 170 - 225°C fırın sıcaklıklarında, 0 - 13 dakika süresince pişirilmiştir. Buradaki sıcaklık değerleri bizim çalıştığımız sıcaklık değerlerine oldukça yakın olup, benzer şekilde bu çalışmada da son ürünlere ait DON düzeyinde önemli bir değişim saptanmamıştır [7].

Bölüm 4.4.1'de yer alan ZEA modelinde değinildiği gibi Şimşek ve ark. [21], enzim çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre fermantasyon boyunca DON düzeyinde meydana gelen artışın sadece DON'un bir metaboliti olan DON-3G'nin DON'a dönüşümü ile açıklanamayacağını ifade etmişlerdir. Çünkü fermantasyon boyunca hamurun DON miktarında sürekli artış meydana gelirken, DON-3G miktarında ise önce artış, daha sonra azalış gözlenmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, biyomoleküllere gömülü DON'un enzimatik reaksiyonlar sonucu serbest hale geçmesi gibi farklı ihtimaller üzerinde durmuşlardır. Buğdayın yüksek düzeyde *Fusarium* ile kontaminasyonu sonrası buğday unundaki α -amilaz ve selüloz aktivitesi artışına ve *Fusarium* küflerine ait hücre duvarının buğday içi makromolekülleri parçalayan enzimlerin iyi bir kaynağı olmasına dayanan ayrıntılı enzim aktivitesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla ekmeğin üretimi boyunca α -amilaz, proteaz ve ksilanaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, fermente olmuş hamur örneklerindeki ksilanaz aktivitesinin fermente olmamış hamur örneklerine göre yüksek olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). Fermantasyon boyunca artan ksilanaz aktivitesine bağlı olarak, hücre duvarı materyallerinin hidrolizi artmakta ve bu materyallere bağlı olan DON serbest hale geçmektedir. Bu çalışmayla fermantasyon boyunca mikotoksin miktarında meydana gelen artışta enzim aktivitesinin önemli yere sahip olabileceği anlaşılmıştır. Aynı çalışmada pişirme sonrası ekmeğin örneklerinin DON miktarında kısmi bir azalma gerçekleşmiş olsa da bu azalma, bu tez çalışmasına ait sonuçlarla benzer şekilde istatistiksel olarak önemsizdir. Bütün çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, başlangıç

hamuruna göre son ürün ekmekteki DON miktarının % 40.8 daha fazla olduğu da tespit edilmiştir.

Literatürde yer alan diğer çalışmalarda bildirildiği gibi ([16, 21]), ekmeğin üretimi boyunca DON düzeyinde gerçekleşen dalgalanmalara rağmen, ekmeğin üretiminde kullanılan un ile ekmeğin DON düzeyi karşılaştırıldığında, uygulanan prosesin DON düzeyini önemli ölçüde değiştirmedeği anlaşılmaktadır.

4.5.3. Trabzon ekmeğinin aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ üzerine etkisi

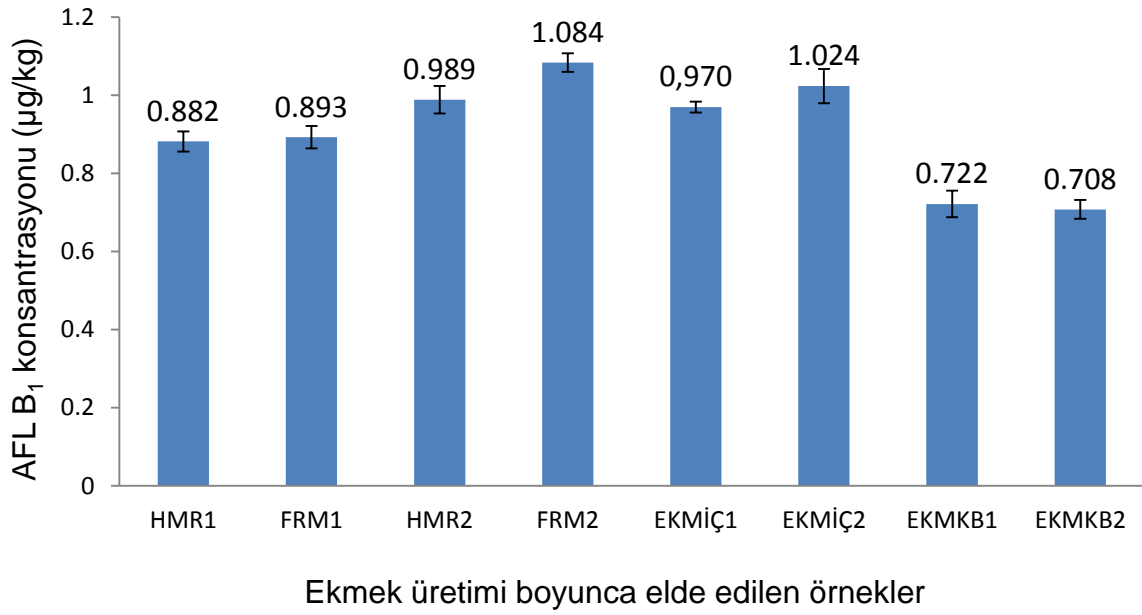
Aflatoksin analiz yönteminin her bir matriksteki geri kazanım değerleri Çizelge 4.11'de verilmektedir. Elde edilen geri kazanımlar, ekmeğin kabuğu örnekleri hariç tüm örneklerde, AFLB₁ için Avrupa Komisyonu tarafından 401/2006 nolu yönetmelikte bildirilen analitik metod kriterlerine uygun bulunmuştur (EC, 2006).

Çizelge 4. 11. AFLB₁ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri (n=3)

Örnek	% Geri Kazanım	RSD [†]
UN	99.7 ± 2.24	2.25
HMR1	91.3 ± 1.50	1.64
FRM1	96.0 ± 2.08	2.17
HMR2	100.5 ± 1.44	1.43
FRM2	94.5 ± 2.45	2.59
EKMİÇ	108.7 ± 3.60	3.30
EKMKB	116.5 ± 2.33	2.00

[†] RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Kuru madde cinsinden 1.075 ± 0.019 ppb AFLB₁ içeren buğday unu ile gerçekleştirilen Trabzon ekmeğinin üretimi boyunca AFLB₁ miktarındaki değişim Şekil 4.4'te gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLB₁ miktarındaki değişim
(† Hata çubukları ± standart sapma değerlerini göstermektedir.)

İlk fermantasyon sonunda AFLB₁ miktarında önemli bir değişim gözlenmemiş ($p>0.05$) ve ikinci fermantasyon sonunda % 9.6 oranında önemli artış meydana gelmiştir ($p<0.05$).

Ekmek örneklerinden elde edilen sonuçlar kendi aralarında paralellik göstermektedir ($p>0.05$). Pişme öncesi hamur örneğine kıyasla ekmek kabuğu ve içinde meydana gelen azalmalar önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Isıl işlemin etkisiyle ekmek kabuğu ve içinde meydana gelen azalmalar sırasıyla % 33.4 – 34.7 ve % 5.5 - 10.5'dir. Trabzon ekmeği üretiminin AFLB₁ üzerine etkisi, 2. hamur (HMR2) sonuçlarının ekmek kabuğu ve içinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmasıyla incelenmiştir. Buna göre tüm proses sonunda ekmek içinde % 1.9 azalış ve % 3.5 artış gözlenirken, ekmek kabuğunda % 26.9 - 28.4 aralığında azalma tespit edilmiştir.

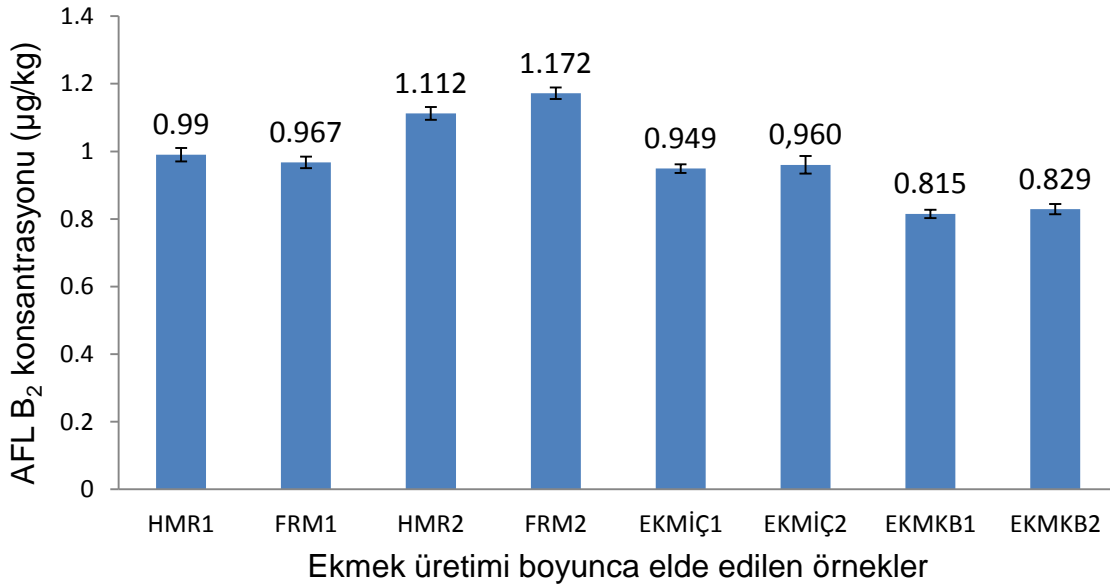
Aflatoksin analiz yönteminin her bir matriksteki geri kazanım değerleri Çizelge 4. 12'de verilmektedir. Elde edilen geri kazanımlar AFLB₂ için Avrupa Komisyonu tarafından 401/2006 nolu yönetmelikte bildirilen analitik metod kriterlerine uygun bulunmuştur [54].

Çizelge 4.12. AFLB₂ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri (n=3)

Örnek	% Geri Kazanım	RSD [†]
UN	106.4 ± 0.74	0.70
HMR1	98.6 ± 1.82	1.85
FRM1	104.6 ± 1.29	1.23
HMR2	112.0 ± 1.38	1.23
FRM2	106.7 ± 1.84	1.72
EKMİÇ	116.2 ± 1.19	1.02
EKMKB	118.4 ± 2.19	1.85

[†] RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Kuru madde cinsinden 1.242 ± 0.036 ppb AFLB₂ içeren buğday ununun kullanıldığı Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLB₂ miktarındaki değişim Şekil 4.5'te gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLB₂ miktarındaki değişim

([†] Hata çubukları ± standart sapma değerlerini göstermektedir.)

AFLB₂ miktarında 6 saatlik ilk fermantasyon sonunda % 2.3 oranında önemli bir azalış (p<0.05), 130 dakikalık maya fermantasyonu sonunda ise % 5.4 oranında önemli bir artış bulunmuştur (p<0.05).

Ekmek örneklerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak paralellik göstermektedir (p>0.05). Pişirme öncesi hamur örneğine kıyasla ekmek kabuğu ve

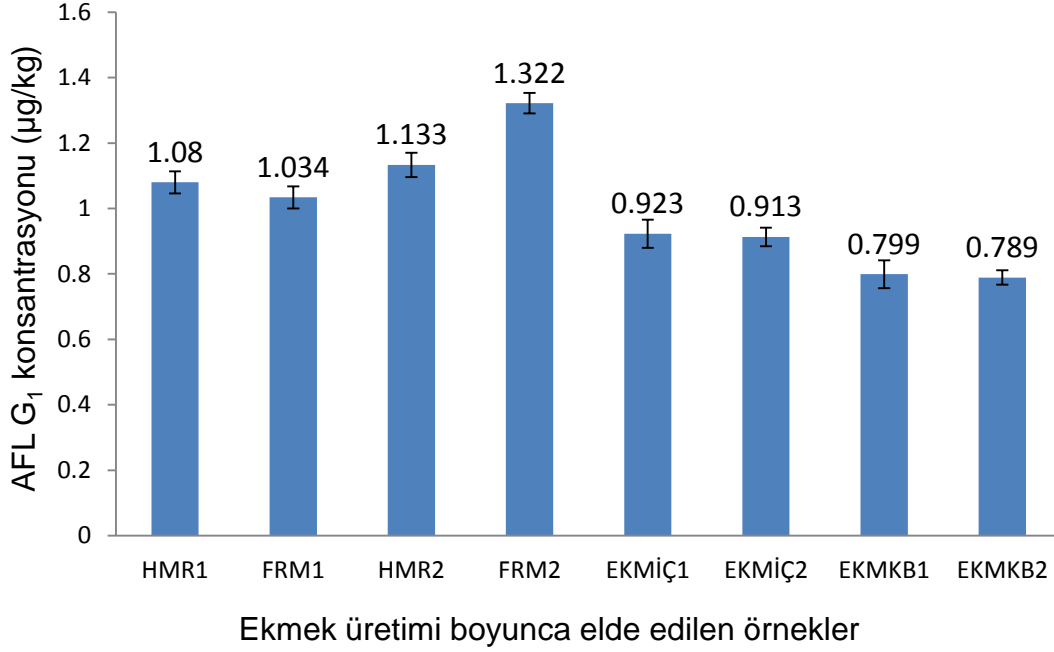
içinde meydana gelen azalmalar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Isıl işlem sonunda ekmek kabuğu ve içinde gözlenen azalmalar sırasıyla % 29.3 – 30.4 ve % 18.1 - 19'dur. Trabzon ekmeği üretiminin AFLB₂ üzerine etkisi, 2. hamur (HMR2) karşımlı sonuçlarının ekmek kabuğu ve içinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmasıyla incelenmiştir. Buna göre tüm proses sonunda ekmek içinde %13.7 - 14.7, ekmek kabuğunda % 25.5 - 26.7 aralığında azalma tespit edilmiştir. Aflatoksin analiz yönteminin her bir matriksteki geri kazanım değerleri Çizelge 4. 13'de verilmektedir. Elde edilen geri kazanımlar, AFLG₁ için Avrupa Komisyonu tarafından 401/2006 nolu yönetmelikte bildirilen analitik metod kriterlerine uygun bulunmuştur [54].

Çizelge 4.13. AFLG₁ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri (n=3)

Örnek	% Geri Kazanım	RSD [†]
UN	84.7 ± 0.00	0.00
HMR1	76.9 ± 2.48	3.23
FRM1	83.3 ± 2.92	3.51
HMR2	89.3 ± 2.65	2.96
FRM2	76.9 ± 2.48	3.23
EKMİÇ	93.4 ± 3.51	3.75
EKMKB	89.0 ± 3.60	4.05

[†] RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Kuru madde cinsinden 1.433 ± 0.026 ppb AFLG₁ içerdiği bilinen buğday unu kullanılarak gerçekleştirilen Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLG₁ miktarındaki değişim Şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLG₁ miktarındaki değişim
(† Hata çubukları ± standart sapma değerlerini göstermektedir.)

Hamur örneklerinin AFLG₁ miktarı, 6 saatlik ilk fermantasyon sonunda % 4.3 oranında azalmış ve 130 dakikalık maya fermantasyonu sonunda ise % 16.7 önemli artış göstermiştir ($p < 0.05$).

Ekmek örneklerinden elde edilen sonuçlar kendi aralarında paralellik göstermektedir ($p > 0.05$). Pişme öncesi hamur örneğine göre ekmek kabuğu ve içi örneklerinde meydana gelen azalmalar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Pişirme sonrası ekmek kabuğu ve içinde gerçekleşen azalmalar sırasıyla % 36.6 – 40.3 ve % 30.2 – 30.9'dur. Trabzon ekmeği üretiminin AFLG₁ üzerine etkisini değerlendirmek üzere ekmek örneklerinden elde edilen sonuçlar, 2. hamur karışımından elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Buna göre tüm proses sonunda ekmek içinde %18.5 - 19.4 ve ekmek kabuğunda % 29.5 - 30.4 oranında azalma tespit edilmiştir.

Aflatoksin analiz yönteminin her bir matriksteki geri kazanım değerleri Çizelge 4. 14'te verilmektedir. İlk fermantasyon sonrası hamur örneği hariç tüm örneklerde AFLG₂ için hesaplanan geri kazanım değerleri Avrupa Komisyonu (EC) tarafından 401/2006 nolu yönetmelikte bildirilen analitik metod kriterlerine uygun bulunmuştur. İlk fermantasyondan sonra elde edilen hamur örneğine ait geri

kazanım değeri ise sınır değerin altında bulunmuştur [54].

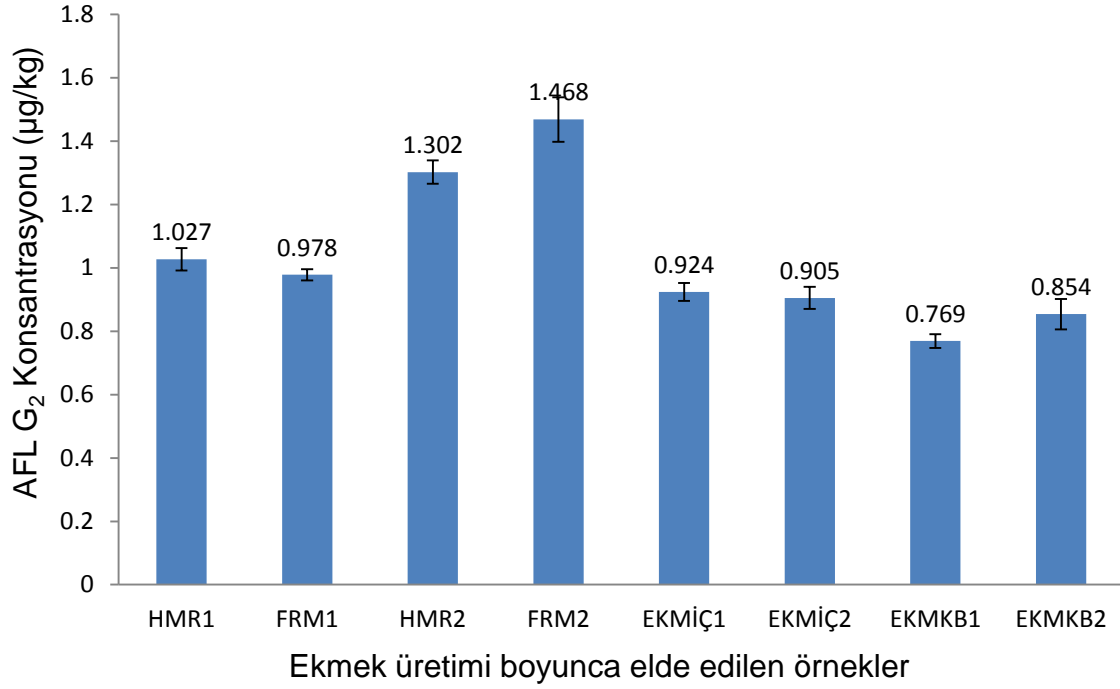
DON deneyinde olduğu gibi AFLG₂ için bulunan düşük geri kazanım değeri, benzer şekilde ekmek üretimi sırasında gerçekleşmemiştir. Bu durum yine ispatlanamayan ancak anlık LAB-mikotoksin bağlanmasına işaret etmektedir. Bu sonuçlara göre, ölü LAB hücrelerinin AFLG₂'yi bağlama kapasitesinin yüksek olduğu düşünülebilir.

Çizelge 4.14. AFLG₂ analiz yöntemi için belirlenen geri kazanım değerleri (n=3)

Örnek	% Geri Kazanım	RSD [†]
UN	79.2 ± 2.13	2.69
HMR1	52.3 ± 2.46	4.70
FRM1	44.9 ± 2.50	5.47
HMR2	90.4 ± 2.70	2.96
FRM2	81.0 ± 4.50	5.57
EKMİÇ	85.7 ± 3.87	4.52
EKMKB	68.8 ± 3.29	4.79

[†] RSD: relatif standart sapma (RSD = (standart sapma / ortalama) * 100)

Kuru madde cinsinden 1.698 ± 0.076 ppb AFLG₂ içeren buğday unu ile gerçekleştirilen Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLG₂ miktarındaki değişim Şekil 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Trabzon ekmeği üretimi boyunca AFLG₂ miktarındaki değişim
(† Hata çubukları ± standart sapma değerlerini göstermektedir.)

AFLG₂ miktarı 6 saatlik fermantasyon sonunda % 4.8 oranında azalmış ($p < 0.05$) ve 130 dakikalık fermantasyon sonunda % 12.7 oranında artmıştır ($p < 0.05$).

Ekmek örneklerinde bulunan sonuçlar kendi içinde paralellik göstermektedir ($p > 0.05$). Ekmek kabuk ve içi örneğinde azalmalar önemli bulunmuş ($p < 0.05$), AFLG₂ miktarında meydana gelen azalmalar sırasıyla % 41.8 – 47.6 ve % 37 – 38.3 oranında gerçekleşmiştir. Trabzon ekmeği üretiminin AFLG₂ üzerine etkisi, 2. hamur (HMR2) karşımlı sonuçlarının ekmek kabuğu ve içinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmasıyla incelenmiştir. Buna göre tüm proses sonunda ekmek içinde %29 – 30.5, ekmek kabuğunda % 30.4 - 40.9 aralığında azalma tespit edilmiştir.

Zinedine ve ark. [59], Afrika'ya özgü ekşi mayalı hamurdan izole ettikleri LAB suşlarını, 30°C ve pH 6.5'deki kültür ortamında çoğaltmış ve 48 saat sonunda ortamdaki AFLB₁ konsantrasyonunun % 1.8 – 44.9 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Ortam pH'sı ve sıcaklığındaki farklılığa bağlı olarak elde edilen sonuçların değiştiği anlaşılmış ve bu durumun koşullara bağlı olarak spesifik bir enzim aktivitesinin değişmesi sonucu gerçekleştiği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında, 6 saatlik ekşi hamur fermantasyonu sonunda AFLB₁

miktarında önemli bir değişimin gerçekleşmemesi yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçlarıyla çelişse de, enzim faaliyetlerinin hamur fermantasyonu boyunca AFLB₁ – LAB bağlanmasını etkilediği düşünülmektedir. Ancak daha önceki çalışmalarda da bahsedildiği gibi, fermantasyon canlı ve dinamik bir proses olduğundan pek çok parametrenin bu bağlanmayı etkileyebileceği düşünülmektedir.

Shetty ve ark. [60], kültür ortamında çoğaltılan çeşitli maya suşlarının AFLB₁'i *in vitro* düzeyde bağlama kapasitesini araştırmıştır. Çalışma boyunca 18 tane *Saccharomyces cerevisiae* suşuyla çalışılmış, bunlardan 11 tanesi bir çeşit geleneksel fermente mısır hamuru olan Kenkey'den ve 7 tanesi Sorghum bitkisinden üretilen bir çeşit biradan (Pito) izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının AFLB₁'i bağlayabildiği ancak bağlama kapasitesinin suşa özgü bağlanma mekanizmasına göre değiştiği anlaşılmıştır. Bu suşlardan 3 tanesinin ortamdaki AFLB₁'i % 40'tan fazla, diğer 3 tanesinin ise % 10'dan daha az bağlayabildiği tespit edilmiştir. Geriye kalan 12 suş türü ise, ortamdaki AFLB₁'i % 10 – 40 oranında bağlamaktadır. En yüksek bağlanmanın gerçekleştiği zaman ise, maya hücrelerinin büyüme fazının (eksponansiyel faz) başlangıcıdır ve durağan faza yaklaştıkça bağlanma oranı giderek azalmaktadır. Bu sonuç, bu tez çalışmasında DON ve AFLG₂ için elde edilmiş geri kazanım sonuçlarını açıklayan bir veri olarak değerlendirilebilir. Aynı çalışmada % 73 – 75 oranında bağlanmanın inkübasyonun ilk 30 dakikasında gerçekleştiğine vurgu yapılarak LAB-mikotoksin bağlanmasında olduğu gibi maya-mikotoksin bağlanmasının da hızlı ve anlık bir proses olduğu bildirilmektedir. Isıl işlemin ve asitlik artışının maya hücre duvarında mikotoksini bağlayan spesifik bölgeleri açığa çıkardığı düşünülerek ısıl işlem ve pH'daki düşme sonucu maya hücresi-AFLB₁ bağlanmasının artacağı belirtilmiştir.

Trabzon ekmeği üretiminin 130 dakika maya fermantasyonu sonunda AFLB₁ miktarında meydana gelen artış, yukarıda bahsedilen AFLB₁-maya bağlanmasını desteklememektedir. Ancak daha önce de ifade edildiği gibi hücresel yapılarla bağlanma veya enzim faaliyeti gibi mekanizmaların etkilerini fermantasyon boyunca tek başına gözlemek mümkün olmadığından pek çok parametre ortamdaki mikotoksin düzeyini etkilemektedir. Ayrıca mikotoksin miktarının uzun süren fermantasyon basamakları sonunda değerlendirilmesi nedeniyle anlık hücre-

mikotoksin bağlanması tespit edilememiştir. Ancak AFLB₁ hariç tüm aflatoksinler için fermantasyonun ilk 6 saatinde gerçekleşen önemli azalmadan sonra devam eden 130 dakikanın sonunda önemli artışın gözlenmesi, fermantasyon uzadıkça ortaya çıkan başka etkiler nedeniyle hücre-mikotoksin yapısının zayıfladığına işaret etmektedir.

Chelule ve ark. [61], Afrika'ya özgü mısır lapasında yaptıkları bir araştırmada 24 saat boyunca, oda sıcaklığında laktik asit fermantasyonuna bırakılan mısır lapasında AFLB₁ miktarının tespit edilebilir düzeyin altına indiğini gözlemiştir. Bu sonuç, LAB fermantasyonu devam ettirildiğinde mikotoksin miktarında ciddi azalmanın sağlanacağını gösterse de, bunun AFLB₁-LAB bağlanması sonucu mu yoksa enzimatik ya da bakteriyel parçalanma sonucu mu gerçekleştiğini anlamak için destekleyici çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tam buğday ekmeği üretiminin AFLB₁ üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kristal halde AFLB₁ eklenen tam buğday unu ile hazırlanan ekmek hamurunun AFLB₁ miktarında yoğurma boyunca düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç, ZEA için gerçekleştirilen ekşi hamur modelinden (Çizelge 4.5) elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Nitekim, una ilave edilen toksinin yoğurma sırasında çeşitli gıda bileşenleriyle etkileşmesi sonucu ölçülebilir serbest toksin formunun azalması beklenmektedir. Ancak doğal kontamine un örneklerinin serbest toksin miktarında yoğurmayla artış meydana gelmesi, yoğurma gibi işlemlerin kullanılan hammaddenin özelliğine göre toksin içeriğini etkilediğini göstermektedir. Aynı çalışmada hazırlanan hamur 30 dakika boyunca maya fermantasyonuna bırakılmış, daha sonra 120°C fırında 30 dakika pişirilmiştir. Pişirme sonrası ekmek örneklerinin AFLB₁ miktarında hamur örnekleri ile kıyaslandığında önemli bir azalma gözlenmemiştir ($p>0.05$) [41].

Bu tez çalışmasında da AFLB₁ üzerine pişirmenin etkisi sadece ısıl işlem olarak ele alındığında bir azalış tespit edilse de, Trabzon ekmeği üretiminin AFLB₁ üzerine etkisi değerlendirildiğinde toksin varlığını değiştirmedeği gözlenmektedir. Bu durum, başlangıç hamurunda (HMR2) ölçülen toksin değerinin varolan değerden daha düşük ölçüldüğünü gösterdiğinden, bir prosesinin toksin üzerine etkisini sağlıklı bir şekilde değerlendirebilmek için her aşamada ölçüm yapma gerekliliği daha iyi anlaşılmaktadır.

Adegoke ve ark. [62], %1 oranında manyok unu içeren ekmek üretiminin AFLB₁

varlığına etkisini araştırmıştır. Manyok kökünden elde edilen un, suyla karıştırılıp kaynatılmış ve karışım 36°C'ye soğutularak yarı saydam jel kıvamına getirilmiştir. Daha sonra şeker, tuz, maya çözeltisi ve yağ ile karıştırılarak elde edilen hamur, 30 – 40 dakika boyunca fermantasyona bırakılmıştır. Olgunlaştırılan hamur, 215°C'de fırında 40 dakika boyunca pişirilmiştir. İşlem boyunca manyok ununda ölçülen AFLB₁ değeri; jelde %45.5 oranında azalmış, hazırlanan hamurda değişmemiş ve manyok ekmeğinde % 50 oranında azalma göstermiştir.

Yukarıdaki çalışmada pişirme sonrası AFLB₁ miktarında belirlenen % 50 oranında azalma, Trabzon ekmeği üretiminin pişirme basamağı sonrası ekmek kabuğunda gözlenen % 33.4 – 34.7 azalma oranına kıyasla oldukça yüksektir. Her iki çalışmada fermantasyon öncesi uygulanan işlemlerin farklı olması ve çalışmaların farklı gıda matrikslerinde gerçekleştirilmesi nedeniyle AFLB₁ miktarında meydana gelen azalma oranları değişmektedir denilebilir.

Kpodo ve ark. [63], fermente mısır ürünlerinde proses boyunca aflatoksin ve sitrinin miktarı değişimini araştırmışlardır. Bu amaçla mikotoksin içerdiği bilinen mısır taneleri karıştırılıp 3 gün boyunca, 28°C ortam sıcaklığında ve 1:3 (w/v) oranında suyla ıslatılmış ve daha sonra öğütülmüştür. Bu mısır unu ile hazırlanan hamur örnekleri 28°C ortam sıcaklığında 3 gün fermantasyona bırakıldıktan sonra, 3 saat pişirilerek geleneksel bir ürün olan Kenkey hazırlanmıştır. Örnekler yüksek (A) ve düşük (B) düzey aflatoksin içerikli olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır. Yüksek düzeyde aflatoksin içeren A sınıfındaki örneklerin aflatoksin miktarının, 72 saatlik fermantasyon sonrası azalmadığı bildirilmektedir ($p>0.05$). Hatta örneklerin AFLB₁ miktarında ıslatma ve 48 saatlik fermantasyon sonunda ve AFLB₂ miktarında ise yine ıslatma ve 24 saatlik fermantasyon sonunda önemli artışlar bulunmuştur. Bu artış, fermantasyon boyunca hamur örneklerinin pH değerindeki düşüğe bağlanmış ve pH düşüşüyle birlikte aflatoksindeki lakton halkasının kendini onarmış olabileceği bildirilmiştir. Pişirme sonrası AFLB₁ ve AFLG₁ miktarında % 80 ve AFLB₂ miktarında ise % 35 azalma gerçekleştiği belirtilmiştir ($p<0.05$). AFLG₂ miktarında ise önemli bir değişiklik bulunmadığı bildirilmektedir ($p>0.05$). Düşük miktarda aflatoksin içeren B sınıfı örneklerin aflatoksin miktarında da fermantasyon sonunda önemli bir değişiklik gözlenmediği ancak, ısı işlem sonrası aflatoksin miktarında meydana gelen azalmaların yüzdesel olarak düştüğü ifade edilmiştir (AFLB₁ için % 38 ve AFLB₂ için %7). Aynı çalışmada pişirme işlemi sonunda

AFLB₂ ve AFLG₂'nin, AFLB₁ ve AFLG₁'e göre ısıya daha stabil olduğu anlaşılmıştır.

Benzer şekilde bu tez çalışmasında da pişirme sonrası AFLB₁ miktarındaki azalma AFLB₂'ye göre yüksek bulunmuştur. Ancak ısıl işlem sonunda en yüksek azalma çelişkili olarak AFLG₂ miktarında gerçekleşmiştir.

Elsanhoty ve ark. [64], çeşitli LAB suşlarının aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂'yi bağlama yeteneğini ve Baladi ekmeği üretiminin bu mikotoksinler üzerine etkisini araştırmıştır. Seçilen suşlar arasında en yüksek bağlama yeteneğini tüm aflatoksinler (B₁, B₂, G₁ ve G₂) için *L. rhamnosus TISTR 541* suşu göstermiş, canlı ve ısıtılarak öldürülmüş hücre olarak aflatoksinleri % 86.2 - 34.1'e değişen oranlarda bağlamıştır. Baladi ekmeği üretimi, sadece ekmeğin mayası, sadece *L. rhamnosus TISTR 541* ve ekmeğin mayası ile *L. rhamnosus TISTR 541*'nin birlikte kullanıldığı üç farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan hamur örnekleri 450 - 500°C sıcaklığında, 1-1.5 dakika pişirilmiştir. Aflatoksin düzeyi; un, hamur karışımı, 1. ve 2. saat fermantasyon ve pişirme sonrası olmak üzere 5 aşamada ölçülmüştür. Tüm proses değerlendirildiğinde, *Saccharomyces cerevisiae* ve *L. rhamnosus TISTR 541*'nin birlikte kullanıldığı örneklerde diğer örneklerle göre aflatoksin miktarında en yüksek azalmanın gerçekleştiği bildirilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmanın sonuçları ile bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, seçilmiş LAB suşlarıyla gerçekleştirilen fermantasyonların aflatoksinleri azalmada daha etkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ile çelişkili bir şekilde Trabzon ekmeği üretiminde 130 dakikalık maya fermantasyonu sonunda tüm aflatoksinler için önemli artışların bulunması, fermantasyon işleminin aflatoksin-maya bağlanmasını baskıladığını, hatta maya enzimlerinin çalışmasıyla gömülü aflatoksinin daha çok serbest hale geçtiğini düşündürmektedir. Ancak pişirme işlemi sonrası bu tez kapsamında incelenen mikotoksinler arasında en yüksek azalma aflatoksinlerde gözlemlendiğinden bu durum, fermantasyon boyunca yüksek miktarda aflatoksinin serbest kalmış olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Ancak ısıl işlemin, doğal kontamine ürünlere göre toksin ilave edilen ürünlerin mikotoksin miktarını daha fazla etkilediği de göz ardı edilmemektedir.

5. YORUM VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında geleneksel bir ekmek üretim yöntemi olan Trabzon ekmeği üretiminin *Fusarium* toksinleri ve aflatoksinler üzerine etkisi araştırılmıştır. Trabzon ekmeği üretimi, uzun süren fermantasyonun ardından olgunlaştırılan hamurun, normal ekmeğe göre daha uzun sürede ve daha yüksek sıcaklıkta pişirilmesiyle elde edilmektedir.

Trabzon ekmeği üretiminde fermantasyon basamağı, laktik asit bakterilerinin hakim olduğu uzun süreli ve ekmek mayasının hakim olduğu kısa süreli olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilir.

İlk 6 saatte hamurun pH'sında gözlenen düşüş, fermantasyon boyunca LAB'ların çoğalarak ortama hakim olduğuna işaret etmektedir. Bu aşamada, ZEA ve AFLB₁ miktarında istatistiksel olarak önemsiz artış gözlenmektedir. DON miktarında önemsiz ($p>0.05$) ve aflatoksin B₂, G₁ ve G₂ miktarında ise önemli ($p<0.05$) azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar ile ekşi hamur fermantasyonu sonunda aflatoksin B₂, G₁ ve G₂ miktarında kısmi azalmaların sağlanabileceği gösterilmiş olsa da, bu azalma düzeyi gıdalardaki mikotoksin miktarını yasal sınırların altına indirmek için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle insan tüketimine sunulacak gıdalarda ekşi hamur fermantasyonu tek başına mikotoksin riskini azaltacak bir yöntem olarak değerlendirilemez.

Ekmek mayası katılarak hazırlanan ikinci hamurun 130 dakikalık fermantasyonu sonunda ortama artık *Saccharomyces cerevicea* hakim olmaktadır. Çünkü *Saccharomyces cerevicea*'nın ortamdaki diğer mikroorganizmalara göre daha gelişmiş bir enzim sistemi bulunmaktadır. Fermantasyonun bu aşamasında tüm mikotoksinlerin miktarında istatistiksel olarak önemli artış gözlenmiştir. En yüksek artış oranı aflatoksinler için gözlenmiştir (AFLG₁). Literatürdeki maya-mikotoksin bağlanmasını açıklayan çalışmaların aksine, bu sonuçlar *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyonun mikotoksin miktarında artış meydana getirdiğini ortaya koymaktadır. Daha açık bir ifadeyle, literatürdeki çalışmalar maya hücre duvarına ait yapıların mikotoksinleri yüksek kapasitede bağladığını gösterse de, canlı maya hücreleri yüksek enzim aktivitesine sahip olduğundan fermantasyon boyunca gıda matriksini hızla bozarak bağlı mikotoksinleri serbest hale geçirmektedir. Ekmek mayası katılarak gerçekleştirilen

fermantasyon prosesi boyunca mikotoksin miktarının artış göstermesi yine literatürdeki pek çok çalışma ile desteklenmektedir.

Ekşi hamur fermentasyonunun ZEA üzerine etkisini değerlendirmek üzere yapılan model çalışmasının ilk 6 saatinde gözlenen azalma ile Trabzon ekmeği üretiminin fermentasyon aşamasındaki ilk 6 saat sonunda ZEA miktarında gözlenen önemsiz artış çelişkili bulunmuştur. Her iki çalışmanın da ekşi hamur fermentasyonu olması ve süre, sıcaklık gibi koşullar bakımından benzer olmalarına karşın, fermentasyon koşullarında hakim mikroorganizma modelleri aynı değildir. Çünkü model çalışmasında unun doğal mikro florasının hakim olduğu fermentasyon koşulları söz konusuysa, Trabzon ekmeği üretiminde kullanılan starter hamur parçası bir önceki güne ait ekmek hamurundan alındığından ticari ekmek mayası da içermektedir. Bu nedenle, yukarıda da açıklandığı gibi, Trabzon ekmeği üretiminin ilk fermentasyon aşamasında meydana gelen önemsiz artış, *Saccharomyces cerevicea* varlığına ve enzimatik faaliyetine de bağlanabilir.

Tüm mikotoksinlerin model çalışması ve fermentasyon boyunca gösterdiği davranışın genel olarak çok benzer olduğu gözlenmektedir. Buradan hareketle fermentasyon boyunca gözlenen mikotoksin miktarları, mikotoksinin yapısından çok hamurun yapısında meydana gelen fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişimlere bağlı olarak değişmektedir denilebilir. Çünkü yapısal olarak farklı olsalar da tüm mikotoksinler aynı koşullarda benzer davranış göstermiştir. Aradaki istisnai farklar ise fermentasyonun ilk 6 saatinde ortaya çıkmış ve kullanılan unun doğal kontamine ya da toksin ilaveli un olmasına ve mikotoksinin yapısal özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Kullanılan un örneklerinin mikotoksin düzeyinin de sonuçlardaki farkı etkilediği düşünülmektedir.

Fermentasyon işleminin mikotoksinler üzerine etkisi kısaca özetlendiğinde, LAB ve maya hücresel yapılarının mikotoksinleri yüksek düzeyde bağladığını gösteren mevcut çalışmaların aksine, bu mikroorganizmaların hakim olduğu fermentasyon koşullarında aynı sonuçlar gözlenmemektedir. Çünkü fermentasyon canlı ve dinamik bir süreçtir; buna bağlı olarak özellikle uzun süren fermentasyon işlemleri boyunca, hücre-mikotoksin bağlanmasını baskılayacak mekanizmaların ortaya çıkması ve serbest mikotoksin miktarını artırması kaçınılmaz görünmektedir.

Isıl işlemin mikotoksinler üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise, bu çalışmayla literatürdeki pek çok çalışmaya göre mikotoksin miktarında görece bir azalmanın

sağlandığı görülmektedir. Çünkü normal ekmeğe göre Trabzon ekmeği pişirme sıcaklığı daha yüksek ve pişirme süresi daha uzundur. Burada etkili başka bir faktör ise, uzun süren fermantasyonda gömülü (saklı) mikotoksinlerin açığa çıkması ve buna bağlı olarak mikotoksinlerin ısıya maruz kalan yüzey alanının genişlemesidir. Ekmek örneklerinde gözlenen en yüksek azalma hem kabuk, hem iç örneklerinde AFLG₂ için, en düşük azalma ise yine kabuk ve iç örneklerinde DON için gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre ısıya en dayanıklı mikotoksin DON'dur. Üretimde kullanılan unun doğal kontamine ya da toksin ilaveli un olması, fermantasyonda olduğu gibi, pişirme sonrası ekmek örneklerinde meydana gelen azalma oranlarını etkilemektedir. Bu nedenle en yüksek azalma, toksin ilaveli unun kullanıldığı, aflatoksin içeren ekmek örneklerinde tespit edilmiştir denilebilir.

Özetle, gıda analizlerinde tespit edilemeyen mikotoksinin uygulanan işlemler boyunca serbest kalması son ürünün mikotoksin miktarında artışa sebep olabilmektedir. Özellikle doğal yolla kontamine olmuş hammaddelerde, mikotoksinin yapısal materyallerle etkileşimi nedeniyle gerçek mikotoksin miktarı çoğu zaman belirlenememektedir. Bu ve benzeri araştırmalardan elde edilen sonuçlar, var olan analiz yöntemlerinin sorgulanmasını ve bu yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmaları teşvik etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Bennett, J., W. ve Klich, M., Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516, **2003**.
- [2] Şahin, İ., Korukuoğlu, M., Küf-Gıda-İnsan, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 155, VİPAŞ A.Ş. Yayın Sıra No: 31, **2000**.
- [3] Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F., Lactic acid bacteria-Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review, *Food Control*, 21, 370–380, **2009**.
- [4] Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S., Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 84, 1256–2152, **2001**.
- [5] Jiang Y., Jolly P.E., Ellis W.O., Wang J-S., Phillips T.D., Williams J.H., Aflatoxin B₁ albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians, *International Immunology*, 17(6), 807–814, **2005**.
- [6] Teniola, O. D., Addo, P.A., Brost, I. M., Farber, P., Jany, K.-D., Alberts, J., F., Van Zyl, W.H., Steyn, P.S., Holzapfel, W. H., Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenvivorans* sp. nov. DSM44556T, *Int J Food Microbiol.* 105, 111 – 117, **2005**.
- [7] Bergamini, E., Catellani D., Dall'asta C., Galaverna G., Dossena A., Marchelli, R., Suman M., Fate of *Fusarium* mycotoxins in the cereal product supply chain: the deoxynivalenol (DON) case within industrial bread-making technology, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.*, 27(5), 677-87, **2010**.
- [8] Döll, S. And Dänicke, S., The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, *Prev Vet Med.* 102(2), 132-145, **2011**.
- [9] Krska, R., Welzig E., Boudra H., Analysis of *Fusarium* toxins in feed, *Animal FeedvScience and Technology*, 137(3-4), 241-64, **2007**.
- [10] Kushiro, M., Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat, *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2127-2145, **2008**.
- [11] Yumbe-Guevara, B. E., Imoto T. & Yoshizawa T., Effects of heating

- procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat, *Food Addit Contam.* 20(12), 1132–1140, **2003**.
- [12] Valle-Algarra, F.M., Mateo E.M., Medina A., Mateo F., Gimeno-Adelantado J.V., Jimenez M., Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.*, 26(6), 896-906, **2009**.
- [13] CAST, Mycotoxins — Risks in plant, animal and human systems, Task Force Report, No. 139, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, 1–191, **2003**.
- [14] Shetty, P.H., Jespersen, L., *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 48–55, **2006**.
- [15] Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, 12p, **2008**.
- [16] Lancova, K., Hajslova, J., Kostelanska, M., Sehnalova, M., Nedelnik, J., Moravcova, H., Vanova, M., The fate of mycotoxins during the processing: milling and baking, *Food Addit Contam.* 25(5), 650-659, **2008**.
- [17] Richard, J. L., Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int J Food Microbiol.* 119, 3–10, **2007**.
- [18] Cirilini, M., Dall’Asta, C., Galaverna, G., Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins (Review), *Journal of Chromatography A*, 1255: 145– 152, **2012**.
- [19] Vendl, O., Berthiller, F., Crews, C., Krska, R., Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC-MS-MS, *Anal Bioanal Chem.*, 395, 1347-1354, **2009**.
- [20] Berthiller, F., Dall’Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam G., Krska R., Masked mycotoxins: determination of deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 53, 3421–3425, **2005**.

- [21] Şimşek, Ş., Burgess, K., Whitney, K.L., Gu, Y., Qian, S.,Y., Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in wheat, *Food Control*, 26: 287-292, **2012**.
- [22] Galaverna, G., Dall'asta, C., Mangia, M., Dossena, A., Marchelli, R., Masked Mycotoxins: an Emerging Issue for Food Safety, *Czech J. Food Sci.*, Vol. 27, Special Issue, **2009**.
- [23] Scudamore, K., H., Guy, R.C.E., Kelleher, B., Mac-Donald, S.J., Fate of the fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, during extrusion of wholemeal wheat grain. *Food Addit Contam.* 25, 331–337, **2008**.
- [24] Hazel, C. M., Patel, S., Influence of processing on trichothecene levels, *Toxicology Letters*, 153, 51–59, **2004**.
- [25] Samar, M.M., Neira, M.S., Resnik, S.L., Pacin, A., Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology, *Food Addit Contam.*, 18(11), 1004-10, **2001**.
- [26] El-Nezami, H, Polychronaki,N.,Salminen,S., Mykkanen, H., Binding Rather Than Metabolism May Explain the Interaction of Two Food-Grade *Lactobacillus* Strains with Zearalenone and Its Derivative α' -Zearalenol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (7), 3545–3549, **2002**.
- [27] El-Sharkawy, S.H., Selim, M.I., Afifi, M.S., Halaweish, F.T., Microbial Transformation of Zearalenone to a Zearalenone Sulfate, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 549-552, **1991**.
- [28] Yiannikouris, A., Andre, G., Buleon, A., Jeminet, G., Canet, I., François, J., Bertin, G., Jouany, J. P., Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with α -D-Glucans, *Biomacromolecules* 5, 2176-2185, **2004**.
- [29] El-Nezami, H., Kankaapää, P., Salminen S. and Ahokas, J., Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind food carcinogens. *Food Chem Toxicol*, 36: 321–326, **1998**.
- [30] Cecchini, F., Morassut, M., Garcia-Moruno, E., Di Stefano, R., Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.*, 23, 411–417, **2006**.
- [31] El-Banna, A. A., Lau, P.-Y., and Scott, P. M., Fate of mycotoxins during

- processing of foodstuffs II—Deoxynivalenol (vomitoxin) during making of Egyptian bread. *Journal of Food Protection*, 46, 484–486, **1983**.
- [32] Young, J. C., Fulcher, G. R., Hayoe, J. H., Scott, P. M., and Dexter, J. F., Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats., *J Agric Food Chem.* 32, 659-664, **1984**.
- [33] Siruguri, V., Ganguly, C., Bhat R. V., Utilization of mouldy sorghum and *Cassia tora* through fermentation for feed purposes, *African J Biotechnology*, 8 (22), 6349-54, **2009**.
- [34] Boudra, H., Le Bars, P., Le Bars, J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl Environ Microbiol.*, 61, 1156–58, **1995**.
- [35] Bullerman, L. B., Bianchini, A., Stability of mycotoxins during food processing, *Int J Food Microbiol.* 119(1-2), 140-146, **2007**.
- [36] Sugita-Konishi Y, Park BJ, Kobayashi-Hattori K, Tanaka T, Chonan T, Yosshikawa, K., Kumagai, S., Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 70, 1764–1768, **2006**.
- [37] Ragab, W., S., M., Drusch, S., Schnieder, F., Beyer, M., Fate of deoxynivalenol in contaminated wheat grain during preparation of Egyptian 'balila'. *Int J Food Sci Nutr.* 58, 169–177, **2007**.
- [38] Matsuura, Y., Yoshizawa, T., and Morooka, Effect of food additives and heating on the decomposition of zearalenone in wheat flour. *J Food Hygienic Society of Japan*, 22, 293–298, **1981**.
- [39] Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Matsuki, Y., and Ueno, Y., Residues of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone, in wheat and processed food after milling and baking. *J Food Hygienic Society of Japan*, 27, 653–655, **1986**.
- [40] Hwang, J., Lee, K., Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments, *Food Chemistry*, 98, 71-75, **2006**.
- [41] Reiss, J., Mycotoxins in foodstuffs. XI. Fate of aflatoxin B₁ during preparation and baking of whole-meal wheat bread, *Cereal Chemistry*, 55(4), 421-423, **1978**.
- [42] Akgün, F., B., Ekşi Hamur Tozu Eldesi ve Ekmek Üretiminde

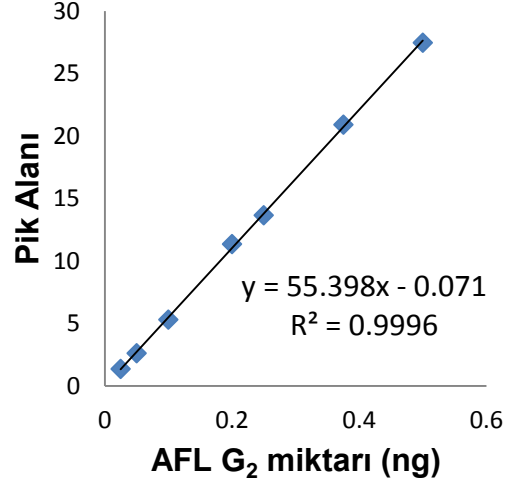
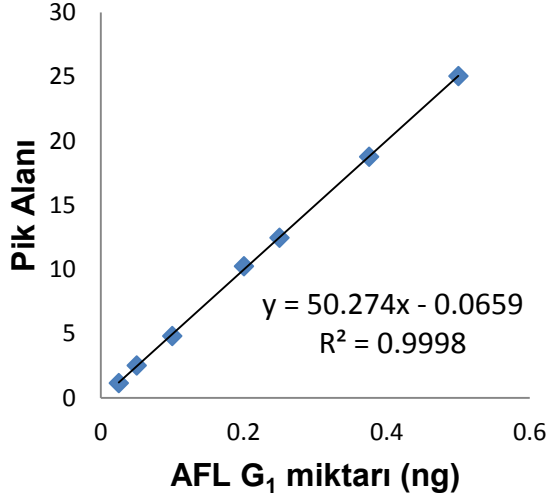
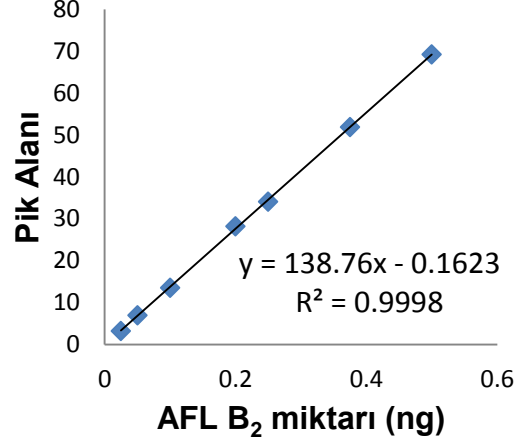
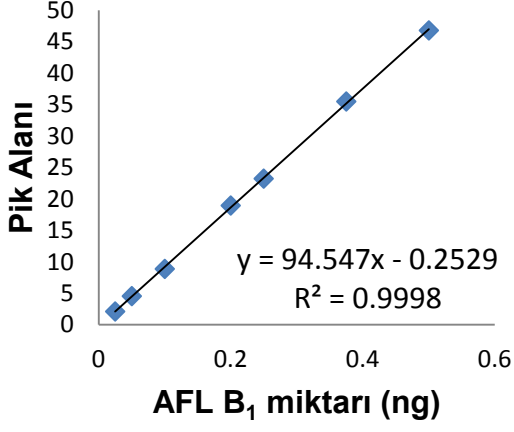
- Kullanılabilir Olanakları (Yüksek Lisans Tezi) , Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 66 s., **2007**.
- [43] Göçmen, D., The effects of use of sourdough and lactic starter on formation aroma in bread, *Gıda*, 26 (1), 13-16, **2001**.
- [44] Gobbetti, M., The Sourdough Microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeast, *Trends in Food Science & Technology*, 9: 267-274, **1998**.
- [45] Elgün, A. ve Ertugay, Z., Tahıl İşleme Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:718, s. 376, **2003**.
- [46] Gerçekaslan, K.E., Trabzon Vakfıkebir ekmeğinin bayatlamasının çeşitli yöntemlerle takibi ve Francala ekmeği ile mukayesesi (Yüksek lisans tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, 104 s., **2006**.
- [47] AACC International, American Association of Cereal Chemists, Approved methods of the AACC, 10th Edition, The Association, St. Paul, MN., USA, **2000**.
- [48] Corsetti, A., Settanni, L., "Lactobacilli in sourdough fermentation: A review". *Food Research International* 40, 539-558, **2007**.
- [49] Kotancılar, G., H., Karaoğlu, M., M., Gerçekaslan, K., E., Uysal, P., Ekşi hamur katkısının beyaz tava ekmeğinin bayatlaması üzerine etkisi, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 37(1), 103-110, **2006**.
- [50] Neumann, G., Lombeart, G., A., Kotello, S., Federowich, N., Determination of Deoxynivalenol in Soft Wheat by Immunoaffinity Column Cleanup and LC-UV Detection: Interlaboratory Study, *Journal of AOAC International*, Volume 92, Number 1, 181-189, **2009**.
- [51] MacDonald S.J., Anderson, S., Brereton, P., Wood, R., Damant, A., Determination of zearalenone in barley, maize and wheat flour, polenta and maize-based baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, 88, 1733-40, **2005**.
- [52] AOAC International, Official Method 991.31, Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter, The Association: Washington, DC, **2000**.
- [53] Numanoğlu, E., Mısır ve ürünlerinde prosesin *Fusarium* toksinlerine etkisi (Doktora tezi), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 123 s., **2013**.

- [54] EC (European Commission), Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, EC Official Journal of the European Union L 70. 22p., **2006**.
- [55] Niderkorn, V., Morgavi, D., P., Pujos, E., Tissandier, A., Boudra, H., Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro model simulating corn silage Food Addit Contam. 24(4),406–415, **2007**.
- [56] Gobbettia, M., De Angelis, M., Corsetti, A. and Cagno, R. Di, Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria, Trends in Food Science & Technology 16, 57–69, **2005**.
- [57] Gareis, M., Bauer, J., Thiem, J., Plank, G., Grabley, S., Gedek, B. Cleavage of zearalenone-glycoside, a “masked” mycotoxin, during digestion in swine. Zentralblatt für Veterinärmedizin B, 37, 236–240, **1990**.
- [58] Samarajeewa, U., In situ degradation of mycotoxins by physical methods. Mycotoxins and Animal Foods, edited by J. E. Smith and R. S. Henderson (Boca Raton: CRC Press), 785–796, **1991**.
- [59] Zinedine, A., Faid, M., Benlemlih, M., *In Vitro* Reduction of Aflatoxin B1 by Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Moroccan Sourdough Bread, Int J Agric. & Bio.1560–8530, 67–70, **2005**.
- [60] Shetty, P., H., Hald, B., Jespersen, L., Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods, International Journal of Food Microbiology 113, 41–46, **2007**.
- [61] Chelule, P.K., Mbongwa, H.P., Carries, S., Gqaleni, N. Lactic acid fermentation improves the quality of amahewu, a traditional South African maize-based porridge, Food Chemistry, 122, 656–661, **2010**.
- [62] Adegoke, G., O., Akinnuoye, O., F., A., Akanni, A., O., Effect of processing on the mycoflora and aflatoxin B1 level of a cassava-based product, Plant Foods for Human Nutrition 43, 191-196, **1993**.
- [63] Kpodo, K., Serensen, A., K., Jakobsen, M., The occurrence of mycotoxins in fermented maize products, Food Chemistry, Vol. 56, No. 2, pp. 147-153, **1996**.

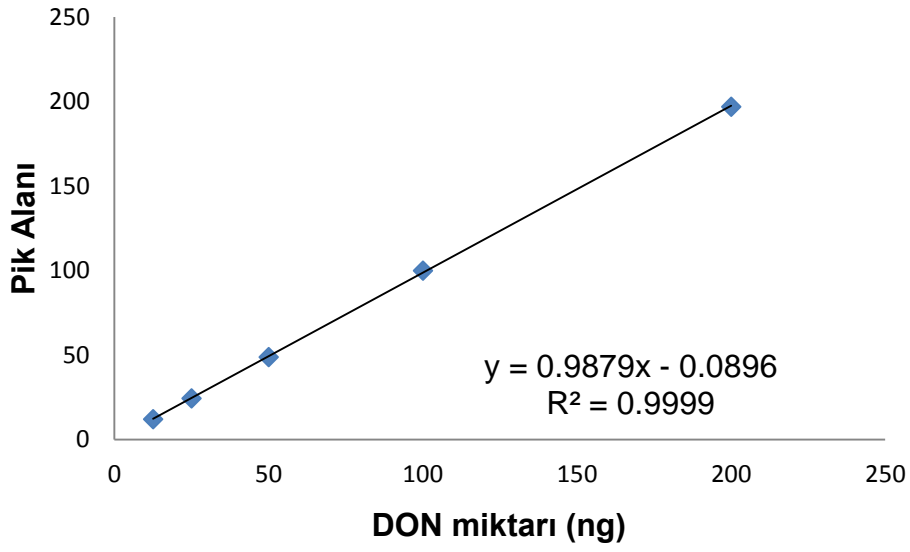
- [64] Elsanhoty, R., M., Ramadan, M., F., El-Gohery, S., S., Abol-Ela M., F., Azeke, M., A., Ability of selected microorganisms for removing aflatoxins in vitro and fate of aflatoxins in contaminated wheat during baladi bread baking, Food Control 33, 287-292, **2013**.

EKLER

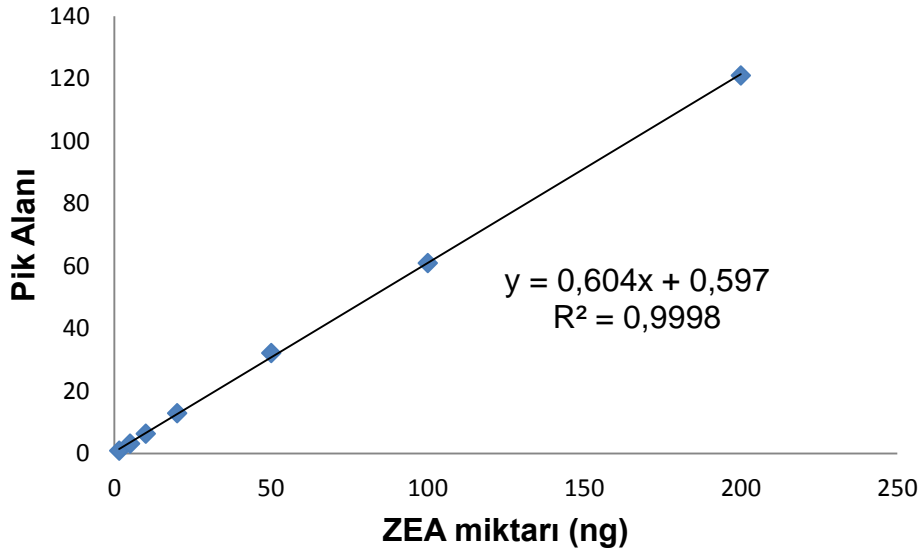
Ek-1 Aflatoksinler için oluşturulan kalibrasyon eğrileri



Ek-2 DON için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



Ek-3 ZEA için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Pınar YILMAZ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Yılı : 1986
Medeni Hali : Bekar
E-posta : yilmazpinar@hacettepe.edu.tr
Adres : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Eğitim

Lise (1997-2004) : Mehmet Emin Resulzade Anadolu Lisesi
Lisans (2005-2010) : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-İyi

İş Deneyimi –

Deneyim Alanları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi – TÜBİTAK Hızlı Destek Projesi, Proje No: 111O489, Trabzon Ekmeği Üretimine Aflatoksin ve Fusarium Toksinleri Üzerine Etkisi, 2012 – Bütçe: 25.000₺

Tezden Üretilmiş Yayınlar –

Tezden Üretilmiş Sözlü Sunumu İle Katıldığı Toplantılar –