ÇAY İŞLETMELERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
Atatürk Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

TÜRK ÇAYLARINDA AFLATOKSİN VARLIĞI VE MUHTEMEL BULAŞMA KAYNAKLARI

Nesrin TEKİNER
Gıda Mühendisi

Kubilay TÜRKYILMAZ
Deneme ve İstatistik Kısım Müdürü

RİZE-2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET **1**
1. GENEL BİLGİLER **1**
1.1 Aflatoksinler Hakkındaki Genel Bilgiler 1
1.1.1 Mantarlar 1
1.1.1.1 Aspergillus flavus 2
1.1.1.2 Aspergillus parasiticus 3
1.1.2 Mikotoksinler 3
1.1.2.1 Aflatoksinler 4
1.1.2.1.1 Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı 5
1.1.2.1.2 Aflatoksinlerin Sentezi 6
1.1.2.1.2.1 Su Aktivitesi 7
1.1.2.1.2.2 Sıcaklık 7
1.1.2.1.2.3 pH 7
1.1.2.1.2.4 Diğer 7
1.1.2.1.3 Aflatoksinlerin Sağlık Üzerindeki Etkileri 8
1.1.2.1.4 Maksimum Kalıntı Limitleri 8
1.1.2.1.5 Aflatoksinlerin Dünya ve Türkiye Gündemine Girişi 9
2. MATERYAL VE YÖNTEM **11**
2.1 Materyal 11
2.1.1 Son Kullanım Tarihi Geçmiş Numuneler 11
2.1.2 Piyasada Satılan Açık Çaylar 11
2.1.3 Piyasada Satılan Ticari Çaylar 11
2.1.4 Kaçak ve Yabancı Menşeli Çaylar 12
2.1.5 Fabrikalarda Üretilen Yarı Mamul Çaylar 12
2.1.6 Ticari Olarak Paketlemeye Uygun Olmayan Yarı Mamul Kuru Çaylar 14
2.1.7 Yarı Mamul Çay Ambarlarında Bulunan Eski Tarihli Çaylar 14
2.1.8 Yarı Mamul Kuru Çay Ambarlarında 2 Yıl Bekletilen Nevi Çaylar 15
2.1.9 Eski Tarihli Çeşitli Çaylar 15
2.1.10 İmalat Kalıntıları 15
2.2 Yöntem 18
2.2.1 HPLC Sistemi 19
2.2.2 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması 20
2.2.3 Numunelerin Analiz İçin Hazırlanması 23
2.2.4 Ekstraksiyon 28
2.2.4.1 Yöntem-1 28
2.2.4.2 Yöntem-2 28
2.2.4.3 Yöntem-3 28
2.2.4.4 Yöntem-4 29
2.2.4.5 Yöntem-5 29
2.2.5 Filtrasyon 30
2.2.6 Saflaştırma (Clean-up) 30
2.2.7 HPLC Aşaması 31
3. SONUÇ 32
4. TARTIŞMA **36**
5. KAYNAKLAR **38**

TÜRK ÇAYLARINDA AFLATOKSİN VARLIĞI VE MUHTEMEL BULAŞMA KAYNAKLARI

ÖZET

Aflatoksinler, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri kanıtlanmış olan toksik bileşiklerdir. Ülkemizde, siyah ve yeşil çay ürünlerinde aflatoksinlerin varlığı ve muhtemel bulaşma kaynakları konusunda yeterli sayıda bilimsel araştırma yapılmış değildir. Bu çalışmada yaklaşık 200 numune üzerinde aflatoksin analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre hiçbir numunede aflatoksin tespit edilmemiştir. Bunun nedenleri hakkındaki görüşler raporun sonuç bölümünde açıklanacaktır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Aflatoksinler Hakkındaki Genel Bilgiler

Aflatoksinler, Aspergillus flavus ve Aspergillus parasiticus türü mantarlar tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir. Konunun daha iyi anlaşılabilmesi için önce "mantar" ve "mikotoksin" tanımlarını açıklamak gerekir.

1.1.1 Mantarlar

Mantarlar kök, gövde, yaprak, çiçek ve klorofile sahip olmayan makroskobik veya mikroskobik canlılardır. Biyoloji biliminde "fungus" olarak isimlendirilirler. Bu kelimenin çoğulu ise fungi'dir. Hava ve toprakta doğal olarak bulunurlar. Hayvanlar sınıfına mı ait oldukları yoksa bitkiler sınıfına mı ait oldukları konusu günümüzde bilim adamları tarafından tartışılmaya devam etmektedir. Yukarıda sayılan özellikleri nedeniyle bitki özelliği taşımadıkları gibi hareket etme yeteneklerinin olmayışı, hücrelerinin çevresinde bir çeperin oluşu ve sporla çoğalmaları nedeni ile bitki olarak kabul edilmektedirler. Üremeleri sporlar ile ya da tomurcuklanma ile gerçekleşir.

Alman botanikçi Johann Heinrich Friedrich (1767-1850)'e göre mantarlar 6 bölüme (division) ayrılmaktadırlar.

1. Chytridiomycota
2. Deuteromycota
3. Zygomycota
4. Glomeromycota
5. Ascomycota
6. Basidiomycota

Aflatoksinleri üreten mantar türleri Ascomycota bölümünde yer almaktadırlar.

1.1.1.1 Aspergillus flavus

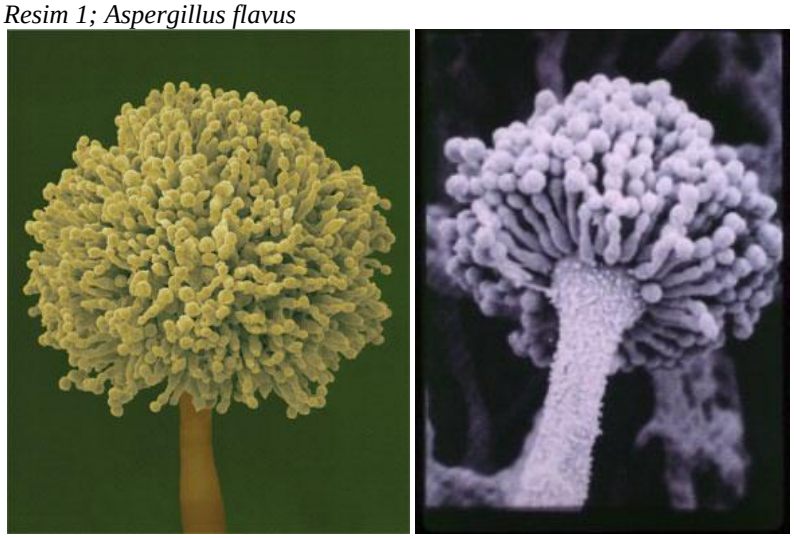
Aspergillus flavus türü mantarların Johann Heinrich Friedrich'e göre mantarların sistematiğindeki yerleri şu şekildedir.

Tablo 1; A.flavus mantarlarının sistematiği

Domain:	Eukaryota
Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotina
Class:	Eurotiomycetes
Order:	Eurotiales
Family:	Trichocomaceae
Genus:	Aspergillus
Species:	***A. flavus***

Aspergillus flavus türü mantarlar hücre duvarı yapısında bulunan kitin, selüloz gibi maddeler sayesinde değişik çevre şartlarına uyum sağlayabilirler. %13-15 gibi düşük rutubetli ortamlarda yaşayabilirler. Sıcaklık istekleri optimum 35-38 ºC dir. Ancak 6-60 ºC gibi çok geniş sıcaklık aralığında çoğalabilirler. Aerobik canlılardır. Oksijen azlığında gelişmeleri yavaşlar. 1,5-8,5 pH aralığında gelişebilirler. 0,78 su aktivitesinde bile gelişmelerini sürdürebilirler.Eşeysiz sporlarla çoğalırlar. Bu mantar türünün mikroskop altındaki görüntüsü aşağıdaki gibidir.

Resim 1; Aspergillus flavus



1.1.1.2 Aspergillus parasiticus

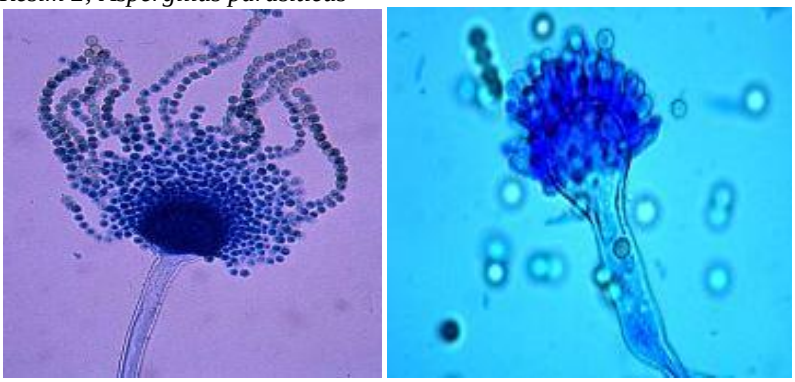
A.flavus gibi Aspergillus parasiticus türünün de Johann Heinrich Friedrich'e göre mantarların sistematiğindeki yerleri şu şekildedir.

Tablo 2; A.parasiticus mantarlarının sistematiği

Domain:	Eukaryota
Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotina
Class:	Eurotiomycetes
Order:	Eurotiales
Family:	Trichocomaceae
Genus:	Aspergillus
Species:	***A. parasiticus***

A.parasiticus, A.flavus gibi aynı fiziksel ve morfolojik özellikleri gösterir. Bu mantar türünün mikroskop altındaki görüntüsü aşağıdaki gibidir.

Resim 2; Aspergillus parasiticus



1.1.2 Mikotoksinler

Mikotoksin terimi Yunanca'da mantar anlamına gelen 'mykes' ve Latince'de zehir veya toksik anlamına gelen 'toxicum' kelimesinden türetilmiştir. Küfler tarafından oluşturulan ve insan, bitki ve sıcakkanlı hayvanlar için toksin etkisi gösteren sekonder metabolitlerdir. Mikotoksinler birincil metabolit olan polipeptidler, amino asitler, fenoller ve terpenoitlerden değişik enzimatik yollarla sentezlenmektedir. Gıda ve yemlerde en önemli kontaminantlardan biri olarak kabul edilen mikotoksinler, dünyada gıda üreticisi olan ülkelerin büyük bölümünde, gıda güvenliği için önemli bir tehlike oluşturmaktadır. Gıda üretiminde küf gelişimi ve mikotoksin üretimi hammadde aşamasında, hammadde depolama sırasında, gıdaların işlenmesi sırasında ve perakende satış notalarında ortaya çıkmaktadır. Bu aşamalarda küfler oksijen, sıcaklık ve su aktivitesi gibi önemli faktörler açısından uygun şartlar buldukları zaman kolayca gelişerek çoğalırlar. Şartlar uygun olduğu zamanda toksin üretimine başlarlar.

Bütün küfler mikotoksin üretmezler. Mikotoksin üretebilen küfler toksijenik olarak tanımlanmaktadır ve tür sayısı 350 civarındadır. Bilinen yaklaşık 6000 adet küf metaboliti vardır. Ancak bunların hepsi mikitoksin değildir. Mikotoksin özelliğine sahip olan metabolit sayısı 300 civarındadır. Mikotoksinlerden ancak 20-25 tanesi gıda ve hayvansal yemlerde bulunur ve bunları tüketen canlılar üzerinde etkili olurlar.

Mikotoksinlerin insanlara bulaşması genellikle iki şekilde olur. Birincisi, insanlar ve hayvanlar doğrudan mikotoksin ile bulaşmış gıda ve yem maddelerini tüketerek mikotoksinleri bünyelerine alırlar. İkinci olarak da mikotoksin bulaşmış yem ile beslenen hayvanların et, süt ve yumurta gibi ürünlerine bu toksinler geçmekte ve hayvansal ürünlerin tüketilmesi sonucu da mikotoksin dolaylı olarak insanlara geçebilmektedir. Bunların dışında; küf sporlarının ve parçacıklarının, özellikle ürünün işlenmesi sırasında, aeresol veya toz halinde havaya yayılması sonucunda mikotoksinlerin doğrudan solunum ile ciğerlere ve deri ile temas ile de vücuda alınması söz konusu olmaktadır.

Bilinen başlıca mikotoksinler ve bunları üreten mantar türleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 3; Başlıca mikotoksinler ve üretici mantar türleri

Mikotoksin	Toksini üreten fungus türleri
Aflatoksin	Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus
Okratoksin	Aspergillus ochraceus, Penicillum verrucosum var.
Patulin	Aspergillus clavatus, Penicillum patulum, Aspergillus giganteus
Trikotesen	Fusarium culmorum, Trichoderma viride,Trichothecium roseum
Zearelenon	Fusarium culmorum, Fusarium graminearum
Fumonisin	Fusarium maniliforme, Fusarium proliferatum
Sitrinin	Penicillum citrinum, Penicillum verrucosum var.
Penisilik aist	Aspergillus ochraceus, Penicillum verrucosum var.
Siklopiazonik asit	Aspergillus flavus, Penicillum verrucosum var.
Sterigmatosistin	Bipolaris species, Eur. amstelodamii
Rubratoksin	Penicillum Rubrum, Penicillum purpurogenum

1.1.2.1 Aflatoksinler

Aflatoksinler, Aspergillus flavus ve Aspergillus parasitucus türü küfler tarafından oluşturulan ve kimyasal yapısı belirlenen ilk mikotoksindir. İsim olarak toksini üreten en önemli tür olan Aspergillus flavus ile toksin kelimelerinin kısaltmasından oluşmuştur. On sekiz değişik aflatoksin tipi tanımlanmış olup en yaygın olarak bilinenleri B_1, B_2, G_1, G_2, M_1 ve M_2 olarak isimlendirilmiştir.

B ve G harfleri ile isimlendirilen aflatoksinler ana tipler olup ultraviole ışık altında kendilerini mavi ve yeşil renk ile belli ederler. Ultraviole ışık altında mavi renk ile görünenler ingilizce blue=mavi kelimesinin baş harfi olan B ile, yeşil renk ile görünenler ingilizce green=yeşil kelimesinin baş harfi olan G ile isimlendirilmiştir. B2, B1'in G2 de G1'in dehidro türevleridir. M harfi ile isimlendirilenler, B_1 ve B_2 aflatoksinlerinin oksidatif metabolitleri olup süt aflatoksinleri olarak bilinirler. Bunlar kontamine besin veya yemlerin tüketilmesinden sonra sütte (hayvan veya insan sütü), idrar ve dışkıda görülmektedir. Yem ile birlikte aflatoksin B_1 alan bir ineğin sütünden aldığı toksinin %1-3 kadar bir kısmının aflatoksin M_1 olarak izole edilebildiği tespit edilmiştir.

Aflatoksinler daha çok uygun şartlarda hazırlanmamış gıdalarda bulunur. Özellikle, mısır, hububat, un, ekmek, bitkisel çaylar,fındık, fıstık, kötü şartlarda kurutulmuş baharat, incir, üzüm, kuruyemiş, pamuk, ay çekirdeği, et, süt, yumurta gibi ürünlerde bulunabilmektedir. Özellikle temel tüketim mamullerinde oluşan aflatoksin, günlük tüketimlerinin yüksek olmasından dolayı çok daha fazla tehlikelidir. Örneğin ekmeğin fazla tüketilmesinden dolayı buğdayda bulunan aflatoksin miktarının oranı çok önemlidir. Steril edilmekle, kızartmakla, kaynatmakla zarar görmezler. Alkali ortamlara ve oksit maddelere karşı hassastırlar. Aflatoksinli ürünlerin kesinlikle imha edilmesi gerekir.

1.1.2.1.1 Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı

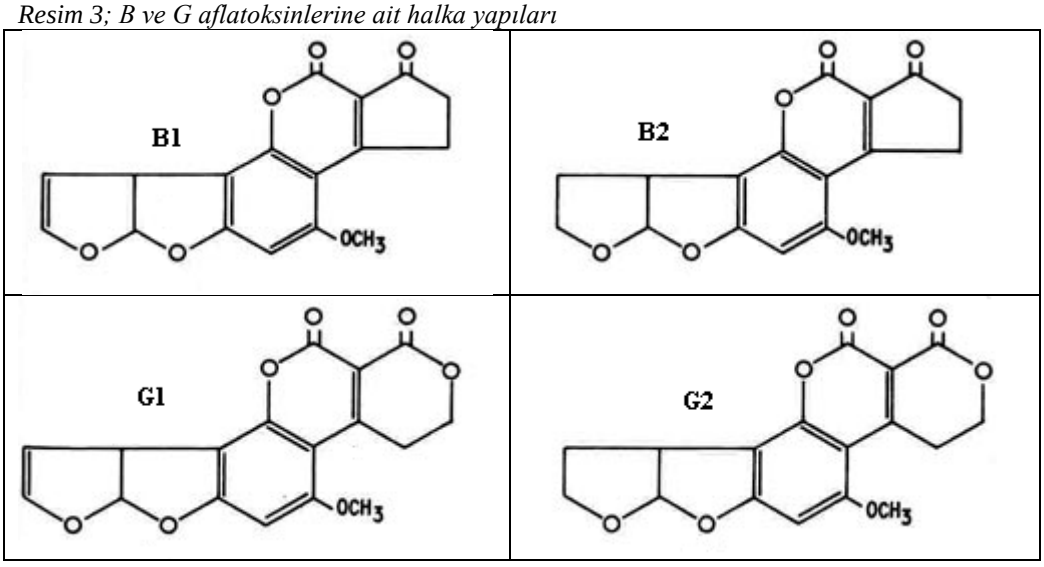
Aflatoksinlerin kapalı kimyasal formülleri ile molekül ağırlıkları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4; ; Önemli aflatoksinlerin molekül formülü ve molekül ağırlıkları

Aflatoksin	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328
M_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330

Kimyasal yapı olarak bifuron halkası ve lakton bağlantısı taşıyan yüksek yapılı kumarin bileşiklerdir. Difurokumarosiklopentanon grubu ve difurokumarolakton grubu olarak ikiye ayrılır. B1 ve B2 aflatoksinleri difurokumarosiklopentanon grubunda, G1 ve G2 aflatoksinleri ise difurokumarolakton grubunda bulunurlar. Renksiz veya sarı, iğne şeklinde kristallerdir. Kloroform, metanol, etanol ve dimetilsulfoksid içerisinde kolayca çözünürler. Kloroform veya benzen içindeki çözeltileri yıllarca dayanıklıdır. Önemli aflatoksinlerin halka yapıları aşağıdaki resimde gösterilmiştir.

Resim 3; B ve G aflatoksinlerine ait halka yapıları

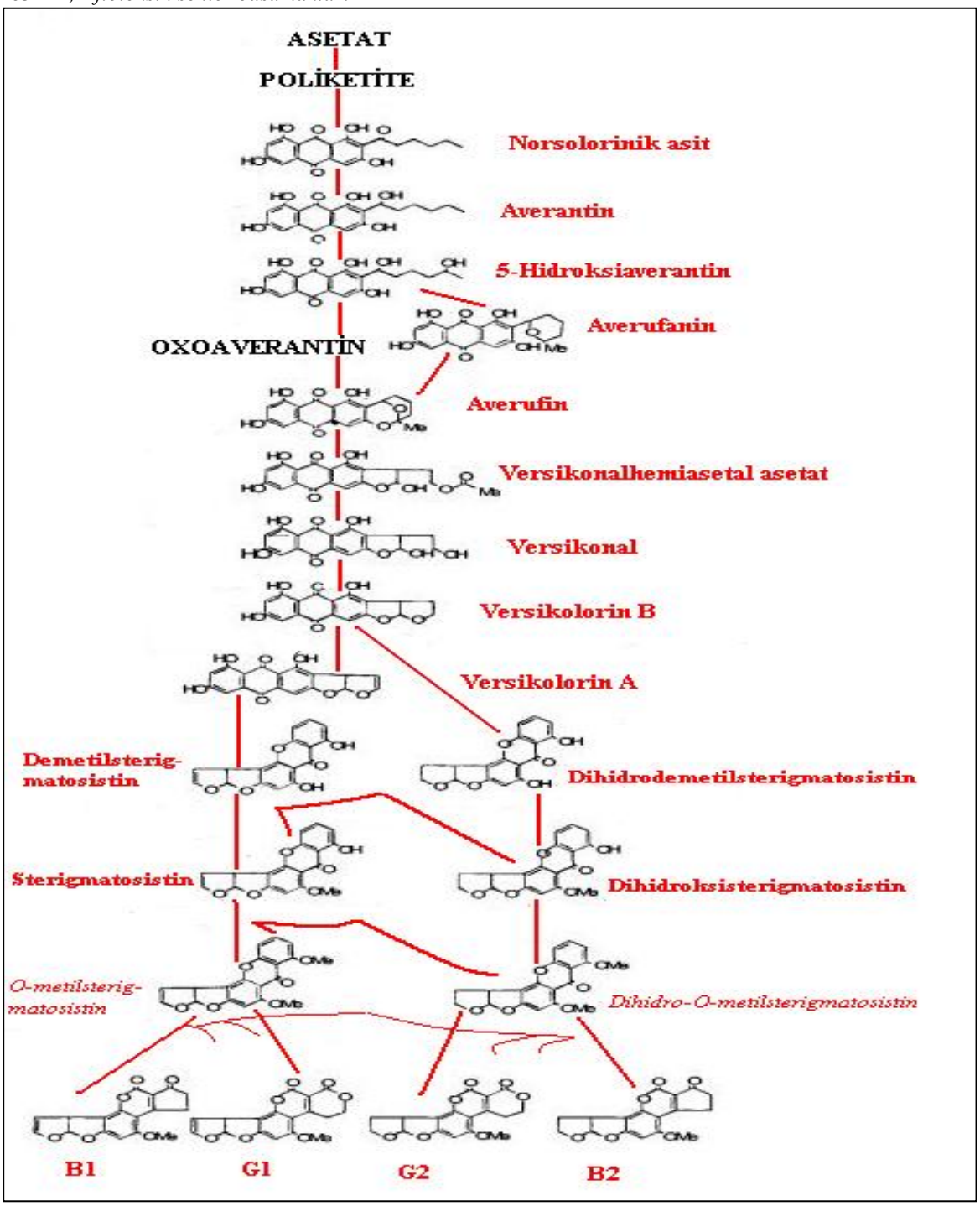


1.1.2.1.2 Aflatoksinlerin Sentezi

Aflatoksinler, kendilerini üreten küflerin ikincil metabolitleridir. Küfler hayatlarını sürdürmek için protein, amino asit ve nükleik asit gibi birincil metabolitleri üretirler. İkincil metabolitler, bu metabolitlerin oluşumu sırasında meydana gelen ve kimyasal yönden birbirleriyle benzer madde gruplarından oluşan bileşiklerdir. İkincil metabolit ürünlerin küfler tarafından savunma mekanizması ve metabolizmada regülasyon görevleri için üretildikleri düşünülüyorsa da tam olarak ne için oluşturuldukları henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Aflatoksinlerin sentez aşamaları konusunda bir çok araştırma yapılmış olup sentez işlemi aşağıda resimde gösterilmiştir.

Resim 4; Aflotoksin sentez basamakları



Bir ürüne aflatoksin üreten küflerin bulaşması o üründe aflatoksin olduğu anlamına gelmez. Küflerin aflatoksin sentezleyebilmesi için uygun ortam bulmaları ve yeteri kadar zamana sahip olmaları gerekmektedir. Küflerin üründe gelişip aflatoksin üretmelerine etki eden önemli fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler şunlardır.

1.1.2.1.2.1 Su Aktivitesi

Su aktivitesi genel anlamda üründe mikroorganizmalar tarafından kullanılabilecek suyu ifade eder. Ürünün yapısında bulunan suyun buhar basıncının aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncına oranıdır. Saf suyun su aktivitesi değeri 1'dir. Ürünlerin su aktivitesi değeri 0-1 arasındadır. Ürünün yapısındaki serbest su miktarının artmasıyla su aktivitesi değeri de artarak 1 e yaklaşır.

Aflatoksin üreten küflerin gelişebilmesi için gerekli olan minimum su aktivitesi değeri ile bunların aflatoksin üretebilmeleri için gerekli olan su aktivitesi değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 5; Küflerin gelişmesi ve aflatoksin üretmesi için gerekli olan su aktivitesi değerleri

Küf	Gelişme için gerekli olan minimum su aktivitesi	Aflatoksin sentezi için gerekli olan minimum su aktivitesi
Aspergillus flavus	0,780	0,830 - 0,870
Aspergillus parasiticus	0,820	0,870

1.1.2.1.2.2 Sıcaklık

Aflatoksin üreten Aspergillus flavus ve Aspergillus parasiticus türü küflerin gelişme için ihtiyaç duydukları minimum sıcaklık değerleri 6-8º C' dir. Bu küfler, en fazla 50-60° C'de gelişmelerini devam ettirebilirler. Gelişmelerini sürdürebilmeleri için gerekli en uygun sıcaklık 35-38° C' dır. Toksin sentezi için gerekli en düşük sıcaklık 10-13 ° C, en yüksek sıcaklık 42° C, en uygun sıcaklık ise 25-30 ° C' dır.

1.1.2.1.2.3 pH

Aklatoksin oluşturan küfler 1,5 - 8,5 pH aralığında gelişme gösterebilirler. Aflatoksin üretimi 2,5 - 6 pH aralığında gerçekleşir. Yüksek miktarda toksin üretimi pH 5,0 üzerinde oluşur. pH 4'ün altında toksin üretimi oldukça azalır.

1.1.2.1.2.4 Diğer

Ürünlere bulaşan küflerin aflatoksin sentezleme miktarlarına etki eden diğer hususlar zaman, ışık, bağıl nem, karbondioksit konsantrasyonu, oksijen konsantrasyonu, üründeki mekanik zararlar ve mineral madde içeriği olarak sayılabilir. Aflatoksin üreten küfler gelişme ve toksin üretimi için uygun ortam buldukları zaman 1-4 günde risk oluşturabilecek seviyede aflatoksin üretirler.

1.1.2.1.3 Aflatoksinlerin Sağlık Üzerindeki Etkileri

Aflatoksinlerin canlılar üzerinde meydana getirdiği rahatsızlıklara "Aflatoksikoz" adı verilir. Aflatoksikoz ile ilgili rahatsızlıklar iki değişik şekilde ortaya çıkar. Akut aflatoksikoz, orta düzeyin üzerinde aflatoksin alımı sonucu ortaya çıkar. Kanama, akut karaciğer hasarı, ödem, gıda sindirimi, emilimi veya metabolizmada değişiklik ve ölüm gibi sonuçlara neden olur. Kronik aflatoksikoz ise düşük ve orta düzeyde aflatoksin alımı sonucu ortaya çıkar. Teşhisi zordur. Ortak belirtiler arsında gıdaların sindiriminde sıkıntı veya düşük büyüme hızı yer alır.

Aflatoksinler çok düşük dozlarda dahi vücuda alındığında kanserojenik, mutajenik, teratojenik ve kuvvetli hepatotoksik etki gösterirler. Bu etkileri göstermesi bakımından aflatoksinler $B_1>G_1>B_2>G_2$ şeklinde sıralanırlar. Buna göre aflatoksin B1 en etkili olandır.

Aflatoksinler bilinen en kanserojenik maddeler arasında yer almaktadır. Vücuda alınan aflatoksin süt, idrar ve karaciğere geçerken DNA'yı mutasyona uğratarak kanser meydana getirmektedir. Bir çok epidemiyolojik çalışma aflatoksinler ile artan karaciğer vakaları arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ayrıca böbrek ve kolon kanserlerine de neden olurlar. Uluslar Arası Kanser Araştırma Merkezi (IARC), aflatoksinleri "Grup I" kanserojenler sınıfına dahil etmiştir. Bu grup yeterli kanıt elde edilmiş kanserojenleri içermektedir. Ülkemizde de Kasım-1983 ve Kasım -1984 ayları arasında Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığına ihbar edilen kanser vakalarının %77,2 si aflatoksin formasyonu için uygun iklim koşullarına sahip bölgelerden (Marmara, Ege ve Akdeniz bölgeleri) olması dikkat çekicidir.

Aflatoksinlerin kanserojen etkilerinin yanında hepatit B ve hepatit C virüslerinin vücuttaki etkilerini arttırdıkları ve bağışıklık sistemini bozdukları tespit edilmiştir. Ayrıca karaciğer üzerindeki kanjerojen etkilerinden başka karaciğerin hepatik dokularına da zarar vererek akut rahatsızlıklara (siroz, sarılık, vb.) ve ölümlere neden olurlar. Hepatik lezyonları ve kanamayı arttırırlar. Serum enzimlerini arttırır, serum proteinlerini azaltır ve kanın pıhtılaşma mekanizmasını bozarlar.

Aflatoksin B_1 en mutajen mikotoksindir. Kromosal yanılmaya ve DNA kırılmasına neden olarak istenmeyen mutasyonların ortaya çıkmasını sağlar.

Aflatoksinler teratojenite özelliğine sahip olmaları nedeniyle protein sentezini inhibe ederler. Böylece canlılarda sakat veya ölü doğumların ortaya çıkmasına neden olurlar.

Aflatoksinler akut olarak böbreklerde hasar, tümör oluşumu, nefropati ve böbreklerde ani kanama gibi hastalıklara da neden olurlar.

1.1.2.1.4 Maksimum Kalıntı Limitleri

Maksimum Kalıntı Limiti (MRL= Maximum Residue Level), üzerinde bulunduğu ürünü tüketen canlılar üzerinde sağlık açısından risk oluşturmayan kontaminant miktarı için kritik sınırı ifade eder. Maksimum kalıntı limitleri uzun çalışmalar sonucunda tespit edilmekte olup genelde ürünlerin 1 kilogramında bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı miktarını gösterir. Bu miktarların hesaplanması için yapılan çalışmalarda insan ağırlığı için ortalama 60 kg değeri kullanılır. Avrupa Birliği tarafından günlük aflatoksin için kabul edilebilir doz insanlarda 0,014 ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Buna göre, 60 kg ağırlığındaki bir insan için 1 günde alınabilir doz 0.84 ng olmaktadır.

Aflatoksin probleminin yaygın olması nedeniyle FAO, WHO ve UNEP gibi çeşitli uluslar arası kuruluşlar tarafından çeşitli tarama çalışmaları yapılmaktadır. Aflatoksinlerin değerlendirilmesi için genel olarak toplam aflatoksin ve aflatoksin B_1 miktarları dikkate alınmaktadır. Çeşitli ürünlerde aflatoksinler için ülkelerin izin verdiği MRL değerleri farklılık göstermektedir. Bu değerler ülkelerin kendi mevzuatlarında belirtilmektedir. Ancak uluslar arası ticarette geçerli olacak normları yakalamak için yapılan çalışmalar sürdürülmektedir.

Ülkemizde ve Avrupa Birliği'nde aflatoksinler için belirlenmiş maksimum kalıntı limitlerini gösteren tablo aşağıda verilmiştir.

Tablo 6; Aflatoksinler için belirlenen MRL değerleri, µg/kg (Toplam: B_1+ B_2+ G_1+ G_2)

	ÜRÜN	TÜRKİYE		AB	
		B_1	(B_1+G_1+B_2+G_2)	B_1	(B_1+G_1+B_2+G_2)
Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan gıdalar	Yerfıstığı	5	10	8	15
	Yağlı Tohumlar	5	10	8	15
	Badem	5	10	12	15
	Antepfıstığı	5	10	12	15
	Fındık	5	10	8	15
	Diğer kuruyemişler	5	10	5	10
	Kuru meyveler	5	10	5	10
Doğrudan tüketime sunulan / işlenmiş	Yerfıstığı	5	10	2	4
	Yağlı Tohumlar	5	10	2	4
	Badem	5	10	8	10
	Antepfıstığı	5	10	8	10
	Fındık	5	10	5	10
	Diğer kuruyemişler	5	10	2	4
	Kuru meyveler	5	10	2	4
	Baharatlar	5	10	5	10
	Bebek maması	1	2	0,1	-

AB ve Türkiye dışında diğer ülkelerde de aflatoksinler için belirlenmiş limitler bulunmaktadır. Özellikle ABD ve Çin'de belirlenen limitler Türkiye ve Avrupa Birliği'nde belirlenen limitlerden daha yüksektir. (20 ppb seviyeleri)

1.1.2.1.5 Aflatoksinlerin Dünya ve Türkiye Gündemine Girişi

Aflatoksinlerin ve dolaysıyla mikotoksinlerin dünya gündeminde yer alması 1960 yılında olmuştur. Bu tarihten önce de çeşitli vakalar meydana gelmiş ancak bu vakaların nedenleri o tarihlerdeki koşullar altında tam olarak aydınlatılamamıştır.

Mikotoksinlerin neden oldukları hastalıklara ait kayıtlar M.Ö 600 yıllarına dayanır. Bu tarihlere ait Asur tabletlerinde çavdarmahmuzu adı ile anılan küfler (Claviceps purpurea) ile bulaşmış tahılların zararlı etkilerinden bahsedilmektedir.

M.Ö. 400 yılında Sparta'da ilk toplu zehirlenmeye ilişkin kayıtlar bulunmuştur. Ortaçağ Avrupası'nda nekroz ve kangrenle kendini gösteren ergotizm hastalığı da mikotoksinlere bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. O tarihlerde Aziz Antoyus Humması olarak adlandırılan bu hastalık yine mikotoksinli tahılların tüketilmesi sonucu sık sık ortaya çıkmıştır. Hastalık 1920 yılında tekrar ortaya çıkmış en son olarak ta 1951 yılında Fransa'da görülmüştür.

Penicillum türlerinin pirinçler üzerinde toksin oluşturmasına bağlı olarak toksinli pirinçleri tüketen kişilerin hastalandığı, kusma, kasılma ve felç belirtileri ortaya çıktığı ve ilk belirtilerden sonra 1-3 gün içerisinde hastaların öldüğü 1890 yılında Japon patoloji uzmanları tarından keşfedilmiştir. 2. Dünya Şavaşı'ndan sonra da değişik ülkelerden ithal edilen sarı renkli küflü pirinçlerin tüketilmesi ile bu hastalık sıkça ortaya çıkmıştır. Hastalık, Sarı Pirinç Hastalığı olarak adlandırılmıştır.

1928 yılında Almanya ve İskandinav ülkelerinde domuzlarda "nefropati" tanılanmıştır. Böbrek hastalığına neden olan ve Aspergillus achraceus türü küf tarafından oluşturulan mikotoksin daha sonra tanımlanabilmiştir. Okratoksin A olarak isimlendirilen bu mikotoksinin Eski Yugoslavya, Bulgaristan ve Romanya gibi Balkan ülkelerinde ortaya çıkan Balkan nefropatisinin de nedeni olduğu çok daha sonra ortaya çıkmıştır.

Penicillum rubrum türü küflerle bulaşık mısırlarla beslenen at ve sığırların öldüğüne dair raporlar 1927 yılına dayanır.

1960 yılından önce Pityomyces chartarum türü küfler ile bulaşmış yemlerle beslenen koyun ve sığırlarda yüz egzamasının görüldüğü bilinmektedir.

Mikotoksinlere bağlı olarak görülen önemli bir salgın vakası da 2. Dünya Savaşı'ndan sonra o zaman ki Sovyetler Birliği'nin Orenburg Bölgesi'nde ortaya çıkmıştır. Bu salgına, ağız boşluğunda yaralar, deride ve mukozlu membranlarda kanamalar, ateş gibi belirtiler gösteren ve beslenmeye bağlı toksik etki ile kanda lökosit sayısının düşmesi sonucu oluşan bir lösemi türü olan ve Alimentary Toxic Aleuika (ATA) olarak isimlendirilen hastalık neden olmuştur. Hastalığın savaş sırasında hasat edilmeyen ve kış boyu tarlalarda kalan hububat üzerinde Fusarium ve Cladosporium küflerinin çoğalması sonucu ortaya çıktığı düşünülmüştür.

Aflatoksinlerin keşfedilmesi 1960 yılında İngiltere'nin güneyindeki kümeslerde meydana gelen ve 100.000'den fazla hindi, binlerce ördek yavrusu ve sülün palazının telef olmasına neden olan olaydan sonra olmuştur. Salgına neden olan hastalık Turkey-X olarak isimlendirilmiştir. Hastalığa kümes hayvanlarının yemlerine protein kaynağı olarak ilave edilen Brezilya menşeli yer fıstıklarında bulunan toksinin neden olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sırasında toksinin kromatografik ayrımı yapılmış ve aflatoksin olarak isimlendirilmiştir. Esasında 1910 yılında bir araştırmacı küflenmiş Brezilya cevizinden Aspergillus flavus türü küfü izole etmiş ve bu küfün zehirlenmeye neden olduğunu belirtmiş ise de o zamanlar bu konu üzerinde fazlaca durulmamıştır. 1980 yılında yapılan bir çalışmada ilk verileri doğrulayıcı sonuçlar elde edilmiştir.

Ülkemiz açısından aflatoksin sorunu 1967 yılında ortaya çıkmıştır. Bu tarihte Kanada'ya ihraç edilen 10 ton iç fındık aflatoksinli olduğu için geri çevrilmiştir. Aynı şekilde 1971 yılında ABD'ye ihraç edilen 45 parti Antep fıstığında da aflatoksin tespit edilmiş ve 31 parti ürün geri çevrilmiştir. 1972 yılında Kanada'ya ihraç edilen kuru incirlerde de aflatoksin tespit edilmiştir.

Aflatoksinlerin tanımlanmasından sonra dünya üzerinde önemli vakalar ortaya çıkmıştır. 1970 'li yıllarda Tayvan'da 3, Uganda ve Tayland'da birer çocuk aflatoksin düzeyi yüksek gıdaları tüketmeleri sonucunda ortaya çıkan akut zehirlenmeler sonucunda hayatlarını kaybetmişlerdir. 1974 yılında Hindistan'da 15 ppm'e kadar yüksek düzeyde aflatoksin içeren mısır yiyen 320 kişiden 80'i hayatını kaybetmiştir. 1981 yılında Kenya'da konsantrasyonları 1,6-12 ppm arasında olan mısırdan kaynaklanan 20 akut zehirlenme olayında 12 kişi ölmüştür. 2004 yılında Kenya'nın Doğusu'nda ve Merkez'indeki 8 ilde meydana gelen aflatoksin zehirlenmelerinde 317 kişi etkilenmiş, bunların 125'i hayatlarını kaybetmiştir. Hastalığın tespit edildiği evlerden toplanan 31 mısır unu, darı ve fasulye örneğinden 15 tanesindeki aflatoksin B_1 miktarının 20 - 8.000 ppb arasında olduğu saptanmıştır. Ayrıca bölgedeki pazaryerlerinden toplanan mısır ürünlerinde de yüksek düzeyde aflatoksin tespit edilmiştir. Aynı bölgede 2005 yılının Mayıs ayında yine aflatoksin zehirlenmeleri ortaya çıkmış, tespit edilen 100 vakada 13 ölüm olayı meydana gelmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Bu çalışmada Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü ve özel sektör tarafından üretilen mamul ve yarı mamul çay numunelerinin yanı sıra küflerin gelişmesi ve aflatoksin üretebilmesi için uygun ortam oluşturan çay ve atık çay numuneleri de kullanılmıştır. Bu amaçla geniş bir alanda numune çalışması yapılmış, alınan numuneler laboratuara getirildikten sonra hemen analiz edilmişir. Çalışmada kullanılan numuneler 10 farklı kaynaktan temin edilmiştir.

2.1.1 Son Kullanım Tarihi Geçmiş Numuneler

Bu amaçla, Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğüne bağlı Pazarlama Bölge Müdürlükleri ve Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlükleri'nden toplanan, son kullanım tarihi geçmiş ve imha amacıyla 100. Yıl Çay Paketleme Fabrikasına gönderilen çay numuneleri kullanılmıştır.

- Diyarbakır Pazarlama Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Siyah Çay 1.Numune
- Diyarbakır Pazarlama Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Siyah Çay 2.Numune
- İstanbul Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Siyah Çay 1.Numune
- İstanbul Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Siyah Çay 2.Numune
- İstanbul Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Siyah Çay 3.Numune
- İstanbul Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Yeşil Çay 1.Numune
- İstanbul Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Yeşil Çay 2.Numune
- İstanbul Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Yeşil Çay 3.Numune
- İstanbul Pazarlama ve Üretim Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Yeşil Çay 4.Numune
- İzmir Pazarlama Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Siyah Çay 1.Numune
- İzmir Pazarlama Bölge Müdürlüğü'nden Gönderilen Dökme Siyah Çay 2.Numune

2.1.2 Piyasada Satılan Açık Çaylar

Ticari olarak piyasada satılmak üzere herhangi bir paketleme materyali ile paketlenmemiş bunu yerine dökme çay olarak büyük ambalaj materyalleri içerisinde ağzı açık şekilde satılan çaylardan ilk kontrollerde nem oranı yüksek olarak tespit edilen çaylardan alınan numuneler kullanılmıştır.

2.1.3 Piyasada Satılan Ticari Çaylar

Ülkemizde çay üretimi ve pazarlaması konusunda faaliyette bulunan özel sektör tarafından üretilmiş ve paketlenerek piyasaya sürülmüş olan ticari çaylardan alınan numuneler kullanılmıştır. Bu amaçla aşağıda belirtilen ticari isimdeki çaylar kullanılmıştır.

- ÇAYKUR Burcum Yeşil Çay
- ÇAYKUR Hediyelik Siyah Çay
- ÇAYKUR Naneli Yeşil Çay
- DOĞUŞ Karadeniz Export Siyah Çay
- LİPTON Yellow Label Siyah Çay
- OFÇAY Filiz Siyah Çay
- OFÇAYSAN Çamlica Filizi
- ÖZÇAY Koop. Organik Siyah Çay
- ÖZÇAY Siyah Çay
- FİLİZ Prenses Siyah Çay

2.1.4 Kaçak ve Yabancı Menşeli Çaylar

Piyasada satılmak üzere kaçak olarak ülkemize sokulan ve numune olarak 100. Yıl Çay Paketleme Fabrikasında bulunan çaylar ile piyasadan satın alınan ithal ticari çaylar kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan çaylar aşağıdaki gibidir.

- Rize Serbest Bölge'de Ele Geçirilen Kaçak Çay ,200 Yılı , 1. Numune
- Rize Serbest Bölge'de Ele Geçirilen Kaçak Çay ,200 Yılı , 2. Numune
- Lipton İthal Siyah Çay

2.1.5 Fabrikalarda Üretilen Yarı Mamul Çaylar

Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne bağlı Yaş Çay Fabrikalarında üretilen ve tasnif ünitesinde nevilerine ayrılan yarı mamul çaylar kullanılmıştır. Bu amaçla aşağıda belirtilen yarı mamul çaylar kullanılmıştır.

- Ambarlık Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün Dönemi 1.Nevi Siyah Çay
- Ambarlık Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Nevi Siyah Çay
- Araklı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
  Ardeşen Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Ardeşen Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Arhavi Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 3.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Aşıklar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Azaklı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Bölümlü Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Nevi Siyah Çay
- Camidaği Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 3. Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Cumhuriyet Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Cumhuriyet Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 7.Nevi Siyah Çay
- Çamlı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Nevi Siyah Çay
- Çayeli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.sürgün 1.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Çiftlik Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Derepazarı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Eskipazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Fındıklı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Gündoğdu Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Gündoğdu Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı. 3.Sürgün 7.Nevi Siyah Çay
- Güneysu Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 3.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Hayrat Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 2.Nevi Siyah Çay

- Hopa Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Işıklı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- İyidere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Nevi Siyah Çay
- Kalecik Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Kalkandere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Karaca Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı. 2.Sürgün 7.Nevi Siyah Çay
- Karaca Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Nevi Siyah Çay
- Kemalpaşa Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Kemalpaşa Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Nevi Siyah Çay
- Kendirli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Kirazlık Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Kirazlık Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Melyat Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Melyat Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Muratlı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Musadağı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Of Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Pazarköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Sabuncular Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 3.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Salarha Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Selimiye Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 3.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Selimiye Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Sürmene Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Nevi Siyah Çay
- Taşçılar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 2.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı. Antik Yeşil 1-2.Sürgün Yeşil Çay
- Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı Antik Yeşil 2-2.Sürgün Yeşil Çay
- Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı Kardelen 1-2.Sürgün Yeşil Çay
- Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı Kardelen 2-2.Sürgün Yeşil Çay
- Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı Toz Yeşil-2.Sürgün Yeşil Çay
- Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı Turkuaz-2.Sürgün Yeşil Çay
- Tersane Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Tirebolu Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 3.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 4.Nevi Siyah Çay
- Veliköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Sürgün 1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Zihniderin Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 3.Sürgün 1.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-1.Dönem 1.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-2.Dönem 4.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-2.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-2.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008Yılı 3.Sürgün-2.Dönem 7.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-3.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-3.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Büyükköy Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 Yılı 3.Sürgün-3. Dönem 4.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-1.Dönem 1.Nevi Siyah Çay

- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-1.Dönem 4.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-2.Dönem 4.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-2.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Pazar çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-2.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-3.Dönem 5.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-3.Dönem 6.Nevi Siyah Çay
- Pazar Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-3.Dönem 7.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-1.Dönem 1.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-1.Dönem 2.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3ürgün.S-1.Dönem 3.Nevi Siyah Çay
- Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008 yılı 3.Sürgün-1.Dönem 4.Nevi Siyah Çay

2.1.6 Ticari Olarak Paketlemeye Uygun Olmayan Yarı Mamul Kuru Çaylar

Bu amaçla Çay İşletmeler Genel Müdürlüğüne bağlı yaş çay fabrikalarında üretilen ve paketleme fabrikalarına gönderilmeden önce yarı mamul kuru çay ambarlarında muhafaza edildikten sonra paketlenmek üzere 100. Yıl Çay Paketleme Fabrikasına gönderilen ancak; kontroller sonucunda paketlemeye uygun olmayacak şekilde rutubetli, ıslak, küflü ve yabancı madde içerdiği için fabrikalarına iade edilmek üzere bekletilen çaylardan alınan numuneler kullanılmıştır.

- Bölümlü Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü
- Bölümlü Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü
- Çayeli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Islak
- Çayeli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2004 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü
- Çayeli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı Karışık Nevi siyah Çay
- Gündoğdu Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü
- Hopa Çay Fabrikası Müdürlüğü 2004 Yılı 3.Nevi Siyah Çay, Rutubetli
- Işıklı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Islak
- Melyat Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Nevi Siyah Çay, Islak
- Sabuncular Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Islak

2.1.7 Yarı Mamul Çay Ambarlarında Bulunan Eski Tarihli Çaylar

Üretim tarihi eski olup henüz paketlenmemiş olan yarı mamul çaylar çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Bu amaçla bu çayların tespit edilmesi amacıyla Çay işletmeleri Genel Müdürlüğüne bağlı yarı mamul kuru çay ambarları kontrol edilmiştir. Bu kontroller sırasında aşağıda belirtilen yarı mamul kuru çay ambarlarında bulunan eski üretim tarihli nevi çaylardan alınan numuneler çalışma sırasında kullanılmıştır.

- Camidağı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2006 Yılı Üretimi 6. Nevi Siyah Çay
- Camidaği Çay Fabrikası Müdürlüğü 2006 Yılı Üretimi 3. Nevi Siyah Çay
- Salarha Çay Fabrikası Müdürlüğü 2006 Yılı Üretimi 6. Nevi Siyah Çay
- Hopa Çay Fabrikası Müdürlüğü 2004 Yılı Üretimi 5. Nevi Siyah Çay

2.1.8 Yarı Mamul Kuru Çay ambarlarında 2 Yıl Bekletilen Nevi Çaylar

Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğüne bağlı Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüğü ve Yeşil Çay Deneme Üretim Merkezi'nde üretilen siyah ve yeşil çaylar, kraft torba içerisine konarak Ulucami, Ambarlık ve Taşlıdere Çay Fabrikası Müdürlüklerine ait yarı mamul kuru çay ambarlarında 2 yıl süreyle bekletilmiştir. 2 yıl sonunda bu çaylardan alınan numuneler çalışma kapsamında kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan çay nevileri aşağıdaki gibidir.

- 1. Nevi Siyah Çay
- 2. Nevi Siyah Çay
- 3. Nevi Siyah Çay
- 4. Nevi Siyah Çay
- 5. Nevi Siyah Çay
- 6. Nevi Siyah Çay
- 7. Nevi Siyah Çay
- Antik Yeşil-1 Nevi Yeşil Çay
- Antik Yeşil-2 Nevi Yeşil Çay
- Kardelen-1 Nevi Yeşil Çay
- Kardelen-2 Nevi Yeşil Çay
- Turkuaz Nevi Yeşil Çay

2.1.9 Eski Tarihli Çeşitli Çaylar

Numune almak üzere kullanılacak olan eski tarihli çayların tespit edilmesi amacıyla Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğüne bağlı çeşitli birimlerde araştırma yapılmıştır. Araştırma sonucunda aşağıda belirtilen birimlerde çeşitli şekillerde muhafaza edilen, eski tarihli çaylar bulunmuş olup bu çaylardan çalışmalarda kullanılmak üzere numune alınmıştır.

- İzmir Bölge Müdürlüğü'nden elde edilen 2004 yılı üretimi dökme şekilde muhafaza edilen siyah çay
- Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nden elde edilen 1976 yılında teneke kutu ambalajlı "Kamelya" marka siyah çay
- Ambarlık Çay Fabrikası Müdürlüğü'nden elde edilen ve cam kavanoz içerisinde muhafaza edilen 2002 üretimi 2 Nevi Siyah Çay
- 100.Yıl Çay Paketleme Fabrikası Müdürlüğü'nden elde edilen ve plastik ambalaj malzemesi içerisinde dökme olarak muhafaza edilen nemli siyah çay
- Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden elde edilen üretim tarihi belirsiz ve dökme şekilde muhafaza edilen küflü siyah çay

2.1.10 İmalat Kalıntıları

Yaş çay üretim fabrikalarında imalat kısımlarında üretim esnasında çeşitli kalıntılar oluşur ve iyi temizlenmedikleri zaman bu kalıntılar üzerinde kolayca küf gelişimi meydana gelir. Bu kalıntılar üzerinde aflatoksin oluşabileceği düşünülerek çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Bunu için Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğüne bağlı Azaklı Çay Fabrikası Müdürlüğüne ait imalat ünitesinin aşağıda belirtilen kısımlardan imalat atıkları ve kalıntıları alınmıştır.

- Soldurma Ünitesi Yükleme Bandı
- Soldurma Ünitesi 1. Kat, Traf
- Soldurma Ünitesi 1. Kat, Bünker
- Düz Kıvırma Makinesi
- Düz Kıvırma Ünitesi Ana Bant
- Düz Kıvırma Ünitesi 2. Bant
- Düz Kıvırma Ünitesi 2. Bant Çıkışı
- Presli Kıvırma Ünitesi Ana Bant Başı
- Presli Kıvırma Ünitesi Ana Bant Sonu
- Presli Kıvırma Ünitesi Yükleme Bandı
- Presli Kıvırma Makinesi 1. Numune
- Presli Kıvırma Makinesi 2. Numune
- Yaş Çay Eleği
- Fermantasyon Ünitesi Yükleyici Helezon
- Fermantasyon Makinesi, 1. Numune
- Fermantasyon Makinesi, 2. Numune
- Fermantasyon Ünitesi Çıkışı
- Kurutma Fırını
- Kurutma Fırını Ön Yükleme Bant Rölesi
- Kurutma Fırını 1. Yükleme Bandı
- Kurutma Fırını 2. Yükleme Bandı
- Kurutma Fırını Ön Yükleme Bant Altı
- Kurutma Fırını Çıkışı An Bant Altı
- Kuru Çay Eleği Altı 1. Numune
- Kuru Çay Eleği Altı 2. Numune
- Kuru Çay Ana Taşıyıcı Bant
- Midilton
- Tasnif Ünitesi 1. Numune
- Tasnif Ünitesi 2. Numune
- Tasnif Ünitesi 3. Numune
- Tasnif Ünitesi Atık Toz Çay

Bu amaçla kullanılan numunelerden bazıları üzerinde gözle görülür bir şekilde küf gelişimi tespit edilmiş olup numunelere ait birkaç resim aşağıdadır.

Resim 5; Presli Kıvırma Ünitesi Ana Bant Başından alınan numuneye ait resim

Resim 6; Presli Kıvırma Ünitesi Yükleme Bandından alınan numuneye ait resim

Resim 7; Fermantasyon Ünitesinden alınan 1. Numuneye ait resim

Resim 8; Fermantasyon Ünitesinden alınan 2. Numuneye ait resim

Resim 9; Kurutma Fırını 2. Yükleme Bandından alınan Numuneye ait resim

Resim 10; Midilton'dan alınan Numuneye ait resim

2.2 Yöntem

Siyah ve yeşil çaylarda aflatoksin analizinde kullanılmak üzere geliştirilmiş olan ve geçerliliği kanıtlanmış uluslar arası veya ulusal herhangi analiz yöntemi yoktur. Numunelerin analizi için TS EN 12955 (Gıda maddeleri- Hububatlarda, kabuklu meyvelerde ve türetilmiş ürünlerde aflatoksin B1 ile aflatoksin B1, B2, G1, ve G2 toplamlarının artkolon türevlendirmeli ve immınoaffinite ile kolondan geri almalı yüksek performanslı sıvı kromotografisi yöntemi) standardı ve AOAC Official Method 999.07. Aflatoxin B1 and Total Aflatoxin in Peanut Butter, Pistacho Paste, Fig Paste and Paprika Powder. Immunoaffinity Column Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization yönteminden faydalanıldı. Ayrıca aflatoksin analizi için kullanılan cihaz ve ekipman üreticisi firmaların tavsiyeleri de dikkate alındı.

2.2.1 HPLC Sistemi

Numunelerin analizinde kullanılan HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromotografisi) sistemi şu konfigürasyondan oluşmuştur.

- Degaz Ünitesi: (Spectra SYSTEM SCM 1000, Thermo)
- Gradient Pompa: (Spectra SYSTEM P4000, Thermo)
- Otosampler: (Spectra SYSTEM AS3000, Thermo)
- Floresans Dedektör: (Spectra SYSTEM FL3000, Thermo)
- Analitik kolon: (Prodigy 5µ ODS3, 4,6*150mm, Phenomenex)
- Kolon Sonu Türevlendirme Sistemi (KOBRA CELL, Rhone Diagnostics)

HPLC sisteminin bilgisayar tarafından kumanda edilebilmesi için ChromQuest 4,0 ticari yazılım programı kullanıldı.

Aflatoksin analiz şartları aşağıdaki gibi oluşturuldu

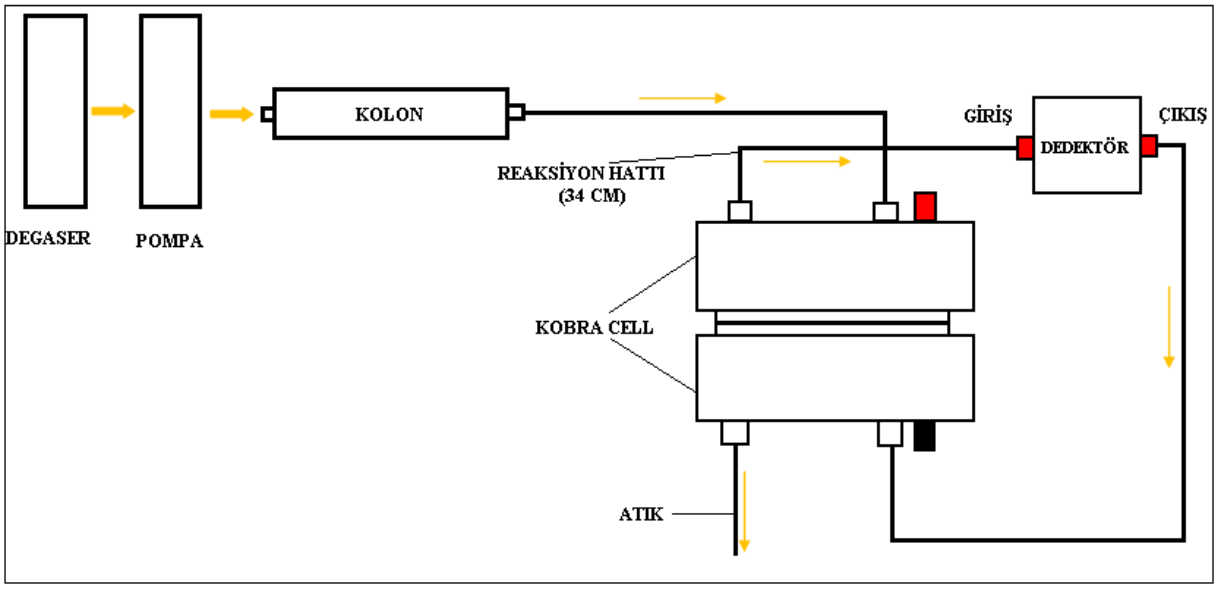
- Mobil Faz : 120 mg KBr ve 100µl HNO_3 içeren Su-Metanol Çözeltisi(55:45)
- Akış Hızı : 1 ml/dakika
- Kolon Fırını : 40ºC
- KOBRA CELL : 100µA
- Dedektör :

Tablo 7; Aflatoksin analizinde kullanılan floresans dedektör programı

Zaman(Dakika)	Excitation(nm)	Emission(nm)
0	360	440
11	360	440

HPLC sisteminin kuruluşuna ait diyagram aşağıdaki resimde gösterilmiştir.

Resim 11 ; Aflatoksin analizi için kurulan HPLC sistemine ait diyagram



2.2.2 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

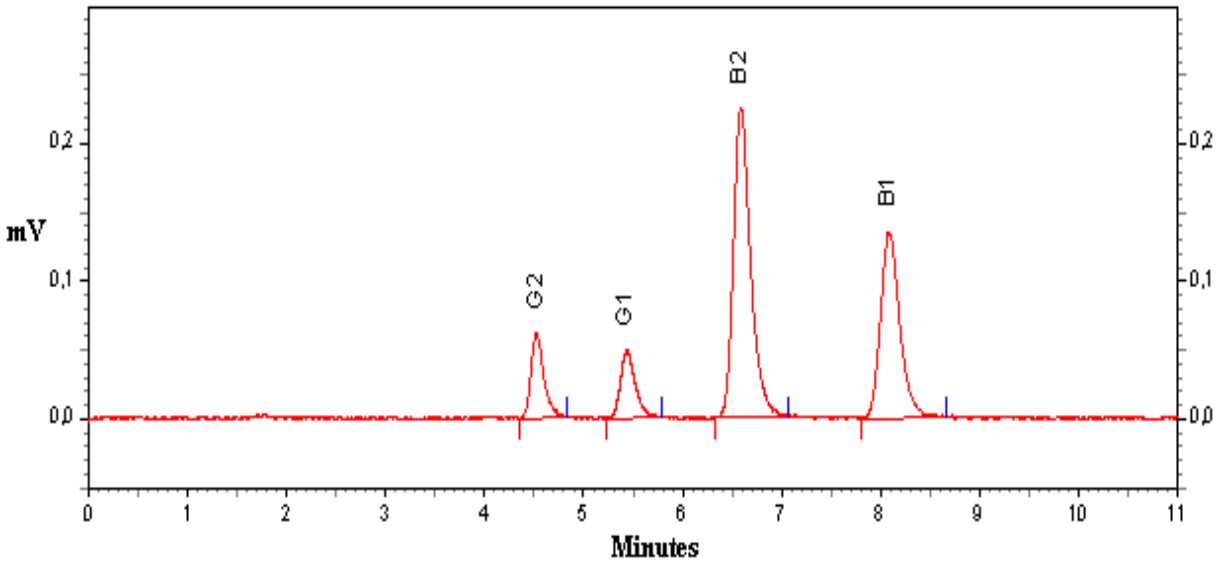
Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması amacıyla kullanılan ve 250 ng/ml B_1, 250 ng/ml B_2, 250 ng/ml G_1 ve 250 ng/ml G_2 olmak üzere toplam 1000 ng/ml içeren aflatoksin standart çözeltisi R-Biopharm AG Firmasından satın alındı. Satın alınan aflatoksin standart çözeltisinden aşağıdaki tabloya uygun 5 farklı konsantrasyona sahip çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan aflatoksin standardı çözeltilerinin konsantrasyonlarının aşağıda gösterilen tabloya uygun olması sağlandı.

Tablo 8; Kalibrasyon eğrisi için kullanılan aflatoksin konsantrasyonları

AFLATOKSİN	**KONSANTRASYON(ng/kg=ppb)**				
B_1	0,5	1	2	2,5	3,75
B_2	0,5	1	2	2,5	3,75
G_1	0,5	1	2	2,5	3,75
G_2	0,5	1	2	2,5	3,75

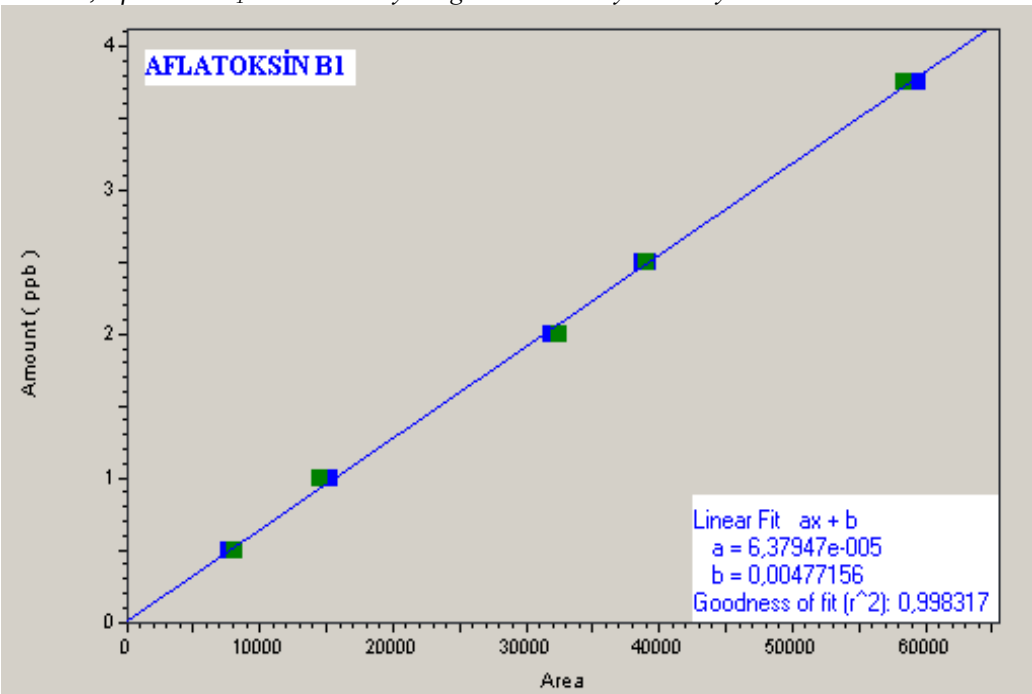
Hazırlanan çalışma çözeltilerinden her biri 3 paralel şekilde 100 µl cihaza enjekte edildi. Elde edilen tipik kromotograma ait resim aşağıda gösterilmiştir.

Resim 12: Aflatoksin standart çözeltisine ait tipik kromotogram

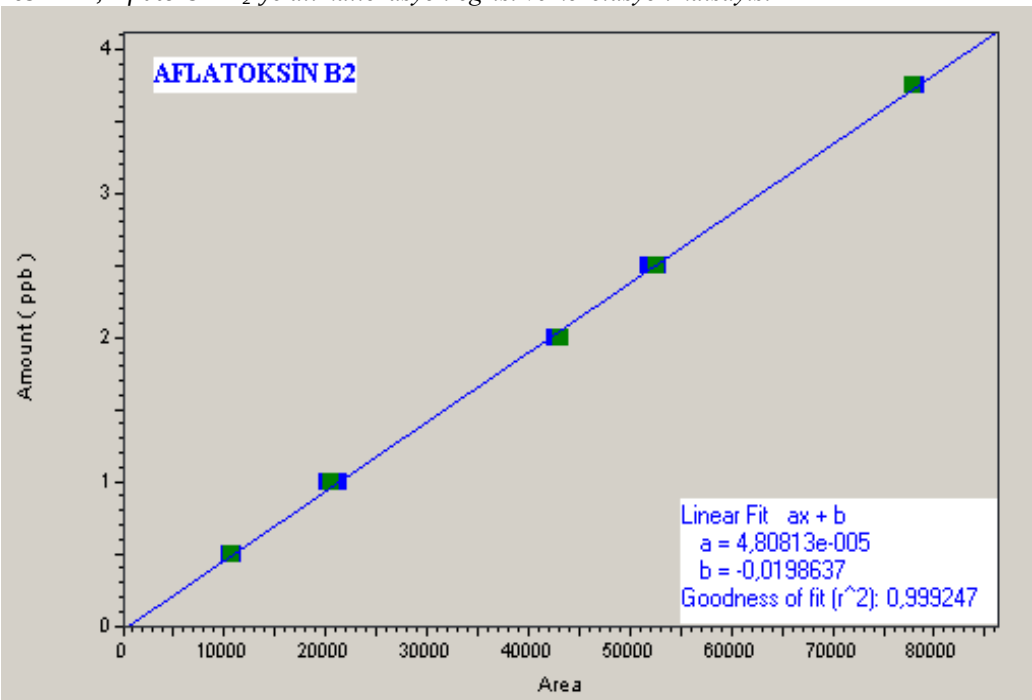


HPLC cihazında okutulan 5 farklı konsantrasyondaki aflatoksin standardına karşılık elde edilen pik alanlarından faydalanarak kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Her bir Aflatoksinin kalibrasyon eğrisi ve elde edilen korelasyon katsayıları aşağıdaki gibidir.

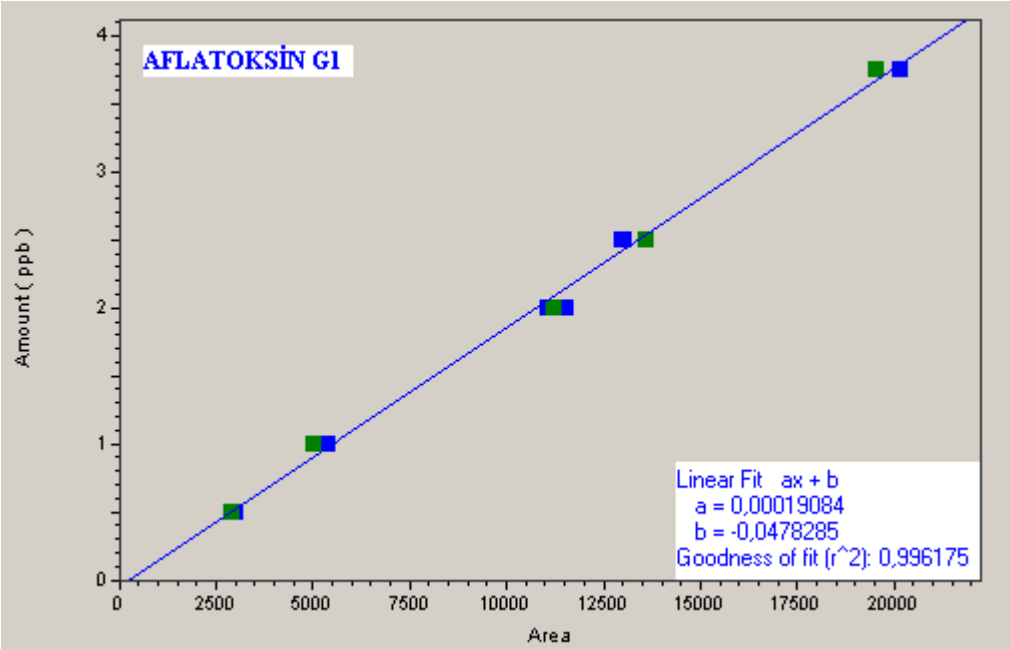
Resim13; Aflatoksin B_1'e ait kalibrasyon eğrisi ve korelasyon katsayısı



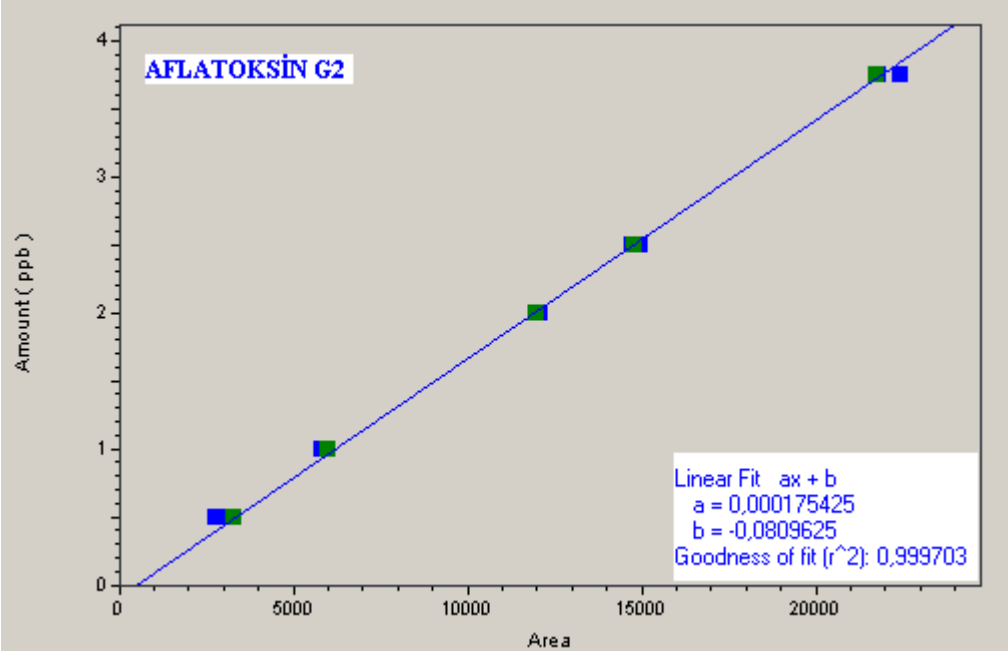
Resim 14; Aflatoksin B_2'ye ait kalibrasyon eğrisi ve korelasyon katsayısı



Resim 15; Aflatoksin G_1'e ait kalibrasyon eğrisi ve korelasyon katsayısı



Resim 16; Aflatoksin G_2'ye ait kalibrasyon eğrisi ve korelasyon katsayısı



2.2.3 Numunelerin Analiz İçin Hazırlanması

Analiz için çeşitli yerlerden toplanan ve laboratuara getirilen numuneler üzerinde önce su aktivitesi analizi yapıldı. Su aktivitesi analizinden sonra numuneler analiz edilinceye kadar uygun şartlarda muhafaza altına alındı. Numunelere ait su aktivitesi değerleri aşağıda tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 9; Piyasada Satılan Ticari Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Numune	Su Aktivitesi
ÇAYKUR Burcum Yeşil Çay	0,388
ÇAYKUR Hediyelik Siyah Çay	0,408
ÇAYKUR Naneli Yeşil Çay	0,387
DOĞUŞ Karadeniz Export Siyah Çay	0,408
LİPTON Yellow Label Siyah Çay	0,430
OFÇAY Filiz Siyah Çay	0,436
OFÇAYSAN Çamlica Filizi	0,415
ÖZÇAY Koop. Organik Siyah Çay	0,433
ÖZÇAY Siyah Çay	0,449
FİLİZ Prenses Siyah Çay	0,426

Tablo 10; Ticari Olarak Paketlemeye Uygun Olmayan Yarı Mamul Kuru Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Numune	Su Aktivitesi
Bölümlü Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü	0,445
Bölümlü Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü	0,459
Çayeli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Islak	0,443
Çayeli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2004 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü	0,450
Çayeli Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı Karışık Nevi siyah Çay	0,442
Gündoğdu Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Küflü	0,454
Hopa Çay Fabrikası Müdürlüğü 2004 Yılı 3.Nevi Siyah Çay, Rutubetli	0,466
Işıklı Çay Fabrikası Müdürlüğü 2008Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Islak	0,993
Melyat Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 2.Nevi Siyah Çay, Islak	0,996
Sabuncular Çay Fabrikası Müdürlüğü 2007 Yılı 5.Nevi Siyah Çay, Islak	0,998

Tablo 11; Fabrikalarda Üretilen Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Fabrika Adı	**Yıl**	**Sürgün**	**Dönem**	**Nevi**	**Su Aktivitesi**
Ambarlık Çay Fabrikası	2007	2	-	1	0,387
Araklı Çay Fabrikası	2007	2	1	2	0,396
Ardeşen Çay Fabrikası	2007	2	1	3	0,364
Ardeşen Çay Fabrikası	2007	3	-	4	0,366
Arhavi Çay Fabrikası	2007	2	3	3	0,403
Aşıklar Çay Fabrikası	2007	2	-	4	0,377
Azaklı Çay Fabrikası	2007	2	2	5	0,382
Bölümlü Çay Fabrikası	2007	2	1	5	0,398
Büyükköy Çay Fabrikası	2007	3	-	1	0,372
Camidağı Çay Fabrikası	2007	2	3	5	0,389
Cumhuriyet Çay Fabrikası	2007	2	2	3	0,407
Çamlı Çay Fabrikası	2007	2	-	1	0,387
Çayeli Çay Fabrikası	2007	2	1	5	0,378
Derepazarı Çay Fabrikası	2007	2	2	5	0,415
Eskipazar Çay Fabrikası	2007	2	2	5	0,382
Fındıklı Çay Fabrikası	2007	3	1	2	0,380
Gündoğdu Çay Fabrikası	2007	2	1	2	0,381
Gündoğdu Çay Fabrikası	2007	3	-	7	0,362
Güneysu Çay Fabrikası	2007	2	3	6	0,403
Hayrat Çay Fabrikası	2007	2	2	2	0,409
Hopa Çay Fabrikası	2007	2	1	6	0,376
Işıklı Çay Fabrikası	2007	2	1	6	0,384
İyidere Çay Fabrikası	2007	3	-	1	0,381
Kalecik Çay Fabrikası	2007	2	2	6	0,376
Kalkandere Çay Fabrikası	2007	3	-	4	0,380
Karaca Çay Fabrikası	2007	2	-	7	0,398
Karaca Çay Fabrikası	2007	3	-	1	0,381
Kemalpaşa Çay Fabrikası	2007	2	2	3	0,361
Kemalpaşa Çay Fabrikası	2007	3	-	1	0,362
Kendirli Çay Fabrikası	2007	2	1	3	0,373
Kirazlık Çay Fabrikası	2007	3	1	6	0,390
Kirazlık Çay Fabrikası	2007	2	2	6	0,404
Melyat Çay Fabrikası	2007	2	2	2	0,387

Fabrika Adı	Yıl	Sürgün	Dönem	Nevi	Su Aktivitesi
Melyat Çay Fabrikası	2007	2	1	6	0,376
Muratlı Çay Fabrikası	2007	2	1	3	0,390
Musadağı Çay Fabrikası	2007	3	1	2	0,350
Of Çay Fabrikası	2007	2	2	6	0,384
Ortapazar Çay Fabrikası	2007	2	-	1	0,369
Pazar Çay Fabrikası	2007	2	1	3	0,399
Pazarköy Çay Fabrikası	2007	2	2	5	0,383
Sabuncular Çay Fabrikası	2007	3	3	3	0,392
Salarha Çay Fabrikası	2007	2	1	3	0,393
Selimiye Çay Fabrikası	2007	3	-	4	0,374
Selimiye Çay Fabrikası	2007	2	3	2	0,390
Sürmene Çay Fabrikası	2007	2	-	1	0,378
Taşçılar Çay Fabrikası	2007	2	2	2	0,390
Taşlıdere Çay Fabrikası	2007	1	2	Kardelen-1	0,380
Taşlıdere Çay Fabrikası	2007	2	1	Kardelen-2	0,400
Taşlıdere Çay Fabrikası	2007	2	-	Antik Yeşil-1	0,380
Taşlıdere Çay Fabrikası	2007	2	1	Antik Yeşil-2	0,398
Taşlıdere Çay Fabrikası	2007	1	2	Turkuaz	0,399
Taşlıdere Çay Fabrikası	2007	2	2	Toz Yeşil	0,411
Tersane Çay Fabrikası	2007	2	-	4	0,391
Tirebolu Çay Fabrikası	2007	2	-	1	0,393
Ulucami Çay Fabrikası	2007	3	3	5	0,359
Ulucami Çay Fabrikası	2007	2	1	5	0,380
Ulucami Çay Fabrikası	2007	2	-	4	0,390
Ulucami Çay Fabrikası	2007	3	-	4	0,360
Veliköy Çay Fabrikası	2007	2	1	2	0,420
Zihniderin Çay Fabrikası	2007	3	1	6	0,353
Cumhuriyet Çay Fabrikası	2007	3		7	0,375

Tablo 12; Yarı Mamul Kuru Çay Ambarlarında 2 Yıl Bekletilen Kuru Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Numune	Su Aktivitesi
1. Nevi Siyah Çay	0,693
2. Nevi Siyah Çay	0,679
3. Nevi Siyah Çay	0,692
4. Nevi Siyah Çay	0,692
5. Nevi Siyah Çay	0,675
6. Nevi Siyah Çay	0,678
7. Nevi Siyah Çay	0,698
Antik Yeşil-1 Nevi Yeşil Çay	0,677
Antik Yeşil-2 Nevi Yeşil Çay	0,693
Kardelen-1 Nevi Yeşil Çay	0,688
Kardelen-2 Nevi Yeşil Çay	0,675
Turkuaz Nevi Yeşil Çay	0,691

Tablo 13; Yarı Mamul Kuru Çay Ambarlarında Bulunan Eski tarihli Kuru Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Numune	Su Aktivitesi
Salarha Çay Fabrikası Müdürlüğü 2006 Yılı Üretimi 6. Nevi Siyah Çay	0,712
Camidaği Çay Fabrikası Müdürlüğü 2006 Yılı Üretimi 3. Nevi Siyah Çay	0,688

Tablo 14; Eski Tarihli Çeşitli Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Numune	Su Aktivitesi
Ambarlık Çay Fabrikası Müdürlüğü'nden elde edilen ve cam kavanoz içerisinde muhafaza edilen 2002 üretimi 2 Nevi Siyah Çay	0,290

Tablo 15; Piyasada Satılan Açık Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Numune	Su Aktivitesi
Açık Çay	0,441

Tablo 16; Kaçak ve Yabancı Menşeli Çaylardan Alınan Numunelerin Su Aktivitesi Değerleri

Numune	Su Aktivitesi
LİPTON İthal Siyah Çay	0,420

Tablo 17; Kuru çay üretim bandının farklı noktalarından alınan imalat kalıntılarının su aktivitesi değerleri

Numune	Su Aktivitesi
Soldurma Ünitesi Yükleme Bandı	0,705
Soldurma Ünitesi 1. Kat, Traf	0,989
Soldurma Ünitesi 1. Kat, Bünker	0,997
Düz Kıvırma Makinesi	0,997
Düz Kıvırma Ünitesi Ana Bant	0,997
Düz Kıvırma Ünitesi 2. Bant	0,997
Düz Kıvırma Ünitesi 2. Bant Çıkışı	0,999
Presli Kıvırma Ünitesi Ana Bant Başı	0,993
Presli Kıvırma Ünitesi Ana Bant Sonu	0,997
Presli Kıvırma Ünitesi Yükleme Bandı	0,812
Presli Kıvırma Makinesi 1. Numune	0,697
Presli Kıvırma Makinesi 2. Numune	0,695
Yaş Çay Eleği	0,996
Fermantasyon Ünitesi Yükleyici Helezon	0,994
Fermantasyon Makinesi, 1. Numune	0,996
Fermantasyon Makinesi, 2. Numune	0,995
Fermantasyon Ünitesi Çıkışı	0,996
Kurutma Fırını	0,597
Kurutma Fırını Ön Yükleme Bant Rölesi	0,547
Kurutma Fırını 1. Yükleme Bandı	0,999
Kurutma Fırını 2. Yükleme Bandı	0,991
Kurutma Fırını Ön Yükleme Bant Altı	0,660
Kurutma Fırını Çıkışı An Bant Altı	0,576
Kuru Çay Eleği Altı 1. Numune	0,606
Kuru Çay Eleği Altı 2. Numune	0,601
Kuru Çay Ana Taşıyıcı Bant	0,612
Midilton	0,575
Tasnif Ünitesi 1. Numune	0,610
Tasnif Ünitesi 2. Numune	0,594
Tasnif Ünitesi 3. Numune	0,602
Tasnif Ünitesi Atık Toz Çay	0,619

2.2.4 Ekstraksiyon

Analiz numunelerinin aflatoksin analizi için ekstraksiyon işleminde, en iyi ekstraksiyon verimini elde edebilmek amacıyla çeşitli yöntemler denendi. Bunun için kör numune üzerine konsantrasyonu bilinen standart ilavesi yapıldı. Standart ilave edilen kör numuneler değişik ekstraksiyon yöntemlerine tabi tutuldu. Denenen ekstraksiyon yöntemlerinde hangisinin en yüksek verime sahip olduğunun tespit edilmesi amacıyla geri alma hesaplaması yapıldı. Geri alma çalışmasında toplam aflatoksin miktarı(B_1+B_2+G_1+G_2) ve aflatoksin B_1 miktarı dikkate alındı. Geri alma sonuçları aşağıdaki eşitlik yardımı ile bulundu.

$$\% R = [(CF-CU)/CA] \times 100$$

Burada;

%R : Geri alma oranı (%)
CF : Standart eklenmiş kör örnek ölçüm sonucu
CU : Standart eklenmemiş kör örnek ölçüm sonucu
CA : Eklenen standart miktarı

En iyi ekstraksiyon veriminin elde edilmesi amacıyla bu çalışmada aşağıdaki farklı yöntemler denemiştir.

2.2.4.1 Yöntem-1

50 gr numune + 200 ml Asetonitril-Su(60:40) + Sodyum Klorür (4 gr)

Analiz yöntemi, Ankara İl Kontrol Laboratuarı Müdürlüğü'nde bitkisel çayların analizinde kullanılmaktadır. Ekstraksiyon sonucunda geri alma, aflatoksin B_1 için % 98,6 ve toplam aflatoksin için % 57,2 olarak bulunmuştur.

2.2.4.2 Yöntem-2

25 gr numune + 200 ml Asetonitril-Metanol(50:50)

Yöntem, R-Biopharm AG Firmasından özel olarak gönderildi. Ekstraksiyon sonucunda geri alma, aflatoksin B_1 için % 74,8 ve toplam aflatoksin için % 57,6 olarak bulunmuştur.

2.2.4.3 Yöntem-3

50 gr numune + 200 ml Asetonitril-Metanol(50:50) + Sodyum Klorür (4 gr)

Yöntem, R-Biopharm AG Firmasından gönderilen Yöntem-2'nin modifiye edilmesiyle elde edildi. Ekstraksiyon sonucunda geri alma, aflatoksin B_1 için % 106,1 ve toplam aflatoksin için % 70,3 olarak bulunmuştur.

2.2.4.4 Yöntem-4

25 gr numune + 125 ml Su-Metanol(30:70) + Sodyum Klorür (5 gr)

Yöntem, Trabzon İl Kontrol Laboratuarı Müdürlüğü'nde bitkisel çayların analizinde kullanılmaktadır. Ekstraksiyon sonucunda geri alma, aflatoksin B_1 için % 53,6 ve toplam aflatoksin için % 56,3 olarak bulunmuştur.

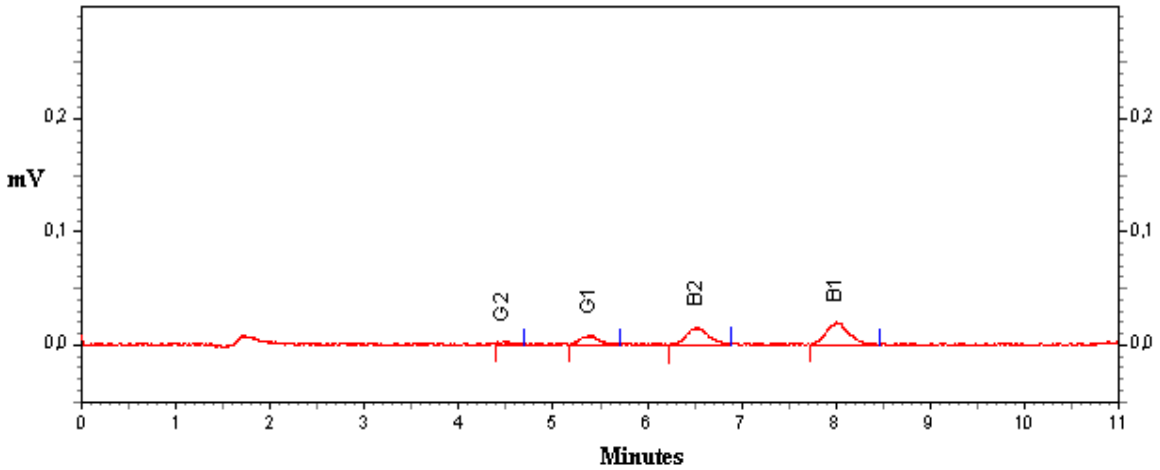
2.2.4.5 Yöntem-5

50 gr numune + 200 ml Asetonitril-Metanol-Su(40:20:40) + Sodyum Klorür (4 gr)

Analiz yöntemi, Ankara İl Kontrol Laboratuarı Müdürlüğü'nde bitkisel çayların analizinde kullanılan yöntemin laboratuarımızda modifiye edilmesiyle elde edildi. Ekstraksiyon sonucunda geri alma, aflatoksin B_1 için % 71,6 ve toplam aflatoksin için % 55,5 olarak bulunmuştur.

Türk Gıda Kodeksi tarafından yayımlanan 2007-21 Sayılı "Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği" aflatoksin analizlerinde 1-10 ppb konsantrasyon aralığı için geri alma oranının % 70-110 olmasını öngörmektedir. Buna göre en iyi ekstraksiyon verimi Yöntem-3 ile elde edildiğinden dolayı analizlerde kullanılan numuneler için burada belirtilen estraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Toplam 4 ppb (1 ppb B_1, 1 ppb B_2, 1 ppb G_1, 1 ppb G_2) konsantrasyona ait geri alma çalışmasının tipik kromotogramı ve geri alma verileri aşağıdaki resimde gösterilmiştir.

Resim 17: 4 ppb'lik geri alma çalışmasında elde dilen tipik kromotogram ve değerler



Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
G2	4,467	544	0,163	ppb
G1	5,384	2447	0,935	ppb
B2	6,523	5233	0,652	ppb
B1	8,003	6851	1,061	ppb
Totals		15075	2,811	

2.2.5 Filtrasyon

Ekstraksiyondan sonra analiz numuneleri ikili bir filtrasyon işlemine tabi tutuldu. Bunun için ekstarakt önce külsüz filtre kâğıdından (Whatman 4) süzüldü. Süzüntüden 8 ml alınarak çözeltinin pH'sının ayarlanması için üzerine 52 ml PBS (Phosphate buffered saline) tampon çözeltisi ilave edildi. Karışım ikinci filtrasyon işlemi için cam mikrofiber filtreden geçirildi.

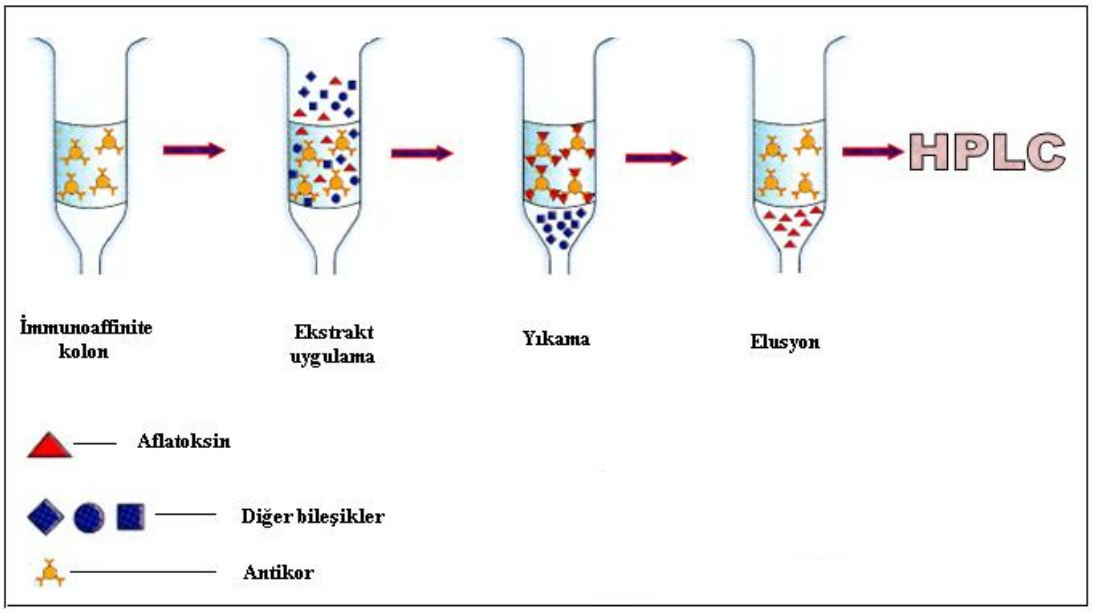
2.2.6 Saflaştırma (Clean-up)

Aflatoksinler numune içerisinde çok düşük konsantrasyonda bulunurlar. Bu nedenle tespit edilmelerinin sağlanması amacıyla numune içerisinde bulunan diğer tüm bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Saflaştırma denilen bu işlem için yapılan araştırma çalışmaları sonucunda aflatoksinler için spesifik antikorlar içeren immuno-affinite kolonları geliştirilmiştir. İmmunoaffinite kolonlar iki tip olarak üretilmektedir. 1.Tip kolonlardaki çalışma prensibinde; numuneden elde edilen ekstrakt kolondan geçirilir. Kolon içerisinde aflatoksinler için spesifik olarak üretilmiş olan antikorlar bulunur. Ekstrakt içerisindeki aflatoksinler bu antikorlar tarafından tutulurken diğer tüm bileşikler ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra antikorlar tarafından tutulan aflatoksinler uygun bir çözücü ile alınarak HPLC safhasına geçilir. 2. Tip kolonlardaki çalışma prensibine göre ise; numuneden elde edilen ekstrakt kolondan geçirilirken aflatoksin dışındaki tüm bileşikler kolon içerisinde bulunan antikorlar tarafından tutulur. Kolondan sadece aflatoksinler geçer. Bu işlemden sonra HPLC safhasına geçilir.

İmmunoaffinite kolon uygulaması ile ekstraktın saflaştırılması işlemi filtrasyondan sonra yapılır. Bunun için cam mikrofiber filtreden süzülen ekstraktan 30 ml alınır. Ekstrak 2-3 ml/dakika hızla immunoaffinite kolondan geçirilir. Daha sonra kolondan aynı hızla 15 ml HPLC grade su veya tampon çözelti (PBS =Phosphate buffered saline) geçirilir. Son olarak kolondan 1 ml Metanol geçirilerek antikorlar tarafından tutulan aflatoksinler alınır. Ekstrak 1 ml HPLC grade su ile seyreltilerek HPLC aşamasına geçilir.

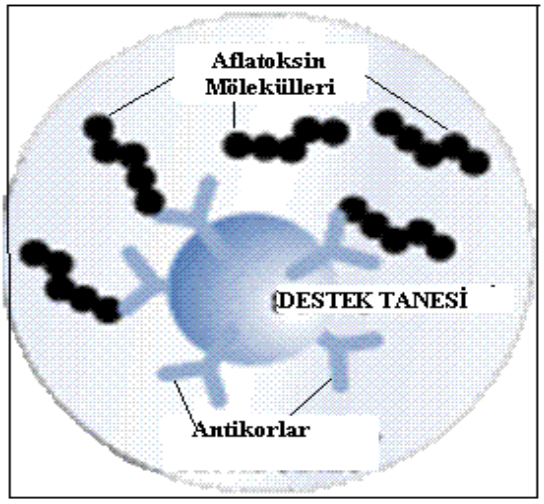
Bu çalışmada R-Biopharm AG Firmasından temin edilen 1. Tip immunoaffinite kolonlar kullanılmıştır. Aflatoksin analizlerinde immunoaffinite kolonların kullanılma sistemi aşağıdaki resimde gösterilmiştir.

Resim 18; İmmunoaffinite kolonlarda saflaştırma işlemi



İmmunoaffinite kolonlarda aflatoksin moleküllerinin tutunma durumu aşağıdaki resimde şematize edilmiştir.

Resim 19: İmmunoaffinite kolonlarda afllatoksinlerin tutunması

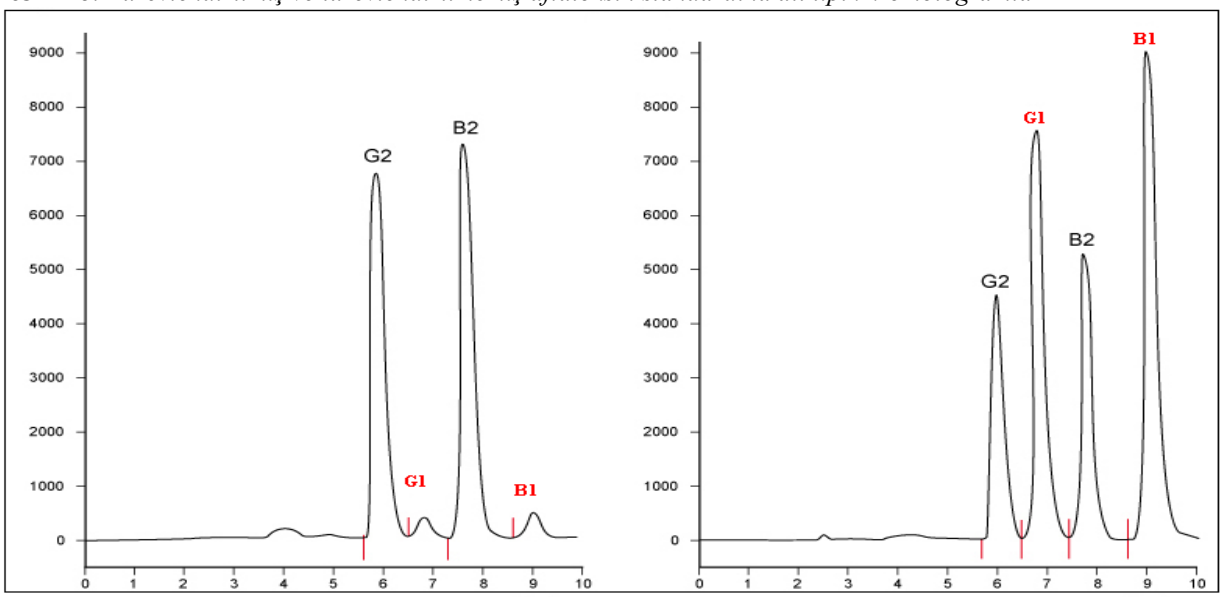


2.2.7 HPLC Aşaması

Ekstarkt, saflaştırma işleminden sonra vorteks karıştırıcıda iyice karıştırılır. 1,5 ml'lik koyu renkli HPLC vialine alınarak daha önceden hazırlanmış mobil faz ile yaklaşık 1 saat sureyle şartlanmış cihaza yerleştirilir. Enjeksiyon işleminden önce aflatoksinlerin türevlendirilmesi amacıyla KOBRA CELL'in siteme bağlı olması ve en az 30 dakika sureyle şartlandırılmış olması gerekmektedir.

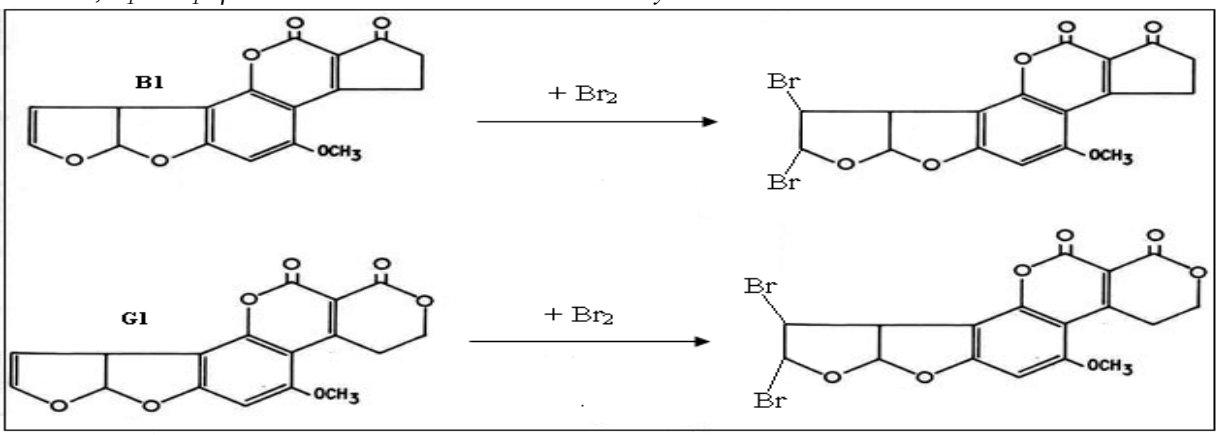
Türevlendirme işlemi, aflatoksin analizleri için çok önemli bir işlem basamağıdır. Bu işlemle analiz sırasında kullanılan floresans dedektörde tespit edilemeyen veya çok az bir şekilde görünen B1 ve G1 piklerinin görünür hale gelmesi ve boylarının uzaması sağlanır. Türevlendirme yapılmadan ve türevlendirme yapılarak HPLC'de okutulan aflatoksin standardına ait tipik kromatogramlar aşağıdaki resimde gösterilmiştir.

Resim 20: Türevlendirilmiş ve türevlendirilmemiş aflatoksin standardına ait tipik kromotogramlar



Türevlendirme işlemi, aflatoksin B_1 ve aflatoksin G_1 bileşiklerinin yapısında bulunan ikinci furan halkasındaki çift bağın açılarak bu bağlara mobil faz içerisinde bulunan brom atomlarının bağlanması sonucu meydana gelir. İkinci furan halkasındaki çift bağların açılması 100µA akım uygulanması sonucunda Kobra Cell içerisinde bulunan özel yapıdaki membran yüzeyinde gerçekleşir. Açılan çift bağlara brom atomlarının bağlanma işlemi de Kobra Cell ile floresans dedektör arasındaki 34 cm uzunluğunda olan reaksiyon hattında meydana gelir. Meydana gelen aflatoksin türevleri floresans ışığa daha fazla tepki verdiği için floresans dedektörde daha kolay görünürler. Aflatoksin B_1 ve aflatoksin G_1 bileşiklerinin türev reaksiyonları aşağıdaki resimde gösterilmiştir.

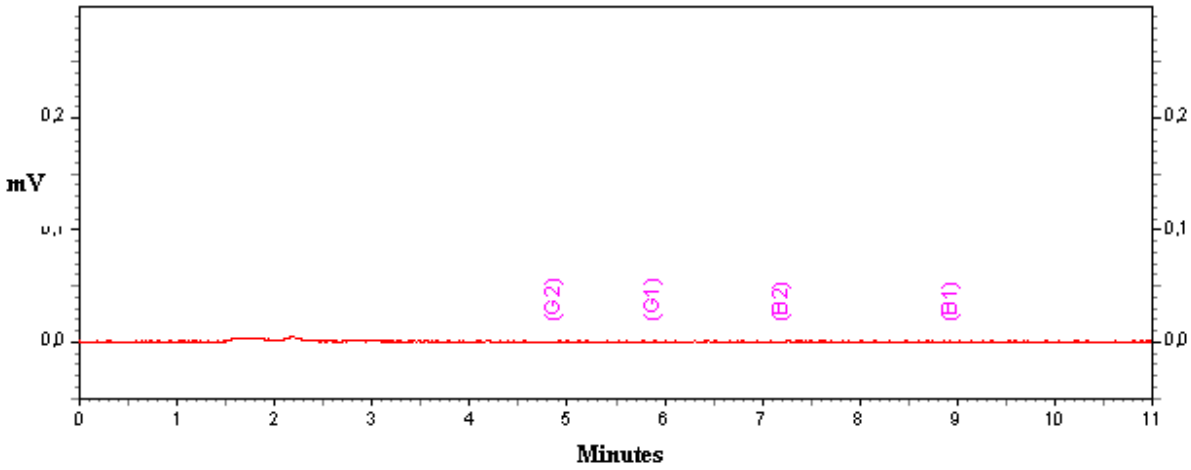
Resim 21; B_1 ve G_1 aflatoksinlerin brom ile türevlenme reaksiyonları



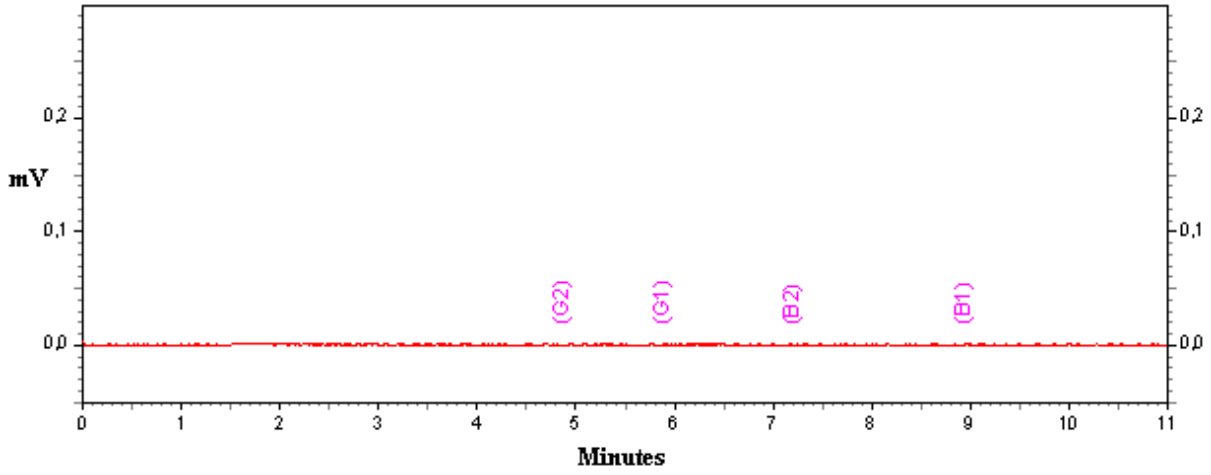
3. SONUÇ

Çalışma kapsamında 10 farklı kaynaktan temin edilerek laboratuara getirilen 171 adet numune iki paralel olarak analiz edildi. Her paralel için HPLC cihazında üç okuma yapıldı. Analiz sonuçlarına göre çalışmada kullanılan 171 adet numunenin hiç birisinde aflatoksin tespit edilmemiştir. 10 farklı gruba ait numunelerden elde edilen tipik kromotogramlar aşağıdaki resimlerde gösterilmiştir. Numunelere ait analiz sonuçları raporun EKLER bölümünde verilmiştir.

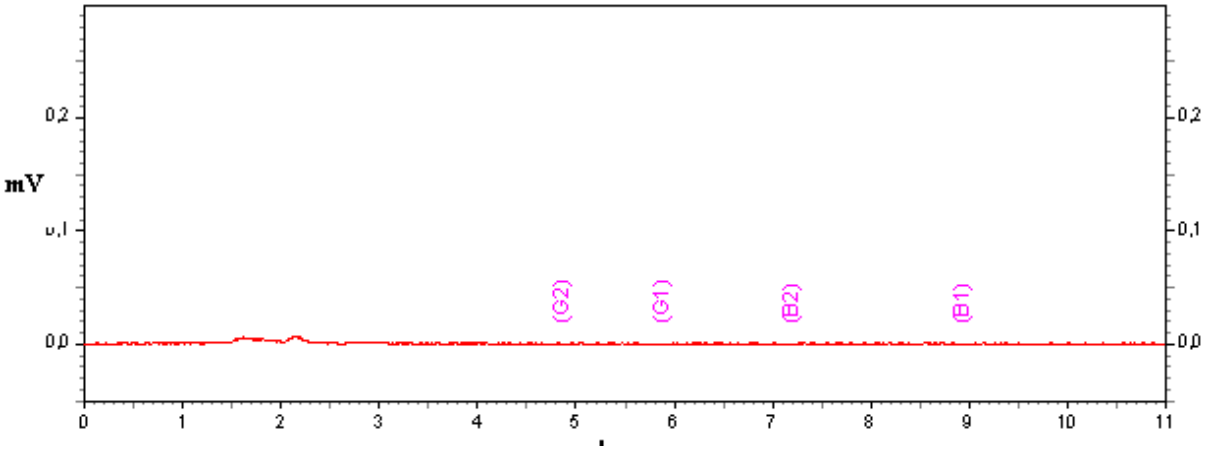
Resim 22; 1976 yılında paketlenmiş ÇAYKUR'a ait ticari çay(Kamelya-teneke kutu) numunesine ait kromotogram



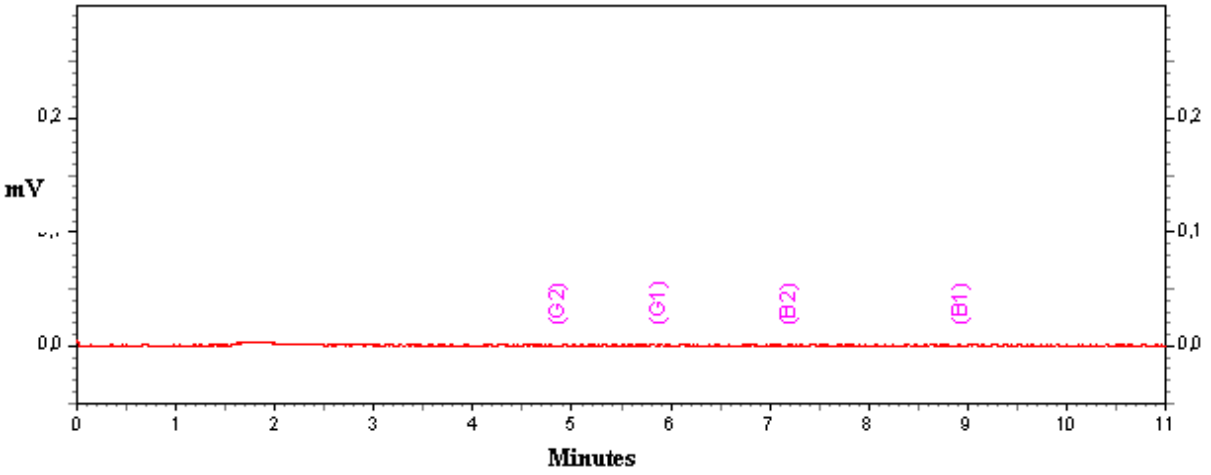
Resim 23; Rize Serbest Bölge'de ele geçirilen kaçak çay ,2000 Yılı , 1. Numune ait kromotogram



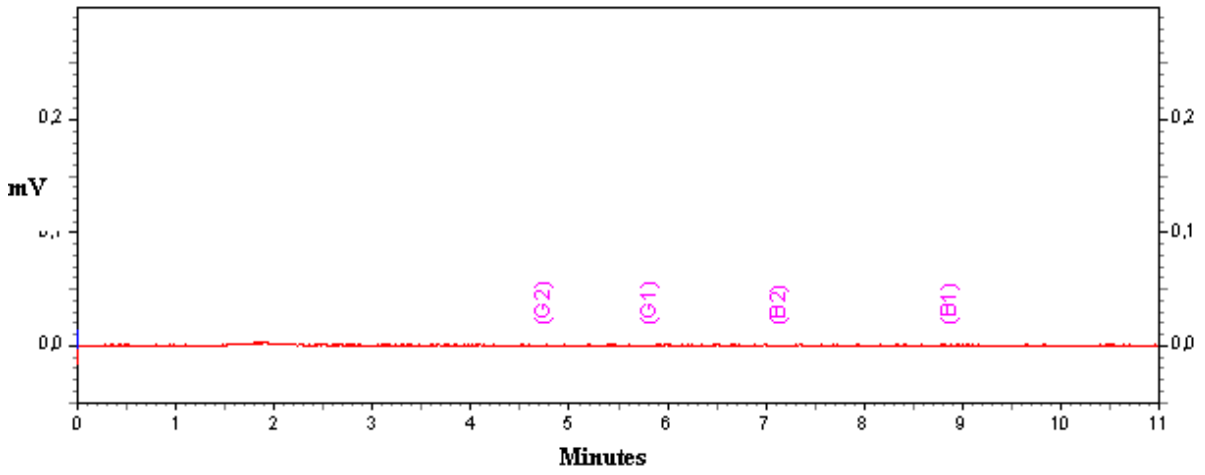
Resim 24; İzmir Pazarlama Bölge Müdürlüğü'nden alınan dökme siyah çay 1. Numuneye ait kromotogram



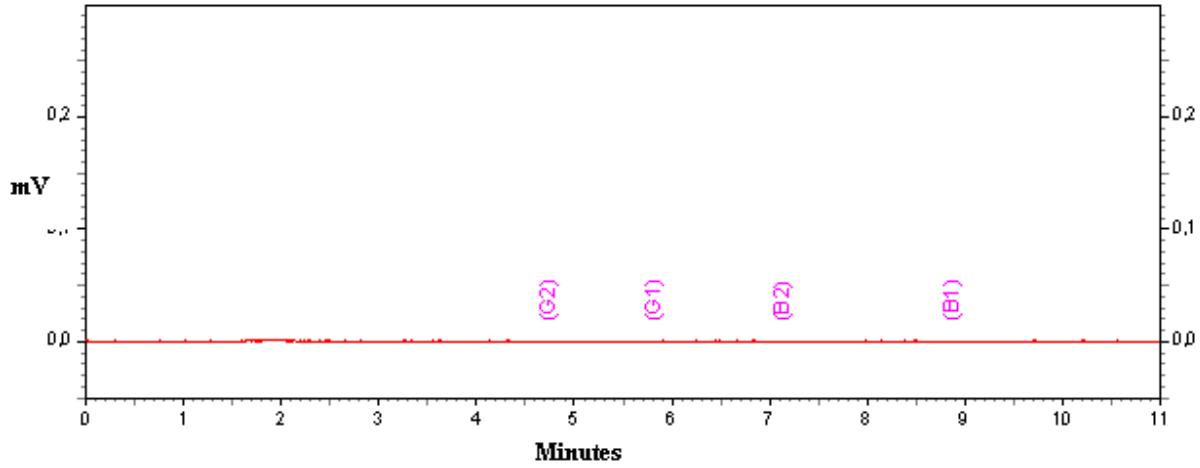
Resim 25; Paketleme için uygun olmayan Çayeli Çay Fabrikası'na ait 2007 Yılı siyah çay numunesine ait kromotogram



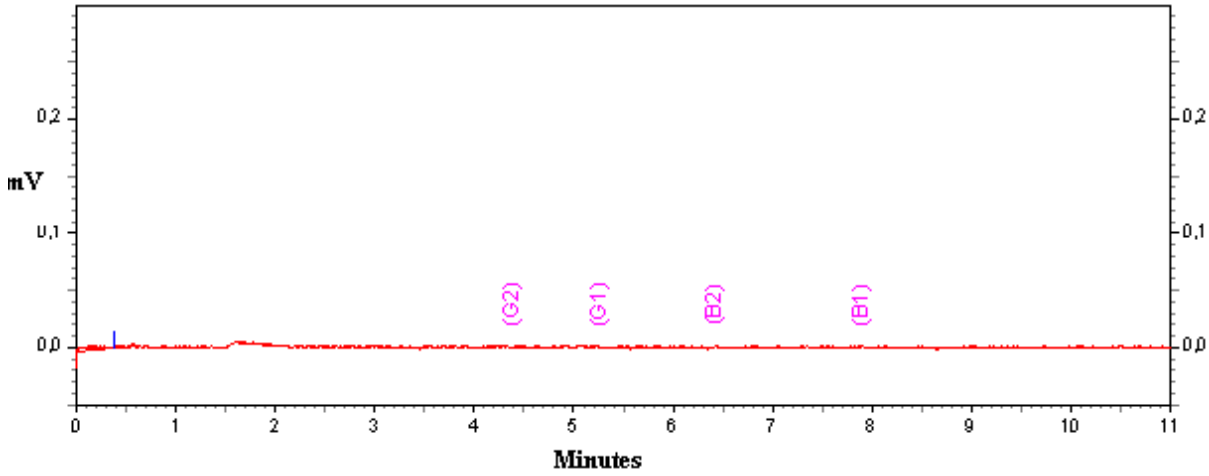
Resim 26; İmalat ünitesinde presli kıvırma makinesinden alınan 1.Numuneye ait kromotogram



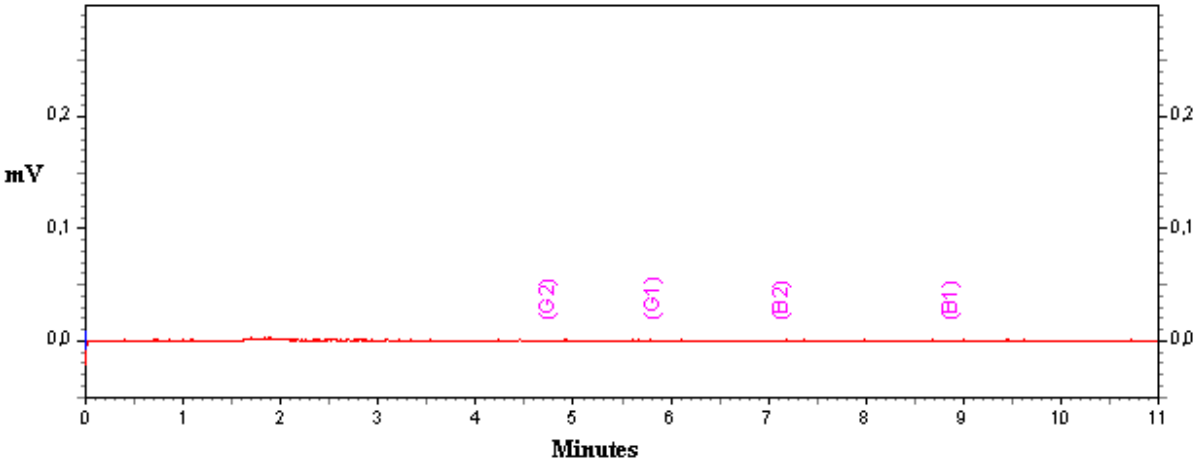
Resim 27; Piyasada satılan açık çay numunesine ait kromotogram



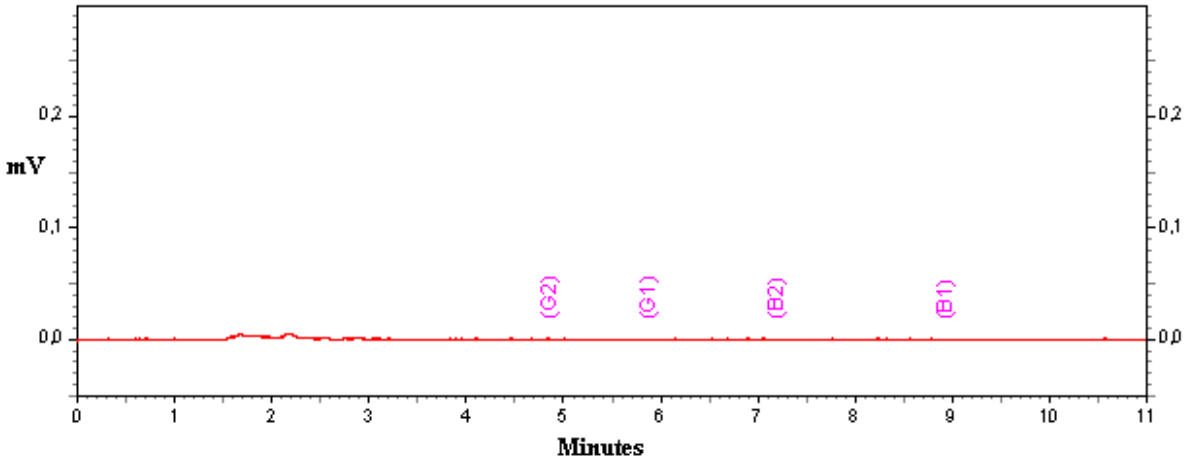
Resim 28; Camidağı Çay Fabrikası 2007 Yılı 2.Sürgün 3.Dönem 5.Nevi çay numunesine ait kromotogram



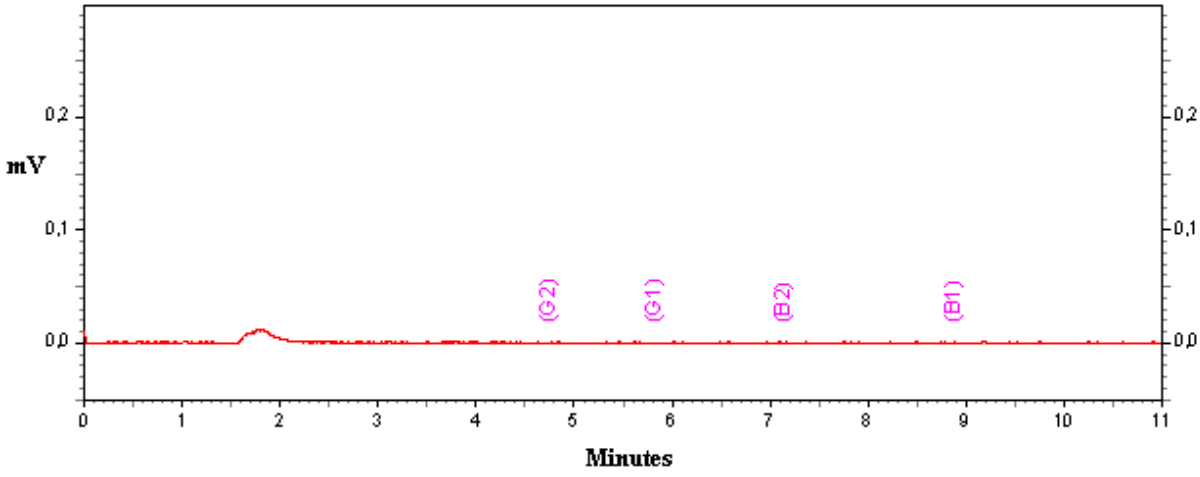
Resim 29; Piyasada satılan ticari çay (Özçay Koop. Organik Siyah Çay) numunesine ait kromotogram



Resim 30; Yarı mamul kuru çay ambarında 2 yıl bekletilen 5.Nevi siyah çay numunesine ait kromotogram



Resim 31; Camidağı Çay Fabrikası'na ait 2006 Yılı üretimi 3.Nevi siyah çay numunesine ait kromotogram



4. TARTIŞMA

Ülkemizde siyah ve yeşil çaylarda aflatoksinlerin bulunup bulunmadığı hakkında yeterli sayıda bilimsel çalışma yapılmadığı raporun özet bölümünde belirtilmişti. Aflatoksin üreten küflerin gelişebilmesi ve toksin üretebilmesi için yeterli şartları sağlayan numunelerin seçilmesine dikkat edilerek yapılan bu çalışma sonucunda hiçbir numunede aflatoksin tespit edilememiştir. Burada iki soru sorulabilir. İlkine göre; analiz için seçilen 171 numune üzerinde aflatoksin tespit edilememesi bir rastlantı sonucunda mı ortaya çıkmıştır? İkinci soru olarak ta; siyah ve yeşil çay ürünlerinde aflatoksin oluşumunu engelleyen veya baskılayan başka unsurlar mı bulunmaktadır?

İlk soruya, analiz için seçilen 171 numunede aflatoksin tespit edilememesi tamamen bir rastlantıdır şeklinde cevap vermek oldukça zor görünmektedir. Çünkü analiz için, özellikle aflatoksin üretimi yapan küflerin gelişmesi için su aktivitesi değeri, süre, sıcaklık, ortamdaki oksijen konsantrasyonu ve diğer şartlar bakımından uygun özelliklere sahip numuneler seçilmiştir. Bu özellikleri taşıyan çay dışındaki incir, kabuklu yemiş, kırmızıbiber, bitkisel çay gibi herhangi bir numune üzerinde aflatoksin gelişmesi ihtimalinin çok yüksek olduğu bu ürünlerde sık sık ortaya çıkan aflatoksin sorunlarının gündeme gelmesi nedeniyle rahatlıkla söylenebilir. Bu durumda; aynı şartlarda bulunan ve küf gelişimi için aynı ortamı oluşturan ürünlerin çoğunluğunda aflatoksin tespit edilebilirken siyah ve yeşil çaylarda tespit edilememesinin nedeninin ikinci sorunun cevabında olduğundan bahsetmek mümkün olmaktadır.

Çalışma kapsamında yapılan literatür araştırmasında görülmüştür ki, çayın yapısında bulunan ve çaya özgü polifenolik bileşikler ile yine çayın yapısında bulunan bazı mineraller aflatoksin oluşumunu baskılayıcı özellik göstermektedirler. Bu konularda oldukça fazla sayıda çalışma yapılmış olup elde edilen veriler bu bilgileri doğrulayıcı sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre epigallokateşin gallat ve diğer önemli fenolik bileşiklerin aflatoksinlerin vücuttaki etkilerini nötralize ettikleri ve bunların olumsuz etkilerini baskıladıkları anlaşılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Dairesinden (USDA) Bruce Campbell ve Jong Kim, yaptıkları çalışma sonucunda çayın yapısında bulunan kafeik asidin aflatoksin oluşumuna neden olan bütün küflerin gelişimini baskıladığını tespit etmişlerdir. Bunun gibi yapılan bir çalışma sonucuna göre çayın yapısında bulunan özellikle fenolik asitler (gallik asit, kafeik asit, salisilik asit, vb.) ürünler üzerinde aflatoksin oluşturan küflerin gelişmesi üzerine herhangi bir etki yapmazken bu küflerin aflatoksin üretmeleri üzerine önemli derecede etki yaptıkları saptanmıştır. Ortama ilave dilen çinko, bakır, kadmiyum, krom ve demir iyonlarının aflatoksin üretimi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, çinko iyonu ilavesi ile aflatoksin üretimi arasında pozitif bir korelasyon oluğu (r=0,325-0,385) tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda ortama mangan, bakır, kadmiyum, krom ve demir iyonları ile bunların belli oranlarda karışımlarının ortama ilave edilmesinin aflatoksin üretimini büyük ölçüde önlediği tespit edilmiştir. Örneğin; Paul B. Marsh, Marıon E. Sımpson, ve Mary W. Trucksess tarafından yapılan bir araştırmada başlangıçtaki toplam aflatoksin üretimi miktarı 27,6 µg iken ortama 1 ppm kadmiyum iyonu ilavesi ile aflatoksin üretimi 2,9 µg'a, 5 ppm ilavesi ile 0,06 µg'a 10 ppm ilavesi ile 0,03µg'a ve 25 ppm ilavesi ile de 0 seviyesine düştüğü saptanmıştır. Aynı çalışmada başlangıçtaki toplam aflatoksin üretimi miktarı 18,0 µg iken ortama 0,5 ppm krom iyonu ilavesi ile aflatoksin üretimi 21,9 µg'a çıkmış, daha sonra 1 ppm ilavesi ile 7,6 µg'a 3 ppm ilavesi ile 4,8 µg'a ve 5 ppm ilavesi ile de 2,7 µg seviyesine düştüğü saptanmıştır. Ortama 10 ppm kadmiyum iyonu ilavesi ile aflatoksin üretimi tekrar 9,0µg seviyesine çıkmıştır.

Ülkemizde üretilen çayların yapılarında bulunan gallik asit, toplam kateşin ve bazı mikro ve makro element miktarları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 18; Çayda yapısında bulunan bazı metal iyonu ve fenolik bileşiklerin miktarları

	Siyah Çay	Yeşil Çay	Yaş Çay	Atık Çay
Gallik Asit (%)	0,11-0,34	0,03 - 0,78	0,04-0,010	0,09-0,10
Toplam Kateşin (%)	0,61-2,13	12,0-13,6	15-22	0,30-0,50
Çinko (ppm)	15-40	15-20	14-20	15-40
Bakır (ppm)	7-10	7-9	8-10	7-10
Demir (ppm)	150-220	140-240	60-150	150-220
Kadmiyum (ppb)	50	5-20	-	50
Krom (ppb)	1013	1012	-	1013

Aflatoksin konusu üzerinde yapmış olduğumuz bu çalışmada kullanılan numunelerin çinko, bakır, kadmiyum, krom ve demir içerikleri ile diğer fenolik bileşik içerikleri incelendiğinde, tespit edilen miktarların bu ürünler üzerinde gelişen aflatoksin üretme yeteneğine sahip küflerin bu toksini üretmelerine engel olacak seviyelerde oldukları saptanmıştır.

5. KAYNAKLAR

- Arda M, Temel Mikrobiyoloji 2. Baskı, Median Limited Şirketi Ankara 2000
- Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. S. 63-70. Ankara
- Aqualab Water Activity Meter Operator's Manual Vesion 3, Decagon Devices, Inc. 10607-03
- Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. Bitkisel çaylarda aflatoksin analizi eğitim notları. Şubat 2006. Ankara
- Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. Mikotoksinler. Çaykur eğitimi notları. Revizyon/Şennur Özkaya. Şubat 2006. Ankara
- AOAC International. Aflatoxin B1 and Total Aflatoxin in Peanut Butter, Pistacho Paste, Fig Paste and Paprika Powder. Immunoaffinity Column Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization. AOAC Official Method 999.07.2006
- Cornelia B.,Dumitrita R.,Veronica S. C.,Oana T.,Ovidiu B.,Ioana N.,Carmen S. Protective action of different natural flavan-3-ols against aflatoxin B_1-related cytotoxicity. Journal of Food BiochemistryVolume 34, Issue 3, pages 595–610, June 2010
- Certel, M., Ertugay, M.F. 1996. Gıdalarda Su Aktivitesinin Kontrol ve Belirleme Yöntemleri – 2
- E. Olatunde Farombi. Aflatoxin contamination of foods in developingcountries: Implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategiesAfrican Journal of Biotechnology Vol. 5 (1), pp. 001-014, 2 January 2006
- Elden Taydaş E. Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri. KKGM Gıda Kontrol Hizmetleri Daire Başkanlığı. Ankara
- EN Official Journal of the European Union. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006. 2006
- EN Official Journal of the European Union. amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. COMMISSION REGULATION (EU) No 165/2010 .2010
- http://en.wikipedia.org/wiki/fungus
- http://www.naturalpedia.com/Aflatoxin-3.html
- http://www.nutraingredients.com/Research/The-green-tea-treatment
- http://www.nutraingredients-usa.com/Research/Gains-in-green-tea-research
- http://www.fuelingtactics.com/NOPI/2006/20061010.htm
- http://www.vienna-doctor.com/ENG/Articles_ENG/green_tea_treatment.html
- http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/Epigallocatechingallate.pdf
- http://www.springerlink.com/content/b23whk7x026374kh/
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/238471
- http://www.idosi.org/aejaes/jaes4(2)/1.pdf
- http://walnutresearch.ucdavis.edu/2003/2003_407.pdf
- http://wageningenacademic.metapress.com/content/h52535601313081n/
- www.tuksiad.org/calisma/diger/aflatoksin.doc
- http://ec.europa.eu/food/fs/inspections/fnaoi/reports/contaminants/turkey/fnaoi_rep_turk_9105-2003cm_tr.pdf
- http://www.musan.com.tr/pepper/aflatoksin.html

- http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-2010.pdf
- http://billpattersonshata.com/GT_Hep.htm
- http://business.highbeam.com/437101/article-1G1-154328970/caffeic-acid-curbs-fungal-aflatoxin-production
- http://tarimkutuphanesi.com/Sutte_gorunmez_tehlike:_AFLATOKSIN_M1__Mucahit_KALKAN_Ziraat_Muhendisi_01587.html
- http://www.romerlabs.com/en/products/columns.html#c756
- K Enes, Gıdaların Hazırlanmasında Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kullanım Alanları. Yüksek Lisans Tezi, Mersin üniversitesi Mühenddislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin, 2002
- Kagaya, N., Tagawa, Y., Nagashima,H., Saijo, R., Kawase, M. and Yagi, K. Suppression of cytotoxininducedcell death in isolated hepatocytesby tea catechins. European Journal of Pharmacology, 450**:** 231–236. 2002.
- Karaoğlu Ş., A. 2002. Kuru Çayda Bakteriyolojik ve Mikolojik Kontaminasyonun Araştırılması. Rize
- Martins ML., Martins HM., Bernardo F.Fumonisin B1 and B2 in black tea and medicinal plants. Laboratoria Nacional Investigacao Veterinaria. Estrada de Benfica,Lisboa, Portugal.PMID:11510675
- Peraica M, Radic B, Ludc A, Pavlovic M. Toxic Effects Mycotoxins in. Human, Builetin of the Health Organization,1999,77(9):754-766.
- R-BiopharmRhone Ltd. Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxins. Aflaprep Ifu(P07V14).doc.16.04.2003
- R. Bunkova, I. Marova and M. Nemec, Antimutagenic Properties of Green Tea, Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum), Volume 60, Number 1, 25-29, DOI: 10.1007/s11130-005-2539-7
- Sugisawa A, Umegaki K. Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. Department of Food Science Research for Health, National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, 162-8636, Japan.
- Tarım Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Seviyelerinin Resmi Kontrolleri İçin Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği. Tebliğ No 2002/25. R.Gazete 25.03.2002/24706. Ankara
- Tayfur M. Besinlerdeki Küfler ve Mikotoksinler, Beslenme ve Diyet Dergisi, I993, 22(1): 101-108.
- Tayfur M, Mikotoksinler ve Önemi, Standart, Temmuz 1996, say- fa 87-90.
- Thermo Scientific. Analysis of aflatoxins using fluorescence detection. Application note:381
- Türk Standartları Enstitüsü. Gıda maddeleri- Hububatlarda, kabuklu meyvelerde ve türetilmiş ürünlerde aflatoksin B1 ile aflatoksin B1, B2, G1, ve G2 toplamlarının artkolon türevlendirmeli ve immınoaffinite ile kolondan geri almalı yüksek performanslı sıvı kromotografisi yöntemi. TS EN 12955. Mart 2003. Ankara
- Yoshiaki Ito and Mitsuo Ito, Suppressive Effect of (–)-Epigallocatechin Gallate on Aflatoxin B1-induced Chromosome Aberrationsin Rat Bone Marrow Cells, Journal of Health Science, 47(3)248-257(2001)

EKLER

EK 1; Yarı mamul kuru çay ambarında 2 yıl bekletilen 5.Nevi siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 2; 1976 yılında paketlenmiş ÇAYKUR'a ait ticari çay(Kamelya-teneke kutu) numunesine ait analiz raporu

EK 3; Rize Serbest Bölge'de ele geçirilen kaçak çaydan (2000 Yılı) alınan , 1. Numuneye ait analiz raporu

EK 4; İzmir Pazarlama Bölge Müdürlüğü'nden alınan dökme siyah çay 1. numuneye ait analiz raporu

EK 5; İzmir Pazarlama Bölge Müdürlüğü'nden alınan 2004 yılı dökme siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 6; Paketleme için uygun olmayan Çayeli Çay Fabrikası'na ait 2007 Yılı 5. Nevi siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 7; Piyasada satılan açık çay numunesine ait analiz raporu

EK 8; Camidağı Çay Fabrikası 2007 Yılı 2.Sürgün 3.Dönem 5.Nevi siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 9; Piyasada satılan ticari çay (Özçay Koop. Organik Siyah Çay) numunesine ait analiz raporu

EK 10; Camidağı Çay Fabrikası'na ait 2006 Yılı üretimi 3.Nevi siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 11; Paketleme için uygun olmayan Bölümlü Çay Fabrikası'na ait 2007 Yılı üretimi küflü 5. Nevi siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 12; Pazar Çay Fabrikası 2008 Yılı 3.Sürgün 2.Dönem 5.Nevi siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 13; Siyah çay işleme bandı düz kıvırma ünitesi 2. bant bölümünden alınan imalat kalıntısı numunesine ait analiz raporu

EK 14; Paketleme için uygun olmayan Sabuncular Çay Fabrikası'na ait 5. Nevi ıslak siyah çay numunesine ait analiz raporu

EK 15; Yarı mamul kuru çay ambarında 2 yıl bekletilen Antik Yeşil-2 yeşil çay numunesine ait analiz raporu