

BESİNLERDE BULUNAN BAZI MİKOTOKSİNLERİN  
BİYOSENTEZİ, ANALİZİ, ORGANİZMALAR  
ÜZERİNE ETKİLERİ VE KONTROL YÖNTEMLERİ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri  
Enstitüsü Lisansüstü Yönetmeliği  
Uyarınca Biyoloji Anabilim Dalı Genel  
Biyoloji Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Anadolu Üniversitesi  
Merkez Kütüphane

BESİNLERDE BULUNAN BAZI MİKOTOKSİNLERİN  
BİYOSENTEZİ, ANALİZİ, ORGANİZMALAR  
ÜZERİNE ETKİLERİ VE KONTROL YÖNTEMLERİ

Münir TUNCER

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Genel Biyoloji Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç.Dr.Merih KIVANÇ

Haziran-1992

Münir TUNCER'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Besinlerde Bulunan Bazı Mikotoksinlerin Biyosentezi, Analizi, Organizmalar Üzerine Etkileri ve Kontrol Yöntemleri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye : Doç.Dr.Merih KIVANÇ

Üye : Doç.Dr.Abdurrahman Üsame TAMER

Üye : Doç.Dr.Ahmet ÖZATA

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .....  
03. HAZİRAN 1992 gün ve 315-4 ..... sayılı kararıyla  
onaylanmıştır.

Prof.Dr.Rüstem KAYA

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bu çalışmada, bazı küf mantarları ile kontamine olmuş besinlerin kullanım amaçları göz önünde tutularak; aflatoksinler, okratoksinler, sitrinin ve patulinin biyosentezi, izolasyonu, canlılar üzerine etkileri ve kontrol yöntemleri incelenmiştir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalar aflatoksinler üzerinde yoğunluk kazanmaktadır. Bu nedenle aflatoksinler hakkında edinilen bilgiler diğer mikotoksinlere oranla daha kapsamlıdır. Diğer mikotoksinler hakkında da detaylı bilgilerin elde edilebilmesi için bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle ülkemizde küflü yiyeceklerle beslenme ve besleme alışkanlığını ortadan kaldırmak, ancak bu mikotoksinlerin zararlarının belirlenmesi ile olacaktır. Bu da bu konuda yapılacak çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## SUMMARY

In this study, the biosyntheses methods of control and isolations of the aflatoxins, ochratoxins, citrinin and patulin produced by mould and ochratoxins the effect of food contaminated with some mould on human beings are reviewed.

Most of the studies so far focused on the aflatoxins. That is why the information on the aflatoxins is more and broader than those of other mycotoxins. More research is needed to obtain more detailed information about other mycotoxins. Especially for our country, it is necessary to reveal the harm of mycotoxins in order to eliminate the habit of eating moulded food. That makes the studies on the mycotoxins are necessary to draw attention to the problem.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesi sırasında değerli uyarı ve yardımlarını esirgemeyen, sabırlı ve değerli hocam Sayın Doç.Dr.**Merih KIVANÇ**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı yakından izleyen ve bana yol gösteren değerli Bölüm Başkanımız Sayın Doç.Dr. **Süleyman TOKUR**'a teşekkürü zevkli bir görev sayıyorum.

Bütün çalışmalarım boyunca her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında bir an bile beni yalnız bırakmayan eşim **Meral TUNCER**'e teşekkür ederim.

**Münir TUNCER**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. BAZI BESİN VE YEM MADDELERİ ÜZERİNDE YAPILAN MİKOTOKSİN ÇALIŞMALARI .....	17
3. MİKOTOKSİNLERİN BİYOSENTEZİ .....	25
3.1. Aflatoksinlerin Biyosentezi .....	25
3.2. Okratoksinlerin Biyosentezi .....	28
3.3. Sitrinin Biyosentezi .....	29
3.4. Patulin Biyosentezi .....	32
4. MİKOTOKSİNLERİN BİYOSENTEZİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER	34
4.1. Biyolojik Faktörler .....	34
4.1.1. Suş özelliği .....	34
4.1.2. Ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet .....	36
4.2. Kimyasal Faktörler .....	37
4.2.1. Substrat .....	37
4.2.2. Besin maddeleri .....	40
4.2.3. Antifungal amiller .....	42
4.3. Çevresel Faktörler .....	43
4.3.1. Sıcaklık .....	43
4.3.2. Su aktivitesi .....	45
4.3.3. Atmosferik gazlar .....	47
4.3.4. pH .....	48
4.3.5. Işık .....	48

## İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
5. MİKOTOKSİNLERİN ETKİLERİ .....	50
5.1. Biyokimyasal Etkileri .....	50
5.1.1. Enerji metabolizmasına etkileri .....	50
5.1.2. Karbohidrat ve lipid metabolizmasına etkileri .....	51
5.1.3. Nukleik asit (DNA ve RNA) ve protein sentezine etkileri .....	52
5.2. Biyolojik Etkileri .....	56
5.2.1. Kanserojenik etkileri .....	56
5.2.2. Mutajenik etkileri .....	58
5.2.3. Teratojenik etkileri .....	59
5.2.4. Hepatotoksik etkileri .....	59
5.2.5. Toksik etkileri .....	61
6. MİKOTOKSİNLERİN TAYİN YÖNTEMLERİ .....	65
6.1. Örneklemeye .....	65
6.2. Numunenin Ekstraksiyonu .....	67
6.2.1. CB metodu .....	68
6.2.2. BF metodu .....	69
6.3. Ekstraktın Temizlenmesi .....	70
6.4. Ayırma .....	72
6.4.1. Fizikokimyasal metotlar .....	72
6.4.1.1. Kromotografik yöntemler .....	72
-İnce tabaka kromatografisi .....	72
-Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi.....	74
-Gaz-sıvı kromatografisi ...	75
6.4.2. Hızlı metotlar .....	75
6.4.2.1. Parlak yeşil-sarı floresans testi .....	75
6.4.2.2. Mini kolon kromatografisi .....	76
6.4.3. Aletli metotlar .....	77
6.4.3.1. Florodansimetre .....	77
6.4.3.2. Spektrofotometre .....	78
6.4.4. Biyolojik metotlar .....	78
6.4.4.1. Hücre ve doku kültürü testi .....	78
6.4.4.2. Cıvcıv embriyo testi .....	79
6.4.4.3. Larva testi .....	80
6.4.4.4. Ördek yavruları testi .....	80
6.4.4.5. Mikroorganizma testleri .....	81



## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
6.4.5. İmmuno-kimyasal metotlar .....	83
6.4.5.1. Radioimmunoassay (RIA) .....	83
6.4.5.2. Enzim bağılı immuno sorbant assay (ELISA) .....	84
7. <sup>BN</sup> MİKOTOKSİNLERİN KONTROLÜ .....	86
7.1. Küf Gelişmesinin ve Kontaminasyonunun Önlenmesi .....	86
7.1.1. Çiftlik koşullarının iyileştirilmesi	86
7.1.2. Antifungal amiller .....	87
7.1.3. Genetik mühendisliği .....	88
7.1.4. Depolama koşullarının kontrolü .....	88
7.1.4.1. Nem .....	89
7.1.4.2. Sıcaklık .....	90
7.1.4.3. Gaz atmosferi .....	90
7.2. Toksik Ürünlerin Detoksifikasyonu .....	91
7.2.1. Fiziksel ayrıştırma .....	92
7.2.1.1. Solvent ile parçalama .....	92
7.2.1.2. Isı ile inaktivasyon .....	93
7.2.1.3. Işınlama .....	94
7.2.1.4. Adsorbsiyon .....	94
7.2.2. Kimyasal detoksifikasyon .....	95
7.2.2.1. Amonyaklama .....	95
7.2.2.2. Kükürt dioksit .....	95
7.2.3. Biyolojik değişim .....	96
8. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	97
9. KAYNAKLAR DİZİNİ .....	99

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Aflatoksinler ve kimyasal formülleri .....	7
1.2. Okratoksinlerin kimyasal yapısı .....	9
1.3. Sitrinin ve ilgili bileşiklerin kimyasal yapıları .....	10
1.4. Beş üyeli toksik laktonların kimyasal formülleri .....	11
3.1. Aflatoksin B <sub>1</sub> biyosentezi .....	26
3.2. Okratoksin A'nın biyosentezi .....	30
3.3. (C <sup>14</sup> )-asetattan sitrinin biyosentezi .....	31
3.4. Asetat metioninden sitrinin biyosentezi .....	32
3.5. Patulin biyosentezi .....	33
7.1. Aflatoksin D <sub>1</sub> 'in kimyasal yapısı .....	95

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
1.1.	Gıda maddeleri üzerinde gelişen küfler tarafından oluşturulan bazı mikotoksinler ve etkileri .....	3
1.2.	Çeşitli ülkelerde aflatoksin kontrolü .....	14
2.1.	Ege Bölgesi tarım ürünlerinde rastlanan to toksin oluşturan küfleri içeren ürünlerin yıllara göre dağılımı .....	18
6.1.	Örneklendirme yaparken alınabilecek minimum örnek miktarı .....	66

## GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>		<u>Sayfa</u>
1.1.	Mikotoksin araştırma periyotları .....	5

## 1. GİRİŞ

Günlük yaşantımızda sık görülen ve hemen her çeşit gıda maddesinde üreyebilen küfler, son yıllarda üzerinde önemle durulan güncel bir araştırma konusu olmuştur. İnsanlar tarafından tüketilen tarım ürünlerinde oluşan kayıpların büyük bir kısmına küfler neden olmaktadır. Çevre koşulları uygun olduğu takdirde, bu mikroorganizmalar her türlü tarım ürünü üzerinde gelişebilmektedir (Rambo et al., 1974; Esentepe ve ark., 1977; Atlı ve Köşker, 1980; Kıvanç, 1992). Bu nedenle bütün ürünler, geliştirilmeye başlandıkları andan tüketilinceye kadar geçen her basamakta, küfler ile bulaşma tehlikesi ile karşı karşıyadırlar.

Yakın zamanlara kadar, çeşitli ürünlerde oluşan bu bozulmalara karşı duyulan ilginin temelinde ekonomik kayıplar yer almakta ve çalışmaların çoğu beslenme değerindeki düşmeler, çimlenme yeteneğinin yitirilmesi gibi konuları kapsamıştır. Üzerinde küf gelişmesi görülen ürünlerin hayvan yemi olarak kullanılmasında bir sakınca görülmemiş ve bu mikroorganizmaların gelişme süreçleri içinde ürünlerde oluşturdukları metabolitlerle ilgilenilmemiştir. Küflü yemleri yiyen hayvanlardaki ölümler ise çok az sayıda araştırmacının dikkatini çekmiştir (Denizel, 1986).

Mikroorganizmalar gelişmeleri sırasında iki tip bileşik üretmektedirler. Bunlardan bir grubu hücrenin yapısına giren bileşiklerdir. Diğer grubu ise sekonder metabolizma ürünleri olup, hücre fonksiyonunu yerine getirmeleri için belirgin bir görevleri yoktur. Mikotoksinler bu ikinci grup içinde yer alırlar (Betina, 1989).

350 tür küf mantarının, 300'ün üzerinde mikotoksin oluşturulduğu bilinmektedir. Türler içinde varyasyonların olduğu da düşünülürse, 10.000 civarında mikotoksin üreticisi olan küf olduğu tahmin edilmektedir (Peterson, 1986).

Mikotoksinler, değişik küf türlerinin salgıladıkları toksik sekonder metabolik ürünler olup, kimyasal yapı bakımından oldukça farklılık gösterirler. Bu küf metabolitlerinin insan ve hayvanlarda neden olduğu patolojik veya fizyolojik bozukluklara mikotoksikozis adı verilir. Mikotoksikozise neden olan küfler ve ürettiği oldukları toksinler ile etki şekilleri Çizelge 1.1'de görülmektedir.

19. yüzyılda Japonya'da sarı pirinç toksikozisine küflerin neden olduğu (Ciegler et al., 1971), Amerika'da ise pekçok çiftlik hayvanının ölümüne, yedikleri küflü hububatların yol açtığı bilinmekte idiye de (Christensen, 1965); bu konudaki kapsamlı çalışmalar 1960 yılından sonra hız kazanmıştır.

1960 yılında İngiltere'de rasyonlarında yer fıstığı küspesi bulunan 100.000'den fazla hindi, birkaç ay içinde ölmüş ve sebebi bilinmediği için bu hastalığa "hindi X hastalığı" (turkey X disease) denilmiştir. Yine bu tarihlerde İngiltere'de 14.000 ördek, 5.000 sülün yavrusunun ve Doğu Afrika'nın bazı çiftliklerinde de ördek yavrularının aynı hastalık belirtileri ile öldükleri bildirilmiştir (Goldblatt, 1965; 1971).

Bu olaylar üzerine çok yoğun araştırmalar yapılmış ve nedeni bilinmeyen bu hastalığın, hayvan yemlerinde bulunan Aspergillus flavus tarafından oluşturulan bir mikotoksinden ileri geldiği anlaşılmıştır (Nagarajan, 1973).

Toksisiteye neden olan fungusun A.flavus olduğu teşhis edildikten sonra, toksin üretim kaynağına bağlı olarak "AFLATOKSİN" adını, Aspergillus'un taksonomik kısaltması (A) ve flavusun (fla) speciesinden almıştır. Diğer

Çizelge 1.1. Gıda maddeleri üzerinde gelişen küfler tarafından oluşturulan bazı mikotoksinler ve etkileri (MOSSEL, 1977).

<u>Mikotoksin</u>	<u>Küf Mantarı</u>	<u>Toksik Etki</u>
<del>Aflatoksin</del>	A.flavus A.parasiticus	Kanserogen, mutagen,teratogen
Citreoviridin	Penicillium citreoviride	Motor sinir hücreleri ile interaksiyon
<del>Citrinin</del>	P.citrinum, P.viridicatum A.terreus A.candidus	Nefrotoksik
Cyclopiazonic	P.cyclopium	Kanserogen
Cytochalasius	Phoma Helminthosporium	Kontraktil mikrofilamentlerde bozulma
Acetoxycirpenol	Fusarium roseum	Bağırsakta kanama lumunolojik tepkilerin kaybı
Imodin	Aspergillus mentii ve diğer birçok küf mantarı	İshal yapıcı
Fumitremorgen	A.piscarum Penicillium	Tremorganik
Fusarenou	Insarium nivale	Protein sentezi engelleiyici
Kojik asit	A.flavus ve diğer birçok Aspergillus ve Penicillium türleri	Titreme, sarsılma nöbetleri

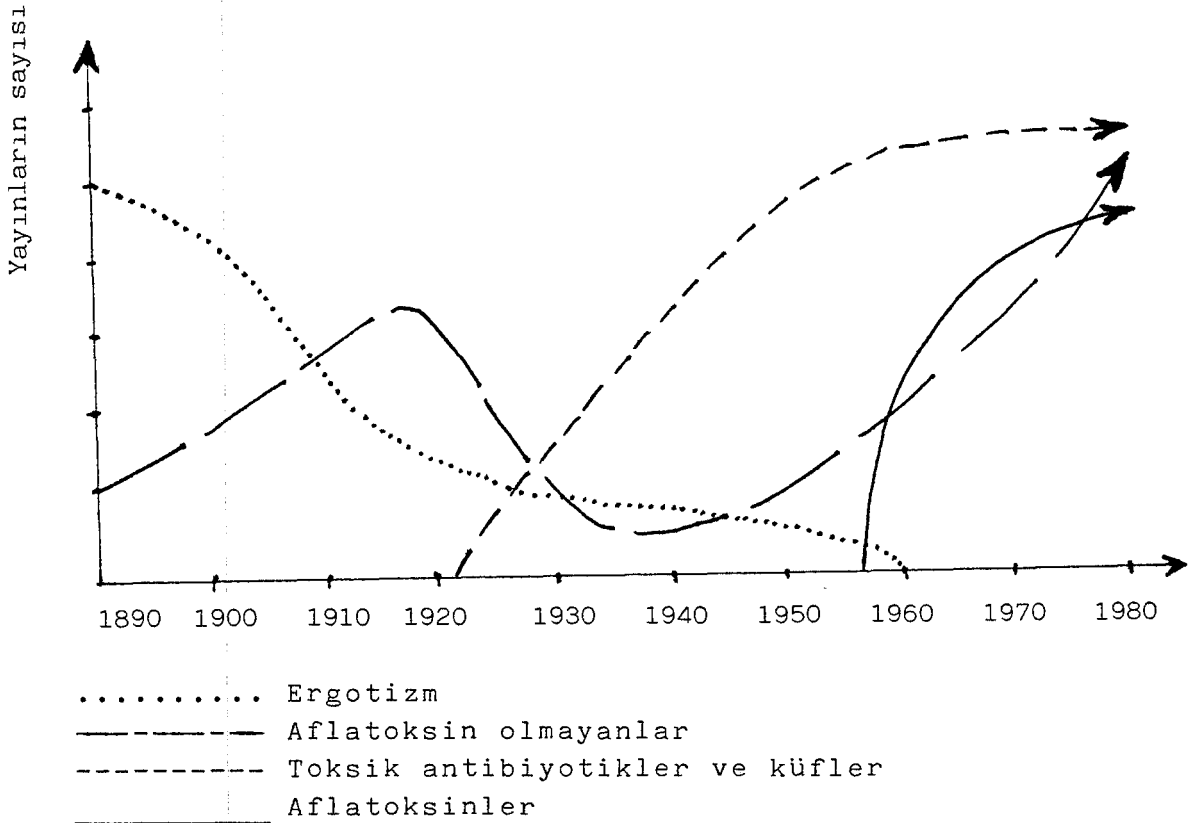
## Çizelge 1.1.(Devamı)

<u>Mikotoksin</u>	<u>Küf Mantarı</u>	<u>Toksik Etki</u>
Luteoskyrin	Penicillium islan- dicum	Kanserogen
<del>Moniliformin</del>	Fusarium moniliform	Mesenterik ödem
<del>Ochratoksin</del>	A.ochraceus P.viridicatum	Nefrotoksik
<del>Patulin</del>	Penicillium ve Aspergillus türler, Pyssochlamysnivea	Kanserogen teratogen
P.R.Toksin	Penicillium roquiforti	Nefrotoksik
Patulin	Penicillium ve Aspergillus türler, Byssochlamysnivea	Kanserogen teratogen
P.R.Toksin	Penicillium roqueforti	Nefrotoksik
Penitrem	P.crustosua P.palitan P.cyclopium	Tremorgenik
Roquefortine	P.roguaforti	Nörotoksik ✓
Rubratoksin	P.rubrum, P.purpuragenum	Hemorojik ✓
Rugulosin	p.rugulosum	Kanserogen ✓
Solaniol	Fusarium solani	Nörotoksik ✓
Stachybotriyotoksin	Stachybotrys atra	Dolaşım bozukluğu ve dermatik etki- ler
Sterigmatocystin	A.versicolor	Kanserogen
T.Z.toksin	Fusarium türleri	Deri iritasyonu, kusma, protein sentezini engel- leyici
Verruculogen	P.vedducumosum, P.piscarum	Tremorgenik
Vomitoksin	Pusarium türleri	Kusturucu
<del>Zearalenone</del>	Pusarium roseum	Steroid hormon sistemlerini en- gelleleyici

toksinler de benzer şekilde kendilerini üreten mikroorganizmaların isimlerini taşıyacak şekilde isimlendirilmişlerdir (Sergeant et al., 1961).

Aynı yıllarda Amerika'da alabalık çiftliklerinde, aflatoksinin büyük kayıplara neden olduğunun anlaşılması ve zehirlenmeden civciv, yarka, ördek yavrusu, buzağı gibi diğer hayvanların da etkilendiğinin görülmesi sonucunda, mikotoksinler 20.yüzyılın en popüler araştırma sahalarından biri haline gelmiştir. Grafik 1.1'de son yüzyılda mikotoksinler ile ilgili yayınların yoğunluğu görülmektedir.

Grafik 1.1. Mikotoksin araştırma periyotları (Yurtyeri, 1979).





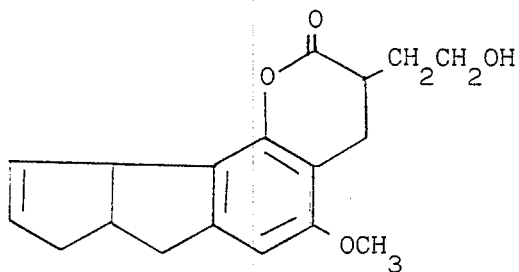
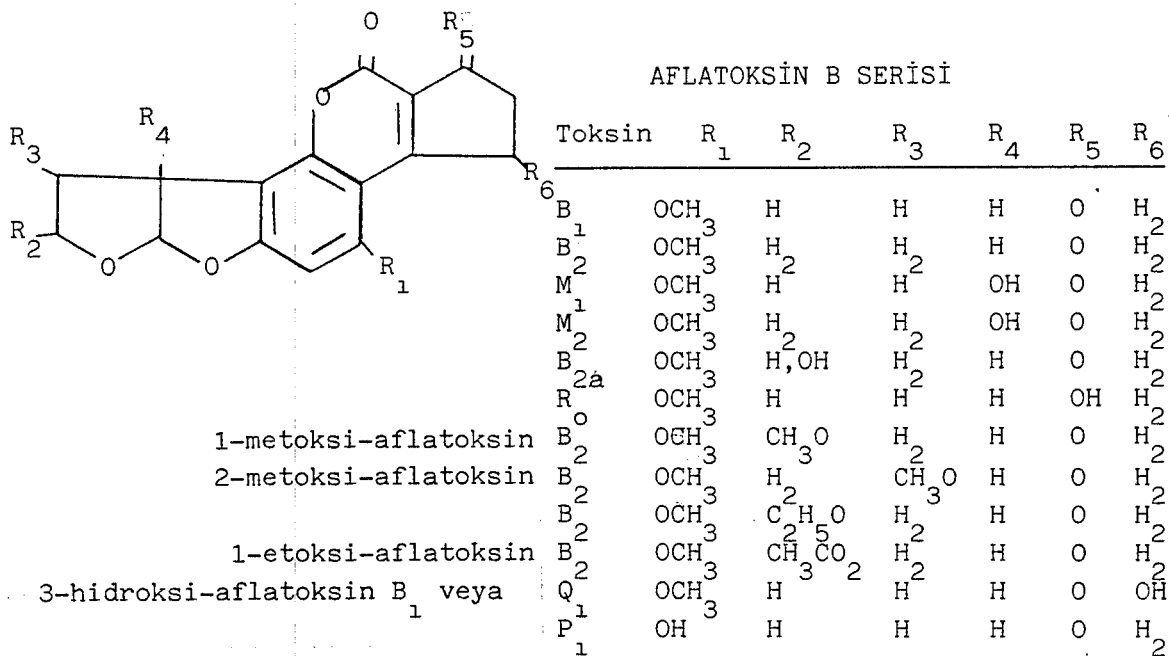
Türkiye'de ise bu konudaki ilk çalışmalar, 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen 10 ton iç fıındığın "aflatoksinli" olduğu gerekçesi ile iade edilmesi üzerine başlamıştır. 1971 yılında A.B.D.'ne sattığımız 45 parti antep fııstığının 36 partisi de aynı nedenle geriye çevrilmiştir. 1972 yılında Danimarka'ya ihraç edilen kuru incirlerde, 938 mg/kg gibi yüksek düzeyde aflatoksin bulunduğu saptanmıştır. 1973-1974 yıllarında A.B.D.'ne gönderilen 38 parti kuru incirden 3 partisi aflatoksin ihtiva ettiği için geri gönderilmiştir (Anonymous, 1974).

Daha sonraki dönemlerde fıındık, antep fııstığı, buğday, un, mısır, incir, süt, peynir, et ve et ürünleri gibi bazı gıdalar üzerinde de mikotoksin çalışmaları yapılmıştır.

Gıda maddelerinin yanı sıra yemlerde de mikotoksinlerin bulunması büyük önem taşımaktadır. Çünkü, yemle birlikte alınan mikotoksin, hayvanın vücudunda biyotransformasyona uğratılarak süt, idrar vb.salgılarıyla dışarı atıldığı saptanmıştır (Masri et al., 1969).

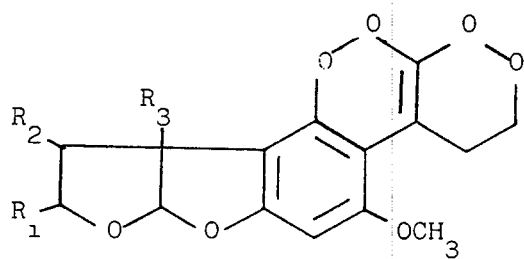
Süt hayvanlarında yemlerle vücuda alınan aflatoksinlerin, karaciğerde biyotransformasyona uğratıldıktan sonra aflatoksin M<sub>1</sub>'in meydana geldiği bildirilmiştir. Aflatoksin M<sub>1</sub>'in, aflatoksin B<sub>1</sub> ile hemen hemen aynı toksik ve kanserojenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Holzalpfel et al., 1966).

Kumanin türevi olan ve difuranokumarinler adı ile bilinen aflatoksinlerin (Şekil 1.1) Aspergillus, Penicillium ve bazı Rhizophus türü mantarlar tarafından sentezlendiği saptanmıştır (Arda, 1979).



PARASİTİKOL  
(Aflatoksin B<sub>3</sub>)

AFLATOKSİN G SERİSİ



1-etoksi-aflatoksin

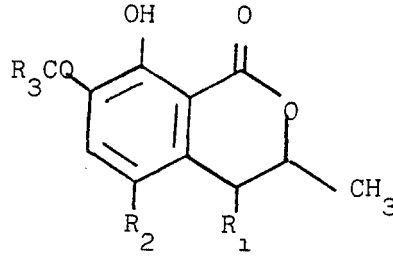
Toksin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
G <sup>1</sup>	H	H	H
G <sub>2</sub> <sup>1</sup>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H
G <sub>2</sub> <sup>2</sup>	OH	H <sub>2</sub>	H
GM <sub>2</sub> <sup>1</sup>	H	H <sup>2</sup>	OH
G <sub>2</sub> <sup>1</sup>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	H <sub>2</sub>	H

Şekil 1.1. Aflatoksinler ve kimyasal formülleri  
(Betina, 1989)

Toksik, kanserojen, mutajen ve teratojen etkiye sahip olan mikotoksinler içerisinde en etkili olanı aflatoksin B<sub>1</sub> dir. Aflatoksin B<sub>1</sub>, A.flavus ve A.parasiticus'un sekonder metabolitidir. Fakat A.flavus'un bütün suşlarının aflatoksin üretmediği bildirilmiştir (Lee et al., 1981).

İlk kez 1960 yılında İnce Tabaka Kromatografi (TLC) ile izole edilen aflatoksinlerin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> olarak adlandırılan dört varyasyonunun olduğu anlaşılmıştır. B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>'in dihidro türevidir. U.V.ışık altında (360 nm) B serisi mavi, G serisi yeşil floresans lekeler oluşturmaktadır (Diener and Davis, 1969).

Güney Afrika'da tahıllar ve baklagillerden izole edilen funguslarının toksisitesi araştırılırken okratoksinler bulunmuştur (Scott, 1965). Aspergillus ochraceus ile buluşturulmuş mısır, deney hayvanlarının ölümüne neden olmuştur. A.ochraceus'un klor içeren metaboliti okratoksin A, daha az toksik olan okratoksin B ile birlikte izole edilmiştir. Okratoksin grubu (Şekil 1.2), okratoksin A ve metil, etil esterleri; okratoksin B ve metil, etil esterleri; okratoksin C, 4-hidroksiokratoksin A ve okratoksin ' dan meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra P.vinidicatum'dan, okratoksin, A,B,4-hidroksiokratoksin A ve 8-karboksi-3,4,-dihidro-9-hidroksi-3-metilisokumarin izole edilmiştir (Hutchinson et al., 1971).



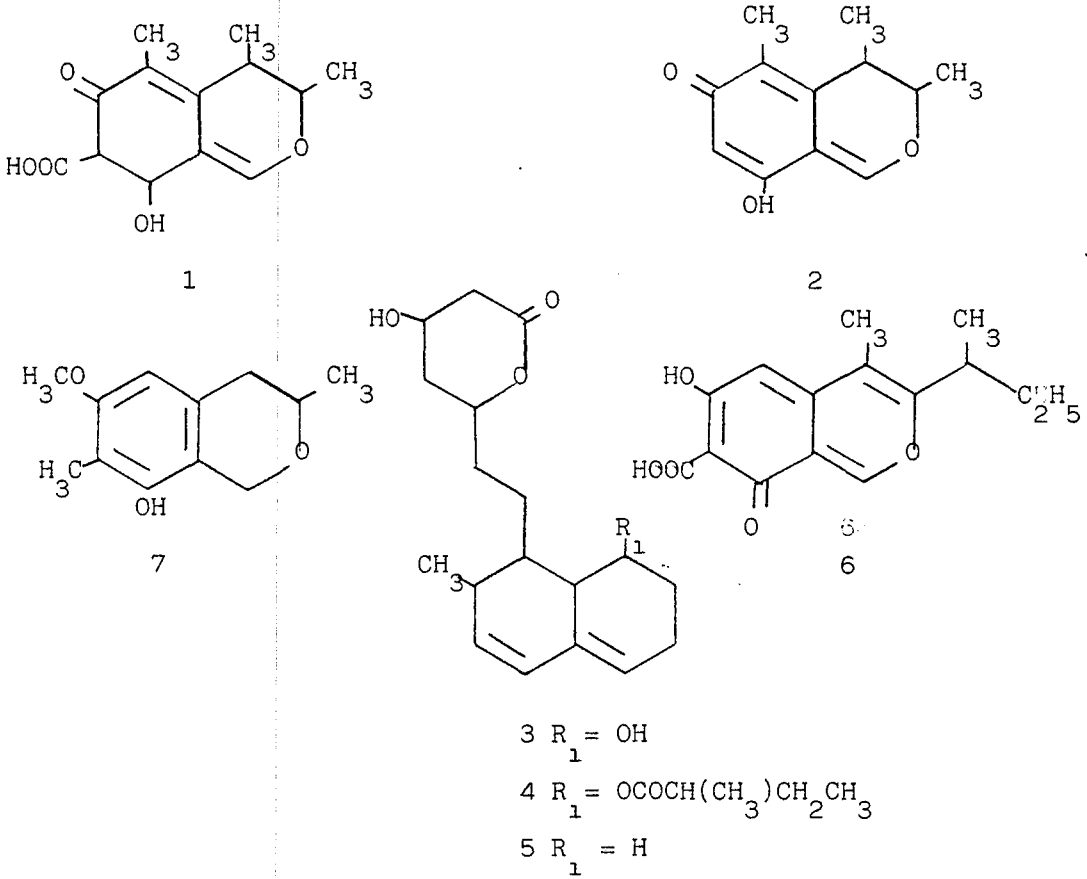
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1 H	Cl	phenyl-CHCH(COOH)NH
2 H	H	phenyl-CH <sub>2</sub> CH(COOH)NH
3 H	Cl	phenyl-CH <sub>2</sub> CH(COOC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> )NH
4 OH	Cl	phenyl-CH <sub>2</sub> C(COOH)NH
5 H	Cl	OH

Şekil 1.2. Okratoksinlerin kimyasal yapısı, (1)okra- toksin A, (2) okratoksin B, (3) okratoksin C (4)hidroksiokratoksin A, (5) okratoksin (Betina, 1989)

Sitrinin, Penicillium citrinum'un kültür filtratından izole edilmiştir. Birçok penicillium ve aspergillus türle- rine ait suşların sitrinin ürettiği bilinmektedir (Jabbar and Rahim, 1962).

Sitrininin, antibakterial ve antibiyotik özelliğinin yanı sıra, fitotoksik etkiye de sahip (Warren et al., 1963) olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Artemia salina, civciv embri- yosu ve fare fibroblastlarına da toksik olduğu bilinmekte- dir. Sitrininin, domuz nefropatisine neden olduğu bildirilmiştir. Mısır, pirinç, buğday, arpa, çavdar, yulaf ve çürüyen domateslerde doğal kontaminant olarak bulunduğu saptanmıştır (Betina, 1989).

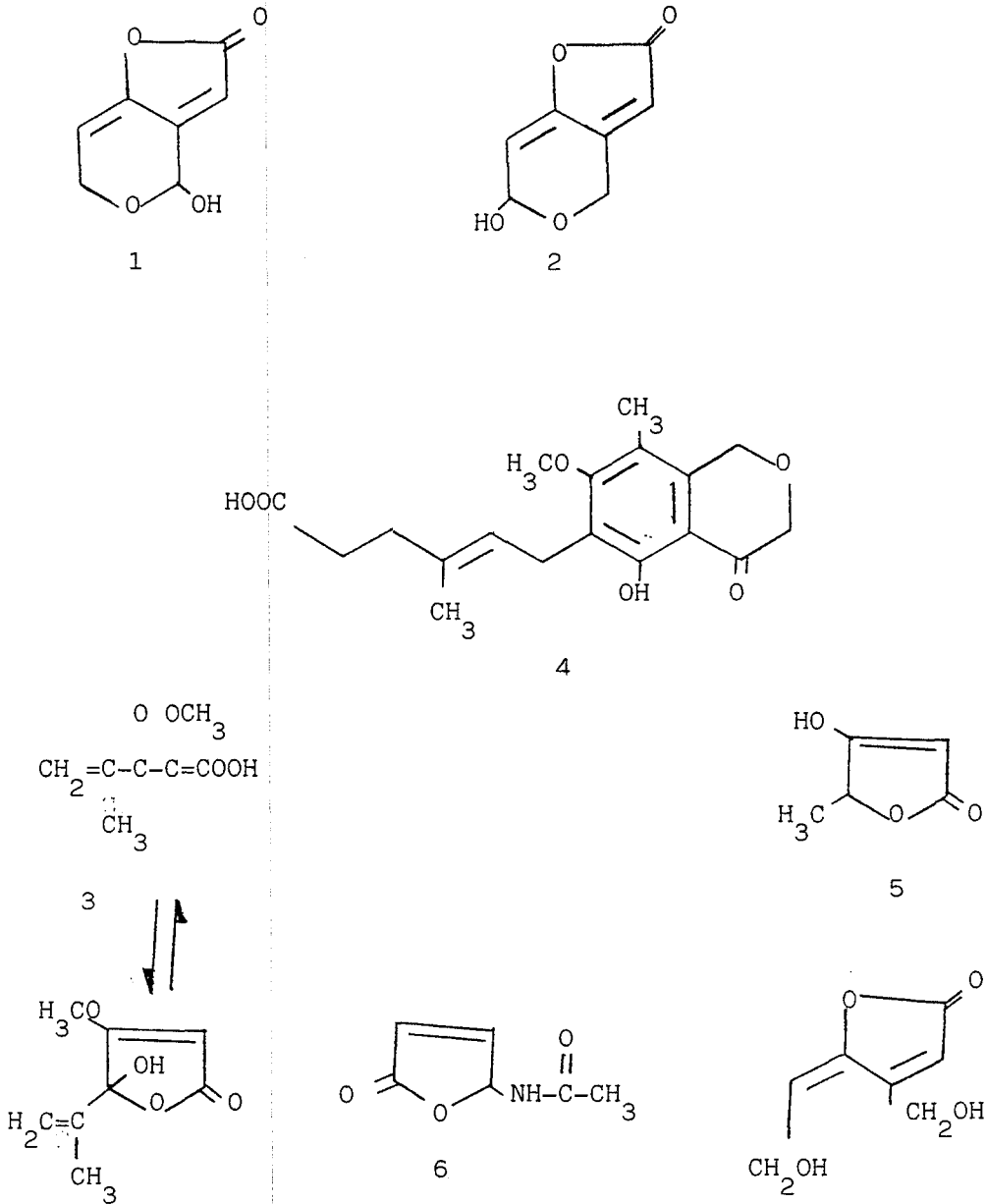
P.citrinum'un mutantlarından dekarboksi-sitrinin ve diğer yapısal ilgili bileşikler izole edilmiştir (Şekil 1.3). Fakat bunların bir kısmının biyolojik etkileri hala bilinmemektedir (Ciegler et al., 1977).



Şekil 1.3. Sitrinin ve ilgili bileşiklerin kimyasal yapıları (1) Sitrinin, (2) dekarboksisisitri- nin, (3) ML-236A, (4) DML-236B, (5) ML-236C, (6) ascocehitine, (7) 3,7 dimetil-8-hidroksi 6-metilzochroman (Betina, 1989)

En iyi bilinen beş üyeli toksik loktonlar (Şekil 1.4) patulin, penisillik asit, mycophenelik asit, butenolid,  $\gamma$ -metil tetronik asit ve asclodiol'dür. Bunlar çoğunlukla değişik aspergillus ve penicillium türlerinin metabolitleridir (Engel and Teuber, 1984).

Patulin, Penicillium patulum tarafından oluşturulan bir aktif antibiyotik bileşen olarak keşfedilmiştir. Fakat ilk olarak P.claviforme'nin ürettiği klaviformin adı altında izole edilmiştir. Daha sonraları insanlarda anti mikrobiyal ajan olarak kullanılması için çok zehirli olduğu belirlenmiştir (Norstadt and Mc Colle, 1963).



Şekil 1.4. Beş üyeli toksik laktonların kimyasal formülleri (1) patulin, (2) isopatulin, (3) penisillik asit, (4) mycophenolic asit, (5)  $\gamma$ -metiltetronik asit, (6) butenolit, (7) ascladiol (Betine, 1989)

Patulin, klavatin-C, klavisin, expansin, penisidin, mycoin, leucopin ve tersinin gibi çeşitli isimler altında bildirilmiştir. Patulinin doğal olarak oluşumu, toksisitesi ve karsinojenitesi; patulini, insan ve hayvan sağlığı için kuvvetli bir tehlike haline getirmektedir. İzopatulinin toksisitesi ise henüz bilinmemektedir (Betina, 1989).

Yiyecek ve yemlerdeki mikotoksinlerin yapısı ve oluşumu, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkileri Bullerman, Mirocha ve diğer araştırmacılar tarafından (Betina, 1989) detaylı olarak incelenmiştir. Mikotoksin problemini bertaraf etmek oldukça zor olduğundan, onları kontrol için en etkili ölçümler, mikotoksinlerin besin ve yemlerdeki varlığını gözlemek için yapılacak dikkatli bir programa bağlıdır. Bu sebeple, insanların mikotoksinlere maruz kalma riskini azaltmak için, besinlerdeki mikotoksinlerin analizlerinin doğru ve duyarlı yapılması önemlidir.

Aflatoksinlerin keşfi, mikotoksinler için analitik metotların gelişmesini teşvik edici araştırmalara neden olmuştur. Yeni metotlar bildirilmesine rağmen, mikotoksinlerin analizi ile ilgili hala üç ana problem vardır: Bunlardan birincisi; mikotoksinlerin kimyasal yapısı ve fiziksel özellikleri ile ilgilidir. Her bir mikotoksinin analizi için ayrı bir metot geliştirilmesi önerilmektedir. Bazı mikotoksinler örneğin, aflatoksin, okratoksin ve zearole-non'un farklı yapısal bileşiklerden ve diğer kontaminantlardan ayrıldıktan sonra direkt kimyasal analize izin veren spektral ve flouresans özellikler gösterirken diğer mikotoksinler, örneğin; trichothecen'ler ve rubratoksinler iyi tanımlanmış absorbsiyon kurallarına sahip değildir. Bundan dolayı değişik metotların kullanılması önerilmiştir (Labuza, 1983).

İkinci önemli problem ise, mikotoksinlerdeki yapısal analogları ayırmaktır. Çünkü, besin ve yem gibi kompleks karışımlarda toksinin çok az bir miktarı bulunur. Analizleri yapmak için ise büyük oranda saf toksin elde edilmesi gerekmektedir.

Üçüncüsü ise; mikotoksinler, zirai ürünlerde heterojen dağılım gösterirler. İstatiksel sapmaları azaltmak için bir üründen birçok örneğin analizi gereklidir (Labuza, 1983). Bu nedenle mikotoksin analizleri için yeni metot geliştirme çalışmalarında bu üç büyük problem halledilmeye çalışılmaktadır. İyi bir metot spesifik, duyarlı ve yapımı kolay olmalıdır. Tercihen otomasyona uyarlanabilmelidir. Mikotoksinler için, analitik metotlar üzerindeki araştırmalar bu özelliklerin birçoğunu kapsayan, birçok yeni tekniğe yol göstermiştir (Labuza, 1983).

Mikotoksin kontrolünde kimyasal metotlar kadar biyolojik tekniklerin de önemi büyüktür. Çünkü, bazı toksik olmayan bileşiklerin de flouresans verme özelliğinde oluşu; kromatografik çalışmalarda bazı mikotoksinlerin ise, benzer değerler vermesi nedeni ile biyolojik testler bir doğrulama testi niteliğini taşımaktadırlar. Bunun yanı sıra kimyasal yöntemlerle belirlenemeyen bazı mikotoksinlere ait toksik etkiler de biyolojik yöntemlerle kontrol edilebilmektedir.

Mikotoksinlerin tayini konusunda yapılan laboratuvar araştırmaları, mikotoksinleri saptamada daha duyarlı ve kolay bir metodun gelişmesini sağlamıştır. Bu teknik "Immunoassay"dir. Bu teknik, hemolog bir mikotoksine karşı oluşturulan spesifik antibadi ve mikotoksin arasındaki ilişkiye dayanmaktadır. Geliştirilen diğer bir yöntem de "enzim bağlı immunosorbant deney" (ELISA) yöntemidir (Labuza, 1983).

Aflatoksinlerin kanser yapma etkileri saptandıktan sonra, bazı ülkeler bunun gıda maddelerinde hangi miktarlardan fazla bulunmaması gerektiğini standartlarla tesbit etmişlerdir (Çizelge 1.2).



Çizelge 1.2. Çeşitli ülkelerde aflatoksin kontrolü  
(Stoloff, 1977).

Ülke	Kanuni kontrol şekli	Besin	Gıda	Yem	Mısaade edilen Aflatoksin lim.
A.B.D.	Kanuni tolerans idari tüzük	Yer fıstığı diğer bütün gıda ve yemler	X	X	15 T <sup>1</sup> (µg/kg) 20 T
Almanya	Nizamname	Bütün gıdalar	X		5 B <sup>2</sup> veya 10T
Brezilya	Bakanlık hükmü	Yer fıstığı küspesi		X	50 B
Danimarka	Hüküm	Yer fıstığı, kabuksuz Brazil fıstığı, yer fıstığı ürünleri	X		0
EEC Ülkeleri	Konsey Direktifi	Bütün karmaşık yemler	X	X	15-50 B
Fransa	Nizamname	Bütün gıdalar	X		5 B
Hindistan	Hindistan Standartlar Enstitüsü teklifi	Yer fıstığı küspesi	X		30 B
İngiltere	Gümrük Nizamnamesi	Yer fıstığı	X		50 B
İsveç	Kraliyet Hükmü Tavsiye Niteli' ginde Standart	Bütün gıdalar Yer fıstığı küspesi		X	5 T 600 B
İtalya	Sağlık Bakanlığı sirküleri	Yer fıstığı veya mamülleri	X		50 B
İsrail	Depolanmış Ürünler Araş. Lab. teklifi	Bütün yem maddeleri	X		20 B
Japonya	Nizamname	Bütün gıdalar ve Yer fıstığı küspesi	X	X	0 1000 B

## Çizelge 1.2. (devamı)

Ülke	Kanuni kontrol şekli	Besin	Gıda	Yem	Müsaade edilen Aflatoksin lim.
Kanada	İdari Tüzük	Sert kabuklu meyveler ve ürünleri	X		15 T
Malawi	İhracaat Nizam.	Yerfıstığı	X		5 B
Malezya	Gıda kanunu	Bütün gıdalar	X		0
Norveç	Tarım Bak.Nizam.	Yağlı tohum küs.		X	600 B
Polonya	Kanun layihası	Bütün gıdalar		X	0
Rodesya	İhtiyacı Kanun	Yerfıstığı karışık yem		X	25 B X50-400 B

1. Toplam Aflatoksinler

2. Aflatoksin B<sub>1</sub>

Gelişmiş ülkeler tarafından ithal edilen gıda maddelerinin, aflatoksin içeriği bakımından sıkı denetime tabi tutulmalarının nedeni halk sağlığını korumaktır. Örneğin, Amerika 1965 yılında yer fıstıklarında bulunabilecek aflatoksin miktarını 30 µg/kg olarak sınırlandırmış iken, 1969 yılında bu sınırı 20 µg/kg'a düşürmüştür. Bugün bu sınırın 15 µg/kg'a düşürülmesi amaçlanmaktadır (Wessel, 1974; Labuza, 1983). Danimarka, Hollanda ve Polonya gibi bazı ülkeler, gıda maddelerinde ve yemlerde teşhis edilebilir seviyede aflatoksin bulunmaması şartı koymuşlardır. Ülkemizde ise mikotoksin sınırlamalarını belirleyen bir kanuni düzenleme bulunmamaktadır. Oysa ki FAO ve WHO gıda maddelerinde bulunabilecek aflatoksin miktarını 30 µg/kg olarak sınırlandırmış bulunmaktadır (Oser, 1969; Labuza, 1983).

Bu çalışmada; gerek besinlerde, gerekse yemlerde sıklıkla rastlanan küflerin sekonder metabolitleri olan aflatoksin, okratoksin, sitrinin ve patulinin besinlerde bulunma oranı, biyosentezi, biyosentezine etki eden faktörler ile bunların insan ve hayvanlara toksijenik etkileri, tayin metotları ve besinlerde mikotoksinlerin kontrolü ile detoksifikasyonları konularındaki yayınlar gözden geçirilerek tartışılmıştır.

## 2. BAZI BESİN VE YEM MADDELERİ ÜZERİNDE YAPILAN MİKOTOKSİN ÇALIŞMALARI

Yer fıstığı, mısır ve bunlardan elde edilen ürünler; çığit, soya, pirinç, ceviz, fındık, badem, buğday, ırmık, un, bezelye, hindistan cevizi, limon, şeftali, domates salçası, elma, elma suyu gibi bitkisel ürünler ile süt, yoğurt, peynir, yumurta, et ve et ürünleri gibi hayvansal ürünler, mikotoksin üreten bazı fungus türleri ile kontamine olduklarında kalite kaybına, dolayısı ile ekonomik zarara neden olmaktadır. Bunun yanısıra insanlar üzerinde oluşturdukları akut ve kronik toksisite konunun önemini bir kat daha artırmaktadır (Ahrens, 1977; Uzunboy, 1984). A.flavus ve A.parasiticus'un bu besinlerde kolaylıkla gelişerek toksin oluşturabildikleri bildirilmiştir (Scott, 1978).

Yurdumuzda mikotoksin çalışmaları çok sınırlıdır. Belirli ürünlerde periyodik olarak yapılması gereken taramalar ise bugüne dek Marmara Araştırma Enstitüsü'nün 1981 yılında başlattığı NATO projesine aittir. Bu proje kapsamında bulunan Ege Bölgesine ait çalışma sonuçları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Güray ve Vural (1968), Kanada'ya ihraç edilip tekrar iade edilen fındıklar ile, Ankara piyasasından toplanan 26 iç fındık numunesinin % 20'sinde aflatoksin saptamışlardır.

Demirer (1972, 1975) süt, yoğurt, beyaz peynir, ayran, eritme, kaşar peyniri, tereyağı, süt tozu ve dondurmadan meydana gelen toplam 63 örnek ile 91 tulum peyniri örneğinin hiçbirinde aflatoksin tesbit edemediğini bildirmiştir.

Çolakoğlu ve Ünal (1974), 13 iç fındık, 20 yer fıstığı, 4 pamuk tohumu ile 1 zeytin örneğinde yaptıkları çalışmada aflatoksine rastlayamamışlardır.

Çizelge 2.1. Ege Bölgesi tarım ürünlerinde rastlanan toksin oluşturan küfleri içeren ürünlerin yıllara göre dağılımı (TÜBİTAK, 1985, NATO Projesi)

İncelenen Ürünler	YILLAR				TÜM YILLAR
	81 N	82 N	83 N	84 N	
Buğday	1	2			3
Pirinç		1			1
Arpa	1	1			2
Mısır	2				2
Tahıl ürünleri		1			1
Ayçiçeği tohumu		1			1
Gelincik tohumu	2				2
Susam tohumu	1	1			2
Kuru üzüm	3	3			6
İncir	2				2
Nohut	1				1
Kayısı		1			1
Mercimek	1				1
Fasulye	1				1

N= Rastlama sayısı

Alperden (1976), pastırma, sucuk, salam, sosis gibi et ürünleri ile peynirlerde yaptığı mikotoksin aramasında; et ürünlerinin % 8'inde, peynirlerin % 4'ünde aflatoksin bulunduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı daha sonra Marmara ve Trakya Bölgesinden temin ettiği 145 adet et ve süt ürünlerinin % 4,82'sinde aflatoksin tesbit ettiğini bildirmiştir (Alperden ve ark., 1978).

Aşkın ve ark.(1977), A.flavus ile aşılana kuru incirler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, nemlendirilip sterilize edilmiş birinci grup örnek ile herhangi bir işleme

tabi tutulmamış ikinci grup örnekleri, A.flavus'un üç ayrı suşu ile aşılıyarak 28 °C'ta iki hafta süre ile inkübe etmişlerdir. Birinci grupta oluşan aflatoksin miktarlarının aşılanaan kültüre göre değiştiğini, maksimum 80-675 µg/kg aflatoksin B<sub>1</sub>, 300-750 µg/kg aflatoksin G<sub>1</sub> meydana geldiğini, ikinci grup örneklerde ise küf gelişiminin ve aflatoksin oluşumunun olmadığını bildirmişlerdir.

Ülkemizin çeşitli bölgelerinde yetişen arpa, buğday, yulaf, çavdar gibi tahıllarda aflatoksin arama çalışması yapan Güray ve ark.(1978), 41 buğday örneğinin 10'unda; 43 arpa örneğinin 6'sında; 10 çavdar ve 33 mısır örneğinin 1'er tanesinde aflatoksin saptamışlardır.

Denizel (1979), Ordu ve Sakarya İllerinden toplanan 41 mısır örneğinin 5 tanesinde 20 ppb'nin altında; 13 tanesinde 30-1000 ppb arasında aflatoksin tespit ettiğini bildirmiştir.

Atlı ve Köşker (1980), buğday, un ve ekmekte aflatoksin oluşumu ve stabilitesini saptamak amacı ile yaptıkları çalışmada, 72 buğday örneğinin sadece 1 tanesinde 1,5 µg/kg aflatoksin B<sub>1</sub> tesbit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar laboratuvar koşullarında buğdayda A.flavus'un üremesini ve aflatoksin oluşturmasını saptamak amacı ile örnekleri A.flavus sporları ile aşılamaş ve 26 °C'ta 15 gün inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonunda yapılan aflatoksin analizinde 10.000 µg/kg aflatoksin B<sub>1</sub> oluştuğunu gözlemişlerdir.

Çoksöyler ve Köşker (1980), 101 çiğ süt, 9 küflü çökelek ve 4 küflü tulum peyniri örneğinde tesbit edilebilir miktarda aflatoksin saptayamamışlardır.

Başaran ve ark.(1986), Eskişehir yöresinden elde ettikleri 90 gıda maddesi ile 63 yem örneği olmak üzere toplam

153 örnekte yaptıkları aflatoksin arama çalışmasında, 6 örnekte aflatoksin bulduklarını bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmacı ve ark.(1988), Eskişehir'de imal edilen bozalarda ve boza yapımında kullanılan hammaddelerde mikotoksin bulunamadığını bildirmişlerdir.

Kıvanç (1990), peynirlerde küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunu incelediği araştırmasında örneklerin hiçbirinde aflatoksin belirleyemediğini bildirmiştir.

Başaran ve ark.(1991), aflatoksinlerin kanserojenik etkisini, Ecbailium elaterium'un anti-kanserojenik aktivite göstererek baskıladığını; dolayısı ile aflatoksin B<sub>1</sub>'in verdiği zararın önlenebileceğini bildirmişlerdir.

Kıvanç ve ark.(1992), Erzurum yöresinden temin ettikleri çiğ sütlerde yapmış oldukları aflatoksin arama çalışmasında aflatoksine rastlayamadıklarını bildirmişlerdir.

Mikotoksinler ile ilgili diğer ülkelerdeki çalışmalarını, ülkemizde yapılan çalışmalarla kıyasladığımızda yaptığımız çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmektedir.

Pirinç, doğal olarak pek çok toprak kökenli mikroorganizmayı içermektedir. Pirinçlerdeki fungusları belirlemeyi amaçlayan Del Prada ve Christensen (1952) tarafından yapılan bir çalışmada, kabukları çıkarılmış pirinçlerden Aspergillus, Penicillium, Curvularia ve Fusarium cinsi funguslar izole edilmiştir. Kabukları izole edilen küflerin % 43'ünü A.glavcus, % 33'ünü A.niger, % 8'ini A.terreus diğer % 8'ini Penicillium spp.nin oluşturduğu saptanmıştır (Eriş, 1989).

Shotwell et al.(1969), 1368 buğday, sorgum ve yulaf örneğinin 11'inde 2-19 ppb aflatoksin tesbit etmiş-

lerdir. Aynı araştırmacılar 1311 mısır örneğinin 35'inde 3-19 ppb aflatoksin B<sub>1</sub>, 5'inde 2-8 ppb aflatoksin G<sub>1</sub>, 866 soya fasulyesi örneğinin 2'sinde 7-10 ppb aflatoksin B<sub>1</sub>, 0,4 ppb aflatoksin G<sub>1</sub> saptamışlardır. Aflatoksin, okratoksin ve zearalenon yönünden 238 mısır örneğini analiz eden Shotwell ve ark.(1970), 6 örnekte 12-25 ppb aflatoksin B<sub>1</sub>, 1 örnekte 12 ppb aflatoksin G<sub>1</sub> bulmuşlardır (Betina,1989).

1971-1972 yıllarına ait 369 mısır örneği üzerinde çalışan Rambo et al. (1974), örneklerden Fusarium, Mucor, Penicillium, Cephalosporium, Gibberella, Nigraspora ve A.flavus grubuna ait küf mantarları izole ettiklerini bildirmişlerdir (Betina, 1989).

A.flavus'un, sterilize edilmiş bazı hayvan yemleri ve soğan, patates, şeker pancarı, kuru üzüm, incir, erik, elma, kayısı gibi gıdalarda aflatoksin üretme potansiyelini araştıran Benzen ve ark. 7-24 gün inkübe edilen bu ürünlerde 50-500 ppb aflatoksin oluştuğunu saptamışlardır (Sert, 1982).

A.ochraceus, çoğunlukla toprak ve çürüyen bitkiler üzerinde bulunur. Ayrıca birçok tarımsal ürünlerde de geniş oranda görülmektedir. A.ochraceus'un toksijenik suşları birçok araştırıcı tarafından izole edilmiştir (Steyn, 1984).

Okratoksin A'yı ilkolarak Güney Afrikalı kimyacılar tanımlamışlarsa da, bu bölgede bunun doğal oluşumu henüz bildirilmemiştir (Steyn, 1984). Toksin, Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'daki birçok bitki ürününde tesbit edilmiştir (Betina, 1989).

Okratoksinlerin bulunduğu zirai ürünler mısır, buğday, arpa, çavdar, yulaf, sorgum, yer fıstığı ve kahve tohumla-



rıdır. Okratoksinlerin oluşumu ile ilgili ilk raporlar Amerikan mısırı ve Kanada buğdayı ile ilgilidir. Steyn (1984), 1970'lerde Kanada, A.B.D., Fransa, İsviçre, Polonya, Yugoslavya, İngiltere ve Hindistan'da okratoksinlerin doğal oluşumları ile ilgili verilerin bazılarını karşılaştırmıştır. Zirai ürünlerin toksin konsantrasyonları, 5-27,5 µg/kg arasında değişmektedir. Okratoksinler ayrıca hububat unlarında da saptanmıştır (Betina, 1989).

Okratoksin A'nın kontamine arpadan biraya geçtiği de tesbit edilmiştir. Toksin ile bulaşmış yeşil kahve tohumlarındaki okratoksin A'nın kavurma işlemi sırasında yok olduğu; fakat aşılınmış yeşil kahve tohumlarındaki A.ochraceus tarafından üretilen okratoksinin stabil olduğu görülmüştür (Tsubouchi et al., 1987).

Patulin, yaygın bir besin kontaminantıdır. Penicillium expansum gibi patulin üreten Penicillium türleri meyvelerde bulunduğundan, kahverengi leke bozukluğu gösteren bir grup meyve (elma, muz, üzüm, armut, ananas, şeftali, kayısı) incelenmiş ve patulin içerdikleri saptanmıştır (Frank et al., 1977).

P.expansum, P.urtica ve Byssochlamys nivea ile enfekte edilen meyve suları, komposto ve sebzelerde de patulin tesbit edilmiştir (Betina, 1989).

1977-1978 yılında Kanada'da tüm büyük üreticilerin elma suları incelenmiş ve analiz edilen örneklerin % 37'sinin patulin içerdiği saptanmıştır. İncelen örneklerdeki ortalama patulin seviyesi 56,5 µg/L; en yüksek seviye ise 115 µg/L olarak belirlenmiştir. Konsantrelerden hazırlanan elma sularınının, taze elmadan hazırlanan elma sularından daha düşük seviyede patulin içerdiği gözlenmiştir (Williams, 1985).

Ekmek ve çöreklerin de uygun bir suş ile enfekte edildiğinde patulin taşıdıkları belirlenmiştir. Buna rağmen bu toksin, çiğ sucuk ve peynirde patulin sentezleyen fungus ile kontamine edilmesine rağmen saptanamamıştır. Bu, muhtemelen patulinin proteinlerin -SH gruplarıyla oluşturduğu reaksiyonun daha az toksik olması veya kimyasal olarak değişmiş bileşenlerin meydana gelmesindedir (Scott and Bullerman, 1976).

Özçelik (1980), Türkiye'de yetiştirilen bazı elma çeşitleri ile yaptığı çalışmada, patulin üreten küf suşları ve doğal yüzey mikoflorasının (Penicillium) 3°C'ta 45 günde çürüttükleri elmalarda 51,7-210 µg/g değerleri arasında patulin oluşturduklarını bildirmiştir.

Kendiliğinden doğal mikoflora ile küflenmiş ekme ve kuru pastalarla, peynir, sucuk, pastırma, salam ve sosis gibi hayvansal gıdalarda da patulin üretildiği bildirilmiştir. Patulinin daha çok meyve ve sebze gibi bitkisel gıda maddeleri ile bunların ürünlerinde üretildiği saptanmıştır (Özçelik, 1982).

Patulin oluşturabilen küfler, meyve ve sebzelerde kolaylıkla üreyebilmekte ve çürümeye neden olabilmektedirler. Meyvelerin, meyve suyuna işlenmesi sırasında küflerin zarar görmesine rağmen, oluşturdukları bu kanserojen etkili toksik madde suda çözüldüğünden, kolaylıkla meyve suyuna geçebilmekte ve pastörizasyon sıcaklığında, asit ortamda ve daha sonra depolama sırasında stabilitesini oldukça iyi koruyabilmektedir. Bundan dolayı meyve suları, meyve suyu konsantreleri, meyve pulpu gibi ürünlerde patulin diğer gıdalara göre daha fazla önem taşımakta, özellikle meyve suyuna işlenecek elmaların işlenmeden önce uzun süre fabrikalarda

yığınlar halinde bekletilmelerinden dolayı, ticari elma sularında sıklıkla patuline rastlandığı bildirilmiştir (Aping, 1982; Mayer, 1982).

İnce (1978), Türkiye'de satılan ticari meyve sularında yaptığı araştırmada değişik fabrikalara ait 260 adet meyve suyu örneğinin incelenmesi sonucunda şeftali nektarlarında 400-1710 µg/l, vişne sularında 710-1710 µg/l, kayısı nektarlarında 700 µg/l, erik nektarlarında 400-700 µg/l ve armut sularında 700 µg/l olarak 24 örnekte patulin saptandığını, buna karşılık elma ve üzüm sularında patulin saptanamadığını açıklamıştır.

Ayrıca çeşitli ülkelerde elma ve diğer meyve sularında yapılan araştırmalar sonucunda incelenen örneklerde Almanya'da 105 farklı elma ürünü örneğinin % 7'sinde 11-50 µg/l, İtalya'da 58 meyve suyu örneğinin % 21'inde 5-15 µg/l, yine İtalya'da 20 reçel örneğinin % 50'sinde 5-50 µg/l, İngiltere'de 136 meyve suyu örneğinin % 16'sında 1-38 µg/l, Fransa'da 27 elma konsantratı örneğinin hepsinde 55-610 µg/l, İspanya'da 104 elma ürünleri örneğinin % 52'sinde 1-250 µg/l, 24 armut ürünleri örneğinin % 23'ünde 0,9-1,0 µg/l, Yeni Zelanda'da 20 elma suyu örneğinin % 3'ünde 106-216 µg/l seviyesinde patulin saptandığı bildirilmiştir (Mortimer et al., 1985).

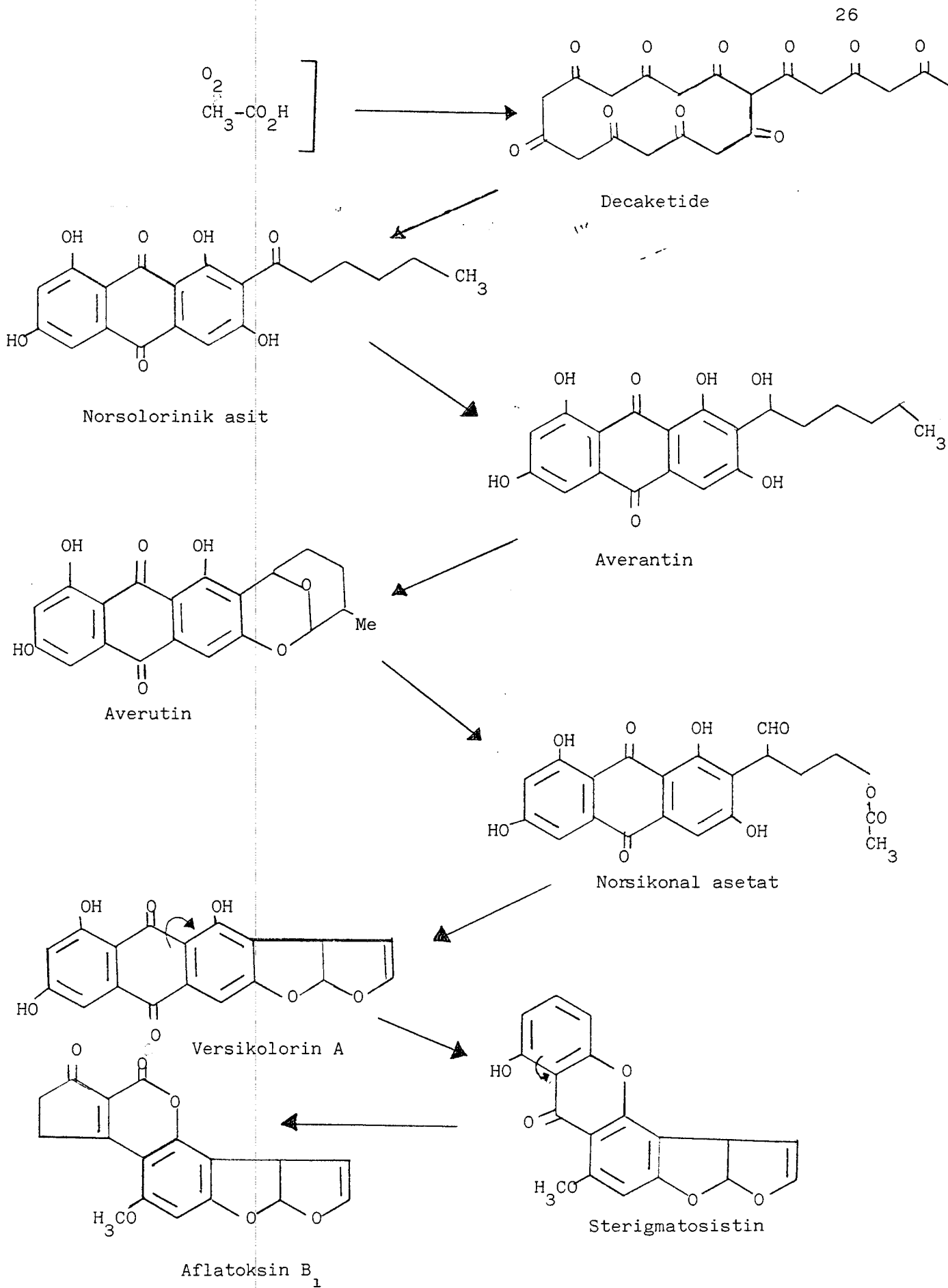
### 3. MİKOTOKSİNLERİN BİYOSENTEZİ

#### 3.1. Aflatoksinlerin Biyosentezi

Biyosentetik olarak aflatoksinler, asetat türevli decaketidelerdir. Aflatoksinler polihidroksi antrakuinon aralıklarında oluşurlar. Basitleştirilmiş bir biyosentetik plan Şekil 3.1'de verilmiştir. Şemadaki oklar, asetatın decaketide, norsolorinik asit, averantin, averutin, norsiconal asetat, versicolorin A ve sterigmatosistin'den aflatoksin B<sub>1</sub>'e kadar giden birçok biyosentetik basamakları göstermektedir.

Aflatoksinleri içeren ana siklopentanon halkaları, aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub>'dir. Birçok yayında işaretlenmiş aflatoksin B<sub>1</sub>'in aflatoksin B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'ye dönüştüğü belirtilmiştir. Fakat, A.parasiticus ve A.flavus'un bloke edilmiş mutantlarıyla yapılan son çalışmalar, aflatoksinlerin çok yönlü bir devirden geçerek bağımsız olarak oluştuklarını düşündürür. Maggan et.al. (1977), aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>'in versicolorin A ve sterigmatosistinden geçerek oluştuğunu ve dihidrofurafuran aflatoksinlerin şu şekilde meydana geldiğini belirtmiştir. Versiconal → versicolorin C → 5, hidroksidihidro sterigmatosistin. Dihidrofurfuran aflatoksinler de şu şekilde oluşur: Versiconal → 5, hidroksidihidro sterigmatosistin → Aflatoksin B<sub>2</sub> → Aflatoksin G<sub>2</sub>.

Çok yakınlarda bu biyosentetik devrim iki basamakta oluştuğu saptanmıştır. O-metilsterigmatosistin, sterigmatosistin ve Aflatoksin B<sub>1</sub> arasında bir aracı olduğu bilinmektedir. Yabani tip A.parasiticus'dan temel antrakuinon bileşeni izole edilmiş ve bu bileşen averufanın

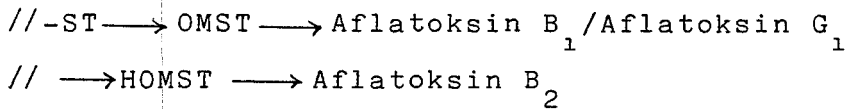


Şekil 3.1. Aflatoksin B<sub>1</sub>'in biyosentezi (Turner and Aldrige, 1983)

olarak karakterize edilmiştir. Averufanın, erken dönemdeki çalışmalarda izole edilmesine rağmen aflatoksinin biyosentetik ana maddesi olduğu düşünülmemiştir. Çalışmalar sonucunda averufanınin, averufin, versicolorin A, O-metilsterigmatosistinin ve Aflatoksin B<sub>1</sub>'e dönüştüğü gözlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda tasarlanan aflatoksinin biyosentetik devri aşağıdaki basamaklardan oluşmuştur: Asetat → norsolorinik asit → averantin → averufanın → averutin → versiconal hemiasetal asetat → versicolorin A → sterigmatosistinin → O-metilsterigmatosistinin → Aflatoksin B<sub>1</sub>.

O-metilsterigmatosistinin (OMST) A.parasiticus'da, aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>'in ana maddesi olduğuna dair önceki tanımlamaları Bhatnager et al.,(1987) tasdiklemişlerdir.

1987'de Clevelant tarafından OMST in hidroksi türevi olan hidroksiortometilsterigmatosistin (HOMST) A.parasiticus'dan izole edilmiştir. Deney sonuçları Aflatoksin B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> in, aflatoksin biyosentetik devrinin ayrı dallarından oluştuğunu, sterigmatosistin (ST) ve OMST aracılılarından önce biyosentetik devirdeki bifurcation şöyledir:



Sterigmatosistinin Aflatoksin B<sub>1</sub>'e dönüşümünün terminal devrindeki iki aktivite A.parasiticus'un aflatoksin üretmeyen mutantından elde edilmiştir.

Bir postmikrozomal enzim aktivitesi ST 'nin OMST'e dönüşümünü katalizler ve mikrozomal aktivite OMST'yi aflatoksin B<sub>1</sub>'e dönüştürür. A.parasiticus'un bloke edilmiş mutantlarının sterigmatosistini hem B hem de G aflatoksinlere

dönüştürme yeteneğinde oldukları belirlenmiştir. Bunu takiben ST 'den B ve G aflatoksinlere bağımsız devirler olduğu deneysel olarak tekrarlanmıştır. Aflatoksin B<sub>1</sub>, bir aracı değildir. Fakat aflatoksin biyosentetik devrinin son ürünüdür (Betina, 1989).

### 3.2. Okratoksinlerin Biyosentezi

Okratoksin üretimi, substratın sıcaklığına, su aktivitesine, sistein ve ilgili yapısal bileşikler ile diğer besin elementleri gibi faktörlere bağlıdır (Lisker, 1985).

Okratoksin A, L-β-fenilalanine bir karboksi grubundan bağlanan 3-4-trihidro-(3R)-metilisokumarin parçasına sahiptir. Teorik olarak 3-4-trihidro-(3R)-metilisokumarin asetat polimolanat çevriminde oluşur.

Okratoksin A'nın biyosentetik bir çalışması, asetatın ve orjinal poliketinin dönüşümünden türeyen okratoksin A'nın sınıflandırma modelini saptamak için Jesus (1980) tarafından yapılmıştır.

P.viridicatum kültürleri , Yeast-Ekstrakt-Sukroz (Y.E.S.) ortamında üretilmiş ve ortama  $|1-C^{13}|$ -asetat eklenmiştir.  $|1-C^{14}|$ -asetat türevli okratoksin A'nın proton enerjisi düzensizliğinden çiftleşmiş  $C^{13}$  NMR spektrumu, beş tane artmış karbon göstermektedir. Yani  $C_{(1)}$ ,  $C_{(3)}$ ,  $C_{(5)}$ ,  $C_{(7)}$  ve  $C_{(9)}$ . Bunlar okratoksin A'nın dihidrometiliso kumarin parçası için karşılıklı pozisyonları işgal eden sınıflandırmalarıyla, bir asetat-polimolanat devrini destekler.

A.ochraceus'un kültür ortamına  $|1,2-C^{13}|$ -asetat eklenildiğinde,  $|1,2-C^{13}|$ -asetat türevli okratoksin A'nın proton enerjisi düzensizliği,  $C^{13}$  NMR spektrumu dönerek birleşmiş

(spin-spin coupling) olduğunu gösterir. Bu bilgiler de  $C_{(11)}-C_{(3)}$ ,  $C_{(4)}-C_{(5)}$ ,  $C_{(6)}-C_{(7)}$ ,  $C_{(8)}-C_{(9)}$  ve  $C_{(10)}-C_{(1)}$ 'in Şekil 3.2'de gösterildiği biçimde düzenlenmiş beş asetat ünitesinden orijin aldığını gösterir. Bu yüzden okratoksin A'nın 3.4-dihidro (3R)-metilisokumarin parçasının biyosentetik orijini şüphesiz bir şekilde tanımlanmıştır.

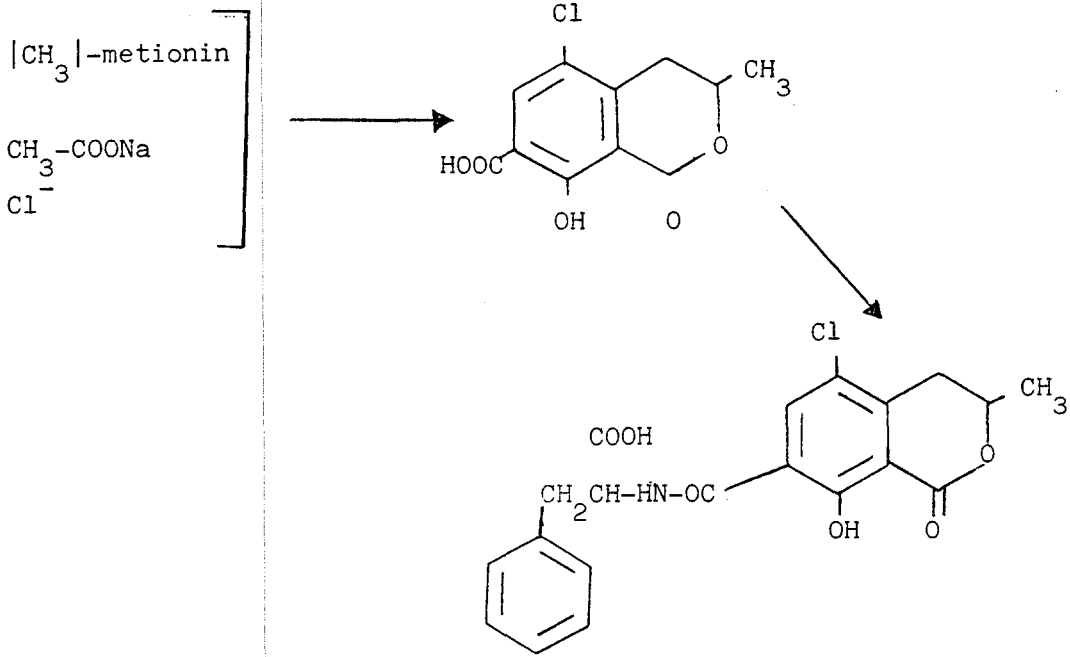
Sonuç olarak, A.ochraceus'un sodyum ( $Cl^{16}$ )-klorid içeren ortamda inkübasyonu sonucu,  $Cl^{36}$  okratoksin A ile birleşir. Klor atomlarının katılımının biyosentezin hangi noktasında olduğu henüz anlaşılmamıştır.

Okratoksin A'nın biyosentezi Huff and Hemilton (1979) tarafından yeniden incelenmiştir. Okratoksin A'nın kombine patwaylerden yani şikimik asit devri (fenilalanin) ve poliketide devrinden (dihidroiso kumarin) geçerek oluşan bir bileşik olduğu ve  $C_{(8)}$ 'deki karboksi grubunun  $C_{(1)}$  kökeninden türediği ve klorin atomunun kloraperoksidaz etkisi sırasında birleştiği söylenebilir (Steyn, 1984).

### 3.3. Sitrinin Biyosentezi

Sitrinin biyosentezi, birbirinden ayrı olarak ve sırası ile  $|1-C^{14}|$ -asetat ve metionin-metil- $C^{14}$  kullanılarak A.candidus ve P.citrinum türleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu deneyler sonucunda sitrinin, 5-asetil ünitesinden oluşan bir penta- $\beta$ -ketide'nin siklizasyonu ile oluştuğunu ve bunun 2-ekstra metil ve karboksil fonksiyonunun  $C_{(1)}$  kökenli olduğunu göstermiştir. Şekil 3.3'de sitrinini takip eden iki bileşenin gerçekte onun öncül maddesi olduğu bulunmuştur (Schwenk, 1958).

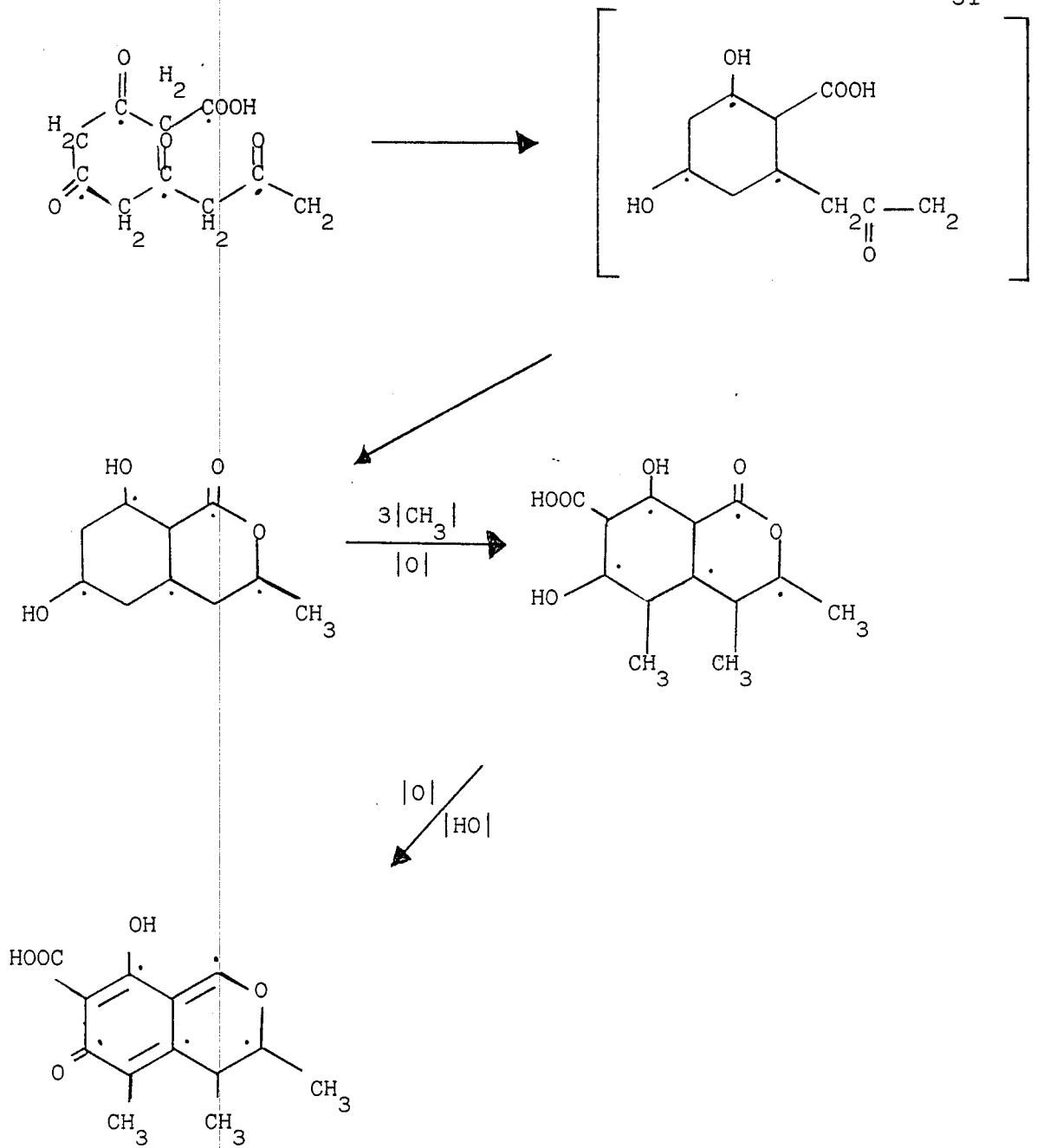




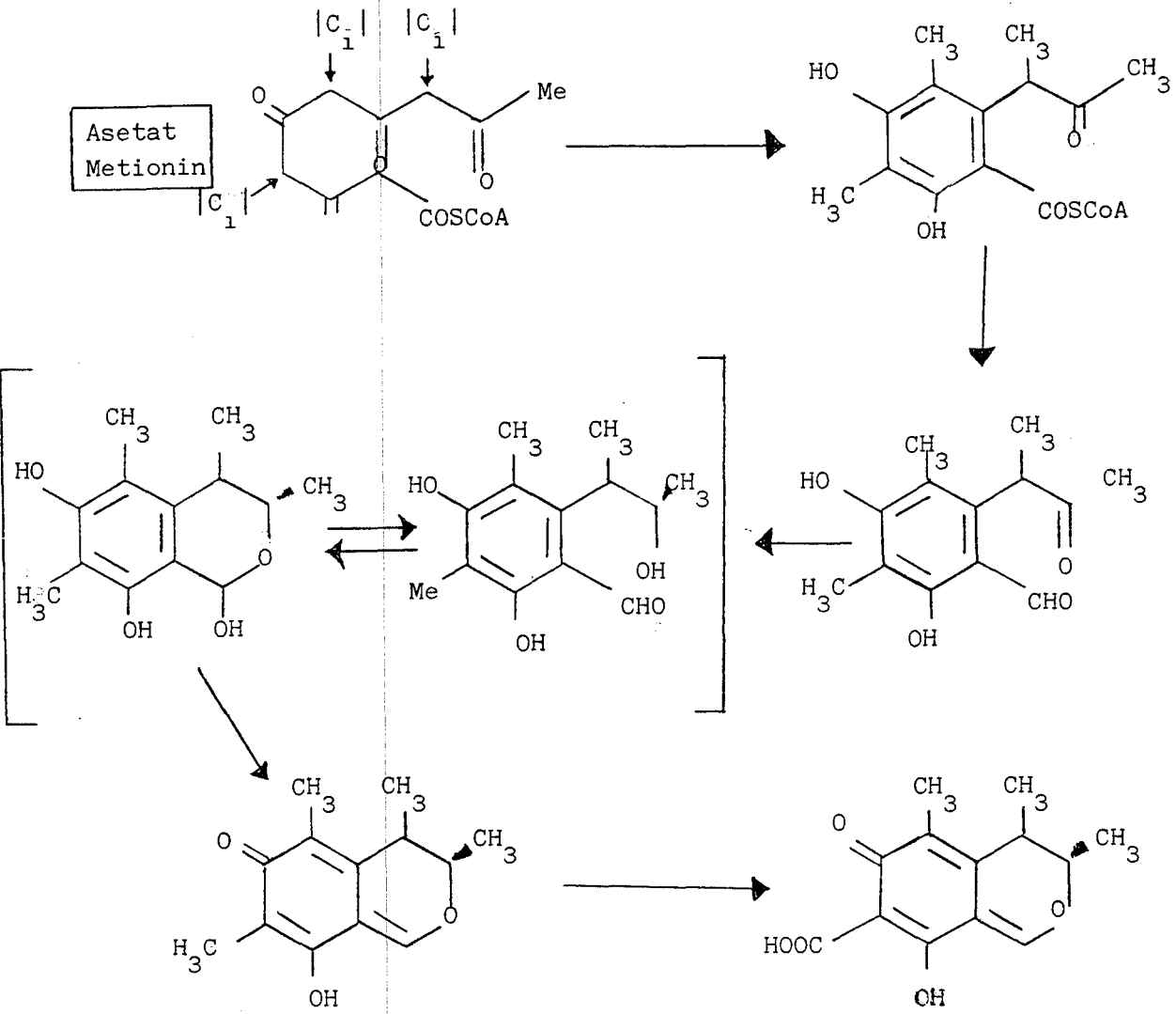
Şekil 3.2. Okratoksin A'nın biyosentezi (Turner and Aldrige, 1983)

Bulgulara dayanarak şu söylenebilir: A.terreus'un bir mutant suşu, sadece ikinci bileşiği üretir. Diğer suşlar ise her ikisini de yani hem sitrinini hem de öncül maddeyi üretirler (Hassel and Jones, 1962).

P.viridicatum tarafında salınan intrasellüler faktörlerin, mikotoksinin instabilitesinden sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Sitrininin yıkımı sonucu oluşan temel ürünler dihidrositrinon (3.4-dihidro-6,8-dihidroksi-3.4,5-trimetil-iso kumarin-7-karboksilik asit) ve okratoksin A olarak adlandırılmıştır. Okratoksin A'yı normal olarak üretebilen P.viridicatum'un dihidrositrinonu okratoksin A oluşturmak üzere değiştirmesi mümkün görülmektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3.  $^{14}\text{C}$ -asetattan sitrinin biyosentezi (Turner and Aldrige, 1983).

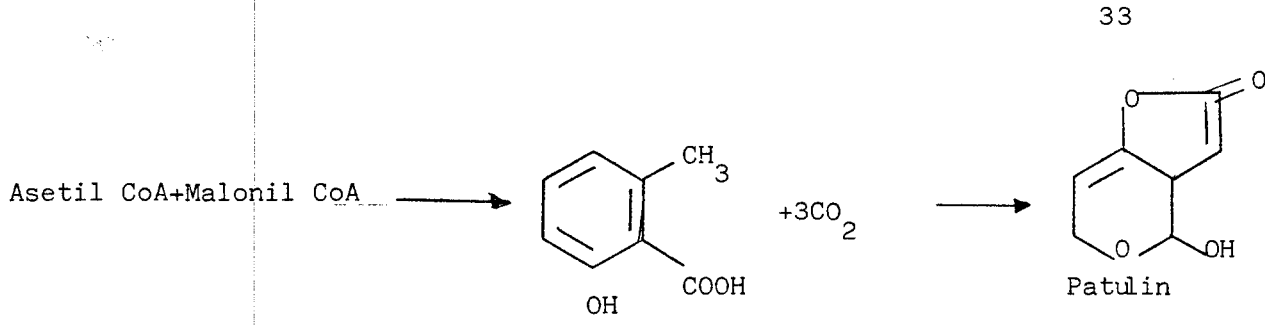


Şekil 3.4. Asetat metioninden sitrinin biyosentezi  
(Turner and Aldrige, 1983)

### 3.4. Patulin Biyosentezi

Patulinin kimyasal yapısı 1949-1950 yıllarında Woodward ve Singh tarafından aydınlatılmış olup 4-hidroksi-4H-furo (3.2.C)-piran-2.(6H)-on'dur (Mortimer et al., 1985). Strüktür formülü Şekil 1.4'de verilen patulin, doymamış bir laktan olup kapalı formülü  $C_7H_6O_4$  ve molekül ağırlığı 154,12'dir. Laktonlar, hidroksikarbonik asitin esterleri olup doğada genellikle doymamış halde bulunurlar. Ancak patulin  $\gamma$ -lakton olup, stabil 5-halkası oluşturduğundan dayanıklı bir yapıya sahiptir (Acar ve Arsan, 1988).

Patulinin biyosentezi bazı araştırmacılara göre şu şekilde (Şekil 3.5) olmaktadır:



Şekil 3.5. Patulin biyosentezi (Ough and Corison, 1980)

Patulin de diğer birçok mikotoksin ve sekonder metabolitler gibi aynı şekilde poliketitlerden oluşturulur. Buna göre patulin C<sup>14</sup> ile işaretlenmiş glukozdan bir poliketitten asetat-6-metil-salisilik asitler oluşmaktadır. Patulinin biyosentezinde başlangıçta bir asetil CoA ile üç tane malonil CoA birbirleri ile birleşerek molekülden redüksiyon ve dekarboksilasyonla 6-metil-salisilik asit sentezlenmektedir. Daha sonra dekarboksilasyon ve bunu takiben m-hidroksibenz aldehyd üzerinden son ürün olarak patulin oluşmaktadır (Lindroth, 1980).

#### 4. MİKOTOKSİNLERİN BİYOSENTEZİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

##### 4.1. Biyolojik Faktörler

##### 4.1.1. Suş özelliği

Mikotoksin oluşturan küf türleri arasında mikotoksin oluşturma yönünden büyük farklar vardır. Bir cinsin farklı türleri farklı derecelerde mikotoksin oluşturduğu gibi, bir türün bütün suşları mikotoksin oluşturma gücüne sahip değildir. Cins değişikliği üretilen mikotoksinin cinsini de etkiler (Ağaoğlu, 1985).

Son zamanlarda, American Type Culture Collection (ATCC)'daki 169 Aspergillus suşunun pirinçte, yerfıstığında ve semisentetik ortamda yüksek basınçlı sıvı kromatografi kullanılarak aflatoksin üretme yetenekleri araştırılmıştır. İncelenen suşlardan 59 tanesi aflatoksin oluşturma yönünden pozitif sonuç vermiştir. Besin fungusu olan A.oryzea ve A.soyae'nin hiçbir suşu saptanabilir seviyede aflatoksin üretmemektedir. Halbuki, A.flavus ve A.parasiticus suşlarının % 35-85'i toksijeniktir (Wei and Jong., 1986).

A.flavus aflatoksin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> üretirken, A.parasiticus aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'yi üretmektedir. Her suşun genotipi, o suşun aflatoksin üretip üretmeyeceğini belirler (Ellis et al., 1991). Ayrıca A.niger, A.ruber, P.citrinum, P.variabile, P.frequentans ve Rhizopus spp. lerinin de aflatoksin oluşturdıkları bildirilmiştir (Ahrens, 1977).

Semeniuk et al. (1971) ile Hesseltine (1972), okratoksin A ve B'nin, A.sulphureus, A.sclerotiorum, A.alliaceus, A.melleus, A.ostianus ve A.petrakii suşları tarafından sentezlendiğini bildirmişlerdir.

Van Walbeek (1969), okratoksin A'nın P.viridicatum tarafından üretildiğini ilk defa bildirmiştir. Okratoksin A üreticisi olarak saptanan penicillium türleri ise P.politan, P.commune, P.purpurescens, P.verruculosum, P.cyclopium, P.crysogenum ve P.variabile olarak belirtilmiştir (Turner and Aldrige, 1983).

Birçok fungusun ikincil metaboliti olan sitrinin orijinal olarak P.citrinum'un Tham suşlarından izole edilmiştir (Hetherington and Raistrick, 1931). Bunun yanı sıra sitrinin ürettiği bilinen türler ise şunlardır: P.lividum, P.phaeajanthinellum, P.impilcatum, P.chrzaszci ve P.citreosulphuratum'dur. Bunlardan P.phaeajanthinellum, P.fellitatum'un sinonimi; P.chrzaszci, P.Janserii'nin sinonimi; P.citreosulphuratum ise P.citreovide'nin sinonimidir (Raper and Tham, 1947).

Sitrinin ürettiği bildirilen diğer penicilliumlar ise şunlardır: P.viridicatum, P.expansum, P.steckii, P.odonatum, P.velutinum, P.canescens, P.purpurescens, P.claviforme ve P.requeforti'dir (Jabbar and Rahim, 1962).

Aspergillus genusuna ait A.niveus, A.carneus, ve A.flavips'inde sitrinin ürettiği bildirilmiştir (Steyn, 1979).

Sitrinin, Pythium ultimum ve Clavariopsis aquatica'nın kültür filtratlarından da izole edilmiştir (Ewart, 1983).

Patulin, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces ve Byssoehlamys genuslarının çeşitli türleri tarafından üretilmektedir. Patulin ürettiği bilinen penicilliumlar ise

P.expansum (P.leucopus), P.patulum Bainier (P.urticae, P.griseofulvum), P.clauiforme, P.equinum (P.terrestre), P.novae-zeolandiae, P.lopidosum, P.granulatum (P.divergens) P.lanosum, P.melinii, P.cyclopium, P.cyaneo-fulvum, P.roqueforti'dir (Engel and Teuber, 1984).

Patulin üreten diğer mikroorganizmalar Paecilomyces varioti, A.clavatus, A.gigantus, A.terreus, Byssochlamy nivea ve B.fulva'dır. (Engel and Teuber, 1984).

Bir suş mikotoksin üretmek için genetik bir potansiyele sahip ise bu suşun üreteceği mikotoksin seviyesi diğer faktörlere bağlı olarak değişir.

#### 4.1.2. Ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet

Uygun koşullar altında besinlerde üreyen küfler arasındaki mikrobiyal rekabet, mikotoksin oluşumunu azaltır veya sınırlandırılabilir. Toksin miktarındaki değişimin nedeni, substrat için bir rekabetin varlığından veya bir küf suşunun diğerleri için inhibitör metabolitler salgılamasından da olabilir. Örneğin, Rhizopus oryzae aflatoksin oluşumunu inhibe etmektedir. Ayrıca önceden oluşmuş aflatoksinleri de metabolize edebilmektedir (Betina, 1989).

A.parasiticus, A.candidus'un bulunduğu ortamda iyi gelişmektedir. Bununla beraber, A.chevalieri'nin ise aflatoksin üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Boller and Schroeder, 1984 ; 1974).

Ortamda, A.niger'in bulunması, sitrik asit üretimi nedeniyle substratın PH'sının 3'e inmesine neden olur. Bu PH'da da aflatoksin üretimi inhibe olmaktadır. Horn and Wicklow (1983), mısırdaki, A.niger'in aflatoksin oluşumuna inhibitör etki yapan, suda çözülebilir bileşikler ürettiğini bildirmişlerdir.

A.flavus ve A.ochraceus'un birlikte aşılandığı mısırlarda, A.flavus'un A.ochraceus'a göre çok daha yüksek rekabet gücüne sahip olduğu görülmüştür. A.flavus birinci haftadan başlayarak mikrofloraya hakim olurken, A.ochraceus'un ancak beşinci haftadan itibaren önem kazandığı bildirilmiştir (Denizel, 1979).

Austwick and Ayerst (1963), Boller and Schroeder (1973), A.chevalieri'nin A.flavus ve A.parasiticus ile rekabet ederek aflatoksin oluşumunu azalttığını bildirmişlerdir.

## 4.2. Kimyasal Faktörler

### 4.2.1. Substrat

Mikotoksinlerin oluşumunda fungusun suşu kadar substratın yapısında önemlidir. Mikotoksin tipi ve mikotoksin üretim seviyesi substratın yapısına bağlı olarak değişmektedir.

Buğday, pirinç gibi yüksek karbohidratlı gıdaların, yerfıstığı ve pamuk gibi yağlı tohumlardan genellikle daha fazla aflatoksin oluşturduğu bilinmektedir. Bu durum, *Aspergillus* grubunun, yağlı tohumlardaki yüksek derecedeki yağı metabolize edemedikleri şeklinde yorumlanmaktadır (Ağaoğlu, 1985).

A.flavus'un basit karbohidratlar ve nişasta gibi polisakkaritlerin yanı sıra, karboksimetil selülozu karbon kaynağı olarak kullanabildiği saptanmıştır (Denizel, 1979).

Denizel ve ark. (1966), % 15 sukroz ve % 2 maya ekstretsi içeren yarı sentetik bir ortamda 600 mg/l'den fazla mikotoksin elde ettiklerini bildirmişlerdir. Daha



fazla miktarlarda toksin elde etmek için ise katı ortamların daha avantajlı olduğunu gözlemişlerdir.

Proteinlerce yüksek, karbohidratlarca düşük substratlar, A.parasiticus'un aflatoksin üretimini artırmazken, A.flavus az miktarda bulunan karbohidratları kullanabildiği için aflatoksin üretimi daha fazla olmuştur (Park and Bullerman, 1983).

Yaklaşık 25 °C'ta inkübasyon ile proteinler, fungal proteazlar ile aminoasitlerine parçalanırlar. Bu amino asitlerin bir kısmı nitrojen kaynağı olarak kullanılırken, karbon kaynaklarının az olduğu durumlarda ise bir kısmı karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Aminoasitler karbon kaynağı olarak kullanıldığında büyük bir miktarda amonyak serbest kalır. Serbest kalan amonyak ve metabolize olmuş diğer nitrojen kaynakları ise aflatoksin üretimini inhibe eder (Ellis et al., 1991).

A.ochraceus ve P.viridicatum tarafından arpada toksin üretiminin değişik protein seviyelerine bağlı olduğu saptanmıştır. Yüksek oranda protein içeren arpada toksin üretimi de fazla olmuştur. Üretimin özellikle glutamik asit ve prolin varlığında arttığı saptanmıştır (Betina, 1989). Glutamik asit, okratoksin A molekülünün hem fenil alanin, hem de isokumarin parçalarına birleştiği için A.ochraceus'un amino asit metabolizmasında hemen etkili olmadığı bildirilmiştir (Bacan et al., 1973).

Sitrinin, tahıl ve meyvelerde olduğu gibi katı veya sıvı ortamda fungal yöntemlerle de üretilebilmektedir. Birçok araştırmacı sentetik ve sıvı ortamlar kullanmışlardır. Birçoğu mısır likörü, maya ekstresi, pepton veya pa-

tates ekstresi ile zenginleştirilmiş kompleks ortamlar kullanılmışlardır (Betina, 1984).

Patulin üreten *Penicillium*lar ve *Aspergillus*lar için Czapek-Dox ortamı kullanılmıştır. Bu konuda Raulin-Thom ortamı da başarı ile kullanılmış ve 70 mg/l patulin elde edilmiştir. Patulinin yüksek oranda elde edilmesi ise kompleks ortamların kullanılması ile sağlanmıştır (Engel, 1975).

P.patulum ile Yeast-EXtract-Sukroz-Broth ortamında 700 mg/l konsantrasyonunda patulin elde edilmiştir. P.urticae ile Patates-Glikoz-Broth ortamında ise 1200-1700 mg/l patulin elde edilmiştir (Norstadt and Mc Colla, 1969).

Yapılan araştırmalar, ortamdaki karbohidratın niteliğine göre patulin oluşumunun da farklı olduğunu göstermiştir. Özellikle ortamdaki dekstroz, fruktoz gibi şekerler patulin oluşumunu artırmaktadır. Yapılan bir araştırmada P.urticae'nin, patates-dekstroz ortamında, patates-sakkaroz ortamına göre daha fazla patulin meydana getirdiği gözlenmiştir (Norstadt and Mc Colla, 1969).

Torres et al.(1987), P.griseofulvum'un patulin oluşturmasını ayrı ayrı glikoz ve sakkaroz içeren ortamda incelemişler ve sonuç olarak, glukozlu ortamda 28 °C'da 25 günde yaklaşık 1300 mg/l patulin oluşurken, aynı koşullarda sakkarozlu ortamda 300 mg/l patulin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Demeglou et al.(1985), yaptıkları araştırmada P.expansum'un malik asit içeren Czapek-DOX sıvı ortamında ancak 20.günden sonra gelişme gösterdiğini ve patulin oluşturmadığını saptamışlardır.

Özçelik (1982), P.expansum'un farklı karbohidrat içeren ortamlarda patulin oluşturmaları ile ilgili olarak yaptığı çalışmada 25 °C'da, PH 3,5'da ve 10 günlük inkübasyon süresi sonunda en fazla patulinin fruktoz içeren ortamda (887,5 µg/ml buyyon), sonra glukoz (537,5 µg/ml buyyon) ve en sonra da sakkaroz (7,2 µg/ml buyyon) içeren ortamda saptadığını bildirmiştir.

#### 4.2.2. Besin maddeleri

Gıda maddelerinin yapısında bulunan bazı besin öğeleri de mikotoksin oluşumunda önemli rol oynar. Örneğin, A.flavus grubundaki organizmalar, gıda maddelerinde bulunan sakkaroz, glukoz, ksiloz, riboz, gliserol ve fruktoz gibi karbohidratlardan yararlanarak aflatoksin oluştururlar. Mannoz ve ksiloz, A.parasiticus'un aflatoksin üretimini stimüle ederken A.flavus'un aflatoksin üretimini inhibe ettiği saptanmıştır (Mateles and Adye, 1965). Azot kaynağı olarak ta bazı durumlarda sadece inorganik azot kaynakları kullanılmaktadır. Buna ek olarak organik azot kaynağı bulunduğu anda ise aflatoksin üretimi maksimuma çıkmaktadır. İnorganik azot kaynaklarından  $(NH_4)_2SO_4$  ve  $KNO_3$ 'ün aflatoksin üretiminde önemli etkisinin olduğu saptanmıştır (Ağaoğlu)

Azot metabolizmasının en önemli yanı ise, A.flavus'un organik azottan nitrifikasyon yolu ile nitrit ve nitrat üretebilme yeteneğinde olmasıdır. Mikotoksin üreten fungusların azot kaynağı olarak  $NO_3^-$  veya  $NH_4^+$ 'ü tercih etmesi cinse göre değişiklik gösterir (Betina, 1989).

Tiwari et al.(1986), sentetik bir ortamda, A.parasiticus'un aflatoksin üretimine, doymuş ve doymamış yağ asitlerinin etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmalar

sonucunda, behenic, sebacic, linolenik ve linoleik asitlerin aflatoksin üretimini stimüle ettiğini bulmuşlardır. 50 mM'lık linoleik asit ile aflatoksin üretiminde 34 kat artış gözlenmiştir. Araştırmacılar çinkosülfat ve sodyum molibdat varlığında aflatoksin üretiminde bir artış olduğunu gözlemişlerdir.

A.flavus ve A.parasiticus, erken büyüme dönemlerinde etilen üretirler. Yine de aflatoksin biyosentezinin başlaması, etilen gelişiminin varlığı ile belirlenir. Etilen oluşturan bir bileşen olan 2-kloroetil fosforik asit, invivoda aflatoksin biyosentezini engeller (Betina, 1989).

80-400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda sodyum selenit varlığı ise A.parasiticus'un aflatoksin üretimini engeller (Bhatnager et al., 1986).

Glisin, glutamat, prolin, aspartik asit, alanin, glutamin gibi amino asitlerle,  $Cd^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{+}$  gibi minör besin maddeleri aflatoksin üretimini stimüle etmektedirler (Davis et al., 1967; Lee et al., 1986).

Hücre gelişmesi ve metabolizma için esas olan çinko, aflatoksin biyosentezi için de esastır. Riboflavin hariç, thiamin ve diğer B grubu vitaminler ile  $MgSO_4$  ve demir gibi mineral maddelerin aflatoksin üretimini stimüle ettiği belirlenmiştir (Ağaoğlu, 1985; Ellis et al., 1991).

Mikotoksin üretimini etkileyen iz elementlerden çinko ve manganezin en az 0,4 ppm olarak ortamda bulunması gereklidir. P.urticae'nin patulin üretebilmesi için kesin olarak manganeze ihtiyacı vardır. Patulin üretimine geçiş süresinde manganezin hücresel seviyeleri saptanmış ve kontrol sınırları belirlenmiştir (Scott, 1986).

#### 4.2.3. Antifungal amiller

1.3.5-triarylpirazolin ve ilgili pirazolinlerin düşük konsantrasyonları, A.flavus'un aflatoksin üretimini inhibe ettiği, fakat A.parasiticus'da ise T-2 toksini, çok düşük dozlarda stimüle ettiği saptanmıştır (Betine, 1989).

Amino benzoik asit, sülfamil amil ve anthronilik asitin aflatoksin üretimini engellediği saptanmıştır (Ağaoğlu)

Fungal gelişmeyi inhibe eden bazı bileşikler, mikotoksin sentezini etkilemektedirler. Propionik asitin A.flavus'un gelişmesini engellediği görülmüştür (Ellis et al., 1991). Sorbik asit, P.requeforti'nin hassas suşlarının tamamını, dirençli suşlarını ise büyük ölçüde inhibe eder. Sorbik asidin, A.flavus ve A.parasiticus'un misel gelişimini yavaşlattığı ve toksin üretimini inhibe ettiği bilinmektedir. Bununla beraber sorbik asitin, inhibitör seviyelerinin altındaki seviyeleri aflatoksin üretimini stimüle etmektedir (Garies et al., 1984; Yousef and Marth, 1983).

Potasyum sorbat, A.parasiticus, A.flavus, A.ochraceus ve Penicillium spp.'lerinin gelişmesini ve spor oluşturmalarını engellemiştir. Potasyum sorbat A.sulphureus ve P.viridicatum tarafından okratoksin A'nın üretimini engellemektedir (Kıvanç, 1990).

Fenil alaninin, karaciğer kültür hücrelerinde okratoksin A'nın toksik etkisini engellediği, farelerde akut zehirlenmeyi önlediği ve prenatal teratojenik etkileri azalttığı bildirilmiştir (Mayura, 1984).

Sitrinin üretimi üzerinde çok fazla etkisi olan 400 µg/ml'lik etionin, büyüme üzerine etkisizdir (Betina and Binouski, 1979). Kültüvasyonun üçüncü gününde ortama etionin eklenmesi ise sitrinin üretimini bloke eder. Sekizinci günde etionin eklenmesinin etkileri ise daha az belirgin olmakla birlikte sitrinin biyosentezinin fazla etkilenmediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar dolaylı yoldan da olsa; etioninin sitrinin sentezini bloke ettiğini; üretimin ilk maksimumundan sonra, büyüme ortamındaki sitrinin seviyesinin düşmesinin mikotoksinin bir biyolojik transformasyonu nedeni ile olduğunu göstermiştir (Petterson and Demoglou, 1987).

#### 4.3. Çevresel Faktörler

##### 4.3.1. Sıcaklık

Mikotoksin oluşumunda bağlı nenden sonra en önemli faktör ortamın sıcaklık derecesidir. Küflerin gelişebildiği sıcaklık dereceleri, oldukça geniş sınırlar arasında olmasına rağmen, mikotoksin oluşumunun genellikle optimum sıcaklık derecesi civarında en üst düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Ağaoğlu, 1985).

A.flavus ve A.parasiticus'un 25-30 °C sıcaklık aralığında en yüksek seviyede toksin ürettiği bilinmektedir. 10 °C'ın altındaki sıcaklıklarda toksin üretilmez iken, 40 °C'ta ancak eser miktarda toksin üretilmektedir. Bu sonuçlar, A.flavus ve A.parasiticus'un 25 izolatında, toksin üretimi için ısı miktarı çalışmalarına dayanarak belirlenmiştir (Ağaoğlu, 1985).

Yaygın depo küflerinin gelişmesi için gerekli olan minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerleri (Çizelge 4.1)

5-55 °C arasındadır (Christensen, 1974).

Çizelge 4.1. Bazı depo küflerinin gelişmesi için gerekli sıcaklıklar (Christensen, 1974)

Fungus	Gelişmesi için gerekli sıcaklık °C		
	min.	opt.	max.
<i>Aspergillus restrictus</i>	5-10	30-35	40-45
<i>A.glaucus</i>	0-15	30-35	40-45
<i>A.candidus</i>	10-15	45-50	50-55
<i>A.flavus</i>	10-15	40-45	45-50
<i>Penicillium spp.</i>	5-10	20-25	35-40

25 °C'ta 42 gün depolanan ve *A.parasiticus* ile aşılana n piri nçlerde, danelerin % 56,5 inde *A.parasiticus* görülürken, % 19,5 inde *A.glaucus*'un hakim olduğu görülmüş tür. 30 °C'ta aynı süre depolanan danelerin % 91'i *A.parasiticus* tarafından infekte edilmiştir. 35 °C'ta depolanan danelerde ise % 95 oranında *A.parasiticus* hakim olmuştur (Uzunboy, 1984).

25-30 ve 35 °C'ta inoküle edilmeden depolanan piri nçlerde, aflatok sine rastlanamadığı; tüm bu sıcaklıklarda *A.glaucus* grup üyelerinin hakim olduğu, 42 gün sonra, 25°C'ta *A.candidus* türlerinin danelerin % 33'ünü, 30 °C'ta % 35'ini ve 35 °C'ta ise % 53'ünü infekte ettikleri görülmüştür (Boller and Schroeder, 1973).

*A.ochraceus*'un okratoksin üretimi için minimum sıcaklık isteği 12 °C, *P.viriticatum*'un ise minimum sıcaklık isteği 4 °C, optimum sıcaklık isteği 24 °C'tır (Tang and Proughan, 1985).

Sommer et al.(1974); yaptıkları çalışmada *P.expansum*'un Patates Dekstroz sıvı ortamında, 0 °C'da yavaş da olsa patulin oluşturabildiğini açıklamışlardır.

Nordholt et al.(1978), yaptıkları çalışmada ,besiyeri ortamında patulin oluşumunda sıcaklık sınırlarını P.expansum için 0-24 °C, P.patulum için 4-31 °C ve C.clavatus için 12-24 °C olarak saptadıklarını belirtmişlerdir.

Lindroth et al.(1978), P.expansum ile aşıl原因an reçellerde 4°C ve 22 °C'da patulin oluşumunu incelemişler ve 4 °C'ta 22 °C'dakinden daha az patulin oluşmasına rağmen sonuç olarak her iki sıcaklık derecesinde de patulin üretilebildiğini saptamışlardır.

Bullerman (1985), P.patulum'un Yeast-Extract-Sucroz (YES) ortamında, 5°C'da, 28 günde ve PH 6,5'da 1,8 µg/ml patulin oluşturduğunu tesbit etmiştir.

#### 4.3.2. Su aktivitesi

Büyüme ve mikotoksin üretimi düşük ısı, düşük su aktivitesi ( $a_w$ ) ve yüksek ısı ile sınırlanır. Buna rağmen yüksek su aktivitesi büyümeyi ve toksin oluşumunu etkilemez. Büyüme için minimum sıcaklıkta 0,95 su aktivitesine gereksinme vardır. 15-20 °C arasındaki düşük sıcaklıklarda su aktivitesi 0,975 iken, yüksek sıcaklıklarda optimum su aktivitesi 0,95'dir.

Depolanan ürünlerde gelişen küf mantarlarının gelişebildikleri en düşük su aktivitesi değeri ile toksin oluşturdukları su aktivitesi değerleri arasında belirgin bir farklılık vardır. A.flavus'un toksin oluşturması için gerekli  $a_w$  değeri, sporlarının çimlenmesi için gerekli olan  $a_w$  değerinden daha yüksektir (Ağaoğlu.,1985).



Depolanan ürün neminin % 18'den az, % 40'dan fazla olması A.flavus'un gelişmesini inhibe eder. Çünkü, bu nemde gelişmekte olan küf mantarları ile rekabete girememektedirler. Aspergillus cinsleri % 13,2-18 arasındaki nemde depolanan hububatlarda aktiftir (Ağaoğlu , 1985).

A.parasiticus ile inoküle edilen pirinçlerde aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı, 0,75 ve 0,80 a<sub>w</sub> değerlerine sahip pirinçlerde çok düşük olarak saptanırken, 0,85 a<sub>w</sub> değerine sahip pirinçlerde daha fazla saptanmıştır. Buna göre A.parasiticus'un pirinç üzerindeki gelişmesi ve buna bağlı olarak ta aflatoksin oluşturması su aktivitesine bağlıdır (Boller and Schroeder, 1974).

A.ochraceus'un toksin oluşturabilmesi için minimum su aktivitesinin 0,83-0,87 arasında olması gerekir. P.viridicatum'un toksin üretmesi için optimal a<sub>w</sub> değerinin 0,95 olduğu bildirilmiştir (Tang and Proughan, 1985).

Patulin oluşumu için minimum su aktivitesi değeri, P.expansum için 0,99; P.patulum için 0,95 ve A.clavatus için 0,99 olarak belirtilmiştir (Northolt et al., 1978).

Lindroth et al. (1978), P.expansum ile aşılansak 22 °C'ta depolanan, % 20 ve % 44 sakkaroz ilave edilerek farklı seviyelerde su aktivitesi içeren çilek reçellerinde, patulin miktarı ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Sonuç olarak, ilk iki aylık depolama sonucunda su aktivitesi değeri 0,98 olan ve sakkaroz ilave edilmemiş örnekte maksimum patulin miktarı 477,8 mg/kg olarak saptanmışken, su aktivitesi 0,96 (% 20 sakkaroz) olan örnekte 41,2 mg/kg, su aktivitesi 0,94 (% 44 sakkaroz) olan örnekte ise 6,9 mg/kg patulin saptamışlardır.

#### 4.3.3. Atmosferik gazlar

Funguslar, aerobik organizmalardır, fakat oksijen ve karbondioksit ihtiyaçları arasındaki ilişki, tür ve suşa bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterir. Atmosferik oksijenin % 20'den daha aşağıya düşmesi veya % 90 ve daha yukarıya çıkması aflatoksin oluşumunu inhibe etmektedir (Shih and Month, 1973).

Nitrojen konsantrasyonundaki artışında aflatoksin oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir (Epstein et al., 1970).

Orth 1974 yılında yaptığı bir çalışmada, atmosferdeki % 40 ve üzerindeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun küf gelişimini ve buna bağlı olarak toksin oluşumunu azalttığını ve % 90 CO<sub>2</sub> bulunan ortamda mikotoksin oluşumunun saptanamadığını belirtmiştir. Ayrıca % 2'lik oksijen (O<sub>2</sub>) konsantrasyonunun da fungal gelişmeyi etkilememekle birlikte toksin oluşumunu azalttığını ve O<sub>2</sub> konsantrasyonunun % 0.2 olması durumunda ise gelişme ve toksin yapımının saptanamadığını belirtmiştir (Northolt and Bullerman, 1982).

Lindroth et al. (1978), yaptıkları araştırmada, normal atmosferde (% 0,3 CO<sub>2</sub>) ve 22 °C'da muhafaza edilen P.expansum ile aşılansmış siyah frenk üzümü reçellerinde toksin miktarının 6 aylık depolama sonunda 738,4 mg/kg bulunmasına karşın % 10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda bu miktarın ancak iki ay içerisinde max. 88.2 mg/kg olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

#### 4.3.4. PH

Mikotoksin oluşumu için PH sınırları 2,5-6,5 arasında değişmektedir. Mikotoksin üreten fungusun özelliğine göre optimum PH sınırları farklılık göstermektedir. Demoglou and Campbell (1986), yaptıkları bir çalışmada P.expansum için 25 °C'ta optimum PH'nin 3,2 ile 3,8 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Özçelik (1982), P.expansum'un % 10 glukoz içeren Czapek-Dox sıvı ortamda 25 °C'ta 14 günde en fazla patulini PH 3,5 da oluşturduğunu saptamıştır.

Bullerman (1985), yaptığı çalışmada Yeast-Extract-Sukroz sıvı besiyerinde P.expansum'un 25 °C'ta en fazla patulini PH 6,4'da (708 µg/ml) oluşturduğunu PH 3,5 da ise 693,6 µg/ml patulin oluşturduğunu bildirmiştir.

#### 4.3.5. Işık

Işık, bir çok küf türünün büyüme ve sporulasyonunda temel bir etkidir. Katı ve sıvı ortamlardaki toksijenik küflerin aflatoksin üretimini ve vejetatif büyümesini etkilemektedir. Işık, fotokimyasal etkisinden dolayı türler üzerine stimülatör ve inhibitör etki yapmaktadır.

Bennet et al. (1978), A.flavus ve A.parasiticus'un karanlık ve aydınlık ortamda spor oluşturduğunu; fakat ışıklı ortamda spor oluşumunun karanlık ortama göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, küflerin sıcak ortamlarda ışığa karşı daha hassas olduklarını, yüksek ve düşük sıcaklıklarda aflatoksin üretiminin inhibe edildiğini; fakat optimum (20-25 °C) sıcaklıklarda inhibe edilmediğini bildirmişlerdir (Ellis et al., 1991).

Kullanılan substratın cinsi de ışığa karşı olan duyarlılığı ve aflatoksin üretimini etkilemektedir. Reiss (1975), ekmekte aflatoksin üretimine ışığın etkisinin olmadığını bildirmiştir. Joffe and Lisker (1969), Czapek ortamda, ışığın aflatoksin üretimini tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Ellis et al., 1991).

## 5. MİKOTOKSİNLERİN ETKİLERİ

### 5.1. Biyokimyasal Etkileri

Claviceps purpurea'nın sclerotiumlarının tüketimi sonucu ortaya çıkan ergotizm, bilinen ilk mikotoksikozislerdendir. Ergotizm uzun yıllardan bu yana bilinmekle birlikte mikotoksinler ve mikotoksikozisler üzerindeki çalışmalar son yıllara kadar yetersiz kalmış, ancak 1960'lı yıllarda hayli karsinojenik olan aflatoksinlerin bulunması ile bu konudaki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Nitekim bu tarihten itibaren tüm mikotoksin ve mikotoksikozisler geniş bir şekilde ele alınarak bunların insanlar ve hayvanlar üzerindeki hepatoksik, nefrotoksik, dermatoksik, nörotoksik, karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve diğer biyolojik etkileri ile metabolizma üzerindeki biyokimyasal etkileri üzerinde araştırmalar hız kazanmış ve birçok mikotoksinin insan ve hayvanlarda etyolojisi bilinmeyen hastalıkların etmeni olabileceği belirlenmiştir (Chu, 1977).

Mikotoksinlerin etki şekli, hayvan organlarından serbest hücreli sistemlere kadar değişik seviyelerde çalışılmıştır. Metabolizmanın belirli 3 bölgesinin toksinler tarafından etkilendiği gözlenmiştir. Bunlar, glikoneojenezis, mitokondrial transport sistemi ve protein sentezidir.

#### 5.1.1. Enerji metabolizmasına etkileri

Purchase and Theron (1968), fare karaciğer hücrelerinin stoplazmalarında, okratoksin A'nın neden olduğu glikojen birikiminin bulunmuşlardır. Bu, toksin tarafından fosforilaz sisteminin bozulması ile ilgili düşüncelerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Fosforilaz enzim sisteminin okratoksin A tarafından inhibisyonu Pitovt (1968) tarafından

gözlenmiştir, fakat glikomutaz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz veya hekzokinazın inhibisyonu gözlenememiştir (Betina, 1989).

Hemilton et al., (1977), hepatik glikojenin birikimi sonucu etlik piliçlerde, glikojen depolama hastalığı gözlemişlerdir. Bunun aksine Japon araştırmacılar ise, okratoksin A verilen farelerde hepatik glikojende bir azalma, serum glukozu, serum laktatı ve karaciğer laktatında artma gözlemişlerdir.

Aflatoksinlerin mitokondrial solunum zincirine de zararlı etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Aflatoksin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> ve M<sub>1</sub>'in etkileri sitokrom b ve c arasında oluşan bir seri etkiye dayanarak açıklanmıştır. Fakat ortamlarda adenozin trifosfat enziminin aktivitesini inhibe ederek, adenozin trifosfat üretiminin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Betina, 1989).

#### 5.1.2. Karbohidrat ve lipid metabolizmasına etkileri

Endo and Kurada (1976), fare karaciğerinde, kolesterol ve trigliserid biyosentezinde sitrininin inhibitör etkilerini göstermişlerdir. Sonraki deneylerde fare karaciğerinden bir hücre serbest sistemde sitrinin işaretlenmiş asetatin non-saponifiable (bir esteri asit ve alkolde ayırtırmak) lipidlere birleşmesini engellemiş, fakat işaretlenmiş molanatin birleşmesini engellememiştir. Kolesterol biyosentezinde bulunan enzimler arasında iki tanesi, asetoasetil Co.A.tiolaz ve 3-hidroksi-3-metil glutari Co.A.redüktaz özellikle inhibe edilenlerdendir. Buğdaydan alınan bir hücre, serbest sistemde inhibisyon için yüksek konsantrasyonların varlığına gereksinim duymasına rağmen aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Kümes kanatlılarında aflatoksinler ağızdan alındığında, karaciğerde lipid miktarının artması sonucunu doğuran lipid metabolizmasında değişme ve karkas yağında azalma meydana getirir. Bağışıklık sistemini etkileyerek bulaşıcı ajanlara karşı hayvanı daha da hassaslaştırmakta ve aşılamaı daha az etkin hale getirmektedir. Aflatoksikozis sırasında lipid emilmesinin zayıflaması ile birlikte yağda-eriyen-vitaminlerin eksikliğinin görülmesi de mümkündür (Akyıldız, 1979).

Başaran ve ark.(1990), aflatoksin B<sub>2</sub>'nin sıçanlar üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada kanserumunda glukoz ve total lipid seviyesinin önemli derecede düştüğünü bildirmişlerdir.

### 5.1.3. Nokleik asit (DNA ve RNA) ve protein sentezine etkileri

Aflatoksin B<sub>1</sub>'in karaciğer mikrozomal fraksiyonu, Pseudomonas aeruginosa'nın lizogenik hücrelerinde profajın indüksiyonuna neden olur. Lizogenik olmayan hücrelerde ise DNA sentezini önemli ölçüde engeller (Betina, 1989).

DNA ve RNA replikasyonu ile protein sentezinin aflatoksin B<sub>1</sub> tarafından engellendiği gözlenmiştir. Ayrıca hücre membranı ve oksidatif forforilasyon üzerine etkisinin olduğu da bilinmektedir (Betina, 1989).

Yapılan deneyler sonucunda aflatoksin B<sub>1</sub>'in yüksek reaktif metabolitlerinin, DNA'daki guanin artıklarının N-7 atomuna kovalent bağlanması ispatlanmıştır. Bu bağlanma DNA'nın ana görünüşü ile sonuçlanmaktadır. B-DNA'daki bir guaninin aflatoksin B<sub>1</sub>'e reaktivitesinin yapılması çift heliksteki purini çevreleyen temel seriye bağlıdır. Invivoda, aflatoksin B<sub>1</sub>'in tavşan karaciğer DNA'sına kova-

lent bağlanması, antioksidantların besinle verilmesi veya toksine karşı immunizasyon ile azaltılır (Betina, 1989).

Aflatoksin B<sub>1</sub> metabolitlerinin DNA'ya kovalent bağlanması DNA replikasyonunun, DNA sentezinin ve mutajenik aktivitenin inhibisyonu ile sonuçlandığı saptanmıştır.

Aflatoksin B<sub>1</sub> tarafından protein sentezinin inhibisyonu, değişik hayvanların değişik dokularında gözlenmiştir. İnvivoda fare karaciğerinde protein sentezinin inhibisyonunun zaman yönünden etkisinin iki basamağı gösterilmiştir. İnhibisyonun erken fazı, aflatoksinin polizomlar üzerine direkt etkisine neden olur (5 saatlik bir süre). Translasyonun uzaması ve sonlanmasının spesifik inhibisyonu gözlenir. Buna rağmen toksin veriminden 7 saat sonra hem m-RNA hem de r-RNA'nın azalmasına yol açan transkripsiyon zayıflamasının bir sonucu olarak protein sentezinin inhibisyonu görülür (Healtcote and Hibbert, 1978).

Aflatoksin B<sub>1</sub>'in karaciğer proteinleri üzerine etkileri araştırılmış ve sonuçta bazı spesifik protein seviyelerinde düşme, bazılarında artma, bazı enzim aktivitelerinde ve protein sentezinde değişimler olduğu gözlenmiştir (Betina, 1989).

Maisner (1983), besinleri ile okratoksin A alan farelerin böbreklerinde fosfoenol pürivat karboksikinaz (PEPCK) için taşınabilen m-RNA seviyesinin oldukça azaldığını bulmuştur. Toksin almış farelerden izole edilen nukleuslarda, total RNA veya PEPCK, m-RNA'nın transkripsiyon olayının toksin tarafından azaltıldığı görülmüştür.



Okratoksin A, invitro sistemde olduğu gibi prokaryotik ve evkaryotik hücrelerde de protein sentezini inhibe eder. Roschenthaler et al. (1978), Bacillus subtilis ve Streptococcus faecalis in protein sentezinde kuvvetli bir inhibisyon gözlemişlerdir.

Okratoksin A tarafından inhibe edilen reaksiyon, aminoasitatasyon reaksiyon (fenil alanin t-RNA sentezi) olduğundan, okratoksinlerin maya sistemlerde protein sentezini fenil alanin-t-RNA sentez katalizasyon reaksiyonunda fenil alanil ile geri çevrilebileceği açıklanmıştır (Creppy, 1979).

Benzer sonuçlar karaciğer kültür hücrelerinde de elde edilmiştir. Protein sentezindeki okratoksin A teşvikli inhibisyonun hücre kültür ortamında fenil alanil bulunduğunda tamamen engellendiği gösterilmiştir. Okratoksin A'nın (1-15 mg/kg) intraperitoneal dozlarına protein oluşumunun duyarlılığı daha sonra fare, karaciğer, böbrek ve dalağı için saptanmıştır. Protein sentezinin inhibisyonu, dalak ve böbrekte karaciğerdekinin 2-3 kat fazlasıdır. Okratoksin A ile birlikte fenil alanin injeksiyonu tüm organlardaki protein sentez inhibisyonunu ortadan kaldırmaktadır (Creppy, 1984).

Karaciğer kültür hücrelerinde okratoksin A ve sitriinin birleşik etkileri, hücresel protein, RNA ve DNA sentezinde bu iki toksinin birleşik ve tektek olan etkileri araştırılmıştır. Okratoksin A varlığında, protein sentezi toksinin eklenmesinden 30 dakika sonra, RNA sentezi 150 dakika sonra inhibe edilirken, DNA sentezinde en az 5 saat süre ile inhibisyon oluşmadığı saptanmıştır. Sitriinin ilk olarak RNA sentezini, daha sonra protein sentezini ve en son DNA sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir (Creppy, 1980).

Sitrininin, E.coli RNA polimerazı inhibe ettiği ve RNA polimeraz I ile karşılaştırıldığında tercihen eukaryotik RNA polimeraz I'i inhibe ettiği belirlenmiştir (Terao and Ueno, 1978).

Sitrininin, 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunun sitostatik, 50-200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarının ise sitotoksik etkili olduğu; 100 $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda hücrelerdeki RNA, protein ve DNA sentezini inhibe ettiği saptanmıştır. RNA inhibisyonunun 5-7 dakikada, protein sentezi inhibisyonunun 12 dakikada, DNA sentezi inhibisyonunun ise 2 saatte olduğu bildirilmiştir. Bu bilgiler sitrininin RNA sentezini protein sentezinden daha hızlı etkilediğini göstermektedir. İzole çekirdeklerde 100  $\mu\text{g/ml}$  sitrininin, RNA polimeraz I'i % 60 oranında, RNA polimeraz II'yi ise % 24 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir (Terao and Ueno, 1978). RNA polimeraz I, r-RNA sentezinden sorumlu olduğundan bunun inhibisyonu total RNA sentezinde azalma olarak çok çabuk görülür hale gelir. Eukaryotik m-RNA'ların yarılanma ömürleri uzun olduğunda; m-RNA sentezinden sorumlu olan RNA polimeraz II aktivitesindeki bir düşüşün, protein sentezinde hızlı bir etki göstermeyeceği düşünülmektedir (Roedar et al., 1976).

Sitrinin ve okratoksinin, küf kontamineli maddelerde aynı oranda oluşabildiği ve her ikisinin de karaciğer kültür hücreleri üzerine sitotoksik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bunların, hücrel protein, RNA ve DNA sentezi üzerindeki tek veya birleşik etkileri incelenmiştir. Sitrininin, RNA sentezini 10 dakika, protein sentezini 20 dakika sonra ve DNA sentezini ise 120 dakika sonra inhibe ettiği bulunmuştur. Halbuki okratoksin A'nın varlığında protein sentezi 30 dakika, RNA sentezi ise 150 dakika sonra inhibe edilirken en az 5 saat sonra DNA sentezinde inhibisyo-

nun oluşmadığı bildirilmiştir. Karaciğer kültür hücrelerine her iki mikotoksin birlikte verildiğinde, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu hemen, DNA'nınki ise kısa bir süre sonra olduğu saptanmıştır (Creppy et al., 1980).

Patulinin, DNA'da sürekli tek kenar kırıklarına neden olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar insan ve hayvan hücre kültürleriyle yapılan deneylerden de elde edilmiştir (Umeda et al., 1972).

Patulinin, E.coli'de DNA'ya zarar verdiği belirlenmiştir. Canlı hücrelerde 10 µg/ml konsantrasyonunda patulin DNA'da tek kenar kırıklarına neden olur. Mililitrede 50 µg patulinin uygulanmasında ise çift kenar kırıkları gözlenmiştir. Patulin seçici DNA hasar verici aktiviteye sahip bir mikotoksindir (Lee and Röschenhaler, 1986).

RNA sentezinin patulin ile inhibisyonu araştırılmış ve patulinin invitroda DNA sentezleme sisteminin aktivitesini değiştirdiği gözlenmiştir. Patulin, özellikle transkripsiyonun başlangıç basamağındaki RNA polimerazın aktivitesini bozduğu saptanmıştır (Movla and Hatay, 1977).

Patulinin protein sentezini de direkt olarak bozduğu görülmüştür. Çünkü, bir serbest hücre protein sentezleme sistemine toksinin eklenmesi amino asit birleşmesini engellemektedir. Patulinin translasyonu, polizomları değiştirmekten ziyade pH 5'de enzim fonksiyon aktivitesini bloke etmekle bozduğunu düşündürmüştür (Maule et al., 1978).

## 5.2. Biyolojik Etkileri

### 5.2.1. Kanserojenik etkileri

Kanserojen olarak en iyi bilinen mikotoksinler aflatoksin, sterigmatoksin, patulin ve luteaskirindir. Bun-

lardan en fazla kanserojenik etkiyi aflatoksin göstermektedir ve sentetik kanserojen maddelerden 100 kat daha etkili olduğu bildirilmiştir (Ahrens, 1977).

İnsan ve ördeklerde küflü yiyeceklerden dolayı ölümlerde saptanmıştır. Aflatoksin B<sub>1</sub> en yaygın hepatokarsinojen olarak belirlenmiştir. Aflatoksin B<sub>1</sub>'in fare, sıçan, maymun, ördek ve gökkuşuğu alabalıklarında habis tümörlere neden olduğu saptanmıştır (IARC, 1976). Aflatoksinlerin hedef organı karaciğerdir, fakat diğer organ tümörleri de gözlenmiştir. Besindeki 1 mg/kg kadar düşük bir dozun bile farelerde karaciğer tümörlerine neden olduğu bildirilmiştir (Betina, 1989).

İnsanlardaki karaciğer kanserinin, kontamine yer fıstığı ve tahıl ile beslenme sonucunda oluştuğuna dair Afrika'da birçok bildiri vardır. Mozambik, Tayland'ın bir kısmı, Kenya, Filipinler gibi karaciğer kanserinin yüksek sıklıkta olduğu bölgelerde çok miktarda aflatoksin tüketimi belirlenmiştir. Bu ülkelerdeki epidemiyolojik çalışmalardan, fazla miktarda aflatoksin ile beslenme ve karaciğer kanseri arasında bir doğru ilişki bulunmuştur (Carlborg, 1979).

Hollanda'da yer fıstığı ve keten tohumu işleme fabrikalarındaki işçilerde görülen kanser sıklığının aflatoksin bulaşmış tozların solunumu ile ilişkili olduğuna dair deliller bulunmuştur (Burge et al., 1981). Güneydoğu Amerika hakkında yapılan bir çalışmada; aflatoksin bulaşmış mısır ürünlerinin tüketimi ile ilgili karaciğer kanserinde önemli bir artış gözlenmiştir (Betina, 1989).

Okratoksin A, erkek B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub>'lerde renal kanserojen ve bu suşun dişilerinde hepatik kanserojen olarak etkili olduğu bildirilmiştir (Bendole, 1985).

Sitrininin bilinen kanserojenik ve mutajenik özelliklerinin, makromoleküler sentez üzerindeki zararlı etkileri ile ilgili olduğu düşünülmüştür (Betina and Barth, 1980).

Patulin ile yapılan araştırmalar sonucunda ise patulinin doymamış lakton yapısı nedeni ile kanserojen bir madde olduğu bulunmuştur (Enomoto and Saito, 1972). Patulinin karaciğer, dalak, böbrek, gastro-intestinal sistem ve dolaşım sistemi hastalıklarına yol açtığı saptanmıştır (Lindroth, 1980).

#### 5.2.2. Mutajenik etkileri

Aflatoksin B<sub>1</sub>'in Salmonella typhimurium'un histidine gerek duyan suşları için mutajenik olduğu bulunmuştur. Diğer aflatoksinlerin mutajenitesi E.coli, S.typhi veya Photobacteriumphasphareum gibi mikroorganizmalar kullanılarak araştırılmıştır. Toksinlerin mutajenik etkileri P.phasphareum'un koyu esmer mutantı kullanılarak saptanmıştır. Bacillus thruringiensis var. tolworthi'nin lizogenik hücrelerine aflatoksin B<sub>1</sub> uygulanması, uzamış hücrelerin oluşmasına ve profaj safhasının oluşumuna yol açan olaylara neden olduğu bildirilmiştir (Auffray and Boutibonnes, 1985).

Saccharomyces cerevisa'nın öldürücü bir suşunda (duyarlı suşları öldüren, glikopeptid toksin oluşturan) 10-20 µg/ml aflatoksin B<sub>1</sub> uygulanması, toksik glikopeptid üretmeyen 3 yeni fenotipin oluşumuna sebep olduğu görülmüştür.

Aflatoksinlerin insan lökositlerinde mutajenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Eser ve ark., 1978).

İnvivo ve invitroda, bakterial kromozomal DNA ve plazmid DNA'sı üzerinde sitrininin etkisi araştırılmıştır. Sitrininin E.coli'de değişik konsantrasyonları şu etkilere sahiptir: İnvivoda 100 µg/ml dekromozomal-DNA'da basit kenar kırıkları oluşur. 100 µg/ml varlığında, U.V. teşvikli DNA tam büyüme ortamına gerek duymadan bakteri hücresi içinde onarılır. 300 µg/ml λ profaj bir lizogenik E.coli suşuna yöneltilir. F lac.plazmid taşıyan bir E.coli suşunda ml başına 200 µg sitrinin uygulandığında hücrelerin % 4.7'si Lac<sup>-</sup> fenotipi göstermiştir (Betina, 1989).

### 5.2.3. Teratojenik etkileri

200 µg aflatoksin verildiğinde, sıçan fetüslerinin ve bazen gebe ratların kendilerinin de öldüğü görülmüştür. Gebeliğin sekizinci gününde intraperitoneal, 4 mg/kg hesabıyla, hamsterlere verilen aflatoksin B<sub>1</sub>, yüksek oranda kötü şekillenmiş, reabsorbe olmuş ve ölmüş fetüslerin meydana gelmesine yol açmıştır (Ağaoğlu, 1985).

Okratoksinlerin embriyo toksisitesi ve teratojenik etkileri, tavuk embriyosu ve Brachidonio rerio kullanılarak gözlenmiştir (Debeaupuisse, 1984). Teratojenik etkiye sahip olduğu fare ve sıçanlarda da gözlenmiştir (Hayashi and Kameyama, 1982).

### 5.2.4. Hepatoksik etkileri

Aflatoksinler canlı vücuduna çeşitli yollarla alındıktan sonra karaciğerde metabolize edilerek daha az toksik türevlere dönüştürülür. Koyun, keçi, inek, sıçan, maymun, domuz ve tavuk gibi deney hayvanları üzerinde yapılan deneylerde aflatoksin B<sub>1</sub>; aflatoksin M<sub>1</sub>, P<sub>1</sub> ve Q<sub>1</sub>'e; aflatoksin B<sub>2</sub>; aflatoksin M<sub>2</sub>'ye; aflatoksin G<sub>1</sub> ise aflatoksin M<sub>1</sub>'e

dönüştürülerek idrar ve sütle vücuttan dışarı atılmaktadır (Wyllie and Marehause, 1977; Gote and Hsieh, 1985).

Deneysel olarak standart aflatoksin verilen koyunların karaciğer, böbrek ve idrarlarında, yine aflatoksin B<sub>1</sub> içeren saman ve yerfıstığı ile beslenen ineklerin sütlerinde aflatoksinler tesbit edilmiş ve bunların karaciğer lezyonlarına neden oldukları saptanmıştır (Alcroftt et al., 1966; Goto and Hsieh, 1985).

Aflatoksinlerle meydana gelen zehirlenmeyi takiben, karaciğerde oluşan hücre sel değişiklikleri saptamak amacıyla invitroda denemeler yapılmıştır. Bu amaçla; ördeklere 15 µg toksin uygulanmış, sonuçta ise karaciğer yüzeysel hücrelerinin üremeleri için indüklendikleri ve hücrelerde yağlı bozunmaların yaygınlaştığı gözlenmiştir (Butler, 1964).

Fareler 0,1 mg aflatoksin içeren diyetle beslendikten sonra incelendiklerinde, girintili çıkıntılı bir yapısal özellik gösteren endoplazmik retikulumun şiştiği ve hücre sel organelin bulunduğu yerden hareket ettiği saptanmıştır. Aynı konuda yapılan bir diğer çalışmada ise 0,45 µg/kg aflatoksin B<sub>1</sub> farelere oral olarak verilmiş ve 24-72 saat sonra, hayvanın karaciğer hücrelerinin nukleus ve stoplazmasındaki protein ve RNA miktarlarında azalma olduğu gözlenmiştir (Sporn and Dingman, 1966).

Aflatoksinlerin karaciğerde oluşturdukları hasar sonucu plazmadaki laktik dehidrogenoz, aldolaz, glutamik-pruvik trans aminaz aktivitelerinde artış olduğu gözlenmiştir. Serumda bu enzimlerin faaliyetlerinin artması sonucunda ise karaciğer lezyonlarının oluştuğu saptanmıştır (Eriş, 1989).

Galtier et al. (1984), farelere oral olarak 15 kez okratoksin verilerek sağlanan okratoksikozdan sonra karaciğer

enzim aktivitesinin düştüğünü gözlemişlerdir.

Birçok protozoa, fungus, memeli hayvanlar, bitkiler, HeLa hücreleri ve virüslere toksik olmasına ek olarak patulinin antimitotik ve karsinojenik olduğu bilinmektedir. Sıçanlara haftada iki kez 0,2 mg subkuten verilmesi enfeksiyon bölgesinde malignant tümörlerin oluşumuna neden olmuştur. Fakat ölüm dozunun altındaki dozlarda oral uygulama fare ve sıçanlarda karsinojenik etki göstermemiştir. Patulin ve diğer mikotoksinlerin karsinojenik etkilerinin DNA etkileşimi ile olduğu belirlenmiştir (Ueno and Kubato, 1976).

#### 5.2.5. Toksik etkileri

Gıda ve yem maddelerinde, kalite ve kantite yönünden olduğu kadar insan ve hayvan sağlığı açısından da önemli olan küflerin toksik metabolitlerinin neden olduğu zehirlenmelere mikotoksikozis denilmektedir. Aflatoksikozis, gıda ve yem maddelerinde A.flavus ve A.parasiticus'un metaboliti olan aflatoksin tarafından oluşturulan, insan ve hayvanlarda akut veya kronik bozukluklara ve özellikle deney hayvanlarında karaciğer tümörlerine neden olan bir mikotoksikozistir. (Ağaoğlu, 1985).

Mikotoksinlerin biyolojik etkileri çeşitlidir. Hayvanlardaki akut toksisitesi türden türe hatta hayvanın cinsiyetine göre değişir. Örneğin erkek fareler aflatoksin B<sub>1</sub>' e dişilerden daha duyarlıdır (Arda, 1980).

Ciegler (1975), aflatoksin B<sub>1</sub>'in tek doz oral olarak verilmesinden sonra, hayvan türlerinin LD<sub>50</sub> olarak



belirlenen aşağıdaki duyarlılık sırasını vermiştir. Ördek yavrusu 0,3-0,6; domuz 0,6; alabalık 0,9; köpek 1,0; Gine domuzu 1,4-2,0; koyun 2,0; maymun 2,2; fare 4,5-17,9; civciv 6,3; (mg/kg vücut ağırlığı).

Dört ana aflatoksin arasında en fazla akut toksisitesi olan aflatoksin B<sub>1</sub>'dir. Bunu G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub> izler. Bir günlük ördek yavrularında LD<sub>50</sub> değerleri (µg/50 gr vücut ağırlığı) şöyledir: B<sub>1</sub> 18,2; G<sub>1</sub> 38,2; B<sub>2</sub> 84,8; G<sub>2</sub> 175,5 (Carnagha, 1963).

Bir günlük ördek yavrularında (µg/ördek yavrusu aflatoksin B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> için LD<sub>50</sub> değerlerinin karşılaştırılması sırası ile 230; 16,6 ve 62,0 olarak bildirilmiştir. Aflatoksin B<sub>3</sub> ördek yavrularına oldukça toksiktir. Hayvanlarda aflatoksin B<sub>1</sub> in bir metaboliti olarak bilinen aflatoksikolün belirli hayvan deneylerinde çok toksik olduğu ortaya konmuştur. Sıçanlarda B<sub>1</sub> in anametaboliti olan aflatoksin P<sub>1</sub> ise farelerde hafif toksiktir ve civciv embriyo testi ve Salmonella typhimarium testinde nontoksiktir (Buchi, 1974).

Okratoksin A, güçlü bir nefrotoksindir ve Danimarka'da domuzlarda ve Balkan ülkelerinde insanlarda görülen nefrotik sendromlarda rol almaktadır. Renal fonksiyonların okratoksinler ile bozulması, son zamanlarda mikotoksinlerin toksikolojisi ile ilgili çalışmalarda tanımlanmıştır (Ueno, 1985).

Okratoksin A içeren diyetle beslenmiş domuzlarda böbrekler, kas dokuları ve adipoz doku pişirmeden önce ve sonra incelenmiştir. Pişirme sırasında mikotoksinin yaklaşık % 20'si kaybolmaktadır. Fakat adipoz doku da toksin kaybı olmadığı saptanmıştır (Josefsson and Moller, 1980).

Okratoksin A'nın kümse hayvanlarında demir eksikliği anemisine neden olduğu ve farelerde koyun eritrositlerine karşı immun cevabı inhibe ettiği gösterilmiştir (Haubeck, 1981).

Okratoksin A , öncelikle nefrotoksin olduğundan domuzlarda, kümes hayvanlarında ve insanlarda nefrotoksik sendromlarda bulunmaktadır. Danimarka'daki domuzlarda nefropati yaygınlığı oranı ile besinlerdeki okratoksin A oranı arasında doğrusal ilişki vardır (Kragh et al., 1973).

"Balkan Endemik Nefropati" Yugoslavya, Romanya ve Bulgaristan'daki kırsal alanlarda yerleşmiş insanları endemik olarak etkileyen öldürücü kronik bir hastalıktır. Balkan nefropatinin yaygın olduğu Yugoslavya'nın bir bölgesinde besinlerde yüksek sıklıkta okratoksin A kontaminasyonu bulunmuştur. Polonya tahıl ve yemlerinde okratoksin A, sitrinin, sterigmatosistin, penicillik asit ve toksijenik fungusların geniş yayılımı bildirilmiştir (Betina, 1989).

Sintirininle ilk toksikolojik ve farmakolojik çalışmalar, 1940-1950 yıllarında yapılmış ve nefrotoksitesi daha sonra 1970 yılında ortaya çıkarılmıştır. Sitrininin toksitesi ile yayınlanan veriler şu şekildedir: Subkutan ve intraperitoneal verimlerden sonra sıçanlarda LD<sub>50</sub> 67 mg/kg ve farelerde 35 mg/kg dır. Gine domuzlarında LD<sub>50</sub> 37 mg/kg ve tavşanlarda 19 mg/kg dır. Domuz ve sıçanlarda sitrinin teşvikli renal toksite, büyümüş böbrekler, proksimal tubülülerin dejenerasyonu, pinotik çekirdek, temel membranın kalınlaşması ve bazı tubülülerin kiste dönüşmesidir (Betina, 1989).

Tubülülerin patolojik değişimlerinin olduğu hedef organın böbrek olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara ek

olarak fare, sıçan, tavşan, domuz ve kümes hayvanlarını içeren birçok hayvan türünde sitrininin birçok organik bileşenin transportunu etkilediği gözlenmiştir (Berndt and Hayes, 1978).

Ördek yavrularına ve hindilere çok fazla sitrinin verilmesi ise vücut ağırlıklarının azalmasına ve nefropatiye neden olmuştur. Piliçlere günlük besinlerinde verilen sitrinin ise su alınıminin artmasına ve buna bağlı olarak ta dieriheaya sebep olmuştur (Ames, 1976).

Yapılan araştırmalar sonucunda mikotoksinlerin bitkiler ve mikroorganizmalar üzerine toksik etkide bulunduğu ortaya konmuştur. Patulin, elma polenleri germinasyonunu ve kültüre alınmış soya fasulyesi hücre süspansiyonunun gelişimini inhibe etmiştir (Lindroth, 1980). Aflatoksinler, bitki tohumlarının çimlenme oranını düşürmekte, yaprakta klorofil teşekkülünü önlemekte ve büyümeyi yavaşlatmaktadır (Sert, 1984).

Patulin, Mycobacterium tuberculosis'ide içeren değişik gruptaki pozitif ve negatif bakterilere karşı kuvvetli bir antibiyotik aktivite gösteren toksindir. Aynı zamanda anti fungal aktiviteye de sahiptir. Dokulardaki bitki ve hayvan hücrelerine çok toksiktir. Patulin, Penicillium stalaniferim'daki virüslerin replikasyonunu önler. Botrytis cinerea ve Paecilomyces viridis funguslarında morfolojik değişmelerin oluşumunu teşvik eder. Patulin, bitki hücre zarlarının geçirgenliğini de bozmaktadır (Betina, 1989).

## 6. MİKOTOKSİNLERİN TAYİN YÖNTEMLERİ

### 6.1. Örnekleme

Numunede meydana gelebilecek küf ve teşekkül edecek toksin, numunenin partiyi temsil etme niteliğini ortadan kaldıracacağı için numunenin analize kadar geçen bekleme süresi mümkün olduğu kadar kısa olmalıdır. Ürün kuru olmadığı sürece muhafaza için plastik torbaya konmamalı, kağıt ya da bez torbaya konmalıdır. Yaş olan numuneler ya hemen kurutulmalı veya 4 °C'ta saklanmalıdır. Yeterli bir kurutma, 90 °C'ta 3 saat süre ile uygun kurutma dolabında tutmakla sağlanabilir.

Numunelerin herhangi bir yerinde bulaşma cepleri bulunabileceğinden numunenin tamamı göz açıklığı 0,85 mm. olan elekten geçecek şekilde öğütülür veya uygun karıştırıcılar ile homojen hale getirilir.

Un, sıvı veya hamur şeklindeki ürünler için öğütmeye gerek olmamakla birlikte deney numunesi alınmadan önce iyi bir karıştırma yapılmalıdır. Ayrıca sıvı ürünlerde numune almadan önce tortu iyice karıştırılmalıdır.

Alınacak örnek miktarı 50-1000 gr arasında olmalıdır. Genelde örneklendirilen yığınlar 20 ton veya daha büyük miktarda olabileceğinden çalışma için alınacak alt örneklerin, depoyu temsil edecek özellikleri taşımaları çok önemlidir (Anon, 1983).

Örneklendirme yaparken dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan biri de örneklendirilecek ürünün tane büyüklüğü ile orantılı olacak miktarda örnek alınmasıdır (Çizelge 6.1).

Çizelge 6.1. Örneklendirme yaparken alınabilecek minimum örnek miktarı (Anon, 1983).

Ürün Tipi	Alınabilecek minimum örnek miktarı
TİP I	500 gr.
TİP II	3 kg.
TİP III	5 kg.
	10 kg.
	20 kg.

Analizler için alınacak örneklerin depoyu temsil edici özellikleri taşımaları amacıyla çeşitli örneklendirme yöntemleri geliştirilmiştir:

I. Yöntemde,

20 tonluk depo → 20 kg. örnek → 1 kg öğütülmüş örnek → 50 gr. assay örneği

(Anon, 1983).

II. Yöntemde,

1. Üç adet 3 1/2 kg lık örnek alınır.
2. Depoyu tam olarak temsil etmeleri amacıyla her bir 3 1/2 kg lık örnek, ayrı olarak iyice karıştırılarak homojenize edilir; daha sonra 180 gr lık 20 adet alt örneğe ayrılır (Anon, 1983).

III. yöntemde ise, A.B.D.de depoların aflatoksin yönünden incelenmesi amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. Depolanmış yığının herbir yüzeyi, ikişer fit mesafe ile ol-

mak üzere 8'er kez örneklendirilmiş, dört yüzeyden alınan örnekler birbirinden bağımsız olarak karıştırılıp homojenize edilmiş, daha sonra her bir yüzeyi temsil etmek üzere, 50 gr.lık deney örnekleri ayrılmıştır (Johnson, 1969).

## 6.2. Numunenin Ekstraksiyonu

Aflatoksinler, birçok besin ve yemlerde az miktarda da olsa bulunurlar. Onların ekstraksiyonu, konsantrasyonu ve saflaştırılmaları için değişik metodlar düşünülmüştür. Laboratuvarında sıvı ortamda veya büyük miktardaki fermentasyonlarda üretildiğinde, aflatoksinler kültür filtratlarında extrekte edilirler. Her ne kadar aflatoksinlerin kültivasyon sıvısına hemen geçtiği görülse de, bunların ilgili toksinleri, örneğin; versicolorinler, küf miselleri arasında kalır ve bozulmamış misel zarlarını geçemezler. Miseller genellikle yıkanır, dondurularak kurutulur ve toz haline getirilir. Toz haline getirilen miseller daha sonra 35°C' in altında azaltılmış basınçta kloroform ile ekstrakte edilir (Heatcote and Hibbert, 1975).

Van der Merve (1965)'nin orjinal metodu, okratoksin A ve B'nin, küflenmiş mısır unundan kloroform-metanol ile ekstraksiyonunu içerir. Bu, kaba kloroform ekstratı, daha sonra sulu sodyum hidrojen karbonat ile ekstrakte edilir. Okratoksinler, sulu tabakadan ekstraksiyon ve asidifikasyon ile elde edilir. Daha sonra kolon kromatografisi ile saflaştırılır. Kaba ekstrakt, hegzan-% 85 metanol arasında parçalanır. Metanolik tabaka düşük basınçta konsantre edilir ve kloroform-su arasında parçalanır. Okratoksin A ve B, sodyum hidrojen karbonatta ekst-

raksiyon, asidifikasyon ve kloroformda ekstraksiyon ile organik tabakadan elde edilir (Steyn, 1984).

Sitrininin izolasyonu ya hidroklorik asit ile çökeltmeye ya da düşük PH'da sulu solüsyonlardan ekstaraksiyona dayanır. P.citrinum kültürü filtre edilir ve filtrat, konsantre HCl ile PH'sı 1,5 olarak asitleştirilir. Çöküntü filtre edilir, kurutulur ve kloroformda çözülür. Kloroformda çözünmeyen artıklar filtrasyon ile uzaklaştırılır. Kloroform buharlaştırılır ve sitrinin sıcak ethanolde kristalleştirilir (Davis et al., 1975).

Diğer bir yöntem olarak, sitrinin bir kültür filtratından PH 2,5 olan etil asetat ile ekstrakte edilir. Bunu PH 8,5 olan, fosfat tamponda tekrar ekstraksiyon ve PH 2,5 olan kloroformdaki ekstraksiyon izler. Kloroform ekstresi buharlaştırılır. Artık etilen glikol ve karbon tetra-klorid arasında ayrıştırılır. Sonraki tabaka kuruyana kadar buharlaştırılır. Sitrinin, asetatdan tekrarlanan kristallelenme ile saflaştırılır (Betina, 1984).

P.urticae'nin patates-glikoz brotundaki kültürünün filtrasyonu, miseller uzaklaştırılmış ve filtrat, etil asetat ile konsantre ve ekstrakte edilmiştir. Birleşik ekstreler susuz  $MgSO_4$  ile kurutulmuş, etil-asetal vakumda uçurulmuş ve artık dietil eterde yıkanan bir kolona uygulanmıştır. Patulin 20:1 konsantre eterli solüsyonda, tam beyaz kristaller halinde kristalleşir (Norstadt and Mc Callan, 1969).

#### 6.2.1. CB metodu

50 gr hazırlanmış numune 500 ml.lik cam kapaklı erlene konur. Üzerine 25 ml damıtık su, 25 gr diatame toprağı ve 250 ml kloroform ilave edilir. Erlenin ağzı iyice kapa-

tıldıktan sonra 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çalkalanır. ve filtre kağıdından (Whatmann NO.4) süzülür (Appley, 1968).

Süzülmenin yavaş olacağı durumlarda ise içinde 5 mm kalınlığında diatome toprağı bulunan buhner hunisi, hafif vakum yapılarak süzmede kullanılabilir (Vakum, kloroformun hızla buharlaşmasına neden olacağından yoğunluk değişebilir. Bu nedenle zor süzülen numunelerin dışında kullanılmamalıdır).

Süzülen kloroform fazından 50 ml alınır ve temizleme-saflaştırma işleminde kullanılır.

#### 6.2.2. BF metodu

50 gr hazırlanmış numune bir blender kavanozuna aktarılır. Bunun üzerine 250 ml metanol-su (55+45; V:V) çözücüsü, 2 gr NaCl ve 100 ml hekzan ilave edilir. Blender yüksek devirde 1 dakika çalıştırıldıktan sonra içindekiler 250 ml lik santrifüj tüplerine konarak fazların ayrılması için 2000 devir/dakikada 5 dakika süre ile santrifüj edilir.

Fazların ayrılmasından sonra 25 ml sulu metanol fazı pipetle alınarak 125 veya 250 ml lik ayırma hunisine konur. Ayırma hunisine 25 ml de kloroform ilave edilerek kapağı kapatılır ve 1 dak. kadar çalkalanır. Tekrar fazların ayrılması için beklenir. Alt faz 600 ml lik paslanmaz çelik bir behere (yoksa cam behere) alınır. Bu ekstraktta herhangi bir numune parçacığı bulunmamalıdır.

Behere, azot akımı altında kaynar su banyosu üzerinde tutulur. Çözücü, 2 ml ile kuruma noktası arasında bir miktara inince ekstrakt dikkatlice yıkanarak küçük bir şişeye alınır. Su banyosunda hafif bir azot akımı altında bu şişedeki kloroform kuruyana kadar buharlaştırılır.



Kurutulan şişe ağzı sıkıca kapatılarak ince tabaka kromatografisi (T.L.C) işlemi için buz dolabında saklanır.

### 6.3. Ekstraktın Temizlenmesi

Ekstrakt içinde bulunan yağ artıkları, hafif petrol veya n-hekzan ile yıkamadan sonra, sıvının buharlaştırılması ile uzaklaştırılabilir. Yağı uzaklaştırılmış artık, saflaştırma için hazırlayıcı ince tabaka veya sıvı kolon kromografi ile kullanılır (Hartley et al., 1963).

Birçok besin, yüksek oranda doğal yağ içerir. Sonraki saflaştırmaya karışmamaları için, mümkün olduğunca uzaklaştırılmalıdırlar. Zirai ürünlerdeki aflatoksinlerin izolasyonu ve saflaştırma teknikleri belirlenmiştir. Bu tekniklerden birisi şöyledir:

İyice öğütülmüş yer fıstıkları, bir kaç dakika n-hekzan metanol ve su karışımında bekletilir, santrifüj edilerek ayrılır. Sulu aflatoksin içeren kısım, diatomlu kolonda lipidleri ayırmak için n-hekzan ve kloroform-n-hekzan (1:1) kullanılarak, aflatoksinleri elde etmek için ayırıcı kromografide saflaştırılır (Nesheim, 1964).

Okratoksinlerin kolon kromografi ile ayrılmasında kullanılan teknikler, Steyn (1984) tarafından incelenmiştir. Peterson and Ciegler (1978), okratoksin A'nın saflaştırılmasında, likid-likid ekstraksiyonu ve yüksek performanslı likid kromografi ile (HPLC) son temizleme kullanımını bildirmişlerdir.  $^{13}\text{C}$ -okratoksin A'nın saflaştırılmasında hazırlayıcı slika-jel ince tabaka kromatografisi (PLC) kullanılmıştır (de Jesus, 1980).

Ekstraktın kolon ile temizlenmesi amacı ile kullanılan kolonun (22x300 mm) alt kısmına gevşek bir şekilde cam pamuğu yerleştirilir. Kolon yarısına kadar kloroform ile doldurulduktan sonra 5 gr.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , silikajele destek teşkil etmesi için kolona yavaş yavaş ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülür.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 'ın kolonun dibine oturmasını sağlamak için bir miktar kloroform, musluk açılarak akıtılır. Sonra 0,063-0,2 mm'lik silikajel 60 dan 10 gr. ilave edilir ve silikajelin homojen bir dağılım göstermesi için karıştırılır. Kolon kromotografisinde kullanılan silikajel, 60, bir saat 105 °C'ta kurutulup 100 gr.ına 1 ml su ilave edilerek iyice karıştırıldıktan sonra hava geçirmez bir kaptaki muhafaza edilerek hazırlanır. Silikajel anhidrit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tabakası üzerine oturduktan sonra, üzerine 15 gr anhidrit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ilave edilir. Bundan sonra kloroform  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tabakasının 2 mm üzerine gelene kadar akıtılır. Ayrıca, elde edilen 50 ml ekstraktın üzerine 150 ml hegzan ilave edilir ve kloroform-hegzan karışımı, hazırlanan 22x300 mm.lik kolondan 10-20 ml/dak. hızla akacak şekilde geçirilir. Bu karışımın akışından sonra kolon 150 ml anhidrit eterle yıkanır. Eter fazının  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tabakasının üzerine inmesi beklenir ve 150 ml kloroform-etanol (97+3) karışımı aflatoksinleri elde etmek için kolona ilave edilir. Bu aşamada kolonun altına konan ağız traşlı erlenler, karışımın akışı kesilene kadar kolonun altında tutulur. Elde edilen kloroform-metanol fazı bir buharlaştırıcıda uçurulduktan sonra ağız traşlı erlene 1-3 ml. kloroform ilave edilerek ekstrakt kalıntıları küçük bir şişeye alınır ve kloroform, azot gazı altında uçurularak şişelerdeki ekstrakt kalıntıları ince tabaka kromotografisinde kullanılmak üzere şişenin etrafı aleminyum kağıtla sarılarak buzdolabında muhafaza edilir.

#### 6.4. Ayırma

Ekstraksiyon ve temizleme işlemlerine rağmen ekstrakta tayini etkileyebilecek maddeler bulunabilir. Bu maddelerin uzaklaştırılması amacıyla en yaygın olarak kromografik teknikler kullanılmaktadır.

##### 6.4.1. Fizikokimyasal metotlar

###### 6.4.1.1. Kromotografik yöntemler

###### İnce Tabaka Kromatografisi:

Mikotoksin araştırmalarının ilk yıllarında ince tabaka kromatografisi (TLC) çok yaygın bir teknik olmuştur. Başlangıçta tek yürütme çözgeni kullanılırken, ekstrakta girişim yapıcı maddeleri uzaklaştırmak ve tayin limitlerini düşürmek amacıyla iki boyutlu TLC uygulamaya gidilmiştir. Bu teknik hayvansal dokularda, süt ürünlerinde ve baharatlarda aflatoksin analizinde kullanılmıştır.

Aflatoksinlerin uzun dalga boylu UV ışığı altında floresans yaymaları çok düşük düzeylerde dahi tayinlerini mümkün kılabilir. Ancak tüm mikotoksinler floresans yamazlar veya sadece görünür ışık absorpsiyonu gösterirler. Bu nedenle mikotoksinler bazen plakaya reaktif püskürterek veya reaktif buharına tutarak görünür hale getirilmektedir. Örneğin; sterigmatocystin molekülünün keto ve hidroksil grupları ile bir alüminyum kompleksi oluşturmak üzere  $AlCl_3$  püskürtülerek floresans yaklaşık 100 kat artırılmıştır. Ayrıca floresans kiremit kırmızısından sarıya dönüşmektedir (Boyacıoğlu ve Gönül, 1987).

İnce tabaka kromatografisinde çeşitli maddeler kullanılmakla birlikte en yaygın uygulama şekli şöyledir:

Doğrulama testi sonucu aflatoksin olduğu kesinlikle saptanan örneklerde, kantitatif olarak aflatoksin tayininde görülebilen son nokta yönteminden (Jones, 1972) yararlanılır. Kullanılan 20x20 cm boyutlarıdaki cam plakalar silikajel G ile kaplanırlar. Silikajel ile kaplanan plakalar akışkanlıklarını kaybetmeleri için 30 dak. kurumaya bırakılır. Daha sonra 70 °C'ta 2 saat etüvde kurutulur.

Yöntem, 500 µm kalınlıkta yayılmış plakada, 15-20 µl ekstrakt damlatılmış noktaların, uzun dalga (365 nm) ultra viole lambası altında gözle en son görülebildiği zaman 0,4 ng B<sub>1</sub> ve 0,3 ng G<sub>1</sub> ihtiva etme esasına dayanır (Coomes et al., 1965).

Kloroform ile çözülen ekstraktlar 5,10,15,20 ve 25 µl'lik kısımlar halinde plakalara tatbik edilir. Uygun solvent sisteminde (toluen-etil asetat-%90'lık formik asit; 5 + 4 + 1)

geliştirilen plakalar tanktan çıkarıldıktan sonra uzun dalga (365 nm) ultra viole ışık altında incelenerek ekstraktın çeşitli miktarlarda damlatıldığı plakada her miktar için floresan görüldüğünde ekstraktın konsantrasyonu seyreltilmeli, aksi bir durum mevcut ise ekstrakt, azot gazı altında koyulaştırılmalıdır. Dilüsyon oranları ve son nokta esası dikkate alınarak orantı ile hesaplanarak µg/kg olarak aflatoksin miktarları saptanabilir.

TLC'nin mikotoksin analizlerinde kullanımı son yıllarda HPLC ve kısmen GLC tekniklerinin güncellik kazanması ile azda olsa azalmıştır. Ancak TLC tekniğinin basit ve güvenilir oluşu ile özellikle iki-boyutlu uygulamasının mükemmel ayırım sağlaması ve düşük tayin limitinde analizi mümkün kılması nedeniyle halen çok sık tercih edilebilmektedir.

### Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi:

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ile yapılan ilk çalışmalarda saf aflatoksin standartları ile çalışılmış ve mükemmel sonuçlar alınmıştır. Ancak örnekler ile çalışıldığında düşük geri kazanımlar elde edilmiş ve ekstraktın temizleme safhasının çok etkin yapılması gerektiği anlaşılmıştır. Daha sonraları çok çeşitli kolonların ve dedektörlerin bulunuşuyla teknik çok yaygın hale gelmiştir. Metodun dezavantajı ise akış hücrelerinin örnek sayısı arttıkça kontamine olması, kirlenmesi ve değiştirilmesi zorunluluğudur.

Tekniğin tayin limiti çok düşük olmamakla birlikte uygulaması çok kolaydır. Ancak hareketli fazdaki asit nedeni ile kolonda aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>'in bozulması da mümkündür. Bu nedenle asit miktarlarının çok yüksek tutulması ve standartlar ile en uygun koşullarda bozulma olup olmadığının kontrolü gerekmektedir.

HPLC tekniği süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M<sub>1</sub> tayininde de başarı ile kullanılmıştır (Yazıcıoğlu ve Gönül, 1987). Bu metotların pek çoğunda aflatoksin M<sub>1</sub> reverse faz çözücülerde daha şiddetli fluoresans verdiği için reverse faz HPLC tercih edilmiştir. Ayrıca HPLC tekniği ile buğday, arpa, mısır ve diğer tahıllarda zearalenon çok düşük düzeylerde tayin edilmiştir (Boyacıoğlu ve Gönül, 1987).

HPLC metodunun mikotoksin tayinindeki üstünlükleri çok sayıda örnekle kısa zamanda çalışılabilmesi ve mükemmel kantitatif sonuçlar vermesidir. Cihazın maliyeti ve kullanımında yetişmiş elemanın gerekliliği tekniğin kullanımını sınırlamaktadır.

### Gaz-sıvı kromatografisi:

Gaz-sıvı kromatografisi (GLC) tekniğinin mikotoksin analizlerinde kullanımı pek çok mikotoksinin uçucu olmaması ve bu nedenle mutlaka türevlendirme işleminin gerekmesi nedeniyle sınırlıdır. Ancak trichothecene grubu mikotoksinlerin fluoresans özellikleri olmadığından ve UV absorpsiyonu da göstermediklerinden TLC ve HPLC teknikleri ile tayinleri güçtür. Bu mikotoksinlerin tayinlerinde GLC büyük ölçüde önem taşımaktadır (Scott, 1982).

GLC kütle spektrometresi ile birlikte kullanılabilir. Seçici iyon monitoring modelinde çalışıldığında kütle spektrometresi çok seçici ve duyarlı bir dedektör haline gelmektedir. GLC-kütle spektrometresi kombinasyonu özellikle trichothecenelerin tayininde kullanılmakla birlikte elma suyunda patulin ve tahılda sterigmatocystine tayinlerinde de denenmiştir. Ayrıca gıda analizlerinde GLC'deki son gelişmelerden olan kapiler kolonların trichothecene mikotoksinlerin analizlerinde kullanımında da başarı kazanılmıştır. Ancak bu çok gelişmiş cihazların aşırı pahalı kombinasyonları kullanımlarının yaygınlaşmasını sınırlamaktadır (Boyacıoğlu ve Gönül, 1987).

#### 6.4.2. Hızlı metotlar

##### 6.4.2.1. Parlak yeşil-sarı fluoresans testi

Mikotoksinlerin tayini için, gelişmiş bir laboratuvara sahip olmayan özellikle tarlada, çiftlikte ve ürün satış istasyonlarında aflatoksinlerin analizi, parlak yeşil-sarı fluoresans verme testinden (BGYF) yararlanılarak yapılır. Birçok bitkisel dokuda yer alan peroksidaz enzimi

varlığında, kojik asitin parlak yeşil-sarı flouresans veren bir bileşiğe dönüşmesinden (Marsh ve ark., 1969) hareketle, bu flouresansın gözleendiği substratta aflatoksin üreten küfün varlığı tahmini olarak belirlenmektedir (Boyacıoğlu ve Gönül, 1987).

Bu test özellikle mısırdaki başarı ile uygulanmış olup, aflatoksinler BGYF gözlenen örneklerin yaklaşık % 50'sinde 2 ppb düzeyinde saptanabilmiştir (Shotwell et al., 1972; Shotwell and Hesseltine, 1982). Ancak BGYF testinde en önemli husus, aflatoksin kontaminasyonuna duyarlı olan tarımsal ürünlerin tümünün peroksidaz enzimi içermemesi ve mevcut diğer enzimlerin inaktive edilmesi zorunluluğudur. BGYF testi en çok mısırlarda kullanılmasına karşın buğday, arpa, yulafta ve bademde (Bothast and Hesseltine, 1975; Schade and King, 1984) benzer BGYF gözlenmiştir (Boyacıoğlu ve Gönül, 1987).

#### 6.4.2.2. Mini kolon kromografisi

Yaygın bir kullanım alanı olan teknikte 3-6 mm iç çapta ve yaklaşık 20 cm uzunlukta cam veya plastik tüpler kullanılmaktadır. Kolonun daraltılmış ucuna ufak bir cam pamuğu tıkaç olarak konular ve sıkıştırılır. Kolona belirtilen seviyelerde sırasıyla 8-10 mm kalsiyum sülfat veya sodyum sülfat; 8-10 mm florisil; 8-16 mm silikajel; 8-10 mm nötr alüminyum oksit ve 8-10 mm kalsiyum sülfat veya sodyum sülfat konular. Son olarak kolonun en üstüne küçük bir cam pamuğu sıkıştırılır. Kolona her ilaveden sonra üstten ince bir cam çubukla hafif hafif vurularak dolgunun yerleştirilmesi sağlanır (Anonymaus, 1985).

Bu çözücüler aflatoksinleri florisilden çözebilecek kadar polar olmadıkları için aflatoksinler florisil tabakasında kalmaktadır. Örnek kolonunda gözlenen mavi flouresansı, bilinen miktarlarda standart toksin içeren bir mini kolonla karşılaştırarak kabaca bir tahmin yapmak mümkün olur. Ancak bir hataya düşmemek için mavi flouresansın gözlendiği ekstrakta kantitatif analiz uygulanmalıdır (Boyacıoğlu ve Gönül, 1987).

Aflatoksinler dışında diğer mikotoksinler için de çok çeşitli gıdalarda okratoksin A ve zearalenon (Holiday, 1976, 1980) için mini kolon işlemleri geliştirilmiştir (Boyacıoğlu ve Gönül, 1987).

Mini kolon metodu çok hızlı uygulanabilen, uzmanlık ve gelişmiş bir ekipman gerektirmeyen bir metottur. Ancak yarı kantitatif oluşları, yüksek bir tayin limitine sahip olmaları ve duyarlılığın düşük oluşu bu tekniğin dezavantajlarındanıdır.

#### 6.4.3. Aletli metotlar

##### 6.4.3.1. Florodansimetre

Aflatoksinler, sadece U.V. ışınlarını absorbe etmezler. Aflatoksinler çeşitli ışınları absorbe etmelerinden dolayı kalitatif ve kantitatif olarak kolaylıkla belirlenebilir. Mikotoksinlerin flouresans yoğunlukları konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Bilinen standartların kullanılması ve dansimetre ile mikotoksinlerin miktarı belirlenir. Florodansimetre genellikle TLC yöntemlerine özgü güvenilir bir metottur (Ellis et al., 1991).



#### 6.4.3.2. Spektrofotometre

Bu metodun temeli, 363 nm U.v.ışınlarının absorpsiyonuna dayanır. Silika-jel TLC plakalarında temizlenmiş aflatoksin ekstraktlarının metanolde solusyonu elde edilmiştir. Elde edilen solusyonun 363 nm'de optik yoğunluğu ölçülerek standart elde edilir. Bundan da aflatoksin yoğunluğu hesaplanır. Sık kullanılan bir yöntem değildir (Ellis et al., 1991).

#### 6.4.4. Biyolojik metotlar

##### 6.4.4.1. Hücre ve doku kültürü testi

Biyolojik metotlar özellikle bilinmeyen mikotoksinlerin tayininde kullanılırlar. Nitekim, aflatoksinlerin ilk kez bulunmalarında çok önemli bir rol oynamışlardır. Fakat hangi mikotoksinin aranacağı biliniyorsa her zaman kimyasal yöntemler tercih edilmektedir. Çünkü bu metotlar çok daha hızlı, spesifik ve tekrarlanabilir olup, çok düşük tayin limitlerine sahiptirler.

Biyolojik tayin sisteminde kullanılan organizmalar, mikroorganizmalar, suda ve karada yaşayan hayvanlar, organ ve doku kültür sistemleri ve bitkilerdir (Watson and Lindsay, 1982; Boyacıoğlu ve Gönül, 1986).

Biyolojik tayin metotları içerisinde, karaciğer, böbrek ve kas hücreleri kültür yönteminin kullanım avantajı, düşük konsantrasyonlarda çalışmaya uygunluk sağlamasıdır. Ancak küf kültürleri için kullanılan pek çok besi ortamının toksik olabilmesi ve tayininde kontrol olarak kullanılamaması metodun dez avantajlarından (Boyacıoğlu ve Gönül, 1986).

Zuckerman et al (1967), yaptıkları çalışmada 10 ppm aflatoksin B<sub>1</sub>'in doku kültürü ile inkübasyonu sonucunda, stoplazmadaki RNA'nın tamamen kaybolduğu ve nukleustaki kromatinin gözle farkedilir şekilde azaldığı bildirilmiştir (Eriş, 1989).

Zuckerman (1967), insan karaciğer hücreleri ile yapılan kültürel akut toksisite çalışmaları sonucunda, LD<sub>50</sub> değerinin aflatoksin B<sub>1</sub> için 10 ppm, G<sub>1</sub> için 5 ppm ve G<sub>2</sub> için 16 ppm olduğu saptanmıştır (Eriş, 1989).

#### 6.4.4.2. Civciv embriyo testi

Tüm biyolojik testler içinde en duyarlı olanı, civciv embriyo testidir. Bu metotta az miktarda ekstrakt hücreye enjekte edilmekte ve 3-4 haftalık inkübasyondan sonra canlı kalanlar sayılmaktadır (Anon, 1983).

Bu test, aflatoksin, tremortin, okratoksin, sitrinin, patulin, penisillik asit, gentisik asit ve kojik asit ile pek çok küf toksinleri üzerinde denenmiş, hassas, basit ve hızlı bir test olarak belirlenmiştir. Bir biyolojik kontrol yöntemi olan bu test, toksik veya teratojenik etkiyi gözlemek için yapılır (Topal, 1986).

Fertil (döllenenmiş) beyaz legorn yumurtaları kullanılarak toksinlerin etkisi, yumurtadan çıkış anına kadar saptanan ölümlerin ve sekellilerin toplam yumurta sayısına oranı olarak kabul edilir (Topal, 1986).

Yapılan bir çalışmada patulinin; 1000 ppm-500 ppm ve 100 ppm'lik dozlarından 0,2 ml enjekte edilen yumurtaların, 4 günlük ön inkübasyona tutulmuş embriyolarını 24 saatte öldürdüğü görülmüştür (Topal, 1986).

Aflatoksin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> ve okratoksin A'nın LD<sub>50</sub> değerleri karşılaştırıldığında, B<sub>1</sub>'in civciv embriyolarında G<sub>1</sub>'e göre (B<sub>1</sub> LD<sub>50</sub>=0,017 µg, G<sub>1</sub> LD<sub>50</sub>=0,37 µg) 20 kere, okratoksin A'dan ise (LD<sub>50</sub>=2,4 µg) yaklaşık 140 defa daha toksik olduğu görülmektedir (Denizel, 1979).

#### 6.4.4.3. Larva testi

Bazı balık türleri ve karides gibi deniz hayvanları mikotoksinlerin tayininde kullanılmıştır. Ancak metodun sorunu pek çok mikotoksinin suda oldukça az miktarda gznmesi ve bazı mikotoksinlere uygulanabilmesidir (Boyacıoğlu ve Gönül, 1986).

Genellikle, Brine shrimp olarak bilinen Artemia salina larva testinde, tuzlu su karidesi larvalarıyla çalışılır. Bu test çok kısa zamanda sonuç vermesi ve kolay olması bakımından en yaygın kullanılan test yöntemidir. Bu test ile çalışırken larvaların 2 günden yaşlı olmamasına ve yağ ile kirliliğe karşı hassaslıklarına dikkat edilmelidir (Denizel, 1979; Topal, 1986).

Brine shrimp larva yönteminin hassasiyeti, pek çok mikotoksinin toksik etkilerinin kontrol edilmesi bakımından elverişlidir. Bu yöntemin hassas olduğu toksinler, aflatoksin B, gliotoksin, kojik asid, okratoksin A, rubratoksin B, sterigmatosistin, stemfon ve T<sub>2</sub> toksindir (Topal, 1986).

Sitrininin A.salina için LD<sub>50</sub> si 33,9 µg/ml dir.

#### 6.4.4.4. rdek yavruları testi

Bir günlük ördek yavruları testi, besin ve yemlerdeki mikotoksinlerin aranmasında kullanılan ilk biyolojik yöntemlerden birisidir.

Bu testin uygulanmasında örnekler, ördek yavrularının kursaklarına verilir ve 7 gün sonra ördek yavrularının ölüm oranlarına göre mikotoksinin etkisi belirlenir.

Bir günlük ördek yavrularında ( $\mu\text{g}/\text{ördek yavrusu}$ ) aflatoksin B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> için LD<sub>50</sub> değerlerinin karşılaştırılması sırası ile 230; 16,6 ve 62 olarak belirlenmiştir (Betina, 1989).

Okratoksin A'nın oral LD<sub>50</sub>'si bir günlük ördek yavrularında 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ve yine bir günlük civcivlerde 3,6 mg/kg olarak bildirilmiştir (purehose and Nel, 1967). Bu değer okratoksin B için 54 mg/kg dır.

Yapılan toksikolojik ve patolojik çalışmalarda okratoksin A'nın, aflatoksin B<sub>1</sub>'e benzer bir toksisite yaptığı, 50 gr'lık ördek yavruları için LD<sub>50</sub> değerinin 25  $\mu\text{g}$  olduğu belirlenmiştir (Ciegler and Lillehoj, 1968).

Aflatoksin B<sub>1</sub> için LD<sub>50</sub> değerleri farklı hayvan türleri için araştırılmış ve 0,3-180 mg/kg arasında değiştiği ve bir günlük ördek yavrularının en duyarlı olduğu belirlenmiştir (Ciegler, 1973).

#### 6.4.4.5. Mikroorganizma testleri

Birçok mikroorganizma mikotoksinlere karşı hassas olduğu için mikotoksin tayinlerinde kullanılmaktadır. Bacillus megaterium'un aflatoksinlere karşı en hassas bakteri olduğu bilinmektedir (Topal, 1986).

Bu testin mekanizması üzerine yapılan bir incelemeye göre, aflatoksin B<sub>1</sub>'in B.megaterium gelişmesine inhibitör etkisi, hücre membranlarına verdiği zarardan kaynaklanmaktadır (Tiwari et al., 1985).

Burmaister and Hesselstine (1966), yaptıkları çalışma sonucunda, teste tabi tuttıkları 329 mikroorganizmadan 12 Bacillus, 1 Clostridium ve 1 Streptomyces spesiesinin aflatoksinler tarafından inhibe edildiklerini bildirmişlerdir. Bu organizmalar, B.brevis, B.licheniformis, B.sphaericus, B.subtilis, B.thuringiensis, B.alvei, B.bombysis, B.cereus, B.macerans, B.pumilis, B.techicus, B.megaterium, Clostridium sporogenes ve Streptomyces sp.dir. Aflatoksinlerin ayrıca, Flavobacterium aurantiacum, E.coli, P.auruginosa, P.vulgaris, Streptococcus vulgaris türleri ile Brevibacterium ve Nocardia cinslerine ait birçok bakteri türü üzerinde de olumsuz etkileri bildirilmiştir (Arai et al., 1967; Reiss, 1978).

Lillehoj et al.(1967), 37,5 µg/ml G<sub>1</sub> ile F.aurantiacum un büyümesinin 48 saat sonra % 90 inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Aynı mikroorganizmada aynı derecede inhibisyon için aflatoksin B<sub>1</sub>'in 15 µg/ml si yeterli bulunmuştur.

Sitrinin, antibakteriyal olarak tanımlanmıştır. Sitrinin, Gram negatif türlerden (Vibrio coma, Shigella dysenteria, Salmonella enterididis) ziyade Gram pozitif bakterileri (B.subtilis, B.mycoides, Micrococcus pyogenes var.aereus, M.pyogenes var.albus) inhibe ettiği bildirilmiştir (Warren et al., 1962).

Bacillus subtilis'in % 50 inhibisyonu için gerekli olan sitrinin konsantrasyonuun 5 µg/ml. olduğu bildirilmiştir (Betina, 1989).

Mikroorganizmaların mikotoksin tayininde kullanılması oldukça basit olmakla birlikte mikotoksinlere karşı spesifik olmaları dezavantaj oluşturur. Bu nedenle de tamamlayıcı test olarak kullanılmaktadır.

#### 6.4.5. İmmuno-kimyasal metotlar

Bu metotlar kromatografik ayırma işlemlerinden tamamen farklıdır. Klasik immuno analitik metotlar, anti-jenantibody kompleksinin çökmesine yol açan doğal anti-jenler ve spesifik antibody'lerin arasındaki etkileşim üzerine kuruludur. Antijen-antibody kompleksinin çökmesi antijen veya antibody konsantrasyonu için bir ölçüdür. Mikotoksin tayininde kullanılan immuno kimyasal metotlar Radio Immuno Assay (RIA) veya Enzim bağlı Immuno Sorbant Assay (ELISA) dır (Boyacıoğlu ve Gönül, 1986).

##### 6.4.5.1. Radioimmunoassay (RIA)

RIA testleri, aflatoksin B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>, B<sub>2a</sub> ve Q<sub>1</sub>; okratoksin A, T<sub>2</sub> toksin ve zearalenon için geliştirilmiştir (Chu, 1983).

Yüksek oranda immunojenik olan bakterial toksinlerden farklı olarak, mikotoksinler düşük moleküler ağırlıklı metabolitlerdir. Bu nedenle antijenik değildirler ve immunizasyondan önce protein veya polipeptit taşıyıcıya bağlanmaları gerekir. Taşıyıcı olarak sığır serum albumini, gamma globulin veya polylysin kullanılır (Bierman and Terpian, 1980).

Bileşim hazırlandıktan sonra antibody üretimi, tavşan ve keçiler kullanılarak üretilir. Aflatoksinler için tavşan ve keçi kullanılırken, zearalenone karşı antibody üretimi domuzlarda yapılmıştır (Ueno ve Chu, 1978).

Antibody spesifitesinin farklılığı nedeni ile değişik aflatoksin metabolitlerinin analizi için değişik antibody preparatları kullanılabilir (Ueno and Chu, 1978).

RIA'de radio işaretli toksin kullanılır. Halbuki ELISA'da toksin-enzim bileşeni kullanılmaktadır. Böylece radioaktif bağların spesifik aktivitesi RIA'nın duyarlılığında önemli bir rol oynar (Chu, 1983).

RIA yöntemi, bilinmeyen örnek veya bilinen standardın sabit miktardaki işaretli toksin ve spesifik antibodynin fosfat buffer deki çözeltisinin eş zamanlı inkubasyonunu içerir. Serbest ve bağlı toksinler daha sonra uygun tekniklerle ayrılır ve bu fraksiyonlardaki radyoaktivite saptanır. Bilinmeyen örneğin toksin konsantrasyonu, sonuçların standart eğriyle karşılaştırılmasından sonra saptanır (Chu, 1983).

Genelde RIA, standart preparasyonunda 0,25-0,5 ng düzeyindeki saflaştırılmış mikotoksini saptayabilmektedir. Besin ve yemlerdeki mikotoksini saptamada en düşük sınır ise 2-5 µg/kg dır (Chu, 1983).

#### 6.4.5.2. Enzim bağlı immuno sorbant assay (ELISA)

Biyolojik olarak aktif maddelerin analizi için ELISA'nın iki tipi kullanılır. Her iki tip deney içinde, bir enzim bağlı karışım hazırlanmalıdır. Birinci tipi, homojen-ELISA olarak adlandırılır. Bunda enzim aktivitesi spesifik antibodylere bağlandıktan sonra değişir. Bu yüzden deneyde, enzim bağlı karışımın bağlı ve serbest şekillerini ayırmak gerekli değildir. İkinci tipi ise, heterojen rekabetli ELISA'dır. Bunda enzim aktivitesi değişmeden kalır ve serbest bağlı enzim ligantlarını ayırmak gereklidir.

Mikotoksin analizleri için kullanılan ELISA en son yöntemdir. Mikotoksin analizleri için ELISA duyarlılığı aflatoksin B<sub>1</sub> için 3-5,8 µg/kg; M<sub>1</sub> için 0,25-0,50 µg/kg; okratoksin A için 1-2 µg/kg ve T<sub>2</sub> toksin için 2,5-5 µg/kg dır (Chu, 1983). Saflaştırılmış mikotoksinler kullanıldığında ELISA, RIA'dan yaklaşık olarak 10-50 kat daha duyarlıdır.

ELISA'nın en büyük avantajı radyoaktif maddelerin kullanılmamasıdır. Ayrıca radionukleotidlerin düzenlenmesi ile ilgili problemler ve yaygın alet kullanımını ortadan kaldırmaktadır. Toksinin radyoaktif bağı uygun olmadığı durumlarda ELISA daha da avantajlıdır. Örneğin sütteki 0,25 µg/l kadar az miktardaki aflatoksin M<sub>1</sub> ELISA ile saptanabilir. Halbuki RIA'de en düşük saptama seviyesi 5 µg/l dir. Süt örnekleri ELISA'da direkt olarak kullanılabilir. Saflaştırma safhası olmadığından kısa zamanda birçok örnek analiz edilebilir (Chu, 1983).

Aflatoksin M<sub>1</sub> seviyesi 0,5 µg/l den düşük olan 100 süt örneği, HPLC, TLC ve ELISA ile analiz edilmiş ve veriler arasında süper bir uyum gözlenmiştir. Yine mısır, yerfıstığı ve yağı alınmış mısır örnekleri, diğer yöntemlerle tayin edildiğinde sırası ile 15, 231 ve 49 µg/kg seviyesinde aflatoksin tesbit edilmiş; ELISA ile tayin edildiğinde ise 14, 270 ve 35,5 µg/kg aflatoksin tesbit edilmiştir. Süt örneklerinde diğer yöntemlerle tayin edilen aflatoksin M<sub>1</sub> miktarı 7,6 µg/l iken ELISA ile bu değer 8,6 µg/l olarak bulunmuştur (Friesen and Garren, 1982).



## 7. MİKOTOKSİNLERİN KONTROLÜ

### 7.1. Küf Gelişmesinin ve Kontaminasyonunun Önlenmesi

Küfler, günlük yaşantımızda sık görülen ve hemen her çeşit gıda maddesinde üreyebilen organizmalardır. Özellikle son yıllarda üzerinde önemle durulan araştırma konularından birisi, küfler ve bunların oluşturdukları mikotoksinlerdir. Mikotoksinler, antijenik özellik göstermedikleri için toksin zehirlenmelerinin tedavisinden çok toksin üretiminin önlenmesi yolunda çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Bundan dolayıdır ki ürünlerin uygun koşullar altında hasat edilmesi ve depolanması üzerinde önemle durulmuştur.

#### 7.1.1. Çiftlik koşullarının iyileştirilmesi

Toksijenik küf ile bulaşma, ürünün gelişmesi sırasında hasat ve hasat sonrasında olabilmektedir. Hasat sırasında ürünün mekanik zarar görmesi, küfler ile kontaminasyon şansını artırır. Zarara uğrayan dış kabuk, taneleri koruma görevini yerine getiremediğinden uygun şartlarda sporun çimlenmesi ve tohumları enfekte etmesi daha da kolaylaşacaktır.

Ekimde kullanılacak tohumların sağlam olması; böcek ve bitki hastalıklarının ortaya çıkması ve yayılmasının önlenmesi ile sulama sularının kontrol edilmesi kontaminasyonun oluşumunu ve yayılmasını önleyebilir.

Hasat edilen ürünlerin depolanması sırasında çevre şartları kontrol altına alınarak küf gelişimi engellenmeye çalışılmalıdır. Bu tedbirlerin alınması ile küf kontaminasyonu, gelişimi ve buna bağlı olarak mikotoksin üretimi kontrol altına alınabilir (Ellis et al., 1991).

### 7.1.2. Antifungal amiller

Mikotoksinlerden korunmanın en etkili yolu hayvanlara küflü yemlerin yedirilmemesidir. Bundan da önemlisi küf gelişiminin ve toksin oluşturulmasının önlenmesidir. Son zamanlarda bu amaçla gıda maddelerine ve yemlere bazı kimyasal maddeler katılmaktadır.

Mısır, yerfıstığı ve pamuk tohumu gibi ürünlerin depolanmasında da dikkatli olunarak, bunlara propionik asit, formol gibi antifungal ajanlar ilave edilmektedir. Aflatoksinlerin antagonisti olan metil amin, NaOH, formaldehit,  $H_2O_2$ , gaz klorin, sodyum hipoklorit, ozon vb. maddelerle muameleden sonra bol su ile yıkama sonucunda aflatoksinlerin bir kısmı uzaklaştırılabilir (Ağaoğlu, 1985; Betina, 1989).

Hekzan-aseton-su karışımı ve % 80 izopropanol'ün de aflatoksinleri erittiği; fakat yağlı maddelerde görünüşü ve lezzeti bozduğu için uygulanamayacağı bildirilmiştir (Ağaoğlu, 1985).

Sorbatların ise küfler üzerine etkili olduğu hatta bu etkinin diğer mikroorganizmalara oranla daha fazla olduğu bildirilmiştir. Sorbatlar tarafından P.frequentans, P.rogueforti, A.flavus, A.parasiticus, P.patulum, Geotrichum candidum, Mucor spp. ve A.ochraceus'un bazı suşlarının tamamen inhibe edildiği, bazı suşlarının ise büyümelerinin ve spor oluşumlarının geciktirildiği bildirilmiştir (Kıvanç, 1990).

Meyve sularında görülen patulin ise, özellikle L-askorbik asit ve  $SO_2$  ilavesi ile katılan miktara bağlı olarak inaktive edilebilmektedir. Ancak inaktivasyon sonucu oluşan ürünlerin özellikleri insan sağlığı açısından toksik

olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Pohland and Allen, 1970).

Patulin, ortamdaki sistein, glutation, aktin gibi sülfidril grupları ile reaksiyona girerek inaktive olmaktadır. Ortama askorbik asit ve askorbatların ilavesi ile patulin miktarında önemli derecede azalmalar elde edilmiştir (Lindroth, 1980).

#### 7.1.3. Genetik mühendisliği

Küflerin kontaminasyonunu önlemek için ya küf kontaminasyonuna dirençli çeşitlerin üretilmesi ya da toksin üretimini inhibe edebilecek çeşitlerin yetiştirilmesi fikri son yıllarda önem kazanmıştır.

Yapılan laboratuvar çalışmalarında mısırdaki A.flavus'a ve aflatoksin üretimine dirençli farklı varyateler bulunmuştur. Bu şekilde farklı çeşitlerin üretilmesi ile küf üremesi ve mikotoksin üretiminin engellenebileceği saptanmıştır (Ellis et al., 1991).

#### 7.1.4. Depolama koşullarının kontrolü

Depolanmış tahılların ve tohumların korunmasında nem ve sıcaklığın düşük olması gerekir. Kontamine olmuş üründe küfün gelişimi, ürünün nem düzeyine, sıcaklığa ve havanın bağıl nemine; hızlı kurutma ve havalandırmaya bağlı olarak değişmektedir (Ağaoğlu, 1985).

Depolanan ürünlerde kaliteyi korumak için kullanılan yöntem, genellikle üründe fungus gelişiminin önlenemediği düşük nem oranlarında depolama yapmaktadır. Düşük nem ve düşük sıcaklığın kombinasyonu gıdalarda kalitenin korunmasında çok etkili olmaktadır (Atlı ve Köşker, 1980; Betina, 1989).

Mikotoksinlerin oluşumuna engel olmak için, depo, ambar ve samanlıklarda çatı izolasyonu iyi olmalı, depolanan ürün tabandan ve duvardan nem almamalıdır. Bu nedenle yem çuvalları tahta ızgaralar üzerinde bulunmalı ve 5 çuvaldan fazlası üst üste yığın yapılmamalıdır.

Yığın yapılan çuvalar duvara dayanmamalıdır. Karma yemler hazırlanırken ve stok edilirken en fazla 7-10 günlük ihtiyacı karşılayacak şekilde stok edilmeli, küflenmiş yemler hayvanlara yedirilmemeli; bulaşlı olmayan yemlerle karıştırılarak konsantrasyonu azaltılmaya çalışılmaması önerilmiştir (Ağaoğlu, 1985).

#### 7.1.4.1. Nem

Ürünlerin depolanacağı ambarlarda, nisbi nem arttıkça mikotoksin üretimi de artacağından % 85 ve daha yukarı nisbi nemlerde, 25-35 °C sıcaklık koşullarında depolama yapılmaması bildirilmiştir (Ellis et al., 1991).

Depolanan gıdalarda A.glaucus grubunun esas önemi, düşük rutubette gelişip kendilerine göre daha az zerafilik olan A.candidus, A.versicolor ve A.flavus gibi türlere; gelişmeleri sırasında oluşturdukları su ile ortamın bağıl nemini yükselterek, bu türlerin gelişmelerine yardım etmektedir. Bu nedenle, depolanan gıdalarda bağıl nemin A.glaucus' un gelişmesine yeterli bir seviyeye gelmesi, havalandırmanın yetersiz olduğu hallerde A.flavus gelişmesine ve sonuçta aflatoksin oluşumuna yol açabilir (Denizel, 1979).

Ürünlerin depolandığı ortamlarda nem miktarının artması, elverişsiz havalandırma şartlarından ileri gelmektedir. Depolanan ürünlerdeki değişimlerin önemli bir nedeni de sıcaklıktır. Depolanan ürünlerin nem içeriği ve sıcaklığı sabit kalmalıdır (Denizel, 1979; Betina, 1989).

#### 7.1.4.2. Sıcaklık

Küflerin gelişmesini ve mikotoksin oluşturmasını etkileyen çevre faktörlerinden birisi de sıcaklıktır. Düşük sıcaklıklarda depolama, A.flavus'un gelişmesinin ve aflatoksin üretiminin kontrolü için uygun olabilir. Depolanan ürünlerde sıcaklık düşüşü mümkün olduğunca kısa sürede sağlanmalı ve bu sıcaklık korunmalıdır. Ancak zirai ürünlerin düşük sıcaklıklarda depolanması ekonomik olmadığından genellikle uygulanmamaktadır (Betina, 1989, Ellis et al., 1991).

#### 7.1.4.3. Gaz atmosferi

Besinlerde küf gelişmesi ve buna bağlı olarak mikotoksin gelişmesinin engellenmesi için modifiye edilmiş gaz atmosferi, kontrollü atmosfer ve modifiye atmosferde paketleme ortamlarından yararlanılır.

Modifiye edilmiş gaz atmosferinde havayı oluşturan gazların normal oranları değiştirilmiştir. Bu değiştirme genellikle havanın CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> oranını artırma, O<sub>2</sub> oranını düşürme şeklinde uygulanmaktadır. Modifiye edilerek gaz oranları kontrol altında tutulan atmosferde depolama ve bu ortamlarda ambalajlama ile küf gelişimi önlenebilir (Ellis et al., 1991).

Kontrollü atmosferde gaz oranları istenildiği şekilde ayarlanarak kontrol altında tutulur. Bu yöntem genellikle yığın şeklinde depolanan gıda maddeleri için uygulanır. Ayrıca raf ömrünü uzatmak istediğimiz gıda maddelerinin uzun süre tazeliklerini korumasını sağlamak amacı ile kontrollü atmosfer ortamlarından yararlanılmaktadır.

Modifiye atmosferlerin kullanılması ile respirasyon oranının yavaşlatılması, mikrobiyal gelişmenin önlenmesi ve enzimatik bozulmanın geciktirilmesi sağlanabilmektedir. Bu yöntem, doğal ve ucuz olması ile tercih edilen yöntemler arasında bulunmaktadır (Ellis et al., 1991).

## 7.2. Toksik Ürünlerin Detoksifikasyonu

Gıda ve yemlerdeki mikotoksinlerin detoksifikasyonunda, mikotoksinlerin yapılarının değiştirilmesi, parçalanması veya başka bir madde ile birleştirilip zararsız hale dönüştürülmesi söz konusudur. Detoksifikasyon işleminde;

a- Mikotoksinin parçalanması veya inaktif hale getirilmesi,

b- Detoksifikasyon işlemi sonucunda üründe toksik veya kanserojenik artıkların bırakılmaması,

c- Uygun şartlar altında gelişip yeniden toksin oluşturabileceklerinden dolayı, küf sporları ve misellerinin yok edilmesi,

d- Ürünün besleyicilik değerini ve kabul edilebilirliğini koruması,

e- Uygulanan işlemin önemli teknolojik değişikliklere yol açmaması gereklidir (Jewers, 1983).

Mikotoksin problemini ortadan kaldırmak amacı ile birçok detoksifikasyon yolları denenmiştir. Bunlar; fiziksel ayırma, kimyasal detoksifikasyon, solventle parçalama ve biyolojik değişimdir.

### 7.2.1. Fiziksel ayırıştırma

Fiziksel ayırma işlemi birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlardan en önemlisi ise son ürünün besleyicilik özelliğini etkilememesidir. Bu nedenle mikotoksinlerin gıda ve yemlerden fiziksel yöntemlerle uzaklaştırılmasında % 100 başarı sağlanmaya çalışılmaktadır (Eriş, 1989).

Fiziksel ayırıştırma işlemleri başarı ile kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemler, gıdaların tüketim için uygunluk derecelerini saptamada temel teşkil etmektedirler (Goldblatt, 1979). Bu teknikler olgunlaşmamış, kırılmış, berelenmiş, renksizleşmiş tohumlara uygulanmaktadır. Fiziksel ayırıştırma işlemi genellikle limit miktarlarda kontamine olmuş tohumlar için kullanılmaktadır (Eriş, 1989). Bu yöntemde bentonit ve aktif kömür, aflatoksini fiziksel olarak uzaklaştırmada kullanılır (Betina, 1989).

#### 7.2.1.1. Solvent ile parçalama

Mikotoksinlerin parçalanması amacı ile kullanılan solventler iki grubu ayrılmışlardır:

1- Uygulandıkları ürünlerdeki yağa etkimeyip, sadece mikotoksini uzaklaştıran solventler (örneğin; Aseton/su).

2- Üründeki yağı ve mikotoksini birlikte uzaklaştıran solventlerdir (Örneğin; Petrol hidrokarbonları/su).

Yerfıstıklarındaki aflatoksinlerin detoksifikasyon işlemlerinde; % 80 su içeren izopropanolün 60 °C'ta 6 defa uygulanması sonucu, gıdadaki aflatoksinin tamamen uzaklaştırıldığı saptanmıştır. Aynı amaçla kullanılan bir diğer ikili sistem ise; % 90 aseton ve % 100 su içermektedir. Bu sistem kullanıldığında pamuk tohumlarındaki aflatoksin düzeyi 10 ppm'den inmektedir (Eriş, 1989).

Aflatoksinlerin solvent yardımı ile parçalanmasında kullanılan sulu alkoller, ürünün yapısında yer alan çözünür karbohidratların % 2,5-10'unu uzaklaştırdıkları için ekonomik bulunmamıştır. Fakat aynı amaçla kullanılan hekzan-metanol, hekzan-etanol, hekzan-etanol-su ve hekzan-aseton-su karışımları ile yapılan çalışmaların ümit verici olduğu gözlenmiştir (Eriş, 1989).

Solvent uygulanması ile, uygun şartlarda aflatoksinin tamamı uzaklaştırılabilmekte; kökü fizyolojik etkilere sahip moleküllerin meydana gelmesi önlenmekte ve ekstrakt ile solvent ayrıştırılarak yeniden elde edilmektedir (Jewers, 1983).

Yöntemin dezavantajları ise; işlem için özel malzeme gerekliliği; üründeki karbohidratların da ekstrakte edilmesi ve maliyetinin yüksek olmasıdır (Jerwes, 1983).

#### 7.2.1.2. Isı ile inaktivasyon

Aflatoksinler genelde ısıya dayanıklı bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle bunların detoksifikasyonları 250 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta yapılmaktadır. 250 °C'ta sıcaklık uygulaması aflatoksinlerin inaktivasyonunda etkili olmaktadır. Isıtılan ürünün nem içeriği ve ısıtma işlemi sonucunda basınçla meydana gelen değişiklik aflatoksin miktarının azalmasını etkilemektedir (Ellis et al., 1991).

Mikotoksinlerin ısı ile inaktif hale getirilmesi, düşük dozda mikotoksin içeren gıdalar için uygun olmamakla birlikte beslenme değerini değiştirmedığından dolayı uygun bir tekniktir (Ellis et al., 1991).



### 7.2.1.3. Işınlama

Aflatoksinler U.V. ışığına karşı hassastırlar. Fakat detoksifikasyon işleminde U.V. ışınlarının kullanılması bir takım sakıncaları da beraberinde getirmektedir. Örneğin, U.V. ışığı ile detoksifikasyonu yapılmış yemle beslenen ördeklerin ciğerlerinde bir takım değişmeler gözlenmiştir (Betina, 1989; Ellis et al., 1991).

Aflatoksinlerle kontamine olmuş yer fıstıkları  $\gamma$ -ışınları ile detoksifike edildikten sonra ördeklere verildiğinde yine aynı sonuçlar elde edilmiştir (Ellis et al., 1991).

Yapılan benzer çalışmalarda aflatoksinlerin elektron veya X-ışınları ile ışınlanması, harabiyet için ihtiyaç duyulan doz ve sürede yapılırsa aflatoksinlerin parçalandığını göstermiştir.

### 7.2.1.4. Adsorbsiyon

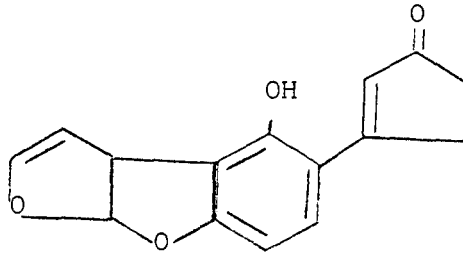
Bentonit adsorbsiyon özelliği gösteren bir kildir. Aflatoksin B<sub>1</sub> içeren solusyona Bentonitin ilave edilmesi ile aflatoksinin adsorbe edildiği görülmektedir. Bentonitin adsorbsiyon kabiliyeti ve aflatoksin uzaklaşması ısıyla muamele ve partikül hacmine bağlı olarak değişir (Ellis et al., 1991).

Aluminyum-oksit, silika ve Aluminyum-silika gibi çeşitli kimyasal maddeler üzerinde de adsorbsiyon özellik göstermelerinden dolayı çalışılmıştır. Bunların içinde hidrat, Na, Ca, Aluminyum-silikatın aflatoksin B<sub>1</sub> için yüksek bir anfiniteye sahip olduğu bulunmuştur (Ellis et al., 1991).

## 7.2.2. Kimyasal detoksifikasyon

### 7.2.2.1. Amonyaklama

Fransa'da yerfıstıklarının iyileştirme amacı ile uygulanan amonyaklama işlemi şöyledir: Yağlı tohumlara 90 °C'ta 2-3 Atmosfer basınçla, 15-30 dak. süre ile amonyak gazı uygulanmakta ve işlem aralıklarıyla tekrarlanmaktadır. Amonyaklama sonucu aflatoksin B<sub>1</sub> molekülü yapısal değişime uğramakta ve aflatoksin D<sub>1</sub> (Şekil 7.1) oluşmaktadır (Cucullu et al., 1976; Eriş, 1989).



Şekil 7.1. Aflatoksin D<sub>1</sub>'in kimyasal yapısı (Turner and Aldrige, 1983)

### 7.2.2.2. Kükürt dioksit

Pohland and Allen (1979), yaptıkları çalışmada patulinin kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>) ile hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğini ve parçalandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar başlangıç absorpsiyon maksimumu 277 nm olan patulinin 5.10<sup>-5</sup> M düzeyindeki sulu çözeltisine makalede belirtilmeyen düzeyde SO<sub>2</sub> katıldıktan sonra 15 dak. içinde bu değer değiştiğini, 238 ve 309 nm.de iki yeni pik saptadıklarını ve bu piklerin de bir süre sonra tamamen kaybolduklarını bildirmişlerdir. Bu kayıp araştırmacılara göre kimyasal yapının değişiminden ve patulinin sulu çözeltilerinde SO<sub>2</sub>'in etkisinin patuline katılımının HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> şeklinde gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır (Aytaç, 1990).

Ough and Corison (1980), yaptıkları araştırmada 25 mg/l patulin içeren üzüm suyuna 100 ppm SO<sub>2</sub> ilavesi sonucunda 15 dak. sonra patulin miktarınının 11,6±1,37 mg/l patulin seviyesine düştüğünü saptamışlardır. Adam, 1980'de yaptığı çalışmada yüksek konsantrasyonlarda (2000 ppm) SO<sub>2</sub>'in patulin ile hemen reaksiyona girdiğini bildirmiştir (Scott, 1984).

### 7.2.3. Biyolojik değişim

Ciegler et al. (1966), yaptıkları bir çalışmada mayaları, küfleri, aktinomisetleri, algleri ve fungal sporları aflatoksinleri parçalama yeteneklerine göre elemişlerdir. Sadece, Flavobacterium aurantiacum NRRL B-184'ün, solumsyondaki aflatoksin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> ve M<sub>1</sub>'i geriye dönüşü olmayacak bir şekilde metabolize edebildiğini saptamışlardır (Eriş, 1989; Ellis et al., 1991). Bunun yanı sıra bazı mikroorganizmaların aflatoksin B<sub>1</sub>'i değişikliğe uğrattığı belirlenmiştir. Bu mikroorganizmalar; Corynebacterium rubrum, Trichoderma viride, Dactylium derroides, Absidia regens, Rhizophus arrhizus ve R.stolonifer'dir (Ellis et al., 1991).

Ördek: yavrusu denemeleri, Flavobacterium aurantiacum ile yeni bir toksik ürün oluşmadan detoksifikasyon işleminin başarılı olduğunu göstermiştir (Eriş, 1989).

## 8. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikotoksinler, insan sağlığını tehdit eden önemli bir unsur olduğundan bazı ülkeler özellikle aflatoksinler için bazı limitler koymuşlardır. Bu ülkeler ithal edecekleri gıda ve yem maddelerinde bulunabilecek toksin limitlerini kanuni düzenlemelerle belirlemiştirlerdir. FAO ve WHO, besinlerde ve yemlerde bulunabilecek aflatoksin miktarını 30 µg/kg; FDA ise insan beslenmesinde kullanılacak besinler için bu sınırı 20 µg/kg olarak saptamıştır.

Ülkemizde ise, çeşitli ürünlerde bulunabilecek mikotoksin miktarını sınırlayıcı hiçbir yasal düzenleme olmadığından, halkımız sağlığı için büyük tehlike teşkil eden bu maddelere karşı tamamen korumasızdır. Gıda maddeleri tüzüğünün (Ercoskun, 1987) 268.maddesi, "tahıllar, bulgur ve yemlik baklagil kuru taneleri aşağıda yazılı hallerde;

a- Bozulmuş, çimlenmiş, küflü, ekşi, tabii olmayan bir koku ve lezzette olanlar, parazitleri ve bunların dışkılarını içerenler,

b- Çavdar mahmuzu % 0,1 ve diğer bitkisel unsurlar miktarı % 0,2 den fazla olanlar, sağlığa az veya çok zarar verecek derecede bozulmuş sayılırlar" der.

Görüldüğü gibi ülkemizde gözlemler sadece duyu organlarımızın duyularına dayandırılmaktadır. Halbuki besinler ve yemler küflü olmasalar bile mikotoksin içeriyor olabilirler. Bu nedenle gıda ve yemlerde bulunabilecek mikotoksin için tolerans sınırlarının kantitatif olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Ülkemizdeki çalışmalar genellikle aflatoksinler üzerinde yoğunlaşmış olup, çoğunluğu bireysel çalışmalardan ibarettir. Diğer mikotoksinler üzerinde çalışmalar ise yok denecek kadar az veya hiç yoktur. Yapılmış bu çalışmaların sonuçlarını yorumlamak ve aralarındaki inter aksiyonu bulmak ise çok zordur. Bu nedenle ülke çapında geniş çaplı bir araştırmaya gereksinme vardır.

Küf gelişiminin engellenmesi açısından ve buna bağlı olarak mikotoksin oluşumunu önlemek amacıyla alınacak tedbirlerin başında küf gelişmesini ve kontaminasyonu önlemek gelmektedir. Bunun için ise işlemlerin tarladan başlaması önerilmektedir. Bunu sağlamak için temiz tohumluk kullanılması, böcek ve bitki hastalıklarının kontrolü ve kontrollü sulama ilk dikkat edilmesi gereken hususlar olmaktadır. Ürünün toplanırken zarar görmemesi ve depolama koşullarının ıslah edilmesi gibi hususlar önem taşımaktadır.

Daha sonraki evrelerde ise hızlı tarama teknikleri geliştirilerek küf ve mikotoksin ile bulaşık ürünün ayrılması gelmektedir.

Amaç ürünlerde küf gelişmesini ve buna bağlı olarak mikotoksin oluşumu için gerekli çevre şartlarının ıslah edilmesini sağlamaktır. Mikotoksin oluştuktan sonra bunun detoksifikasyonu için alınması gereken önlemler genellikle ekonomik olmamaktadır. Bu nedenle de en iyisi, toksin oluşumunun engellenmesinin sağlık açısından da daha emniyetli olacaktır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acar, J. ve Arsan, B.T., 1988. Meyve sularında patulin oluşumu üzerine araştırmalar. TÜBİTAK, Proje No: TOAG-544, Basılmamış. Ankara.
- Ağaoğlu (Tevfik), S. Aflatoksinler ve aflatoksikozis, Seminer notları. Basılmamış, 1985.
- Ahrens, E. (Çev. Acar, J.), 1977. Küf toksinlerinin besin maddelerinde ve yemlerde oluşumu ve önemi. Çağdaş tarım tekniği, (1): 54-58.
- Akyıldız, R.(Çev.), Küfler ve mikotoksinler. Sharby, T.F. Mold and Mycotoxins. Frontiers in Nutrition Supplement No. 270, 272; 1049-1060, 1979, Yem Sanayi Dergisi.
- Allcrof, R. et al., 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of milk toxin. Nature, 209: 154-155.
- Alperden, İ., 1979. Hayvansal ürünlerde mikotoksin araştırmaları ve kalite kontrol esasları. TÜBİTAK MAE, Yayın No: 31, Gebze.
- Anonymous, 1983. Sampling and sample preparation technique for mycotoxin training manvel. Tropical Development and Researcn Institute (TDRI), London, England.
- Anonymous, (TSE), 1985. Aflatoksin tayin metodları-yağlı kuru meyvelerde. TS-4672-Ankara.
- Aping, R., 1982, Die Patulinbildung durch penicillium expansum in apfeln und in apfelsaften in abhangigkeit von der sorte, dem standart und der dungung im vergleich zu relevanten fruchtmerkmalen (Dissertation) gissen (Basılmamış).
- Arai, T., et al., 1967. Antimicrobial activity of aflatoxin. J.Bacteriol. 93: 59-64.
- Arda, M., 1979, Mikoloji, A.Ü.Veteriner Fak. Yayınları, 366. Ders Kitabı, 261.
- Arda, M., 1980. Mikoloji (Genel ve özel), A.Ü.Veteriner Fak. Yayınları. 366. s.322.
- Aşkın, O., Denizel, T., Köşker, Ö., 1977. Aspergillus flavus ile aşıl原因 kuru incirlerde aflatoksun oluşumu üzerine araştırmalar: A.Ü.Ziraat Fak.Yıllığı-27:1.

- Atlı, A. ve Köşker, Ö., 1980. Buğday, un ve ekmekte aflatoksin oluşum ve stabilitesi üzerine araştırmalar. A.Ü.Ziraat Fak. Diploma sonrası yüksekokul ihtisas tez özetleri, 194-311.
- Auffray, Y. and Houtibonnes, P., 1985. Mycopathologia, 91; 159.
- Bacon, C.W., Sweeney, J.G., Robbins, J.D. and Burdick, D., 1973. Appl. microbiol., 26, 155.
- Başaran, A. ve ark., 1985. Besin maddesi olarak kullanılan bazı kuru yiyeceklerde ve kümes hayvanı yemlerinde aflatoksin araştırmalarına ilişkin bulgular., Anadolu Tıp Dergisi, 7: 1-12.
- Başaran, A. ve ark., 1986. Eskişehir'de bazı gıda maddeleri ve yemlerde aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> araştırılması., Anadolu Tıp Dergisi, 8: 51-61.
- Başaran, A., ve ark., 1986. Eskişehir'de sütlerde aflatoksin B<sub>1</sub> ve M<sub>1</sub> araştırması. Anadolu Tıp Dergisi. 8: 61-69.
- Başaran, A. ve ark., 1988. Eskişehir'de imal edilen bozalarda ve boza yapımında kullanılan hammaddelerde mikotoksin araştırmaları. Anadolu Tıp Dergisi, 10:(2) 11-18.
- Betina, V. and Binovska, Z., 1979. Biologi (Bratislava), 34, 461.
- Betina, V. (Editör), 1984. Mycotoxins-Production, Isolation, separation, and purification, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.
- Betina, V., 1989. Mycotoxins. Department of enviromental chemistry and technology, Slovak Polytechnical University Braticlava. Czeshoslovakia., Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.
- Biermann, V.A. and G.Terpion., 1980. Nachweis von aflatoksin B<sub>1</sub> mittels ELISA. Arch. Lebensmittelhyg. 31: 51-57.
- Burmaister, H.R. and C.W. Heiseltine, 1966. Aflatoxin production. Appl. Microbial., 14: 403-404.
- Butler, W.H., 1964. Aflatoxins. J.Pathol Bacterial: 88, 189-196.
- Boller, R.A. and Schroeder, H.W., 1973. Infmence of aspergillus chevalieri on production of aflatoxin in rice by aspergillus paraciticus, Phyto pathology, 63: 1507.

- Boller, R.A. and Schroeder, H.W., 1974. Infmence of aspergillus candidus on production of aflatoxin in rice by aspergillus paraciticus, *Phytopathology*, 64, 121.
- Boyacioğlu, D. ve Gönül, M., 1986, Mikotoksin tayin metodolojisi I. E.Ü. Mühendislik Fak.Der. Gıda Mühendisliği, 4: (2). 87-95.
- Boyacioğlu, D. ve Gönül, M., 1987. Mikotoksin tayin metodolojisi II. E.Ü.Mühendislik Fak.Der. Gıda Mühendisliği, 5: (1), 91-100.
- Carlborg, F.W., 1979. *Food Cosmet, toxical.*, 17, 159.
- Christensen, C.M., 1974. Fungi in cereal grains and their product. *Mycotoxins in food staff.* s.9-14.
- Chu, F.S.et al., 1977. Preparation and characterization of aflatoxin B -O-carboxymethyloxime. *J.Assoc. off. Anal. Chem.* 60: 791-794.
- Ciegler, A. et al., 1966. Aflatoxin production and degradation *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbial.* 14: 826-833, 934-939.
- Ciegler, A. et al., 1971. *Microbial Toxins. Vol. 6, Fungal Toxins.* S: 11-12, Academic Press. Inc.
- Creppy, E. et al., 1979. *FEBS lett.*, 104; 287.
- Creppy, E. et al., 1980, *Toxicol lett.* 6;
- Creppy, E. et al., 1984. *Food Chem Toxicol.*, 22; 883.
- Cucullu, A.F., et al., 1976. *J.Agric. Food Chem.*, 24: 408.
- Çakmak, E.A. ve ark., 1992. Aflatoksin G<sub>1</sub>'in karaciğer ve böbrek üzerindeki histolojik etkileri. *Doğa T.R. Medical Science*, 16 (3): 175-183.
- Çoksöyler, N. ve Köşker, Ö., 1980. A.Ü., Ziraat Fak. Diploma sonrası yüksekökol ihtisas tez özetleri. 436-456.
- Çolakoğlu, M. ve Ünal, K., 1974. *Proc. IV Int. Congress Food Sci. Technol. III:* 309-313.
- Davis, N.D. et al., 1966. Production of aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium *Appl. Microbiol* 14. 378-380.
- Davis, N.D. et al., 1967. Production of aflatoxin B<sub>1</sub> and aflatoksin G<sub>1</sub> in chemically defined medium by *Aspergillus flavus*, *Mycopothd. Mycol. Appl.*, 13, 251-253.



- Davis, N.D. and Diener, U.L., 1978. Mycotoxins, Food and Beverage Mycology. Beuchat L.(ad.) AVI Publishing Company, Inc. Westpont, Connecticut. 401-405.
- Demirer, M., 1975. Ankara Üniv. Vet. Fak. Dergisi. XXI: (1-2), 180-198.
- Demirer, M.A. ve ark. 1979. Piyasada satılmakta olan bazı karma yemlerde ve yem hammaddelerinde Aflatoksin B<sub>1</sub> araştırmaları. A.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 26: 169.
- Denizel, T., ve ark., 1977. Kuru incir ve ezmelerinde bulunan küflerin izolasyon ve identifikasyonları üzerine araştırmalar. A.Ü. Ziraat Fak.Yıllığı, 27; 51.
- Denizel, T., 1979. Mısırların depolanmaları sırasında olu-bazı mikotoksinler ve bunların sinerjistik etkileri, İhtisas tezi, Ankara.
- Diener, V.L. and Davis, N.D., 1969. Aspergillus formation by Aspergillus flavus in aflatokxin. Academic Press, New York.
- Damaglou, A.D. et al., 1985. Some factors governing the production of patulin in apples: Food microbiology. 2,3-10.
- Damaglou, A.P. and Champbell,D.S., 1986. The effect of PH on the production of patulin in apple juice: Letters in Appl. Microbiology., 2, 9-11.
- Eke, D. ve Gökten, D., 1987. Kabuklu fındıklarda Aspergillus flavus gelişmesi ve aflatoksin oluşumu. Gıda Sanayi No: 4: 36-43.
- Ellis, W.O., et al., 1991. Aflatoxins in food. Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, dedection and methods of control. Critical reviewes in food. Science and nutrition. 30(3): 403-439.
- Enomoto, M. and Saito, M. 1972. Carcinogens produced by fungi, Ann. Rev. Microbiol. 26: 279-312.
- Endo, A. and Kurada, M., J., 1976. Antibiot., 29; 841.
- Engel, G. et al., 1975. J.Milchwissenschaft, 30; 129.
- Engel, G. and Tuber, M., 1984. In V.Betina (Editor). Mycotoxins-production, isolotion, separation and duri-fication, elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, p. 291.

- Ercoşkun, A., 1987. Tahıl, bulgur, yemeklik baklagil kuru taneleri. Halk Sağlığı-Çevre Sağlığı ve Gıda Maddeleri Mevzuatı, s: 264-265.
- Eriş, Y. 1989. İzmir İlinde tüketilen tahıllarda ve yağlı tohumlarda aflatoksin üreten küflerle ilgili bir araştırma. Bornova-İzmir.
- Eser, S.R. ve ark., 1978. Bulgurların aflatoksin yapan Aspergilluslarla enfekte olmaları. Cerrahpaşa Tıp Fak. Dergisi, 9: 213.
- Esentepe, M. et al., 1977. The preliminary studies an cotton seed borne fungi on their rater of presence in Ege region. J.Turkish Pytopath. 6: 77-83.
- Ewart, A.J., 1933. Ann., Bot., 47; 913.
- Frieser, M.D. and Garren, L., 1982. International mycotoxin check sample program part II. Report on the performance of participating laboratories for the analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. J.Assoc. Off. Anal.Chem. 4: 864-868.
- Frank, H.K. and Cook, J.M., 1969. biochem. J., 113; 515.
- Galtier, P. et al., 1984. toxical. lett. 23; 341.
- Gardner, A.K., et al., 1968. J. Agric. Food Chem., 16:990.
- Garies, M., et al., 1984. Stimulation of aflatoxin B<sub>1</sub> and T-2 toxin production by sorboste, Appl. Environ Microbiol., 47, 416-420.
- Goldblatt, L.A., 1970. Chemistry and control of aflatoxin. Pure Appl. Chem. 21: 331-353.
- Güray, Ö. ve Vural, N. 1968. Mikotoksinlerle meydana gelen besin zehirlenmeleri münasebeti ile aflatoksinler üzerine bir araştırma. A.Ü. Tıp Fak. Mecmuası, 21: 1030.
- Güray, Ö. ve ark. 1978. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 8: 129-143.
- Hassal, C.H. and Jones, D.W., 1962. Chem. Soc., 4189.
- Hayashi, K. and Kameyama, Y., 1982. Kankyo igoku kenkyusho nenpo (Nagoya Daiaku), 32(1981) 228. Chem. Abstr., 96: 1785d.

- Heathcote, J.G. and Hibbert, J.R., 1978. Aflatoxins: Chemical and biological aspects, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
- Horn, B.W. and Wicklow, D.T., 1983. Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*, *Com.J.Microbiol.*, 29, 1087,
- Holzalpfel, C.W., et al., 1966. Isolation and structure of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> tetrahedron letters. 24: 2799.
- İnce, H., 1978. Bazı meyve sularında patulin stabilitesini etkileyen faktörler üzerinde araştırmalar. İhtisas Tezi. A.Ü. Ziraat Fak. Ankara, 57 s. (yayınlanmamış).
- Jabbar, A. and Rahim, A., 1962. *J.Pharm. Sci.* 51: 595.
- Jewers, K., 1983. Türkiye'de mikotoksinler konusunda verdiği seri seminer notları. *Gıda Müh.Fak.Der.* 1-14.
- Jones, B.D., 1972. Methods of Aflatoxin analysis tropical products institute (TPI), Report 6-70.
- Kıvanç, M., Sert, S., 1985. Taze civit ve lor peynirleri üzerinde mikrobiyolojik çalışmalar. *Gıda.* 10(5), 278-292.
- Kıvanç, M., 1990. Gıda koruyucusu olarak sorbik asit ve tuzları-II. *Gıda.* 15(4): 245-250.
- Kıvanç, M., 1990. Mold growth and presence of aflatoxin in some Turkish cheeses. *Journal of food safety* 10(287-294).
- Kıvanç, M., Akgül, A., Sert, S., 1991. Effect of carvacrol on growth and toxin production by *A.flavus* and *A.parasiticus* sciences, *des aliments*, 11: 361-370.
- Kıvanç, M. ve ark., 1992. Çiğ sütlerde küf izolasyon ve identifikasyonu ile aflatoksin aranması. *Gıda Sanayii* 6: (1), 26-35.
- Labuza, T.P. 1983. Regulation of mycotoxins in food. *J.of food protection.* Vol.46.b No.3, 260-265.
- Lee, E.G.H. et al., 1966. Effects of divalent metals on the production of aflatoxins in submerged cultures, *J. Food Sci.* 31, 432-435.
- Lee, L.S. et al., 1981. Role of lactone ring of aflatoxin B<sub>1</sub> intoxycty and mutagenicity. *Experientia*, 37,16.

- Lillehoj, E.B., et al., 1967. *Experientia*, 23: 187-188.
- Lindroth, S., and Niskanen, A., 1978. Comparison of potential patulin hazard in home-made and commercial apple products: *J. Food Sci.*, 43, 446-448.
- Lindroth, S., 1980. Occurrence, formation and detoxification of patulin mycotoxin. Academic Dissertation. Espoo. Finland, 46 p.
- Masri, M.S. et al., 1969. The aflatoxin M content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. *The Veterinary Record*, 84: 148.
- Mayura, K. et al., 1984. *Appl. Environ microbiol*, 48; 1186.
- Meisner, H. et al., 1983. *Arch. Biochem. Biophys.* 223; 264.
- Meyer, R.A., 1982. Zur Bestimmung von patulin in lebensmitteln-vorschlag einer standartmethode. *Nahrung*, 26/4. 336-342.
- Motales, R.I. and Adye, J.C., 1965. Production of aflatoxin submerged cultures, *Appl Microbiol.* 113, 208-210.
- Mortimer, D.N. et al., 1985. A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin: Food additives and contaminants. 2,3. 165-170.
- Nagarajan, V. and Bhat, R.V., 1973. Aflatoxin production in peanut varieties by *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus paraciticus* Speare. *Appl microbiol* 25: 319, 321.
- Nordholt, M.D. et al., 1979. *J. Food Prot.* 42; 476.
- Nordholt, D.M., 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions: *J. Food Prot.*, 45, 6. 519-526.
- Norstadt, F.A., Mc Colle, T.M., 1963. *Science*, 140; 410.
- Norstadt, F.A. and Mc Colle, T.M., 1969. *Appl. Microbiol*, 17; 193.
- Oser, B.L., 1969. Regulatory aspects of control of mycotoxins in foods. Aflatoxin, L.C. Goldblatt. Academic Press, New York and London: 393-400.
- Ough, C.S. and Corison, C.A., 1980. Measurement of patulin in grapes and wines *J. Food Sci.*, 45,3,476-478.

- Özçelik, S., 1980. Niğde, Amasya ve Erzincan illerinde üretilen önemli elma çeşitlerinde mikrobiyal bozulmalar ve bozulan elmalardan patulin oluşumu: TÜBİTAK 11. Bilim Kongresi. TOAG Tebliğleri (Gıda ve Fermentasyon Teknolojisi Seksiyonu), 1-15.
- Özçelik, S., 1981. Patulin üretimine etki eden bazı faktörler. Ata.Üni.Ziraat Fak., Mikrobiyoloji Kürsüsü, Erzurum.
- Özçelik, S., 1982. Patulin üretimine etki eden faktörler. Gıda, 7,2, 49-54.
- Park, K.Y. and Bullerman, L.B., 1983. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus paraciticus* and *Aspergillus flavus*. J.Food protection 46(3) 178-184.
- Pohland, A.E. and Allen, R., 1970. Stability studies with patulin: J. AOAC, 53, 4, 688-691.
- Raper, K.B. and Thom, C., 1949. A manual of the penicillia, Bailliere, Tiddall and Cox, London.
- Roeder, G.R., 1976. RNA Polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. p.285.
- Scott, P.M., 1978., Mycotoxin infeed and ingredients and their origin. J.Food Protect. 41: 385-3989.
- Scott, P.M., 1982. Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain product. J. AOAC. 65, 876-883.
- Scott, P.M., 1984. Effects of food processing on mycotoxins J.Food Pro. 54(6) 489.
- Scott, R.E. and Gaucher, G.M., 1986. Microbiol, 32; 286.
- Semeniuk, G. et al., 1971. Mycopath. Mycol. Appl., 43; 137.
- Sergeant, K., et al., 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature. 192:1096-1097.
- Sert, S., 1982. Bazı çevre faktörlerinin karma yemlerde aflatoksin oluşumuna etkisi üzerinde araştırmalar. Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi. Süt ve Gıda Teknolojisi Bölümü Mikrobiyoloji Birimi. Erzurum.
- Sert, S., 1984. Aflatoksinlerin mikroorganizmalar ve bitkiler üzerine etkileri. Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi. Ziraat Dergisi. Cilt: 15, Sayı: 1-2.

- Sert, S., 1985. Mikotoksin üretimine tesir eden faktörler. Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi, Ziraat Dergisi. Erzurum. 16, 1-4, 147-159.
- Shin, C.N. and Manth. E.H., 1973. Aflatoxin produced by *A.parasiticus* when incubated in the presence of different goves. J.Milk Food Tech., 36; 421.
- Shotwell, O.L. et al., 1969. Cereal Chem. 46: 446-454.
- Shotwell, O.L. et al., 1970. Cereal Chem. 47: 700-707.
- Sommer, N.F. et al., 1974. Production of patulin by *Penicillium expansum*: App;1. Microbiol. 28, 4, 480-592.
- Steyn, P.S., in V. Betine (Editor), 1984. Mycotoxins-Production, isolation, separation and purification, elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, p.183.
- Terao, K. et al., 1978. Toxicology. Biochemistry and pathology of mycotoxins. Kodansk Ltd. Tokyo, 198.
- Tsubouchi, H. et al., 1987. Mycopathologia. 97; 111.
- Tuncer, N., 1987. Ankara ve çevresinde üretilen yumurta örneklerinde aflatoksin rezüdülerinin araştırılması. Etlik Vet. Mikrob.Derg., 6(1).
- Turner, W.B. and Aldridge, D.C., 1983. Fungal metabolites II, Academic Press. London, 90, 507.
- Topal, Ş., 1986. Biyolojik toksisite kontrolünde larva ve civciv embriyo yöntemleri. Kükem Dergisi, 9(2); 9-23.
- Ueno, Y. and Kubota, K., 1976. Cancer res., 36; 445.
- Ueno, I., and Chu, F.S., 1978. Modification of hepatotoxic effect of aflatoxin B<sub>1</sub> in rabbits by immunization. Experientia 34: 85-86.<sup>1</sup>
- Uzunboy, H., 1984. İthal pirinçlerde aflatoksin araştırmaları. Yüksek Lisans Tezi. Basılmamış.
- Vorster, L.J., 1966. Rev.Fr. Corps. Gras, 13: 7.
- Walbeek, Van, W., et al., 1969. Can.J.Microbiol. 15: 1281.
- Warren, H.H. et al., 1962. J.Amer.Chem. Soc., 84; 1926.
- Wessel, J.R., 1974. Proposed tolerance for aflatoxin in peanuts. Aflatoxin quality control seminer notes. Chicago, Illinois.

- Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G., 1977. Mycotoxie fungi, Mycotoxins, mycotoxicosis I. New York and Masel, pp. 159-185.
- Yousef, A.E. and Marth, E.H., 1983. In corporcution of  $|C^{14}|$  acetate into aflatoxin by resting cutures of *Aspergillus parasiticus* in the presence of antifungal apents, *Eur.J.Appl. Microbiol. Biotech.*, 18, 103.
- Yurtyeri, A., 1979. Aflatoksinli gıda maddelerinin besin kontrolü ve insan sağlığı bakımından önemi. *Et Balık Endüstrisi Dergisi*, 19-28.