

**ÇEŞİTLİ TAHİL UNLARINDAKİ
MİKOTOKSİJENİK FUNGUSLARIN
TANIMLANARAK TEMEL MİKOTOKSİN
POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Rasime ÖZİÇ
Doktora Tezi**

**Biyoloji Ana Bilim Dalı
Haziran 2011**

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 091018**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Rasime ÖZİÇ'in “Çeşitli Tahıl Unlarındaki Mikotoksijenik Fungusların Tanımlanarak Temel Mikotoksin Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 03/06/2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard.Doç.Dr. Nalan YILMAZ SARIOZLÜ	
Üye	: Prof.Dr. Merih KIVANÇ	
Üye	: Prof.Dr. Dilek AK	
Üye	: Prof.Dr. Ahmet ASAN	
Üye	: Prof.Dr. Semra İLHAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

ÇEŞİTLİ TAHİL UNLARINDAKİ MİKOTOKSİJENİK FUNGUSLARIN TANIMLANARAK TEMEL MİKOTOKSİN POTANSİYELLERİNİN

ARAŞTIRILMASI

Rasime ÖZİÇ

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Yard.Doç.Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

2011, 231 sayfa

Bu çalışmada Eskişehir/Türkiye'deki marketlerden alınan un örneklerindeki mikotoksijenik fungusların tanımlanması ve temel mikotoksinleri üretme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 25 farklı un örneği incelenmiş ve 543 küf izole edilmiştir. Küfler diagnostik literatürler kullanılarak geleneksel yöntemler ile cins ve tür seviyesinde tanımlanmıştır. Kimyasal taksonomi için ince tabaka kromatografi (İTK) yöntemi ile tüm izolatların metabolit profilleri elde edilerek morfolojik tanımlama sonuçlarını destekleyici olarak kullanılmıştır.

Un örneklerinden elde edilen küf izolatlarından mikotoksin üretme yeteneğine sahip olanlar kültürel yöntemler ile taranmış ve 130 adet mikotoksijenik küf belirlenmiştir. Bu izolatların aflatoksinleri (B1,B2,G1,G2) ve okratoksin A'yı üretme yetenekleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminde ölçülmüştür. Aflatoksin üretme yetenekleri 0,13-10438,00 ng/ml aralığında, okratoksin A ise 3,69-28440,00 ng/g aralığında belirlenmiştir. 32 temsilci mikotoksijenik izolatın içsel transkrip ayırıcı (ITS) bölgeleri, beta-tubulin ve kalmodulin gen bölgeleri dizilenmiş ve *Aspergillus flavus*, *A. japonicus*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. alliaceus* ve *Penicillium viridicatum* olarak tanımlanmıştır.

İncelenen tüm un örnekleri söz konusu mikotoksinler yönünden HPLC sisteminde incelenmiştir. 24 örneğin farklı seviyelerde söz konusu mikotoksinleri içerdiği ancak; 3 un örneğinin Türk Gıda Kodeksi sınır değerleri üzerinde aflatoksin, 2 un örneğinin de sınır değerler üzerinde okratoksin A içerdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Tahıl unu, mikotoksin, mikotoksijenik küf, HPLC, ITS

ABSTRACT**PhD Thesis****RESEARCH ON IDENTIFICATION OF MYCOTOXIGENIC FUNGI AND
MAIN MYCOTOXIN POTANTIAL IN VARIOUS CEREAL FLOURS****Rasime ÖZİÇ****ANADOLU UNIVERSITY
Graduate School of Sciences****Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ****2011, 231 pages**

In this study, determination of mycotoxigenic fungi in various cereal flours from markets at Eskişehir/Türkiye and their capability of production of main mycotoxin were purposed.

For this aim, 25 different flour samples were investigated and 543 mold isolates were obtained. The molds were identified at genus and species level according to traditional identification literatures. Chemotaxonomic data that was obtained metabolite profiles of all of the isolates with thin layer chromatography (TLC) method were used as promoter of morphological identification results. Mycotoxigenic fungi were screened with cultural methods and determined 130 molds as mycotoxigenic. Aflatoxins (B1, B2, G1, G2) and ochratoxin A production properties were measured with high performance liquid chromatography (HPLC) system. Aflatoxin production properties were detected between 0.13-10438.00 ng/ml, ochratoxin A production properties were detected between 3.69-28440.00 ng/g. 32 representative mycotoxigenic isolates were identified as *Aspergillus flavus*, *A. japonicus*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. alliaceus* and *Penicillium viridicatum* with sequencing of internal transcribe spacer (ITS) regions, beta-tubulin and calmodulin gen regions.

All of the flour samples were investigated with HPLC system for detection of mycotoxins. In addition to mycotoxin contamination at different levels were detected in 24 flour samples, we were determined 3 flour samples including aflatoxin, 2 flour samples including ochratoxin A above maximum limit values of Turkish Food Codex.

Keywords: Cereal flour, mycotoxin, mycotoxigenic fungi, HPLC, ITS

TEŞEKKÜR

Araştırmamın başlangıcından bitimine kadar, tecrübesi ve bilgisi ile her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen değerli danışmanım Yard.Doç.Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlığı sırasında Tez İzleme Komitesinde görev alarak her aşamada görüş ve önerileri ile katkıda bulunan ve desteklerini her zaman hissettiren değerli hocalarım Prof.Dr. Merih KIVANÇ ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden Sayın Prof. Dr. Dilek AK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırmam boyunca bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Prof.Dr. A.Yavuz KILIÇ'a ve Genel Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Kıymet GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım. Tezimin mikotoksin ölçümleri esnasında Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi (BIBAM) olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Doç.Dr. Lütfi GENÇ'e ve yardım sever BIBAM personeline teşekkürü bir borç bilirim. Araştırmamda HPLC cihazının kullanımını öğreterek tezimin ilerlemesine önemli bir katkıda bulunan sayın hocam Arş.Gör.Dr. Erol ŞENER'e ve HPTLC cihazının kullanımını öğreterek tezime veri zenginliği sağlamamda önemli katkısı olan sayın hocam Yard.Doç.Dr. Yasemin SÜZEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezim boyunca tecrübe ve imkanlarını benimle paylaşan ve her zaman desteğini hissettiren değerli hocam Yard.Doç.Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca destekleyici yaklaşımının yanı sıra bilgi ve tecrübesi ile yol gösterici tutumundan dolayı Yard.Doç.Dr. Mehmet CANDAN'a, yardım ve dayanışmalarından dolayı da Yard.Doç.Dr. Meral YILMAZ, Uzm. Erdoğan ÇAKIR ve diğer mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, mesai arkadaşlarıma ve hocalarıma teşekkür ederim.

Kendisini tanıdığım ilk günden itibaren gösterdiği sevgi, saygı ve fedakârlıklardan dolayı eşim Cem ÖZİÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rasime ÖZİÇ
Haziran, 2011

1. İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Küfler ve Mikotoksinler	2
1.2. Mikotoksijenik Küfler	5
1.2.1. Aflatoksin Üreten Küfler	6
1.2.1.1. <i>Aspergillus Flavi</i> Seksiyon Türleri	8
1.2.2. Okratoksin A Üreten Küfler	10
1.2.3. Trikotesen Üreten Küfler	14
1.2.4. Fumonisin Üreten Küfler	17
1.2.5. Zearalenon Üreten Küfler	18
1.3. Dünya’da ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler	19
1.3.1. Aflatoksinler	19
1.3.1.1. Aflatoksinle Kontamine Gıdalar	21
1.3.1.2. Aflatoksin Biyosentez Mekanizması	23
1.3.1.3. Aflatoksinlerin Etki Mekanizması	27
1.3.2. Okratoksinler	32
1.3.2.1. Okratoksinle Kontamine Gıdalar	33
1.3.2.2. Okratoksinlerin Biyosentez Mekanizması	34
1.3.2.3. Okratoksinlerin Etki Mekanizması	37
1.3.3. Trikotesenler	39
1.3.3.1. Trikotesenlerle Kontamine Gıdalar	40
1.3.3.2. Trikotesenlerin Biyosentez Mekanizması	42
1.3.3.3. Trikotesenin Etki Mekanizması	51
1.3.4. Fumonisinler	53

1.3.4.1. Fumonisinle Kontamine Gıdalar	55
1.3.4.2. Fumonisinin Biyosentez Mekanizması	56
1.3.4.3. Fumonisin'in Etki Mekanizması	61
1.3.5. Zearalenon.....	63
1.3.5.1. Zearalenonla Kontamine Gıdalar.....	65
1.3.5.2. Zearalenonun Biyosentez Mekanizması	66
1.3.5.3. Zearalenon Etki Mekanizması	66
1.4. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	68
1.5. Mikotoksinleri Belirleme Yöntemleri	70
1.5.1. Kültürel Yöntemler.....	70
1.5.2. Analitik Yöntemler	71
1.5.2.1. Örneklem	72
1.5.2.2. Ekstraksiyon ve Ekstrenin Temizlenmesi	72
1.5.2.3. İnce Tabaka Kromatografi (İTK)	75
1.5.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC)	75
1.5.2.5. Gaz Kromatografi (GC)	76
1.5.2.6. Kapiler Elektroforez (CE)	76
1.5.2.7. Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant Yöntemi (ELISA)	77
1.5.2.8. Diğer Analiz Yöntemleri.....	77
1.6. Gıda Kaynaklı Küflerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	78
1.6.1. Gıda Kaynaklı Küflerin İzolasyonu.....	78
1.6.2. Gıda Kaynaklı Küflerin İdentifikasyonu	81
1.6.2.1. Morfolojik İdentifikasyon	81
1.6.2.2. Moleküler İdentifikasyon	82
1.6.2.3. Kimyasal İdentifikasyon	84
2. MATERYAL VE METOD	86
2.1. MATERYAL	86
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Un Örnekleri	86
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	87
2.1.2.1. Rose Bengal Kloramfenikol Agar (RBCA) (Fluka 17211).....	87
2.1.2.2. Dikloran-Rose Bengal Agar Base (DRBCA) (Fluka 17147).....	88
2.1.2.3. Czapek Dox Agar (CZ) (Fluka 70185)	89

2.1.2.4. Malt Ekstrakt Agar (MEA)(Merck 1. 05398)	89
2.1.2.5. Malt Ekstrakt Agar (MEA)	90
2.1.2.6. Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA)	90
2.1.2.7. % 25 Glycerol Nitrate Agar (G25N).....	91
2.1.2.8. % 20 Sukrozlu Czapek Yeast Autolysate Agar (CY20S)	91
2.1.2.9. Czapek Dox Agar (CZ)	92
2.1.2.10. Potato Dextroz Agar (PDA) (Merck 1.10130)	92
2.1.2.11. Yeast Extract Sucrose Agar (YES).....	92
2.1.2.12. Cocconut Agar Medium (CAM).....	93
2.1.2.13. <i>Aspergillus flavus/parasiticus</i> Agar (AFPA)	93
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	94
2.1.3.1. Czapek Concentrate (CC)	94
2.1.3.2. Lacto-Cotton Blue Mounting Medium	94
2.1.3.3. Tris-acetate-EDTA (TAE) 50X.....	95
2.1.3.4. PBS	95
2.2. METOD	96
2.2.1. Un Örneklerinden Küflerin İzolasyonu	96
2.2.2. Tek Spor İzolasyonu ve Kùltürlerin Muhafazası	97
2.2.3. İncelenen Un Örneklerinden İzole Edilen Küflerin Geleneksel Teknikler ile teşhisi	98
2.2.4. Elde Edile İzolatların İTK Yöntemi ile Sekonder Metabolit Profillerinin İncelenmesi ve Kimyasal Karakterizasyonun Gerçekleştirilmesi.....	100
2.2.5. Literatürel Olarak Mikotoksijenik Olduğu Bilinen İzolatların Kùltür Ortamında Mikotoksijenik Özelliklerinin İncelenmesi	101
2.2.6. Aflatoksinlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Belirlenmesi	101
2.2.6.1. Standart ve HPLC Koşulları.....	101
2.2.6.2. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması.....	102
2.2.6.3. <i>A. flavus</i> İzolatlarından Aflatoksinlerin Ektraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi	103
2.2.6.4. Un Örneklerinden Aflatoksinlerin Ektraksiyonu ve HPLC	

ile Belirlenmesi.....	105
2.2.7. OTA'nın HPLC ile Belirlenmesi.....	107
2.2.7.1. OTA Standart Çözeltilisinin Hazırlanması.....	107
2.2.7.2. HPLC Koşulları	108
2.2.7.3. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması.....	109
2.2.7.4. Matrikste Doğrusallık, İmmuno Aktif Kolon Verimliliğinin Belirlenmesi ve Kesinlik (Tekrar Edilebilirlik).....	109
2.2.7.5. Okratoksijenik İzolatlardan OTA Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi.....	110
2.2.7.6. Un örneklerinden OTA ekstraksiyonu ve HPLC ile inlenmesi ...	111
2.2.8. Mikotoksijenik Küflerin Moleküler İdentifikasyonu	111
2.2.8.1. Moleküler İdentifikasyona Alınacak İzolatların Seçimi	111
2.2.8.2. DNA izolasyonu	112
2.2.8.3. İncelenecek Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu.....	113
2.2.8.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	114
2.2.8.5. PCR Ürünlerinden Dizi Analizi.....	115
2.2.8.6. İncelenen Gen Dizilerinin Analizi	116
3. BULGULAR	117
3.1. İncelenen Un Örneklerinden Filamentli Fungusların İzolasyonu	117
3.2. Tek Spor İzolasyonu ve Kültürlerin Muhafazası	117
3.3. İncelenen Un Örneklerinden İzole Edilen Filamentli Fungusların Klasik Teknikler ile teşhisi	121
3.4. Elde Edilen İzolatların İTK Yöntemi ile Sekonder Metabolit Profillerinin İncelenmesi ve Kimyasal Karakterizasyonu	131
3.5. Literatürde Mikotoksijenik Olduğu Belirtilen İzolatların Kültür Ortamında Mikotoksijenik Özelliklerinin İncelenmesi.....	133
3.6. Aflatoksinlerin HPLC ile Belirlenmesi	142
3.6.1. Aflatoksin Standardına Ait HPLC Sonuçları.....	142
3.6.2. Kalibrasyon Eğrisi.....	142
3.6.3. <i>A. flavus</i> İzolatlarından Aflatoksinlerin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi	144

3.6.4. Un Örneklerinden Aflatoksinlerin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi	148
3.6.4.1. İmmuno Aktif Kolon Verimliliği	148
3.6.4.2. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik).....	149
3.6.4.3. Un Örneklerindeki Aflatoksin Miktarı.....	149
3.7. OTA'nın HPLC ile Belirlenmesi	154
3.7.1. Standardın HPLC ile Belirlenmesi	154
3.7.2. Kalibrasyon Eğrisi	155
3.7.3. Matrikste Doğrusallık, İAK Verimliliğinin Belirlenmesi ve Kesinlik (Tekrar Edilebilirlik).....	156
3.7.4. Okratoksijenik İzolatlardan OTA Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi	157
3.7.5. Un Örneklerinden OTA Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi	159
3.8. Mikotoksijenik Küflerin Moleküler İdentifikasyonu	161
3.8.1. Moleküler İdentifikasyona Alınacak İzolatların Seçimi.....	161
3.8.2. DNA İzolasyonu	165
3.8.3. İncelenecek Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu ve Saflaştırılması.....	165
3.8.4. PCR Ürünlerinden Dizi Analizi	167
3.8.5. İncelenen Gen Dizilerinin Analizi.....	172
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	176
KAYNAKLAR.....	201
EK-1 Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri.....	215

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. <i>A.flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> 'un zirai ekosistemdeki yaşam döngüsü	8
1.2. Aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	20
1.3. A) Gen kümesi, B) Aflatoksin biyosentez yol izi.	28
1.4. Hücrede aflatoksin üretimi, kontrolü ve taşınması. PM; plazma membranı ..	29
1.5. Reaktif metabolitlerin ve biyogöstergelerin oluşumuna aracılık eden AFB1 metabolizması.....	29
1.6. Okratoksinlerin kimyasal yapıları.....	33
1.7. Okratoksin A biyosentezi	36
1.8. Trikotesenlerin yapısı.....	40
1.9a. Trikotesen biyosentez yol izi. <i>F.sporotrichioides</i> 'de T-2 toksin biyosentetik yol izi.	44
1.9b. Trikotesen biyosentez yol izi. <i>F.graminearum</i> nivalenol ve deksinivalenol biyosentetik yol izi.	45
1.10. <i>Fusarium</i> ve <i>Trichoderma</i> 'da trikotesen biyosentez yol izi ve rol alan genler	46
1.11. <i>F.sporotrichioides</i> ve <i>F.graminearum</i> 'un nivalenol (NIV) ve deksinivalenol (DON) üreten strainlerinde trikotesen biyosentez yol izindeki gen kümesi.	47
1.12. Fumonisinlerin yapısı.....	54
1.13. Hayvan sistemlerindeki sifingolipid biyosentez yol izi.	57
1.14. <i>F.verticillodes</i> 'de tasarlanan fumonisin biyosentez yol izi CoA= Koenzim A.	58
1.15. <i>F.verticilloides</i> 'de fumonisin biyosentetik gen kümesi.	58
1.16. Zearalenon yapısı.	64
1.17. İAK kolon prensibi.....	74
1.18. SPE kolonunun prensibi	74
1.19. Mikotoksin analizinde ELISA prensibi	78
1.20. Gıda kaynaklı fungusların izolasyonu için kullanılan yöntemler	79
1.21. Ribozomal genlerin iç transkripsiyon kısımları (ITS).....	84
1.22. İnce tabaka kromatografisi ile sekonder metabolit analizi işlem şeması	85

2.1. A) <i>Penicillium</i> B) <i>Aspergillus</i> cinsine ait türlerin tanımlanmasında kullanılmış olan besiyerleri, inokulasyon ve inkübasyon sıcaklıklarının şematik gösterimi	99
3.1. İncelenen örneklerle ait izolasyon ortamında elde edilen filamentli fungus kolonileri	117
3.2. A) Tek spor izolasyonunda elde edilen germinasyon bölgeleri, B) Tek spor izolasyonu ile elde edilen saf kültür	118
3.3 A) Yatık MEA tüplerinde hazırlanan mikofungus stoğu, B) Mikrofungusların % 15'lik yağsız süt tozu ortamında hazırlanan liyofilize stokları	118
3.4. İncelenen un örneklerdeki toplam fungus sayısının örneklerle göre dağılımı.....	119
3.5. İncelenen un örneği tiplerine göre ortalama fungus sayısının dağılımı	120
3.6. İncelenen un örneklerinden elde edilebilen izolat miktarları	121
3.7. İTK plakasında 365 nm'de aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2) ve 312 nm'de okratoksin A (OTA)'nın görüntüsü.....	131
3.8. İTK plağında metabolit profili örneği	132
3.9. İncelenen küf izolatlarının ekstrasellüler metabolitlerinin aflatoksin standardı ile karşılaştırılması	132
3.10. İncelenen küf izolatlarının ekstrasellüler metabolitlerinin okratoksin A standardı ile karşılaştırılması	132
3.11. 3.8'de verilen İTK plakasındaki intrasellüler metabolitlerin 365 nm'de CAMAG HPTLC ile analiz grafiği	133
3.12. Kültürel yöntemlerde A) <i>A. parasiticus</i> NRRL 465 (aflatoksin; pozitif), B) <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 (okratoksin A; pozitif) ve C) negatif kontrolün 365 nm'deki görüntüleri	134
3.13. Küf izolatlarının kültürel ortamlarda ve 365 nm'deki görüntüleri; a) İzolat 21.8 (<i>A. ochraceus</i>) (okratoksin A; pozitif), b) İzolat 18.34 (<i>A. flavus</i>) (aflatoksin; pozitif).....	135
3.14. Küf izolatlarının AFPA ortamında görüntüleri; a) İzolat 17.9 (<i>A. flavus</i>); aflatoksin negatif, b) İzolat 6.1 (<i>A. flavus</i>); aflatoksin pozitif.....	135

3.15. Aflatoksin standart karışımına ait kromatogram örneği.....	142
3.16. Aflatoksin G1.....	143
3.17. Aflatoksin B1	143
3.18. Aflatoksin G2.....	143
3.19. Aflatoksin B2	144
3.20. Negatif kontrole ait kromatogram.....	144
3.21. <i>A. parasiticus</i> NRRL 465'a ait kromatogram.....	145
3.22. İzolat 18.35 (<i>Aspergillus flavus</i>)'e ait kromatogram.....	145
3.23. İzolat 12.5'e ait kromatogram.....	146
3.24. 12 no'lu un örneğine ait kromatogram.....	150
3.25. 18 no'lu un örneğine ait kromatogram.....	150
3.26. 26 no'lu un örneğine ait kromatogram.....	150
3.27. OTA standart kromatogramı.....	155
3.28. OTA kalibrasyon eğrisi	155
3.29. Matrikste kalibrasyon eğrisi	156
3.30. Negatif kontrole ait kromatogram.....	157
3.31. <i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174'un (pozitif kontrol) OTA kromatogramı.....	157
3.32. İzolat 24.27 (<i>Penicillium veruucosum</i>)'un OTA kromatogramı.....	158
3.33. Un18 örneğinde OTA kromatogramı	159
3.34. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	161
3.35. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	161
3.36. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	162
3.37. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	162
3.38. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	162
3.39. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	163
3.40. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	163
3.41. 365 nm'de gözlenen metabolit profilleri	163
3.42. Genomik DNA izolasyon sonucu (M: 1 kb marker).....	165
3.43. Kısmi 18S-ITS1-5.8S-ITS4-Kısmi 26S gen bölgesine ait saflaştırılmış PCR ürünü	166

3.44. β -Tubulin (BenA) gen bölgesine ait saflaştırılmış PCR ürünü (M: 1 kb marker)	166
3.45. Kalmodulin gen bölgesine ait saflaştırılmış PCR ürünü (M: 1 kb marker)	167
3.46. İncelenen izolatların ITS dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi.....	173
3.47. İncelenen izolatların beta-tubulin dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi:	174
3.48. İncelenen izolatların calmodulin dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi.....	175
4.1. İncelenen un örneklerinde tanımlanan küf cinsleri ve tür sayıları	179
4.2. <i>Aspergillus</i> ve <i>Alternaria</i> üyelerinde sporulasyon özelliklerinin kıyaslanması	192

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Önemli mikotoksinler, üreticileri, etkileri ve bulundukları ürünler	4
1.2. Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler.	6
1.3. Aflatoksin Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri	23
1.4. Okratoksin A Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri.....	34
1.5. Deoksinivalenol Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri	41
1.6. Fumonisinler Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri.....	55
1.7. Zearalenon Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri	65
1.8. Farklı tiplerdeki gıda ürünlerinde bulunan fungusların izolasyonu için kullanılan yöntem ve besi ortamları	80
1.9. Küflerin identifikasyonunda kullanılan kültür ortamları.....	82
1.10. Tür identifikasyonu için önerilen gen bölgeleri ve veri tabanları	84
2.1. Un örneklerine ait ambalaj, üretim ve son kullanma tarihleri	86
2.2. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan aflatoksin standart karışımı konsantrasyonları.....	102
2.3. HPLC sisteminde incelenen standartların son konsantrasyonları (ng/ml) ...	103
2.4. Her bir aflatoksine ait kesim noktası (a) ve eğim (b) değerleri	104
2.5. OTA kalibrasyon konsantrasyonları	109
2.6.Çalışmada kullanılan primerler.....	116
3.1. 1 ve 2 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları.....	122
3.2. 3 ve 4 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları.....	122
3.3. 5 ve 6 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları.....	123
3.4. 8 ve 9 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları.....	123
3.5. 10, 11 ve 12 numaralı numunelere ait izolatların identifikasyon sonuçları .	124
3.6. 13 ve 14 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları ..	124
3.7. 15 ve 16 numaralı numunelere ait izolatların identifikasyon sonuçları	125
3.8. 17 ve 18 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları ...	125
3.9. 19, 20 ve 21 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları	126

3.10. 22, 23 ve 24 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları.....	126
3.11. 25 ve 26 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları .	127
3.12. İdentifiye edilen türlerin incelenen un örneklerindeki dağılımı	128
3.13. Geleneksel teknikler ile identifiye edilen mikotoksijenik tür, mikotoksijenik özellikleri, örneklerle göre dağılımları ve izolat sayıları...	134
3.14. İdentifiye edilen izolatların İTK ve kültürel ortamlardaki floresans özellikleri	136
3.15. Aflatoksin üretme yeteneğine sahip <i>A. flavus</i> izolatları.....	146
3.16. İmmuno aktif kolonun verimliliği (%) ve kesinliği (% RSD)	149
3.17. İncelenen un örneklerindeki aflatoksin miktarları	151
3.18. Aflatoksin içeren un örnekleri ve aflatoksin mikatırı.....	151
3.19. İmmuno aktif kolonun verimliliği (%) ve kesinliği (% RSD)	156
3.20. OTA üretme yeteneğine sahip izolatlar	158
3.21. Un örneklerindeki OTA miktarı.....	159
3.22. Okratoksijenik izolatlar ve un örneklerindeki okratoksin A miktarının karşılaştırılması	160
3.23. Moleküler identifikasyona alınan izolatlar ve temsil ettikleri grup	164
3.24. İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri	167
4.1. İncelenen 25 adet tahıl kaynaklı un örneği küf yükü, mikotoksijenik küf yükü, aflatoksinler ve okratoksin A içeriği yönünden kıyaslanması	194

1. GİRİŞ

Dünya çapında insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından büyük tehdit oluşturan mikotoksinler Türkiye’de de ciddi sorunlara yol açmaktadır. Özellikle kökeni ve işlenmişliği açısından yüksek oranda fungus barındırabilecek tipteki gıdalar mikotoksin içerikleri açısından bir risk faktörü oluşturmaktadır. Oldukça iyi tanımlanmış yaygın mikotoksijenik funguslar olan *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* genuslarına ait olan türler sadece gıda tüketimi ile değil, hasat ve gıda işleme sürecinde kontaminasyonlara, alerjik ve toksijenik reaksiyonlara sebep olmaktadır.

İnsan ve hayvan sağlığı üzerine güçlü etkisi ve ekonomik önemleri nedeniyle, mikotoksijenik funguslar oldukça fazla taksonomik ve filogenetik ilgi görmektedirler. *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* genuslarına ait bazı türler; pek çok ülke tarafından konu edilmiş olan beş ana mikotoksinin yani; aflatoksinler, okratoksin A, deoksinivalenol (=DON veya vomitoksin), zearalenon (ZEA) ve fumonisin üretiminden sorumludur. Ayrıca biyoaktif bileşiklerin kaynağı ve böyle bileşikleri üreten ajanlar olarak fungusların endüstride kullanımının gittikçe artması ile olası biyolojik yararlarını ortaya çıkarmak amacıyla fungal taksonominin uygulamalı disiplinleri önemli bir boyut kazanmıştır. Fungal taksa tanımlaması için gelişen yaklaşımlar objektif ve çok iyi ön değerlendirme sağladığı için tercih edilmektedir. Fungal sistematığe geleneksel morfolojik yaklaşımlar grup için kullanılabilir karakterlerin eksikliği nedeniyle problemlidir ve özellikle tür seviyesinde sıklıkla yanlışlıklar yapılmaktadır. Ancak, geçen on yıl içinde fungal taksanın tanımlanması ve belirlenmesi için sağlam sonuçlar veren yeni moleküler ve analitik araçlar geliştirilmiştir.

Türkiye un sektörü Dünya un sektöründe önemli bir yer tutmaktadır ve yılda 10 milyon ton un tüketimi ile Dünya ülkeleri arasında 3. sırada yer almaktadır. Ayrıca, yılda yaklaşık olarak 19 milyon ton düzeyindeki buğdayın 15 milyon tonu un ve unlu mamuller için kullanılmaktadır. Çalışmamızda Türkiye ve Dünya açısından bu derece yüksek bir kullanım alanına sahip olan bu gıda türünün mikotoksin ve mikotoksijenik fungus potansiyeli açısından incelenmesi

amaçlanmıştır. Bu amaçla; market kaynaklı farklı un örneklerinden mikotoksijenik fungusların izolasyonu ve geleneksel, kimyasal ve moleküler yöntemler ile tanımlanması gerçekleştirilmiş, un örneklerindeki mikotoksin potansiyeli belirlenmiş, elde edilmiş olan fungus örneklerinin mikotoksin potansiyelleri ortaya konulmuştur.

Farklı un çeşitleri üzerine yapılan bu çalışma ile Türkiye ve Dünya’ da büyük bir sektör ve tüketime sahip olan bu gıda çeşidinin insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından potansiyeli belirlenmiş, karşılaşılan risk faktörlerine göre gerekli önlemlerin alınmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

1.1. Küfler ve Mikotoksinler

Küfler doğal çevrelerde yaygın olarak bulunan, endüstriyel olarak önemli organizmalardır. Küflerin en önemli rolleri organik maddelerin parçalayıcıları olmaları ve bunun eşliğinde de besinlerin döngüye katılmasını sağlamalarıdır. Hayvan ve bitkilerin simbiyontları ve patojenleri olarak ve tahta, boya, deri, gıda ve kumaş gibi doğal ve sentetik materyalleri bozucu organizmalar olarak da önemli rollere sahiptir. Aynı zamanda etanol, sitrik asit, antibiyotikler, polisakkaritler, enzimler ve vitaminler gibi ekonomik olarak önemli maddelerin üreticileri olarak da kullanılırlar (Gadd 1993).

Küfler karakteristik olarak filamentli ya da ipliksi yapıda olan ökaryotik canlılardır. Her bir ipliksi yapı **hif** olarak adlandırılır ve hifler sık dallıdırlar. Dallanmış hiflerin oluşturduğu topluluklara **misel** denir. Her bir hif hücre çeperi ile sarılmıştır ve sadece uç kısımlarından büyürler. Bu apikal büyüme şekli küfleri hemen hemen diğer tüm organizmalardan ayırır. Küfler, heterotrofik beslenme şekline sahiptirler ve enerjilerini organik maddelerden sağlarlar. Bunların en basiti monosakkarit ve aminoasitlerdir. Bu tür bileşiklerin pek çoğu hücre çeperinden absorbe edilmeden önce ekstrasellüler enzimler ile basit monomerlerine parçalanırlar. Küfler, hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalırlar. Fakat her iki durumda da son yapı olarak spor üretilir. Bu yapılar şekil ve büyüklük bakımından oldukça farklıdırlar, fakat sporlar önceden oluşmuş bir embriyo

içermemeleri nedeniyle yüksek bitkilerin tohumlarından farklıdır (Sümer 2006).

Küfler doğada her yerde bulunur ve ekosistemde büyük bir alana yerleşme yönünde gelişmişlerdir. Bu gelişim sırasında sekonder metabolitler olarak bilinen çeşitli ekstrasellüler kimyasalları üretme yeteneği oluşturmuşlardır. Pek çok küf farmasötik alanda kullanılan oldukça yararlı sekonder metabolitleri (örneğin; penisilin) ürettikleri gibi oldukça toksik metabolitleri de üretmekten sorumludur. 1930 ve 1940'lı yıllarda küf kaynaklı antibiyotik olarak kullanılan birçok metabolit, bugün yüksek canlılara gösterdikleri toksik etkiler nedeniyle mikotoksin olarak sınıflandırılmıştır. Mikotoksinler, esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir ve küçük dozlarda alınsalar bile insan, hayvan ve bitkilere toksik etki yaparlar. Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri ve birçok gıda ve yem maddesinde gelişerek toksinlerini oluşturabilmeleri nedeniyle, mikotoksinler çok önemli doğal toksinler olarak kabul edilmektedir. Bunların iki grubu (aflatoksin, okratoksin) 2B karsinojenler olarak sınıflandırılmıştır. Triketesen, zearalenon, patulin ve fumonisin gibi diğer toksinler ise insan gıdaları ve hayvan yemleri ile ilişkili olan önemli ajanlardır (Çizelge 1.1) (Magan ve Aldred 2007; Tunail 2000).

Sekonder metabolitler mikroorganizmalar (ve diğer az gelişmiş organizmalar) tarafından üretilen ve büyümeleri için hayati olmayan ürünler olarak tanımlanabilir. Bu nedenle bu tip metabolitler, üreticileri adına rolleri bilinmeyen metabolik ürünler olarak da tanımlanmaktadır. Mikotoksinleri içeren sekonder metabolitler bir bakıma “yabancı” olarak göz önünde tutulmuştur ve kimyasal yapıları oldukça az anlaşılmıştır. Bu gizemli kimyasalların anlaşılması özellikle mikotoksinler söz konusu olduğunda oldukça önemlidir. Çünkü bu kimyasallar insan gıda zincirinde sorunlar oluşturmaktadır. Bazı çalışmalar bu tip ekstrasellüler metabolitlerin yüzlercesinin farklı çürükçül fungus tarafından üretilbildiğini belirtmiştir ve mikro ekstraksiyon tekniklerini kullanarak ilgili türlerin benzerlik ve farklılıklarını ortaya koymayı başarmıştır (Magan ve Aldred 2007).

Çizelge 1.1. Önemli mikotoksinler, üreticileri, etkileri ve bulundukları ürünler (Tunail 2000)

Mikotoksin	Toksini üreten fungus türleri	Memeli hayvanlara etkileri	Bulunduğu ürünler
Aflatoksin	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	hepatotoksik, kanserojen, teratojen (AFB1)	yer fıstığı, fındık vb. yem, süt, peynir
Bisoklamikasit	<i>Byssosclamyces fulva</i> (<i>Paecilomyces variotii</i>)	kanama	meyve suları
Sitrinin	<i>P. citrinum</i> , <i>A. terreus</i>	nefrotoksik, nörotoksik	pirinç, arpa ve unları, fasulye
Siklopiazonikasit	<i>P. aurantiogriseum</i> (<i>P. cyclopium</i>), <i>P. griseofulvum</i> , <i>A. flavus</i>	hepatotoksik, kanserojen	un, fasulye, yem, et ürünleri
İzlanditoksin	<i>P. islandicum</i>	hepatotoksik	pirinç
Luteoksikrin	<i>P. islandicum</i> .	hepatotoksik, kanserojen	pirinç, yem
Maltorisin	<i>A. oryzae</i>	hepatotoksik	malt embriyosu
Okratoksin	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. alutaceus</i> , <i>P. verrucosum</i> (<i>P. viridicatum</i>), <i>P. aurantiogriseum</i> (<i>P. cyclopium</i>)	nefrotoksik, hepatotoksik, teratojen, immunosupresif	tahıllar, sebzeler, domuz eti, balık ürünleri, malt
Patulin	<i>P. expansum</i> , <i>P. patulum</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>Byssosclamyces nivea</i>	nörotoksik, hücreye toksik	meyveler, meyve suları, malt embriyosu
Penisilikasit	<i>P. martensii</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>A. alutaceus</i>	Hepatotoksik, nefrotoksik, teratojen	pirinç, pirinç unu
Psoralen	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	dermatoksik, mutajen, nekroz oluşumu	sebze (kereviz)
Rubratoksin	<i>P. rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i>	Hepatotoksik, teratojen	tahıllar
Sporidesmin	<i>Pithomyces chartarum</i>	Hepatotoksik, dermatoksik	delice otu
Sterigmatosistin	<i>Bipolaris species</i> , <i>Eur. amstelodamii</i>	kanserojen	buğday, yer fıstığı
Trikotesenler (Diasetoksisirpenol, T-2 Toksin, Nivalenol)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>Myrothecium roridum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichothecium roseum</i>	Alimentary Toxic Aleukia (ATA), düşük dozlarda kusma, lökopeni, deri nekrozları	tahıllar, fasulye, meyve ve sebzeler
Zearalenon (F-2 Toksin)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>	östrojen benzeri etki	Mısır, buğday, fasulye, pirinç, yem.

Türler ve mikotoksin üretimi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi oldukça zordur. Bazı durumlarda, mikotoksinler belirli türler ile yanlış bir ilişkiye dayalı olarak isimlendirilmiştir. Örneğin; verrukulojen, viridikatumtoksin, rubratokin. Zaman geçtikçe ve daha fazla bileşik tanımlandıkça, tür-mikotoksin listesi oldukça büyük bir hale gelmiştir ve gerçek ilişkiyi belirlemek oldukça zorlaşmıştır. Bu ilişkilerden gerçek olanının bilinmesinin ne kadar önemli olduğu açıktır. Gıdalarda mikotoksijenik küflerin bulunma olasılığı ve mikotoksin içerdiği düşünülen gıdalara doğru karar vermek Dünya çapında gıda endüstrisi alanında bir problem haline gelmiştir (Hocking 2006).

1.2. Mikotoksijenik Küfler

Gıda ve yemlerin mikotoksinler ile kontaminasyonu insan ve hayvan sağlığı için büyük bir risk teşkil etmektedir. Mikotoksinler kontamine olmuş gıda ve yemlerin yenmesinden sonra insan ve hayvanlar için akut ya da kronik zehirlenme ve hasar oluşumuna neden olabilmektedir. Dahası mikotoksinler üretim yapan ülkelerde çok büyük ekonomik kayıpların oluşmasına neden olmaktadır. Dünya’da tüketilen tahılların % 25-40’ının bu toksik bileşikler ile kontamine olduğu rapor edilmiştir. Mikotoksinler tarlada, depolama esnasında ya da daha sonraki ısı ve nem açısından uygun koşullar altındaki gıda zincirinde yer alan *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* gibi genusların bazı türleri tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir (Çizelge 1.2) (Riba ve ark. 2010). Bu cinslere ait türler aflatoksin, okratoksin A, trikotesenler, zearalenon ve fumonisin olarak adlandırılan beş önemli mikotoksini üretmektedir (Seifert ve Levesque 2004; Frisvad ve ark. 2007).

Çizelge 1.2. Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler (Tunail 2000).

<i>Aspergillus</i> toksinleri	<i>Penicillium</i> toksinleri	<i>Fusarium</i> toksinleri	<i>Alternaria</i> Toksinleri
Aflatoksinler	Sitrinin	Zearalenon (F-2 toksin)	Alternariol
AFB1	Okratoksin A	Trikotesenler	Alternariolmono- metil-eter
AFB2	Sitreoviridin	Deoksinivalenol	Altertoksin
AFG1	Rubratoksin A	Nivalenol	Tenuazonikasit
AFG2	Rubratoksin B	Diasetoksisirpenol	
AFM1	Patulin	T-2 toksin	
AFM2	Penisilikasit	HT-2 toksin Tremortin,	
AFB2a	P-R (Pen. requaforti)-toksin	Fusarin-C	
AFG2a	Luteosikrin	Fumonisin B1	
AFB3	İzlanditoksin	Moniliformin	
Aspertoksin	Ksantosilin-X		
Sitrinin	Siklopiazonik asit		
Sterigmatosistin	Sitromisetin		
Okratoksin A	Rugulosin		
Patulin	Ksantomegnin		
Penisilikasit			
Rugulovasin A			
Rugulovasin B			
Verrukulotoksin			
Emodin			

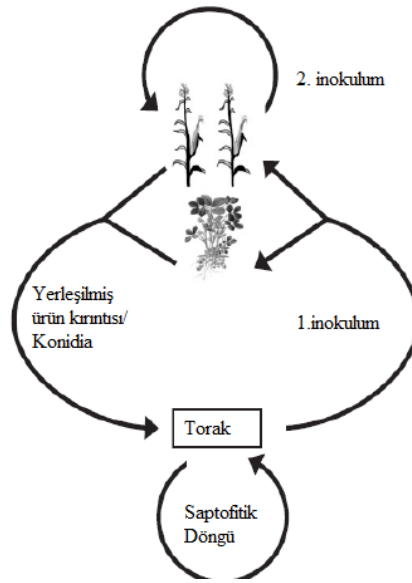
1.2.1. Aflatoksin Üreten Küfler

Aspergillus cinsi Ascomycota filumunun bir üyesidir ve 185'in üzerinde türe sahiptir. *Aspergillus Flavi* seksiyonunun birkaç üyesi aflatoksin üreticisidir. Bunlar *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, *A. minisclerotigenes* ve *A. bonbycis*'i içeren daha az yaygın karşılaşılan türlere ilaveten özellikle *A. flavus* ve

A. parasiticus'u içermektedir. *Flavi* seksiyonunun dışında sınıflandırılmış olan bazı *Aspergillus* türleri de aflatoksin üretmektedir. Örneğin; *Circumdati* grubuna morfolojik olarak benzerlik gösteren, *Ochraceorosei* grubunun bir üyesi olan *A. ochraceoroseus* ve ascomycet üyesi olan *Emericella astellata* ve *E. venezuelensis* (*Aspergillus Nidulant* seksiyon)'de aflatoksin üretmektedir.

Aspergillus Flavi seksiyonunun üyeleri oldukça bol ve toprak kaynaklı küfler arasında geniş bir dağılıma sahiptir ve Dünya'nın her yerinde bulunabilirler. *A. flavus* bitki kalıntıları, ağaç yaprakları, çürümüş odunlar, hayvan artıkları, pamuk, kompost, ölü böcekler ve hayvan leşleri, dış ve iç hava, depolanan tahıllar, yaşayan insan ve hayvanların yüzeyindeki pek çok organik bileşiği besin kaynağı olarak kullanarak yaşamını devam ettiren bir saprofittir. Tarımsal alandaki yaşam döngüsü iki aşamaya ayrılabilir (Şekil 1.1). Bunlardan birincisi; topraktaki bitki kırıntılarına yerleşmesi ve ikincisi ise aktif bir şekilde gelişen bitkisel ürünlerdeki tane ve tohumları işgal etmesidir. Toprak *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un birincil aşılması için bir rezervuar olarak görev yapmaktadır. *A. parasiticus* toprak çevresine daha adapte olmuş görülmektedir ki nitekim yer fıstığında baskın bir şekilde bulunmaktadır. Buna rağmen *A. flavus* hava ve yaprak çevresine daha iyi adapte olmuş görülmektedir ve bu tür mısır, pamuk tohumu ve ağaç yemişlerinde baskın bir şekilde bulunmaktadır.

Kuru ve düşük besin gibi elverişsiz koşullar altında, misel **sklerotia** denilen dirençli yapılar halinde toplanmaktadır. Sklerotia; pigmentli ve hifin sıkı topluluklarıdır ve olumsuz çevresel koşullara dirençli olup uzun süre dormant halinde kalabilir. Bu küfler toprakta ya, böceklerin yüzeyinde ve bitki parçalarında misel olarak ya da sklerotia olarak kışı geçirir. Koşullar uygun olduğu zaman, sklerotia ya ilave hifler üreterek çimlenir ya da toprak ve havada dağılmalarını sağlayan sporları (eşeysiz üreme yapıları) üretirler. Çoğunlukla eşeysiz sporlar ve miseller şeklinde meydana gelirler.



Şekil 1.1. *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un zirai ekosistemdeki yaşam döngüsü

Aflatoksin kontaminasyonu birinci aşamada; gelişen ürünün enfeksiyonu ve ikinci aşamada olgunlaşmadan sonra kontaminasyonda artış olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Her iki aşama pek çok kontaminasyon olayına katkı sağlamaktadır. İklim kontaminasyonun her iki aşamasını da doğrudan etkiler. Kontaminasyonun birinci aşaması esnasında, duyarlı ürünlerin *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından enfekte edilmesi kuşlar, memeliler, böcekler tarafından gelişen ürünü mekanik olarak yaralama yoluyla desteklenir. *A. flavus* sporları çeşitli şekillerde yaralanmış olan ürünlere daha hızlı bir şekilde kolonize olurken, sağlam ürünlere olan etkileri bu derece hızlı gerçekleşmemektedir (Donner 2008).

1.2.1.1. *Aspergillus Flavi* Seksiyonu Türleri

Flavi seksiyonu türlerinin popülasyonu çeşitlidir ve spor rengi, sklerotia üretimi, çözünür pigmentin varlığı ve gelişme oranı gibi karakterleri içeren fenotipik özellikle yönünden farklı bireylerden oluşmaktadır. Fizyolojik ve morfolojik kriterlere dayalı olarak *A. flavus* iki straine ayrılmaktadır. *A. flavus*'un S-tipi izolatları diğer *A. flavus* türlerinkinden daha çok sayıda, küçük (ortalama

<400 µm çapında) sklerotia ve az konidia üretir. S straini sadece B aflatoksinlerini yüksek derişimlerde üretme yeteneğine sahip olan *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* olarak tanımlanmıştır. *A. flavus*'un L-tipi izolatları ise büyük ve az sayıda sclerotia üretir ve *A. flavus*'un tipik straini olarak belirlenmiştir. Strain S-tipine benzerdir fakat farklı fizyolojik kriterlere sahip olduğu Dünya genelinde rapor edilmiştir. Bu strainler G tipi aflatoksinler de üretebilmektedir (Donner 2008).

***Aspergillus flavus* Link**

İlk olarak 1809 yılında tanımlanmıştır. 25 ve 37 °C'de ve Czapeks Yeast Autolysate Agar (CYA) ortamında hızlı bir gelişim gösterir ve sarımsı yeşil koloniler üretir. Kolonisi kadifemsi veya çoğunlukla yünümsüdür. Koloni arka yüzeyi kremsi soluk sarıdan, sarı-pembemsi haki renginde olabilir, fakat özellikle sklerotia üreten strainlerde kahverenginde olmaktadır. Sklerotiaları önce beyaz daha sonra siyah renklidir. Kondidioforları uzun ve kabadır, konidial baş küresel ve ışınsaldır. Vezikülü küreseldir ve metulası bulunduğu silindirik ya da uç kısmı şişkindir. Fiyalidleri silindiriktir ve uç kısmı sivridir, hatta belirgin bir boyun kısmı bulunmaktadır. Konidial baş çoğunlukla iki sıralıdır fakat sadece fiyalite sahip konidial baş da yaygındır. Sporları küresel ya da küremsidir, yüzeyleri hafif pürüzlüdür. *A. flavus* Dünya çapında yayılışa sahiptir. Yerfıstığı, mısır, yağ tohumu, hububat, fıstık, hurma ve diğer pek çok gıdada bulunabilmektedir (Samson ve ark. 2010).

***Aspergillus parasiticus* Speare**

İlk olarak 1912 yılında tanımlanmıştır. 25 ve 37 °C'de ve Czapeks Yeast Autolysate Agar (CYA) ortamında hızlı bir gelişim gösterir ve koyu sarı yeşil koloniler üretir. Kolonileri kadifemsi veya daha sıklıkla yünümsüdür. Kolonileri her ortamda hızlı gelişim gösterir. Koloni arka yüzleri krem, soluk sarı, sarı,

pembemsi haki rengindedir, ancak sklerotia üreten strainlerde kahve renkli olarak görülmektedir. Konidioforları renksiz, uzun, düz veya pürüzlü yüzeylidir. Konidia başı küresel ve ışınısaldır. Vezikülleri küreseldir, metulalarının bulunması durumunda silindirik veya uç kısmı şişkindir. Fiyalitleri silindirik ve sivri uçludur ve belirgin bir boyun kısmına sahiptir. Kondidial baş iki serilidir ancak sadece fiyalide sahip başlarla sıklıkla karşılaşmaktadır. Konidiaları küre ya da küremsi şekillerdedir ve belirgin bir şekilde pürüzlüdür. Dünya genelinde oldukça yaygın bir türdür. Yerfıstığı, hububat, fıstık ve diğer gıdalarda bulunabilmektedir (Samson ve ark. 2010).

Okratoksin A Üreten Küfler

Okratoksin A (OTA) ilk olarak 1965 yılında *A. ochraceus* (*Circumdati* seksiyon) kültüründen izole edilmiştir, fakat devam eden çalışmalar ile bu toksinin *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait çeşitli fungal türler tarafından üretildiği belirlenmiştir. *A. ochraceus* iki türden ibarettir. OTA'yı yüksek miktarda üreten ikincisi ve yeni türü *A. westerdijkiae*'dir. *Aspergillus Nigri* seksiyonundaki *A. carbonarius* önemli bir OTA üreticisidir. Özellikle üzümelerde meydana gelir ve üzüm suyu, şarap ve kurutulmuş bağ meyvelerinde ve bazen de kahve çekirdeklerinde OTA üretir. *Aspergillus niger*'de OTA üretici olarak kaydedilmiştir. *A.niger* topluluğuna ait kaydedilen okratoksijenik izolat yüzdesi *A. carbonarius* türlerinden oldukça düşüktür. *A. lacticoffeatus* ve *A. sclerotioniger*'de kaydedilen diğer OTA üreticileridir.

Diğer *Aspergillus*'larda büyük miktarda OTA üretebilir fakat görülme sıklıkları oldukça düşüktür. *Aspergillus Circumdati* seksiyonunda yer alan *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* ve *Neopetromyces muricatus* OTA üreten diğer türlerdir. *Aspergillus Flavi* seksiyonunda yer alan *Petromyces albertensis*'de OTA üretmektedir.

Penicillium cinsinde OTA üreten türler *P. verrucosum* ve *P. nordicum*'dur. *P. verrucosum* depolanan tahıllarda önemli bir OTA üreticisiyken, *P. nordicum*

salam gibi et ürünlerinde bulunan ana OTA üreticisidir (El-Khoury ve Atoui 2010; Cabanes ve Bragulat 2008).

***Aspergillus ochraceus* K. Wilh.**

İlk kez 1877 yılında tanımlanmıştır ve *Aspergillus Circumdati* seksiyonunun oldukça yaygın bir türüdür. Sarı kahverengi (ochre) kolonilere sahiptir. Vezikülleri yuvarlaktır ve yoğun bir şekilde paketlenmiş metulalar meydana getirir. Fiyalidleri küçük, düz duvarlıdır ve açık kahverengi konidiaları vardır. Kurutulmuş balık, kurutulmuş çeşitli tohumlar, hurma ve yağ tohumu gibi çeşitli gıdalarda yayılım göstermektedir. Ayrıca pirinç, arpa, buğday ve mısır gibi tahıllara ilaveten yeşil kahve tohumunda sıklıkla bulunabilmektedir (Hocking 2006).

***Aspergillus westerdijkiae* Frisvad & Samson**

İlk olarak 2004 yılında tanımlanmıştır. 25 °C’de CYA ortamında nispeten hızlı bir gelişim gösterir ve sarı renkli sporlar üretirler. Kolonileri genellikle kadifemsi ya da çoğunlukla yünümsüdür. Tüm ortamlarda hızlı gelişebilir ve koloni arka yüzeyi krem soluk sarıdan sarıya, pembemsi haki rengine ve özellikle sklerotia üreten strainler için kahverenginde olabilmektedir. Sklerotiaları önce beyaz renkte olup daha sonra lavanta-mor ve siyah renkleri alabilmektedir. Konidioforları uzun ve pürüzlü yüzeylidir. Konidial başlar küremsidir ve daha yaşlı kültürlerde iki ya da daha fazla kompakt kolonlar oluşturabilir. Vezikülü küre şeklinde ve şeffaftır. Metulaları silindir şeklindedir ve uç kısmı şişkindir. Fiyalidleri ise silindirik olup uç kısmında belirgin bir şekilde boyun kısmı bulunmaktadır. Konidial başlar sıklıkla iki serili olup yalnızca fiyalid taşıyan başlarda bulunabilmektedir. Konidiaları küre, küremsi şekillerdedir, renksiz, hafif pürüzlü veya düz duvarlıdır. Dünya genelinde yaygın olmakla beraber çoğunlukla

oldukça sıcak iklimlerde bulunabilmektedir. Kahve tohumu, baharat, şifalı bitkiler ve bazen de tahıl ürünlerinde görülmektedir (Samson ve ark. 2010).

***Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom**

İlk olarak 1916 yılında tanımlanmıştır. 25 °C’de CYA ortamında hızlı bir gelişim gösterir ve siyah sporlar üretir. Koloni arka yüzeyi kremsi, soluk sarı, sarı renklerinde olabilir. Konidioforları 16–22 µm uzunluğundadır. Konidial başlar küre-ışınsal olabilir. Konidioforları düz, uzun ve kabadır. Vezikülleri küre şeklindedir. Metulaları silindiriktir. Fialidleri silindiriktir ve belirgin bir boyun kısmı bulunmaktadır. Konidiaları küre şeklindedir ve siyah uzantılı pürüzlü duvara sahiptir. *A. carbonarius*, *A. niger*’e göre daha düşük toleraslı olmakla beraber halo-toleranttır. Yüksek sıcaklıklarda iyi gelişim gösteremez ve düşük pH ve su aktivitesine toleranslıdır. Siyah konidiaları radyasyona oldukça dirençlidir ve özellikle de güneşte kurutulmuş gıdalarda sıklıkla bulunabilirler. Dünya çapında yaygın bir türdür ve üzüm, kahve ve diğer pek çok gıdada belirlenebilmektedir (Samson ve ark. 2010).

***Aspergillus niger* van Tieghem**

İlk olarak 1867 yılında tanımlanmıştır. 25 °C’de CYA ortamında hızlı bir gelişim gösterir ve mor-siyah, kahverengi-siyah veya siyah renkli koloniler üretir. Koloniler tüm ortamlarda hızlı gelişebilir. Koloni arka yüzeyi krem, soluk sarı sarıya değişebilmektedir ve hatta bazen koyu kahverengi-siyah renklerde olabilmektedir. Konidioforları uzun, düz ve kabadır. Konidial başlar küre-ışınsal şekillerdedir. Vezikülleri küre şeklindedir ve silindirik metulalar taşır. Fialidler silindir şeklinde olup uç kısmında belirgin bir boyun kısmı bulunmaktadır. Konidiaları küre şeklinde, siyah çıkıntılı pürüzlü duvara sahiptir. *A. niger* halo-toleranttır ve yüksek sıcaklıklarda gelişebilir. Dünya genelinde yaygın bir türdür. Üzüm, kahve, mısır, soğan ve diğer pek çok gıdada meydana

gelir. Bitki saksılarındaki toprakta ve iç havada da meydana gelebilmektedir (Samson ve ark. 2010).

***Penicillium verrucosum* Dierckx**

İlk olarak 1901 yılında tanımlanmıştır. 25 °C’de CYA ortamında yavaş bir gelişim gösterir. Saf yeşil konidia ve büyük renksiz eksuda damlalı granülden fasiküle kadar değişen bir koloni yapısına sahiptir. Koloni arkası kahverengi merkezli krem renklidir. Konidioformları renksiz, tervertisillattır ve tüm elemanlar birbirine oldukça yakındır. Stipe pürüzlü duvarlı, metulası ise silindiriktir. Fiyalidler silindiriktir ve belirgin bir boyun kısmına sahiptirler. Konidiaları küre-küresel şekilde, yeşilimsi renkli ve düz duvarlıdır. *P. verrucosum* soğuk ve sıcak bölgelerde dağılım gösterebilmektedir. Arpa, buğday, çavdar, yulaf gibi tahıllarda ve bazen de unlarda bulunabilmektedir. Kırmızı-kahverengi spotlar ile peynirin rengine bozukluklar oluşturmaktadır (Samson ve ark. 2010).

***Penicillium nordicum* Dragoni & Cantoni ex Ramirez**

İlk kez 1986 yılında tanımlanmıştır. Kolonileri 25 °C’de CYA ortamında yavaş bir gelişim göstermektedir. Saf yeşil konidia ve kadifemsi-granüler koloniler oluşturmaktadırlar. Kolonileri büyük ve renksiz eksuda damlalarına sahiptir. Koloni arkası sıklıkla kahverengi merkezli krem renklidir. Konidiofarları renksiz, tervertisillattır ve yapılar birbiri ile sıkı bir görünümde. Stipesi pürüzlü duvarlıdır ve silindirik metulaları taşımaktadır. Fiyalidleri silindiriktir ve uç kısmında belirgin bir boyun kısmı bulunmaktadır. Konidiaları küre-küresimsi, yeşilimsi ve düz duvarlıdır. Soğuk ve sıcak iklimlerde yaygın bir türdür. Kurutulmuş et, küfle fermente edilmiş sosis, tuzlanmış balıklar ve reçelde meydana gelmektedir. Kurutulmuş et ve balıkta çürümelere neden olmaktadır (Samson ve ark. 2010).

1.2.3. Trikotesen Üreten Küfler

Fusarium, *Stachybotrys*, *Myrothecium* ve *Trichothecium* önemli trikotesen üreticileri olup, makrosiklik ve makroksiklik olmayan olmak üzere 2 grup trikotesen üretmektedirler. 100 kadar makrosiklik olmayan trikotesen tanımlanmış olmasına rağmen, bunlar nadiren tahıl ve diğer zirai ürünlerin doğal kontaminantı olarak rapor edilmiştir (Trucksess ve Pohland 2001). *Fusarium* en önemli trikotesen üreticilerindendir. *F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides* yüksek oranda trikotesen üretme yeteneğine sahipken, *F. armenicum*, *F. camptoceras*, *F. compactum*, *F. crookwellense*, *F. kyusheunse*, *F. poae*, *F. pseudograminearum*, *F. solani* ve *F. venenatum* trikotesen ürettiği rapor edilen diğer *Fusarium* türleridir (Desjardins 2006).

Deoksinivalenol (DON) ve onun asetilenmiş türevi (3ADON, 15ADON) en önemli trikotesenlerdendir. *F. graminearum* ve *F. culmorum* özellikle tahıllara özgü DON üreticileridir. Bu türler DON üreticileri arasında önemli bir yere sahip olmakla beraber nivalenol ve diğer bazı toksin ara ürünlerin de üreticileri olarak rapor edilmişlerdir. Bu iki önemli türe ilaveten *F. pseudograminearum* düşük seviyede de olsa DON üretici olarak kaydedilmiştir.

Nivalenol ise özellikle *F. graminearum* tarafından üretilmektedir. Bu küfün nivalenol üretme yeteneği DON üretme oranından daha düşüktür. İlaveten sıcak iklimlerde *F. poae*'de nivalenol üretme yeteneği ile dikkat çekmektedir. Düşük seviyede olmakla beraber *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* tahıl ürünlerinde, *F. venenatum* ise patateste nivalenol üretici olarak belirlenmiştir.

Oldukça önemli olan diğer bir trikotesen ise T-2 toksindir. *F. sporotrichioides* ve *F. langsethiae* Avrupa'da tahıl ürünlerinde belirlenen önemli T-2 toksin üreticileridir. *F. poae* ve *F. sambucinum* düşük seviyede T-2 toksin üreten diğer *Fusarium* türleridir.

Diasetoskirpenol (DAS) ve monoasetil türevi (MAS) dördüncü önemli trikotesenlerdir. *F. venenatum* yüksek seviyede DAS üretme yeteneğine sahiptir. Bu tür sıklıkla tahıl ürünleri ve patatesten izole edilmiştir. *F. poae*'de sıklıkla ve

yüksek seviyede DAS üretebilmektedir. *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* ve *F. sambucinum* düşük seviyede DAS ve MAS üretme yeteneklerine sahiptirler (Hocking 2006).

***Fusarium graminearum* Schwabe**

İlk olarak 1938 yılında tanımlanmıştır ve *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch'nin eşeysiz üreme safhasıdır. Patates Dekstroz Agar (PDA)'da bol beyaz miseller üretir ve bu miseller kültür yaşlandıkça sarı, kahverengi ya da pembe renkleri almaktadır. Yaşlı kültürlerin koloni arka yüzeyi genellikle koyu kırmızıdır. Makro sporları genellikle uzun, silindirik ve hafifçe eğimliden düze değişmektedir. Mikro sporları yoktur ve klamidosporları nadirdir fakat makro spor şeklinde olabilir. Kültür morfolojisi filogenetik olarak *F. graminearum*'a çok yakın olan *F. culmorum* ve *F. crookwellense*'ye benzerdir. Bu türler arasından, sadece *F. graminearum* homotallik üreme evresine sahiptir ve belirli kültür ortamlarında özellikle Carrot agarda bolca peritesyum üretir. *F. graminearum* Dünya genelinde arpa, mısır, yulaf, pirinç ve buğday gibi tahıl tohumlarında ve kahve, bakliyat ve patates gibi bitkilerde meydana gelir (Desjardins 2006).

***Fusarium culmorum* (W.G.Smith) Sacc.**

İlk olarak 1884 yılında tanımlanmıştır ve 1895 yılında Pers A. Saccardo tarafından *Fusarium* cinsine transfer edilmiştir. PDA'da bol miktarda misel üretirler ve bu miseller kültür yaşlandıkça sarıdan pembeye döner. Koloninin alt yüzeyi genellikle koyu kırmızıdır fakat bazı strainlerde kahverengi olabilir. Makro spor genellikle boldur ve kısa, şişman, üç belirgin bölmeli ve kalın duvarlıdır. Klamidospor değişken bir şekilde üretilir ve mikro sporu bulunmaz. Kültür morfolojisi *F. culmorum*'un filogenetik olarak oldukça yakın olduğu *F. graminearum* ve *F. crookwellense*'ye benzerdir. *F. culmorum* toprakta, toprak

döküntülerinde ve bitkilerde yaygın bulunmakla beraber sıcak ve soğuk iklimlerde bol miktarda bulunabilmektedir (Desjardins 2006).

***Fusarium poae* (Peck) Wollenw**

İlk olarak 1902 yılında *Sporotrichum poae* olarak tanımlanmıştır ve 1913 yılında H.W.Wollenweber tarafından *Fusarium* cinsine aktarılmıştır. PDA’da beyaz miseller üretir ve kültür yaşlandıkça bu miseller kırmızımsı kahverengine dönüşür. Koloni arka yüzeyinin rengi beyazdan sarıya, koyu kıızımsı kırmızıya dönüşür. Makro sporlar hafifçe eğriden düze değişir, üç bölmeye sahiptir ve orta bölmenin üstü daha geniştir. Makro spor genellikle nadirdir. Mikro sporlar küresiden (yuvarlak) limon şekline değişmektedir ve monofiyalidler üzerinde belirgin kümeler halinde bolca üretilmektedirler. Polifiyalidler yoktur ve klamidosporları *F. poae*’yi *F. sporotrichioides*’ten ayırır. *F. poae* ılıman iklimlerde oldukça yaygındır ve tohum ve fidelerde özellikle çimenlerden izole edilmektedir (Desjardins 2006).

***Fusarium sporotrichioides* Sherb.**

İlk olarak 1915 yılında kurutulmuş patates yumrularında tanımlanmıştır. Toprak ve bitkilerde, özellikle de soğuk iklimlerdeki tahıl çimlerinde geniş bir yayılıma sahiptir. PDA’da bol miktarda yünömsü beyaz miseller üretir ve bu miseller kültür yaşlandıkça pembeden kahverengine döner. Koloni arka yüzeyi genellikle koyu kırmızıdır. Makro sporlar ortalama olarak 3–5 bölmeli, silindirik ve hafif eğik şekildedir. Klamidospor genellikle boldur. Mikro sporlar polifiyalidlerde oluşur, oval, armut şeklinde ya da makara şeklindedir. *F. sporotrichioides* mısır, başak kökleri ve Kanada, US ve Avrupa ülkelerinde küçük hububatlarda baş beyazlığı ile ilişkilidir (Desjardins 2006).

***Fusarium venenatum* Nirenberg**

İlk olarak 1995 yılında tanımlanmıştır. PDA ortamında beyaz yünümsü miseller üretir ve bu miseller kültür yaşlandıkça turuncu-gri ya da kırmızı renge dönüşür. Koloni arka yüzeyi koyu kırmızı renklidir. Makro sporlar kompakt, hilal şeklinde, sivri apikal hücreli ve beş bölmelidir. Klamidospor vardır, mikro sporları yoktur. Orijinal olarak ana kaynağı toprak olup, kurutulmuş patates yumrularında da rapor edilmiştir (Desjardins 2006).

1.2.4. Fumonisin Üreten Küfler

Fumonisin 1980'lerin sonlarında dikkat çeken, yüksek toksisiteye sahip bir toksindir. *F. moniliforme* ve *F. proliferatum* özellikle mısırdaki önemli fumonisin kaynaklarıdır. Bu türler, mısırdaki ve daha az olarak da tahıl ürünlerinde fumonisin üreticileri olarak Dünya genelinde rapor edilmiştir. *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. thapsinum* ve *F. dlamini* düşük seviyede fumonisin üretme yeteneğine sahip olan diğer *Fusarium* türleridir (Hocking 2006).

***Fusarium moniliforme* J. Sheld. (*F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg)**

İlk olarak 1904 yılında hayvan toksikozu ile ilişkili olarak mısırdan izole edilmiştir. Tür ismi; mikro sporlarının uzun zincirlerine atfen Latince "kolye" anlamında olan "monilis" teriminden türetilmiştir. İki heterotallik *F. moniliforme*'nin çaprazlanması sonucu eşeyli üreme evresi olan *G. moniliformis* gelişimi gözlenmektedir. PDA ortamında beyaz miseller üretir ve kültür yaşlandıkça miseller mor rengi almaktadır. Koloni arka yüzeyinin rengi beyaz, grimsi-turuncu, koyu mor ya da bazı strainlerde siyah renklidir. Makro sporları 3–5 bölmeli, silindir veya nadiren de düz şekildedir. Klamidosporları yoktur. Bu tür monofiyalitlerdeki yalancı başlarda ve zincir halinde, klavat (golf sopası)

mikro sporlar üretmektedir. Dünya çapında yaygın bir *Fusarium* türüdür ve mısır, pirinç, şeker kamışı, muz, kuşkonmaz ve pamuk kaynaklı olarak kaydedilmiş olu tropikal ve subtropikal iklimlerde yayılış göstermektedir (Desjardins 2006).

***Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg**

İlk olarak 1971 yılında T. Matsushima tarafından *Cephalosporium proliferatum* olarak tanımlanmıştır ve 1976 yılında Helgard Nirenberg tarafından *Fusarium* cinsine taşınmıştır. PDA’da yünüksü beyaz miseller üretir ve kültür yaşlandıkça bu miseller grimsi mor renge dönüşür. Koloni arka yüzeyi beyazdan grimsi turuncu, koyu mor ya da bazı strainlerde siyah renkli olmak üzere oldukça çeşitlilik göstermektedir. Makro sporlar 3–5 bölmelidir ve silindir, nadiren de düz şekildedir. Klamidosporları vardır. Mikro sporları karakteristik olarak “V” şeklinde olan polifiyalidlerden gelişen yalancı başlarda ve zincir halinde meydana gelir. *F. proliferatum* olağan dışı bir konakçı aralığına sahiptir ve kuşkonmaz, muz, hurma, incir, sarımsak, mango, mısır, ananas, pirinç, sorgum ve buğday gibi ekonomik öneme sahip bitkilerde ciddi hastalıklara neden olmaktadır (Desjardins 2006).

1.2.5. Zearalenon Üreten Küfler

Zearalenon domuz ve insanlarda hiperöstrojenizme yol açan bir toksindir ve en önemli üreticileri *F. graminearum* ve *F. culmorum*’dur. Bu küfler Dünya genelinde tahıl ürünlerinde rapor edilmiştir. İlâveten düşük seviyelerde olmakla beraber *F. equiseti* ve *F. crookwellense* zearalenon üreten diğer *Fusarium* türleridir (Hocking 2006).

1.3. Dünya’da ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler

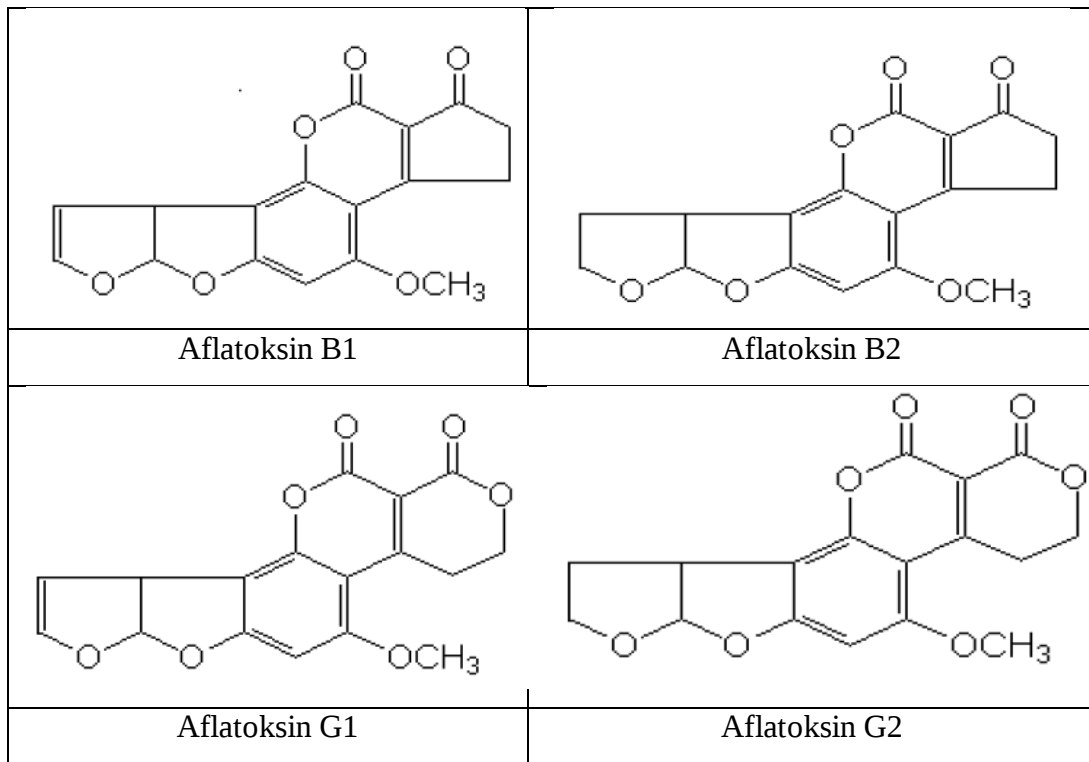
1.3.1. Aflatoksinler

Aflatoksinler (*Aspergillus flavus* toksinleri); *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* küflerinin sekonder metabolitleridir (Sabuncuoğlu ve ark. 2008). *A. flavus*’un bazı suşları, *A. parasiticus*’un hemen hemen bütün suşları aflatoksin üretme yeteneğine sahiptir. Ancak 1987 yılında *A. flavus*’a fenotipik olarak benzerlik gösteren *A. nomius*’un ve son olarak da *A. pseudotamarii*’nin aflatoksin ürettiği belirlenmiştir (Mngadi 2007).

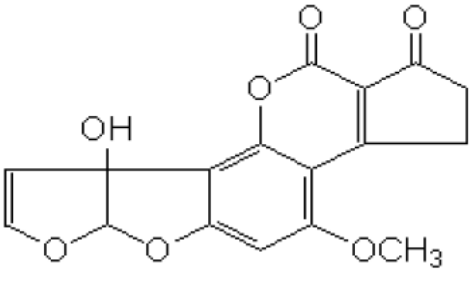
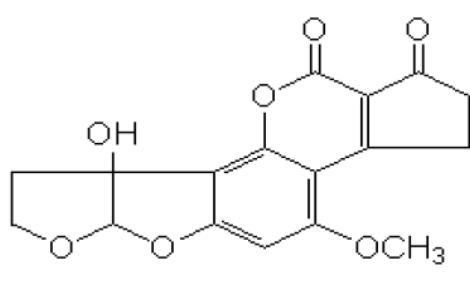
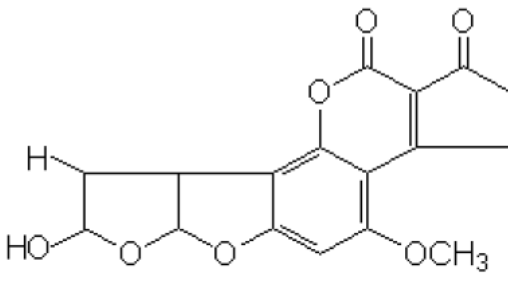
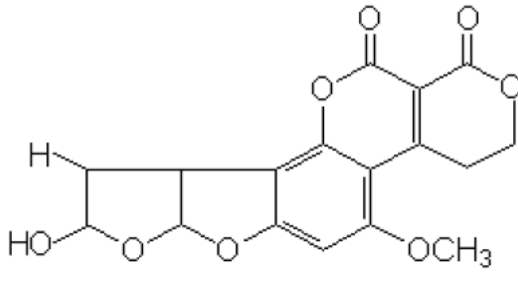
Aflatoksinler “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmıştır. Aflatoksinlerin aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme İTK’da uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B1 ve B2’nin mavi, aflatoksin G1 ve G2’nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir. B toksinleri kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedir (Özkaya ve Temiz 2003). Oluşturdukları toksik etki gücüne göre sıralama AFB1>AFG1>AFB2>AFG2 şeklindedir (Sabuncuoğlu ve ark. 2008). Aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden aflatoksin B1 ve daha az olarak da aflatoksin G1 sorumludur. Bu durum her iki toksinin terminal furan halkası 2, 3 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olması ile ilişkilidir (Şekil 1.2). Aflatoksin B2, B1’in, aflatoksin G2 ise G1’in dihidro türevidir ve “*in vivo*” koşullarda metabolik olarak B1 ve G1’e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler. Bu dört aflatoksinin dışında aflatoksin M1 ve aflatoksin M2 olarak isimlendirilen önemli iki aflatoksin türevi daha bulunmaktadır. M toksinleri aflatoksinli yem ile beslenen ve laktasyon devresindeki memeli hayvanların sütlerinden ve idrarlarından izole edilmiştir. Bu toksinler de İTK’da, uzun dalga boyu UV ışığı altında mavi floresan verirler ve B toksinlerinden daha düşük R_f değerine sahip olmaları ile ayrılırlar. Aflatoksin M1 ve M2, aflatoksin B1 ve B2’nin hidroksi türevleridir ve aflatoksin M2 aynı zamanda dihidro-aflatoksin M1’dir (Şekil 1.2). Aflatoksin B1 ve G1’in hemiasetal

türevleri olan aflatoksin B2a ve G2a'da (Şekil 1.2) *A. flavus*'un doğal metabolitleri olarak izole edilmiştir. Bu türevler aflatoksin B1 ve G1'in asit ortamda hidroksillenmesi ile de elde edilmektedir ve bu özelliklerinden aflatoksin B1 ve G1'in doğrulanmasında kullanılmaktadır.

Aflatoksinler; metanol, kloroform ve diğer birçok organik çözücude çözünebilmektedir. Ancak sudaki çözünürlükleri azdır. Toksinler UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B1 ve B2 için 425 nm'de aflatoksin G1 ve G2 için ise 450 nm'de floresan emisyonu oluştururlar. Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde çok kararlıdır, ancak çok düşük veya yüksek pH'larda (pH<3 ve pH>10), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamlarda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler (Özkaya ve Temiz 2003; Donner 2008).



Şekil 1.2. Aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Özkaya ve Temiz 2003)

	
Aflatoxin M1	Aflatoxin M2
	
Aflatoxin B2a	Aflatoxin G2a

Şekil 1.2. (Devam) Aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Özkaya ve Temiz 2003)

1.3.1.1. Aflatoksinle Kontamine Gıdalar

Aflatoksin en fazla bitkisel ürünlerde görülür. Yer fıstığı, fındık, Antep fıstığı, badem, çam fıstığı, çeşitli cevizler (Paraguay cevizi, Pekan cevizi, Hindistan cevizi) arasında yer fıstığı ve mamulleri en riskli gıdalardır. Tahıllardan buğday, mısır, çavdar, arpa, yulaf, pirinç aflatoksinle bulaşık olabilir ve bunlar değirmencilik ve fırıncılık ürünleri de risk taşır. Çeşitli unlar, kepek, ırmik, mısır gevreği (corn flakes), spagetti bu kapsamda düşünülmelidir. Baklagiller içerisinde soya fasulyesi öne çıkar, ancak fasulye, bezelye, böğrölce, mercimekte de görülebilir. Yağlı tohumlardan; pamuk, ayçiçeği, susam ve kolza tohumlarında sıklıkla rastlanır. Bu tohumlarda ve yağ içeriği fazla olan diğer ürünlerde daha fazla görülmesi, küflerin gelişimi için gerekli olan bağlı olmayan suyun oranının yüksek olmasıyla açıklanır. Hammaddeye bağlı olarak; fıstık ezmesi, fındık ezmesi, badem ezmesi, marzipan (badem veya kayısı çekirdeği ezmesi), persipan (şeftali çekirdeği ezmesi), yer fıstıklarından kıyılmış veya bütün halde şuruba

batırılarak hazırlanan şekerlemeler (Groundnut Toffees) risk taşırlar. Sorgum, darı, mısır ve çeşitli küspeler (yer fıstığı, soya, pamuk, ayçiçeği tohumu küspeleri) gibi hayvan yemleri aflatoksin ile yüksek düzeyde kontamine dir. Baharatlardan özellikle kırmızı toz biber, pul biber, karabiber ve kuru meyvelerden incir aflatoksin açısından önde gelen riskli ürünlerdir.

Çeşitli unlardaki aflatoksin kontaminasyon düzeyini hammaddeyi oluşturan tarımsal ürünün aflatoksin miktarı belirler. Aflatoksin danelerden unlara değişik oranlarda fakat azalarak geçer. Kepekte ise aflatoksin yoğunlaşır. *A. flavus* ile ileri bir düzeyde kontaminasyon gerçekleşmiş ve miseller endosperme girmişlerse, öğütme tekniklerinde alınacak önlemler un ve irmiklerde aflatoksin miktarının düşürülmesinde yetersiz kalır. Mısır unları diğerlerine oranla daha fazla risk taşır (Tunail 2000).

Genel olarak süt, süt tozu ve peynirlerin dışındaki hayvansal gıdalarda aflatoksin hem daha ender bulunur hem de konsantrasyonu daha düşüktür. Aflatoksin B1'in türevi olan aflatoksin M1 süt ve süt ürünlerinde karşılaşılan toksin tipidir. Bununla beraber çiğ fermente sucuk ve salamlar, geleneksel yöntemle kurutulmuş kemikli jambonlar daha fazla risk (Tunail 2000; Heperkan 2006) taşımaktadır.

Baharat çeşitleri de aflatoksin içerikleri açısından araştırılmıştır. Kırmızıbiber (toz ve pul) en riskli üründür. Karabiberde aflatoksine daha az rastlanır ve konsantrasyonu daha düşüktür. Safran, zencefil, kişniş, toz veya kıyılmış Hindistan cevizi içi aflatoksin pozitif bulunan baharat çeşitleridir. Buna karşılık tarçın, hardal, rezene otu, anason, kakule, köri, İspanyol kırmızı biberi (paprika) ise aflatoksin içermez. Ancak negatif bulunan baharat çeşitleri az sayıda taranan örneklerin sonuçlarını yansıtmaktadır. Kimyon için veri bulunmazken, laboratuvar denemelerinde kimyon ve anason tohumları *A. parasiticus*, kakule de *A. flavus* ile inoküle edildiğinde bu substratlar üzerinde aflatoksin oluşmuştur.

Aflatoksinle kontamine tarımsal ürünler kendi içlerinde risk açısından sınıflandırıldığında ilk sıraları; mısır, yer fıstığı, Paraguay cevizi, pamuk tohumu, Antep fıstığı ve kopra (kurutulmuş ve kıyılmış Hindistan cevizi içi) alır. Aflatoksin açısından ikinci derecede önem taşıyan ürünler; kuru incir, badem, Pekan cevizi, ceviz, kuru üzüm ve baharattır. Aflatoksin; darı çeşitlerinde,

buğday, yulaf, arpa, pirinç, soya fasulyesi ve diğer baklagil danelerinde daha ender oluşmaktadır (Tunail 2000).

Gıda ve yemlerde değişik miktarlarda aflatoksine rastlanabilmektedir. Gıda ve yemlerde bulunabilecek aflatoksin miktarı ile ilgili sınırlamalar ülkeden ülkeye değişmektedir. Türkiye için farklı gıda grupları için belirlenen maksimum aflatoksin sınırları Çizelge 1.3’de belirtilmiştir.

Çizelge 1.3. Aflatoksin Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri

(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)		
	B₁	B₁+B₂+G₁+G₂	M₁
AFLATOKSİN			
Fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5,0	10,0	-
Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	-
Tahıllar (karabuğday (<i>Fagopyrum</i> sp.) dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,0	4,0	-
Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	-
Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050
Baharatların aşağıdaki türleri için; - Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiber ve acı kırmızıbiberin bütün ve toz hali dahil) - Karabiber (<i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) - Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) - Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) - Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	5,0	10,0	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı	0,10	-	0,025
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5,0	10,0	0,5

1.3.1.2. Aflatoksin Biyosentez Mekanizması

A. flavus, *A. nomius* ve *A. parasiticus* aflatoksin ürettiği bilinen fungal türlerdir. Ancak *A. nidulans* ve *Bipolaris*, *Chaetomium*, *Farrowia* ve *Monocillium*’ın türlerini içeren 20 kadar farklı *Aspergillus* aflatoksin B1 (AFB1)’in biyosentez yol izinin oldukça toksik ara ürünü olan sterigmatosistini

(ST) üretmektedir. *A. flavus* ve *A. parasiticus*'daki AFB1 biyosentez yol izinin *A. nidulans*'daki ST biyosentez yol izine benzer olmasına rağmen, 3 türe ait karşılaştırmalı çalışmalar *Aspergillus* ve diğer genuslar tarafından takip edilen yol izinin gelişimine ışık tutmak ve biyosentez ya da regülasyonun nasıl meydana geldiğini açıklamak için çaba göstermektedir.

Aflatoksin biyosentezi bloke edilmiş bazı mutantların izolasyonu ve karakterizasyonu aflatoksin yol izinin biyokimyasal ve moleküler biyolojisini açıklamada anahtar bir role sahiptir. Bu aflatoksin bloke mutantların kullanıldığı biyodönüşüm deneyleri, metabolik inhibitörler ve kararlı izotop-ya da radyo izotop etiketli prekürsörler ya da yol izi ara ürünleri bu kompleks biyosentetik yol izindeki reaksiyonun mekanizmasının anlaşılmasını sağlamıştır.

AFB1'in poliketit omurgasının meydana gelişindeki başlangıç adımının; yağ asiti biyosentezindeki ile analog bir davranış içinde poliketit sentaz (PKS) tarafından asetat ve dokuz malonat ünitesinin (CO₂ kaybı ile) polimerizasyonunu gerektirdiği düşünülmektedir. Ancak bir yağ asiti sentaz (FAS) tarafından 6 karbonlu hekzanat başlatıcı ünitesinin sentezinden sonra noranthron denen 20 karbonlu dekatidin meydana gelmesi için PKS tarafından uzatılması da alternatif ve olası bir diğer başlama adımıdır. İkinci seçenekte, norantron varsayılan bir oksidaz tarafından anthraquinone norsolorinic asite (NA) okside edilir. Difuran parçasında 2,3 pozisyonunda çift bağ içeren Versikolorin A (VA) AFB1 yol izinde meydana gelen ilk molekül olmasından dolayı çok önemlidir. Bu çift bağ mikrozomal sitokrom P450 enzimi için bir hedeftir. Aksine aflatoksin B2 (AFB2) bu çift bağdan yoksundur ve bu nedenle 100 kat daha az karsinojendir.

Aflatoksin yol izinde bulunan bazı enzimlerin saflaştırıldığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bu saflaştırılmış enzimler; ST'nin O-metilsterigmatosistine dönüşümünde yer alan iki ayrı O-metiltransferaz, NA'nın averantine (AVN) geri dönüşümlü çevriminde yer alan NA redüktaz (ya da muhtemelen 2 ayrı enzim), versikonal'in versikolorin B'ye dönüşümünde gereken siklaz ve versikonal hemiasetal asetatın versikonol asetata reaksiyonunu katalizleyen iki versikonal hemiasetal asetat redüktaz (VHA redüktaz I ve II, muhtemelen izozimler)'dir.

Aflatoksin biyosentezinde görev alan bazı gen bölgelerine ait yapılan bozulma çalışmaları ile ilgili gen bölgelerinin yol izindeki rolleri belirlenmiştir. Bunlarda *verA* geninin bozulması VA'nın birikmesi ve ST'nin belirgin bir şekilde kaybıyla sonuçlanmıştır. Bu veriler *verA* geninin VA'nın ST'ye dönüşümünde rol aldığını göstermektedir. Benzer şekilde *ver-1*'in bozulması VA'nın birikmesi ve aflatoksin biyosentez yol izinin bloke edilmesi ile sonuçlanmıştır. *Nor-1*'in bozulması ise NA'nın çok yüksek miktarlarda birikmesi ile sonuçlanmıştır. Bu şekilde bozulmaya uğratılan strainlerin düşük seviyede aflatoksin üretebildiklerinden dolayı aflatoksin biyosentez yol izinde NA'dan averufin sentezi için bir ya da daha fazla alternatif yol bulunduğu hipotezini ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca *nor-1*/maltoz bağlama proteini (MBP) bölünme proteini *E.coli*'de ekspresse edildiğinde, ham *E.coli* hücre ekstraktlarının NADPH varlığında NA'dan AVN'ye dönüşmüş olan bölünme proteinleri içerdiği belirlenmiştir. Böylece *nor-1* tarafından kodlanan redüktaz enziminin NA'den AVN'ye dönüşümünü katalizlediği belirlenmiştir.

Metabolit dönüşüm çalışmaları ile bir diğer gen olan *uvm8* geninin AFB1 yol izini *nor-1* ve *nor-1*'in bir kısmını bloke etmek kaidesi ile durdurduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu gene ait peptid dizilerinin FAS'a yüksek benzerlik göstermesi *uvm8* geninin hekzanoat başlatıcının sentezi için gerekli olan bir FAS aktivitesini kodladığı varsayılmıştır. Hekzonattaki 2 keto grubu tamamen hidrokarbona indirgendiğinden, sentezinde yer alan FAS'ın β -ketoaçıl senteza ilaveten ketoredüktaz, dihidrataz ve enoyil redüktaz olmak üzere 3 anahtar enzim aktivitesi içeriği düşünülmektedir. Diğer bir gen olan *omt-1* geninin *E.coli*'de ekspresyonu ile yapılan çalışmalar ile bu genin ST'nin O-metilsterigmatosistine dönüşümünden sorumlu O-metiltransferaz enzimini kodlayan bir gen olduğu belirlenmiştir. Son olarak *afl'* geninin düzenleyici bir gen olduğu ortaya konulmuştur.

Poliketitler hayvanları da içeren diğer organizmalara ilaveten aktinomisetler, funguslar ve bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin büyük ve değişik bir ailesidir. Sekonder metabolitler enzim kofaktörleri, enerji ve yapı blokları yönünden primer metabolitlere bağımlı olsalar da, bu sekonder

metabolitlerin sentezinin düzenlenmesi birincil metabolitlerin düzenlenmesinden farklıdır.

Kültürde *A. parasiticus* ve *A. flavus* idiofaz esnasında aflatoksin üretir, eksponansiyel gelişimde aflatoksin üretimi yavaş ya da durmuştur ve sekonder metabolitler meydana gelmiştir. Transkripsiyon ve translasyon inhibitörleri kullanılarak aflatoksin üretimi için yeni proteinlerin sentezlenmesine gerek duyulduğu gösterilmiştir. Diğer bazı çalışmalar ile de idiofaza kadar belirlenmemiş olan fakat aflatoksin yol izinde gerekli olduğu düşünülen en az 4 enzimin bulunduğu gösterilmiştir. *A. parasiticus*'un batık fermentasyonu esnasında *nor-1* ve *ver-1* RNA transkriptleri aktif gelişim ve durağan faz arasındaki geçiş esnasında hızlı bir şekilde birikmişlerdir. *aflR* genindeki RNA transkriplerinin birikimi düzenleyici bir proteinin kodlandığını işaret etmektedir. Bu genlere ait transkripsiyon koordinasyonunun transkripsiyon seviyesinde düzenleyici bir protein tarafından düzenlendiği ileri sürülmüştür.

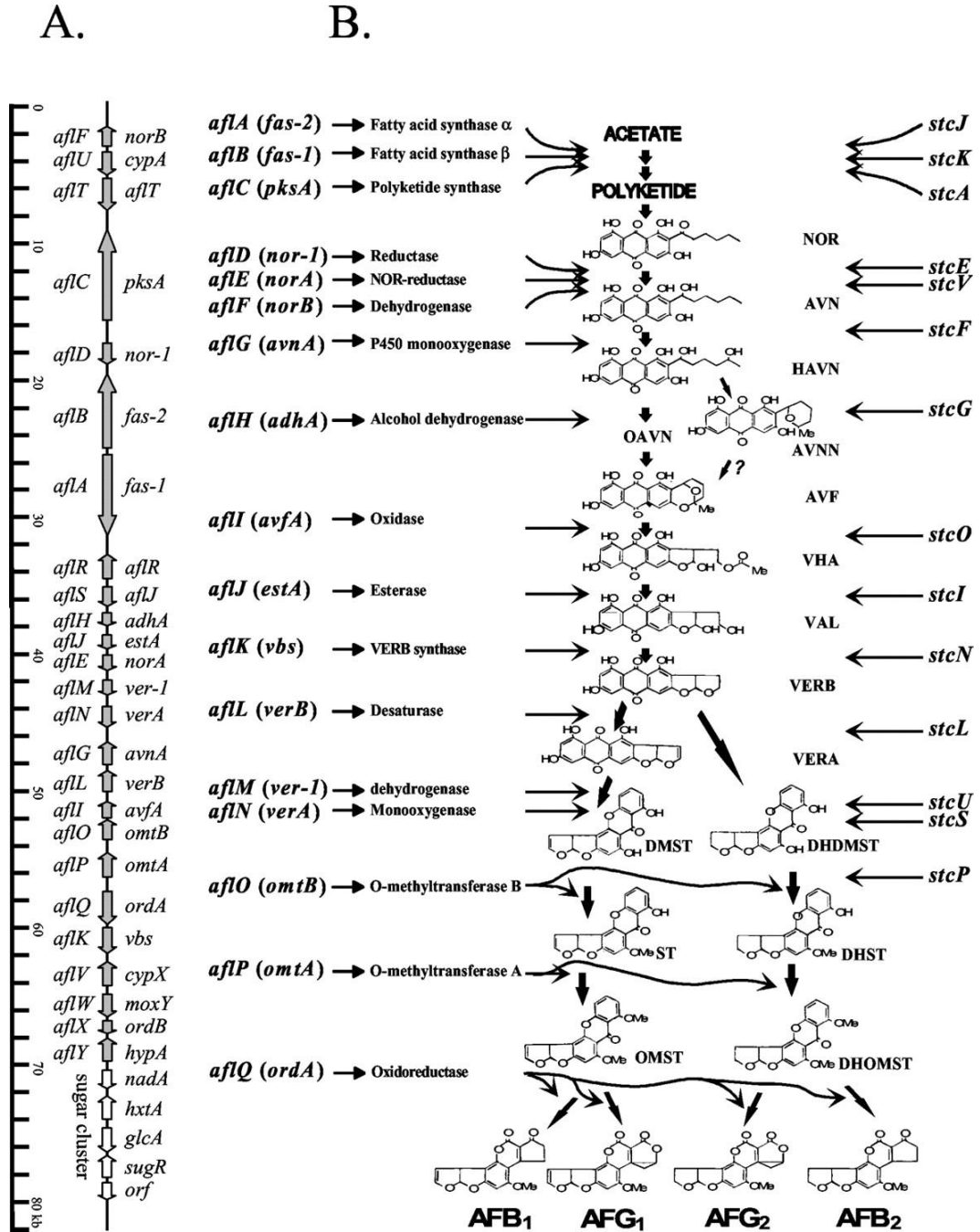
Afl-2 olarak adlandırılan bir genin önemli bir düzenleyici faktör kodladığı önerilmektedir. Genetik kanıtlar ve metabolit besleme çalışmaları *afl-2*'nin aflatoksin biyosentezinde NA'dan önce bulunduğunu göstermektedir. Örneğin *afl-2* geni bloke edilmiş olan *A. flavus* strainlerinde pek çok ara ürünün aflatoksine dönüştürülmediği görülmüştür ki bu veri ilgili genin yokluğunda yol izine ait önemli bir enzimin sentezlenemediğini işaret etmektedir. Diğer bir gen olan *apa-2*'nin de *afl-2* ile homolog fonksiyonlar gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 1.3) (Trail ve ark. 1995).

Aflatoksinin düzenlenmesi; hücresel kompartasyon ve aflatoksin gen ekspresyonu ve karbon akışı olarak iki şekilde modellenmiştir. Birinci model olan hücresel kompartasyonda *nor-1* (ilk), *ver-1* (orta) ve *omtA* (geç) sitoplazmadaki serbest ribozomlarda sentezlenir, taşıyıcı veziküllere paketlenir ve sitoplazma aracılığıyla vakuol hedef yol izinde taşınır. Aksine *vbs* sitoplazmada lokalize olmuştur ve golgi yapısında olduğu, klasik salgı yoluyla da vakuollere taşındığı düşünülmektedir. *Vbs*'nin glikosillenmiş olması bu fikri kuvvetlendirmektedir. İkinci model olan gen regülasyonunda ise glikoz konsantrasyonunun veya glikoz metabolizmasının algılanması *FadA/cAMP/PKA* sinyalizasyon yol izi ile başlar. Şeker metabolizması veya algılanmasına ait mekanizma detayları ise henüz

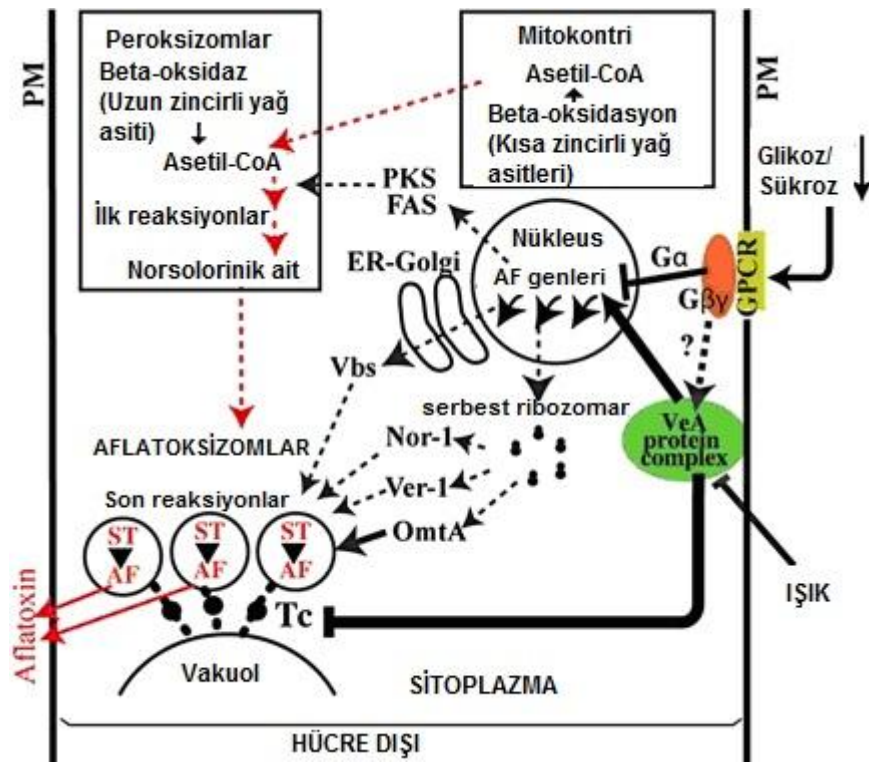
bilinmemektedir. Mitokontri ve peroksizomlar poliketit sentezi için asetil koenzim-A (Asetil CoA)'yi oluştururlar. Aflatoksin sentezinin ilk aşamaları yani asetil CoA'dan norsolorinik asitin oluşması peroksizomlarda meydana gelir. Son araştırmalarda, aflatoksijenik veziküllerdeki (aflatoksizom) yol izine ait son enzim fonksiyonlarının aflatoksinin dışarıya taşınması yönünde olduğu belirlenmiştir. Ancak bu aşamada yol izine ait ilk ve orta enzimlerinde hala var ve aktif olduğu dikkat çekicidir. Karbon kaynağı ve ışık gibi en az iki ayrı sinyal, aflatoksinin sentezi ve dışarı taşınmasında bulunan 2 ayrı düzenleyicinin koordinasyonunu sağlayan VeA aktivitesini tetiklemektedir. Bu düzenleyicilerden birincisi genel ve spesifik transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi aracılığıyla gerçekleşen gen regülasyonudur. İkincisi ise taşıyıcı veziküllerin birikmesi ile sonuçlanan, C sınıfı Vps bağlama kompleks (Tc) aktivitesinin baskılanmasıdır. Her iki düzenleyici çalıştığı zaman, sentez edilen aflatoksini taşıyan ve onları hücre dışına aktaran aflatoksizomlarda aflatoksin enzimleri birikir (Şekil 1.4) (Chanda ve ark. 2009).

1.3.1.3. Aflatoksinlerin Etki Mekanizması

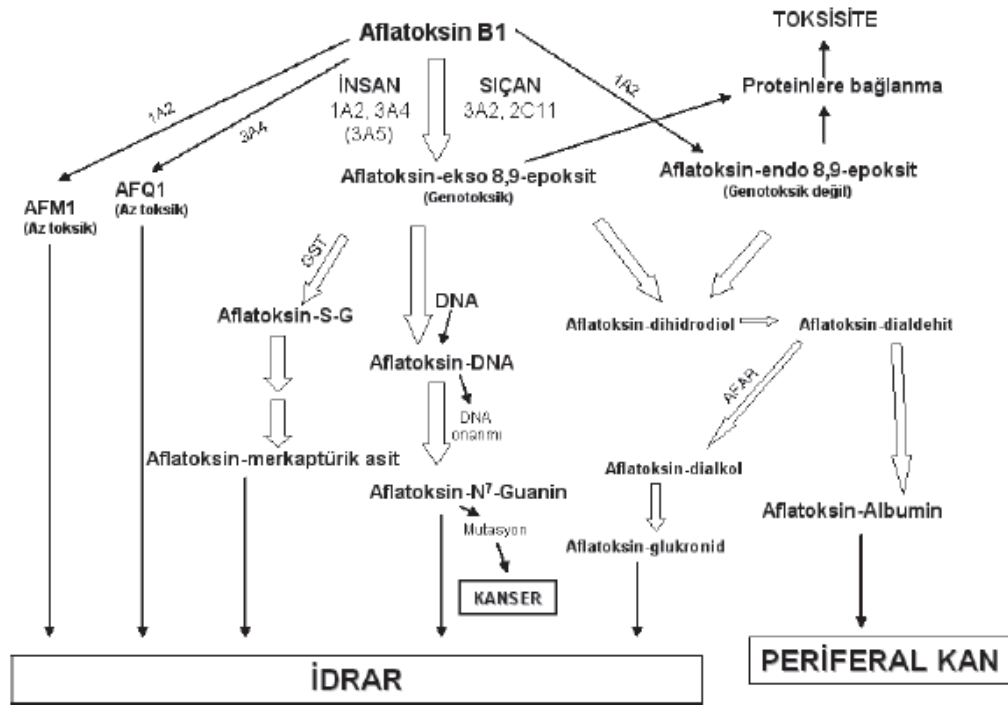
Aflatoksinler (AF), insan ve hayvan sağlığı üzerinde karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkilere neden olur. AF'lerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu akut ve kronik seyirli mikotoksikoza **aflatoksikoz** adı verilir. AF'lerin toksik etkilerinin derecesi, maruziyet durumu yanında kişinin yaşı, beslenme düzeni, hepatit B enfeksiyonu gibi bazı faktörlerden etkilenmektedir. AF'lerin toksik etkileri hepatotoksisite, hepatokarsinojenite, nefrotoksisite, teratojenite, immun sistemin bozulması ile hastalıklara karşı yatkınlık, büyümenin yavaşlaması ve besin maddelerinden yararlanmanın azalması olarak sayılabilir. AF'ler Uluslararası Kanseri Araştırma Örgütüne (IARC) "Grup I" karsinojen olarak değerlendirilmektedirler. AFB1 en bilinen insan karaciğer karsinojenidir. AF'lerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinden biyotransformasyonları sonucu oluşan toksik ana ürünlerin sorumlu olduğu bilinmektedir (Şekil 1.5) (Sabuncuoğlu ve ark. 2008).



Şekil 1.3. A) Gen kümesi, B) aflatoksin biyosentez yol izi. NOR, norsolorinic asit; AVN, averantin; HAVN, 5'-hydroxyaverantin; OAVN, oksoaverantin; AVNN, averufanin; AVF, averufin; VHA, versikonal hemiasetal asetat; VAL, versikonal; VERB, versikolorin B; VERA, versikolorin A; DMST, demetilsterigmatosistin; DHDMST, dihidrodemetilsterigmatosistin; ST, sterigmatosistin; DHST, dihidrosterigmatosistin; OMST, O-metilsterigmatosistin; DHOMST, dihidro-O-metilsterigmatosistin; AFB₁, aflatoksin B₁; AFB₂, aflatoksin B₂; AFG₁, aflatoksin G₁; AFG₂, aflatoksin G₂ (Yu ve ark. 2004)



Şekil 1.4. Hücrede aflatoksin üretimi, kontrolü ve taşınması. PM; plazma membranı, (Chanda ve ark. 2009)



Şekil 1.5. Reaktif metabolitlerin ve biyogöstergelerin oluşumuna aracılık eden AFB1 metabolizması (Sabuncuoğlu ve ark. 2008)

Aflatoksinlerin DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonu; çeşitli enzim aktivitelerinin azalması, glukoz metabolizması depresyonu, fosfolipitler, serbest yağ asitleri, trigliseritler ve kolesterol ve esterileri dahil olmak üzere lipid sentezi inhibisyonu ve pıhtılaşma faktörü inhibisyonu gibi metabolik etkileri vardır. Toksik etkilerini gösterebilmek için metabolik aktivasyona gerek duyan dolaylı etkili bir mikotoksindir. Primer karaciğer kanserinin çok orijinli olduğuna inanılsa da aflatoksin B1 yiyecek kontaminantı olarak yaygın bulunması nedeniyle en güçlü faktördür. Hepatoma ve karaciğer hasarı oluşumuna ilişkin yapılan çalışmalarla AFB1'in K1 ras protoonkogenin aktivasyonunu sağladığı ve p53 tümör başkılalayıcı geni farklılaştırdığı saptanmıştır. Hepatoselüler karsinoma (HCC) hastalarında p53 geninde önemli bir nokta olan 249. kodonun üçüncü bazında guanin→timin (G→T) transversiyonu gözlenmiştir.

Aflatoksinlerin akut ve kronik toksisitelerinde türlerarası, bireylerarası ve cinsiyete göre önemli farklılıklar vardır. Şimdiye kadar toksisitesine tamamen dirençli bir hayvan türü bulunmamıştır. Aflatoksinlere olan duyarlılığın cinsiyete bağlı olup olmadığını araştırmak üzere yapılan araştırmalarda dişi farelerin erkek farelere göre daha az duyarlı olduğu; bu durumun da östrojenik hormonların koruyucu etkinliğinden kaynaklandığı saptanmıştır. Toksikite; çevresel faktörler, maruziyet doz ve süresi, yaş, sağlık ve beslenme alışkanlıklarına göre farklılık gösterebilir.

AFB1'in mutajenik ve karsinojenik etkileri elektronca zengin dihidrobisfuranın, karaciğer sitokrom P450 (CYP 450) izoenzimleri CYP 2C ve daha az olmak üzere farelerde CYP 1A2 ve insanlarda CYP 3A4 ile AFB1'in 8,9 epoksite dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Girgin ve ark. 2001).

AFB1'in sitokrom aracılığıyla oksidasyonu ile detoksifikasyon ürünleri olarak AFM1, AFP1 ve AFQ1 gibi çeşitli hidroksil metabolitler oluşabilmektedir. Memeli türlerinde AFB1 için en önemli detoksifikasyon yolağı metabolizma sonucu oluşan epoksit formunun glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi aracılığıyla gerçekleşen glutatyon (GSH) konjugasyon reaksiyonudur. Epoksit formun endo ve ekzo izomerleri bulunabilmektedir. İnsanlarda AFB1'in 8,9 epoksit formunun oluşumunda baskın olan CYP izozimi 3A4'tür. Özellikle insanlarda CYP3A4 aracılığı ile oluşan ürün sadece ekzo izomer formundadır. Diğer CYP450'ler

aracılığı ile hem endo hem de ekzo epoksit formu oluşabilmektedir. Ekzo epoksit formu yüksek elektrofilik aktiviteye sahiptir ve sadece bu form DNA ile reaksiyon gösterir ki DNA'da guaninin N⁷ konumuna bağlanır. Endo izomerden yaklaşık 500 kat daha fazla mutajenik aktiviteye sahiptir. Hem ekzo hem de endo epoksit, GST tarafından katalizlenen GSH konjugasyonu için substrattır, dolayısıyla GSH tüketicisidir. AFB1'in 8,9 epoksit daha sonra 8,9 dihidroAFB1'e metabolize olarak Schiff bazı oluşumuyla hücresel proteinlerdeki lizin amino asidine –amin grubundan bağlanarak modifiye eder ve hücre hasarı ve ölümüne neden olur. AFB1'de p53 üzerinde mutajenik etki göstermektedir.

AFB1, AFB2 ve sterigmatosistin oksitleri guaminin N⁷ konumu tarafından nükleofilik atağa uğrarlar ve bunun sonucunda oksit açılarak N⁷-guanin DNA katım ürünü oluşur. Oluşan bu yapı 3 spontan süreç ile kaybolabilir;

- (i) aflatoksin dihidrodilün ayrılarak çıplak guanin molekülünün kalması,
- (ii) pürin olmayan kısmını bırakarak guaninin ayrılması,
- (iii) imidazol halkasının açılması

AFB1'in uzaklaştırılması *in vivo* olarak DNA onarım enzimleri nedeniyle daha hızlı gerçekleşmektedir. İmidazol halka açılması guaninin N⁷ pozisyonuna olan aşırı bağlanmanın sonucudur. Halka içindeki pozitif yükün artması sonucu 8,9 – dihidro – 1 – 8- (2,6-diamino – 4 – okso - 3,4 – dihidroprimid – 5 – ilformamido) – 9 - hidroksi AFB1 ve 8, 9-dihidro-8-(2-amino-6-formamido-4-okso-3,4-dihidroprimid-5-ilamino)-9-hidroksi AFB1 olmak üzere iki ürün oluşur. AFB1 katımı olmuş DNA'nın alkali koşullarda tutulması imidazol halkasının açılması ve diol oluşumu ile sonuçlanırken hafif asitik koşullar AFB1-DNA katım ürünlerine dönüşümü sağlar. AFB1-DNA katım ürünleri idrarla atılırlar ve bu atımın diyet kaynaklı AFB1 alımı ile doğrusal olarak arttığı düşünülmektedir. Bu nedenle idrarla atılan AFB1 katım ürünleri; diyetel maruziyetin yanı sıra kanser riskini gösteren önemli bir biyogösterge olarak da kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, idrarlarında AFB1-DNA katım ürünü bulunan bireylerin, bulunmayanlara oranla kansere yakalanma risklerinin 9,1 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Sabuncuoğlu ve ark. 2008; Girgin ve ark. 2001; Özkaya ve Temiz 2003).

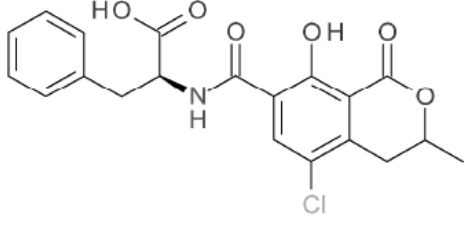
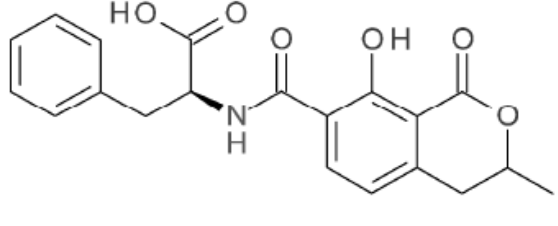
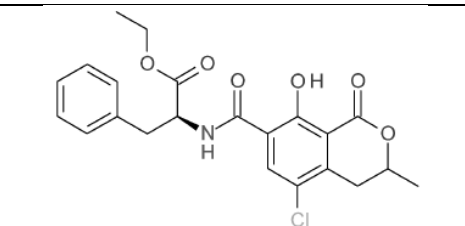
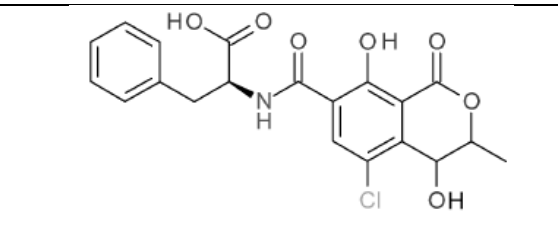
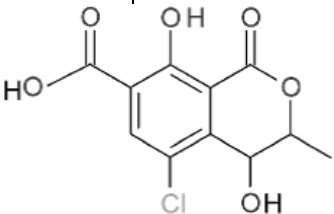
1.3.2. Okratoksinler

Aspergillus ochraceus (*A. alutaceus*), *A. melleus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotium*, *A. albertensis*, *A. wentii*, *A. auricomus*, *A. niger* var. *niger*, *A. sulphureus*, (*A. fresenii*) ve *P. verrucosum* küfleri okratoksinleri üretme yeteneğine sahiptir (Girgin ve ark. 2001). Okratoksin A (OTA) doğada sık olarak bulunması ve nefrotoksik ve kanserojenik aktiviteye sahip olması nedeniyle oldukça önemli bir okratoksindir. OTA'nın Bulgaristan, Yunanistan ve Romanya gibi bazı Balkan ülkelerinde "Balkan Endemik nefropati" olarak adlandırılan öldürücü böbrek hastalıklarına ve üriner bölgede çeşitli tümörlere neden olduğu bilinmektedir (Kabak ve Var 2006).

Okratoksinler; OTA, OTA'nın metil ve etil esterleri olarak bilinen okratoksin C (OTC), 4-hidroksiokratoksin A (4-OH-OTA), okratoksin B (OTB) ve OTB'nin metil ve etil esterleri ve okratoksin α 'dan ibarettir (Şekil 1.6). Okratoksin α hariç, okratoksinler bir amid bağıyla 7-karboksi grubu aracılığıyla L- β -fenilalanine bağlanmış bir pentaketit türevi dihidroksikumarin yapısındadır (Anli ve Alkis 2010; Brase ve ark. 2009).

OTA'nın doğal dekloro analogu olan OTB, OTA'dan 10 kat daha az toksiktir. OTA ile OTB'nin farkı, OTA'nın dihidro-metil-isokumarin halka sisteminde C5 pozisyonunda klor atomu taşımasıdır. Bu klor atomunun varlığına ilaveten, fenolik hidroksil grubu da toksisiteyi arttırmaktadır. OTA esterlerinin toksisitesi OTA'ya benzerlik gösterirken OTB'nin esterleri beklendiği şekilde toksik etkili bulunmamıştır. Okratoksinin tüm bileşikleri sıcaklık ve hidrolize çok dayanıklıdır (Girgin ve ark. 2001).

OTA organik çözücülerde yüksek bir çözünürlüğe sahipken, suda az çözünür. Metanol içerisinde çözüldüğünde 333 nm'de absorbans göstermektedir. 467 nm'de floresan emisyonu oluşturmaktadır. OTA geniş asidik özelliğe sahiptir. pKa değeri fenilalanin kısmın karboksi grubu için 4.2–4.4 ve isokumarin parçasının fenolik hidroksi grubu için 7.0–7.3 arasındadır (Anli ve Alkis 2010).

	
Okratoksin A	Okratoksin B
	
Okratoksin C	4-hidroksiokratoksin A
	
Okratoksin α	

Şekil 1.6. Okratoksinlerin kimyasal yapıları (Özkaya ve Temiz 2003)

1.3.2.1. Okratoksinle Kontamine Gıdalar

Bitkisel ürünler içerisinde tahıllar (buğday, arpa, yulaf, çavdar, mısır, pirinç) OTA'yı yüksek konsantrasyonda içerdiklerinden hem insanlar hem de hayvanlar için kontaminasyon kaynağıdır. Yulaf ve arpalarda genellikle OTA konsantrasyonu daha düşük olmakla beraber ekstrem durumlarda yulafta 27.5 mg.kg⁻¹ düzeyinde görülür. İnsanlara geçen OTA' nın asıl kaynağının hayvansal ürünler olduğu konusunda birçok otorite hemfikirdir. Hayvan yeminde kritik konsantrasyon olan 200 µg.kg⁻¹ düzeyinin üzerindeki değerler hayvan organ ve dokularında OTA kalıntısının düzeyini arttıracığından tehlikelidir. Ancak ne yazık ki gerek kuru incir gerekse toz ve pul biber yüksek düzeylerde OTA içeren ürünlerdir (Tunail 2000).

OTA ile kontamine olma riskine sahip olan farklı gıda gruplarına ait OTA'nın maksimum sınırları Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenmiş ve Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. OTA Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri
(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
OKRATOKSİN A	
İşlenmemiş tahıllar	5,0
Tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,0
Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil)	10,0
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,0
Şarap (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç) ve meyve şarapları	2,0
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,0
Üzüm suyu, üzüm suyu konsantresi, üzüm nektarı ile doğrudan tüketime sunulan üzüm şırası ve üzüm şırası konsantresi	2,0
Bebek ve küçük çocuk ek	0,5
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet	0,5
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	10,0

1.3.2.2. Okratoksinlerin Biyosentez Mekanizması

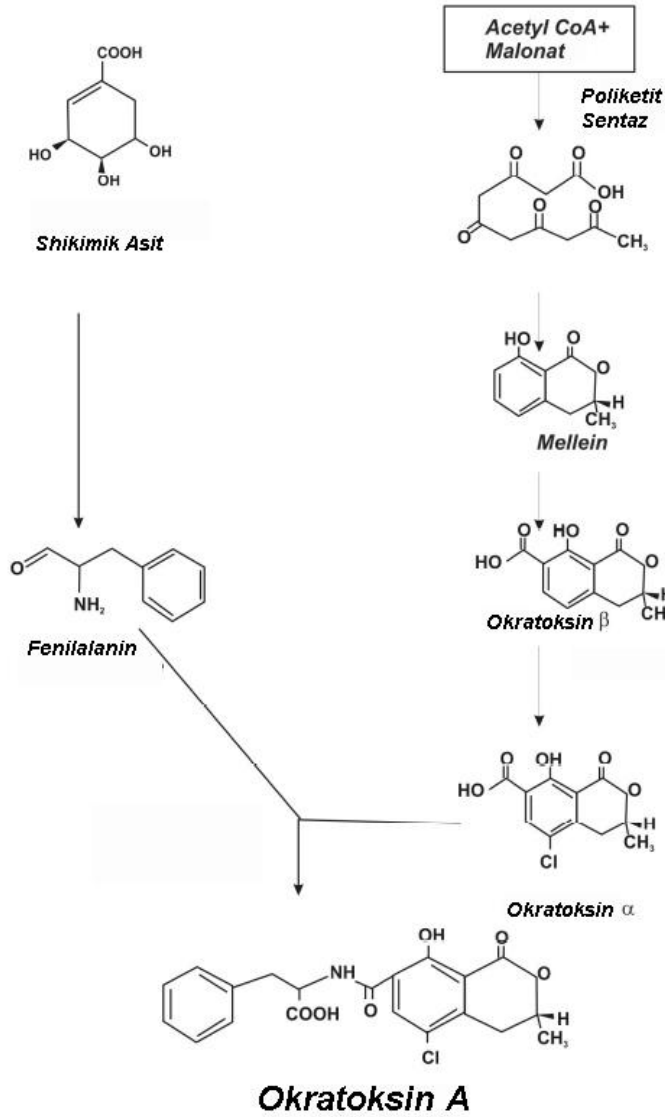
OTA'nın çeşitli toksijenik özellikleri hakkında oldukça fazla bilgi edinilmiş olmasına rağmen, herhangi bir küf türünde OTA'nın biyosentetik yol izi hakkında tam bir bilgi sağlanamamıştır. Ancak çoğunlukla isokumarin grubun poliketit sentaz yol izi ile asetat ve malonattan pentaketitin oluştuğuna inanılmaktadır (El-Khoury ve Atoui 2010). 14C- ve 13C-etiketlenmiş prekürsörlerin kullanıldığı etiketleme deneyleri Shikimat yol izinden fenilalanin, pentaketit yol izinden de dihidroizokumarinin oluştuğunu göstermiştir (Anli ve Alkis 2010). Bundan dolayı, anahtar bir enzim olduğu düşünülen poliketit sentaz fumonisin ve aflatoxin gibi diğer poliketit mikotoksinlerinki ile benzer şekilde OTA biyosentezinde de yer almaktadır. Çeşitli araştırmacılar tarafından OTA'nın yapısına göre mekanistik bir modele dayalı biyosentez yol izi önerilmiştir. OTA'nın heterosiklik kısmı yapısal olarak *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* ve *A. melleus* gibi pek çok OTA üreten tür tarafından üretilen bir sekonder metabolit

olan melleine benzerdir ancak mellein okratoksin üretmeyen türler tarafında da üretilmektedir (El-Khoury ve Atoui 2010).

OTA'nın biyosentezi 3 aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama bir poliketit sentazı kapsayan mellein aracılığıyla okratoksin α 'nın poliketit sentezidir. Bu aşamada bir birim asetatın dört malonat birimine kondensasyonundan ibaret olan izokumarin poliketitin sentezi söz konusudur. Burada poliketit sentazı kodlayan genin *Penicillium* ve *Aspergillus* arasında oldukça farklı olduğu görülmektedir. *A. ochraceus*'da poliketit sentaz genleri sadece OTA için uygun koşullar altında ve mikotoksin sentezinin ilk aşamalarında ekspresse edilir. *Penicillium*'larda ise ilgili gen kümesi tam olarak aydınlatılamamıştır. Çünkü OTA üreten *Penicillium*'lar arasında (*P. nordicum* ve *P. verrucosum*) genetik farklılıklar dikkat çekmektedir (Anli ve Alkis 2010; El-Khoury ve Atoui 2010). İkinci aşama ise açıl aktivasyonunu kapsar; mellein metillenir ve 7-karboksi-mellein'e (=OT β) oksitlenir. Bir kloroperoksidazla klorinasyon OT α 'nın oluşmasına neden olur. Daha sonra bu bileşik ATP kullanılarak bir anhidrid karışımına dönüştürülür. İkinci bir prekürsör olan fenilalanin etil ester aktivasyonu ile takip edilen shikimik asit yol izi ile sentezlenir. Üçüncü aşamada bir sentetaz aracılığıyla aktive edilmiş olan bu prekürsörlerin bağlantısı gerçekleşir, OTC ve OTA etil esteri meydana gelir. Bir esteraz tarafından de-esterifikasyon ya da transesterifikasyon bu kabul edilen yol izindeki son aşamadır. Bu şematik yol izi işaretlenmiş prekürsörler ve *A. ochraceus*'un OTA üreten straini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Varsayılan etiketlenmiş okratoksin α , β ve mellein ara ürünlerin birleştirilmesi OTA üretiminde okratoksin α 'nın önemli derecede, okratoksin β 'nın orta derecede etkili olduğu fakat mellein'nin ise rolünün bulunmadığını göstermiştir (Şekil 1.7).

Penicillium'da OTA biyosentezinden sorumlu gen kümesi *P. nordicum*'a ait 10 kb'lik DNA parçasının klonlanması ile karakterize edilmiştir. İlgili DNA parçasının 3 uzun ORF içerdiği belirlenmiştir. Birinci ORF (*otapksPN*) bir poliketit sentazdır ve *Aspergillus* türlerinde bulunan PKS'den farklıdır. İkinci ORF (*npsPN*) ise ribozomal olmayan peptid sentaz ile homologtur. Üçüncü ORF (*aspPN*) fungal alkalın serin proteinaz ile homologtur. Sistematik bir analizde *otapksPN*'nin *P. nordicum*'da bulunduğu ancak *P. verrucosum*'da bulunmadığı

belirlenmiştir. Bu veri her iki OTA üreten *Penicillium* türü arasında genetik farklılıklar olduğunu işaret etmektedir (El-Khoury ve Atoui 2010). Bu durumun *P. verrucosum*'un OTA'ya ilaveten poliketit esaslı bir mikotoksin olan sitrinini de üretmesinden ileri gelebileceği düşünülmektedir (Anlı ve Alkis 2010).



Şekil 1.7. OTA biyosentezi (Anlı ve Alkis 2010)

Aspergillus türlerinde de OTA'nın üretimi *pks* gen kümesinin ekspresyonuna önemli derecede bağlıdır. OTA'nın biyosentetik yol izinde rol alan genler *A. ochraceus*'da OTA *pks* genlerindeki ekspresyonun elverişli ve stresli koşullarda karşılaştırılması ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Sitokrom P450 monooksijenaz genleri, poliketit sekonder metabolitlerin biyosentezinde yer alan enzimleri kodlayan diğer monooksijenaz genleri ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. Özellikle, p450-H11 geni aflatoxin biyosentezinde bulunan averantin oksidoredüktaz genine, ayrıca *cypA* genine çok benzerdir. *Pks* miktarı ve sitokrom P450 transkriptleri arasında kuvvetli bir korelasyon bulunmaktadır ve biriken OTA miktarı OTA biyosentezinde bu genlerin olası bir role sahip olduğunu işaret etmektedir. *Pks* ve *nrps* (non-ribozomal peptit sentaz) genlerinin ayrı ayrı klonlandığında, bu genlerin aynı yönetimde transkribe olduğu ancak aynı ORF’de olmadıkları belirlenmiştir. Bu veri bu genlerin iki ayrı protein kodladığını işaret etmektedir (Sabuncuoğlu ve ark. 2008).

1.3.2.3. Okratoksinlerin Etki Mekanizması

Okratoksinlerin oluşturdukları klinik tabloya **okratoksikoz** adı verilmektedir. OTA’nın yaptığı renal lezyonlar, prosimal tübülün dejenerasyonu dahil, renal kortekste interstisyel fibrozis, glomerülün hiyalinizasyonu ve tübüler epitelin atrofisi ile birliktedir. OTA böbrek hücrelerinde belli bölgeleri inhibe eder ve bu hücrelerdeki apoptotik tipte lezyonun nedenidir. Sporların solunması da bir diğer maruziyet yoludur. OTA’nın immünoşüpresif, hepatonefrotoksik, teratojenik, apoptoz indükleyici, genotoksik ve lipid peroksidasyonu arttırıcı olduğu gösterilmiştir. OTA, DNA kırılmaları, protein sentezi inhibisyonu ve glikoneogenez, mitokondride oksidatif fosforilasyonun bozulması ve kanın pıhtılaşmasının engellenmesine neden olmasıyla insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır. Fatal doz maruziyeti ile renal tübül nekrozu ve periportal karaciğer hücrelerinde pek çok patojenik değişiklik gözlenmiştir.

Yapılan araştırma verilerine göre OTA’nın temel toksik etki mekanizması, ATP mekanizmasına bağlı olarak mitokondriyel solunumun inhibisyonu, protein sentezinin azalmasına eşlik eden tRNA sentezinin inhibisyonu ve lipid peroksidasyonunun artması olarak tanımlanmıştır (Sabuncuoğlu ve ark. 2008).

OTA’nın oksidatif stresi indüklediği bildirilmektedir. Reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu Fe^{+3} -OTA kompleksi aracılığıyla olmaktadır. OTA, lipid

peroksidasyonu ve aynı zamanda hücresel hasar göstergesi olan malondialdehit artışına neden olmaktadır. Serbest radikal düzeyleri, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler aracılığıyla kontrol edilmektedir. Antioksidan savunma azaldığında veya reaktif oksijen bileşiklerinin düzeyi arttığında oksidatif stres gelişir. Protein sentezinin inhibisyonu ve oksidatif yolak aracılığıyla serbest radikallerin oluşumunun OTA'nın toksik etkisinde anahtar rolü oynadığı gösterilmiştir.

OTA fenilalanin-tRNA sentetaz tarafından katalizlenen reaksiyonda fenil alanin ile yarışarak protein sentezini inhibe eder ve bu özellik toksisitesiyle ilişkilidir (Sabuncuoğlu ve ark. 2008).

OTA'nın temel toksik etkisi nefropatidir ve Balkan Endemik Nefropati olarak bilinen insan ölümcül hastalığın etmenidir. Ayrıca sıçanlar ile yapılan çalışmalar, OTA'nın beyinde farklı seviyelerde lezyona sebep oluşu ve bu nedenle merkezi sinir sistemi üzerinde nörotoksik etkiye yol açtığı belirlenmiştir. OTA çeşitli morfolojik anomalilere yol açan fetal doku birikimleri ve plesanta hasarlarına yol açmaktadır. Fetür üzerinde meydana getirdiği hasarlar OTA'nın teratojenik bir toksin olduğunu göstermiştir. Ayrıca belirli koşullar altında düşük ve yüksek dozlarda OTA varlığı güçlü bir immün sistemi baskılayıcı yönde etki oluşturmaktadır. Lenfoid dokularının nekrozu OTA'ya yüksek hassasiyetin bulunduğunu işaret etmektedir ve humoral ve hücresel immünite etkileri de tanımlanmıştır. OTA'nın periferik T ve B lenfositlerin proliferasyonunun inhibisyonunda ve interlekin 2 (IL2) ve reseptörlerinin üretimini durdurmada önemli bir role sahip olduğu görülmektedir. OTA ile yapılan hayvan deneyleri sonucunda karsinojenite ile karşılaşmış olması bu toksinin insanlar için karsinojen olduğunu düşündürmektedir. Bu toksin beslenme yoluyla alındığında, hepatosellüler tümör, renal hücre tümörleri, hepatomas ve hiperplastik hepatik nodüller gözlenmektedir. OTA'ya maruziyet ve insan kanseri arasındaki ilişkinin ortaya konulmasına yönelik çalışmalar yeterli olmamakla beraber, ürotelyal idrar yolu tümörlerinden ölüm ve sıklığı Bulgaristan ve Yugoslavya'daki Balkan Endemik Nefropatinin coğrafik dağılımı ile bağlantılı bulunmuştur.

OTA, IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı) tarafından "Grup IIB" muhtemel karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. OTA dolaylı karsinojen

mekanizması aracılığıyla epigenetik karsinojen olarak da adlandırılmaktadır. Ancak aynı zamanda DNA'ya doğrudan bağlanabilmesi nedeniyle doğrudan karsinojen olarak kabul edilmektedir (Sabuncuoğlu ve ark. 2008).

1.3.3. Trikotesenler

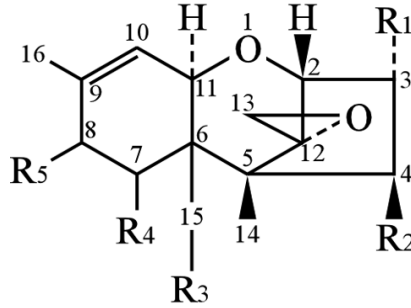
Trikotesenler *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Trichothecium*, *Kerticimosporium*, *Cephalosporium* ve *Cylindrocarpen* küflerinin sekonder metabolitleri olarak oluşan mikotoksinlerdir. 140'dan fazla trikotesen tipi izole edilmiştir ve bu sayı artmaya devam etmektedir (Girgin ve ark. 2001).

Trikotesenler 9 ve 10. (C-9) çift bağ ve 12, 13 epoksit halkası içermesinden dolayı trisiklik seskiterpenlerdir ve bundan dolayı 12, 13-epoksitrikotes-9-en'ler olarak karakterize edilirler. *Fusarium* trikotesenleri C-3, C-4, C-7, C-8 ve C-15 pozisyonlarındaki çeşitli oksijenasyon ve esterifikasyon modelleri ile karakterize olmuştur ve C-4 ve C-15'e bağlı makrosiklikler içermezler (Şekil 1.8).

Trikotesenler 12, 13-epoksitrikotes-9-en halkası temel alınarak kimyasal yapıları göre A, B, C ve D olmak üzere dört farklı gruba ayrılırlar. A ve B tipi trikotesenler C-8 pozisyonunda keto grubu içerip içermemesine göre birbirinden ayrılırlar. A grubu trikotesenler; C-8'de oksijen işlevine sahip olmayan diasetoksiskirpenol ve C-8'de esterlenmiş hidroksil grubuna sahip olan T-2 toksini tarafından temsil edilirler. B grubu trikotesenler C-8'de keto grubuna sahiptir ve nivalenol ve deoksinivalenol ile temsil edilirler (Desjardin 2006). C tipi ilave bir epoksit grubu ile karakterizedir. D tipi ise makrosiklik trikotesenlerden oluşmaktadır ve *Stachybotrys* ve *Trichotecium* üyeleri tarafından üretilir. Tarım ürünlerinde trikotesen kontaminasyonunun büyük kısmını A grubundan olan T-2 toksini ve skirpentriol ile B grubuna dahil olan deoksinivalenol (DON) ve nivalenol (NIV) ve türevleri oluşturmaktadır. T-2 toksini ve skirpentriolün doğada bulunma sıklığı DON ve NIV'e göre daha azdır (Girgin ve ark. 2001; Desjardin 2006).

Tip A ve onun kemotipleri İTK ile ve uzun dalga boylu UV ışığı altında meydana gelen renk değişimleri ile belirlenebilmektedir. Tip B trikotesenler

kahverengi, tip a trikotesenler ise gök mavisi floresan renge sahiptir (Desjardin 2006).



Trikotesen	Oksijenasyon ve Esterifikasyonun Pozisyonu				
	C-3	C-4	C-7	C-8	C-15
Deoksinivalenol	OH	H	OH	=O	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	=O	OH
T-2 toksin	OH	OAc	H	OIsoval	OAc

OAc: Asetil ester, OIsoval; isovalerat ester

Şekil 1.8. Triketesinlerin yapısı (Desjardin 2006)

1.3.3.1. Triketesinlerle Kontamine Gıdalar

Fusarium türleri tarafından üretilen triketesin çok çeşitli bitkisel ürünleri enfekte edebilir ve bundan dolayı triketesinler çok çeşitli gıda ve yemlerde meydana gelebilir. Ancak pratikte mısır, buğday ve arpa gibi tahıl tohumları insan ve hayvan beslenmesindeki triketesin kontaminasyonunun en önemli kaynaklarıdır. Çevresel koşullar küf enfeksiyonu için uygun olduğu zaman, triketesin tarlada tahılları kontamine edebilir ve depolama koşulları da küf gelişimi ve triketesin üretimi için uygun olur ise, toksin miktarı önemli ölçüde artar. Triketesin üreten *Fusarium* türleri doğada ve zirai ekosistemde geniş bir yayılıma sahip olduğundan dolayı, zirai ticaretten triketesinlerin tamamen elimine edilmesi mümkün değildir. Gelişen işletmeciliğin bu konudaki amacı ise gıda ve yemlerdeki triketesin kontaminasyonunun sağlık üzerinde önemli bir etki oluşturamayacak konsantrasyonlara kadar indirmektir. Triketesin yönetim

stratejileri tahıl gıdaları ve işlenmiş gıdalardaki kontaminasyonu ve seviyesini belirlemek için örnek toplanması ve analizi gerektirmektedir. Gelişen ülkelerde toplum eğitimi ile birlikte ürün yönetimi ve depolama standartları, trikotesene insan maruziyetinin sınırlandırılması, kapsamlı gözetimi ve düzenlenmesi iyileştirilmektedir. Az gelişmiş ülkelerde ise aksine trikotesen ve diğer mikotoksinler ile gıda kontaminasyonuna karşı bilinç düşüktür. Sınırlandırılmış kaynaklar nedeniyle, az gelişmiş ülkelerdeki mikotoksin izleme programları sıklıkla sınırlandırılmış ya da ithalat ürünlerine odaklanmıştır.

Kullanılabilir verilerin az olmasına rağmen, az gelişmiş ülkelerdeki popülasyonun mısır, buğday, arpa ve diğer tahıl tohumlarında önemli seviyelerde trikotesene maruz kaldığı düşünülmektedir (Desjardins 2006).

Özellikle bu klimada trikotesen içerikli yemler hayvan zehirlenmelerine ve ölümlerine neden olur ve yaşanan olaylar çok seyrek değildir. Böyle yemlerde diğer toksinlerin yanı sıra T-2 toksini 2 mg/kg^{-1} düzeyinde bulunmuştur. Yem mısırlarında trikotesenler oldukça fazla görülür. Dioksiskirpenol miktarı $31,5 \text{ mg/kg}^{-1}$ düzeyine kadar çıkabilmektedir. Türkiye tahıl ve yem maddeleri bulunduğu iklim kuşağı nedeni ile trikotesenler açısından risk altında değildir (Tunail 2000).

Trikotesen ile kontamine olma riskine sahip olan gıda gruplarında izin verilen maksimum limit Türk Gıda Kodeksi tarafından skirpentriol ile B grubuna dahil olan deoksinivalenol (DON) için oluşturulmuş ve ilgili limitler Çizelge 1.5’de verilmiştir.

Çizelge 1.5. DON Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri

(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

Gıda Maddesi	Maksimum limit ($\mu\text{g/kg}$)
DEOKSİNİVALENOL (DON)	
İşlem görmemiş tahıllar (durum buğdayı, yulaf ve mısır hariç)	1250
İşlenmemiş durum buğdayı ve yulaf	1750
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	1750
Doğrudan tüketime sunulan tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl unları, kepek (son ürün olarak) ve tohumları	750
Makarna	750
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar	500
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	200

Çizelge 1.5. (Devam) DON Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri
(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	750
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	1250

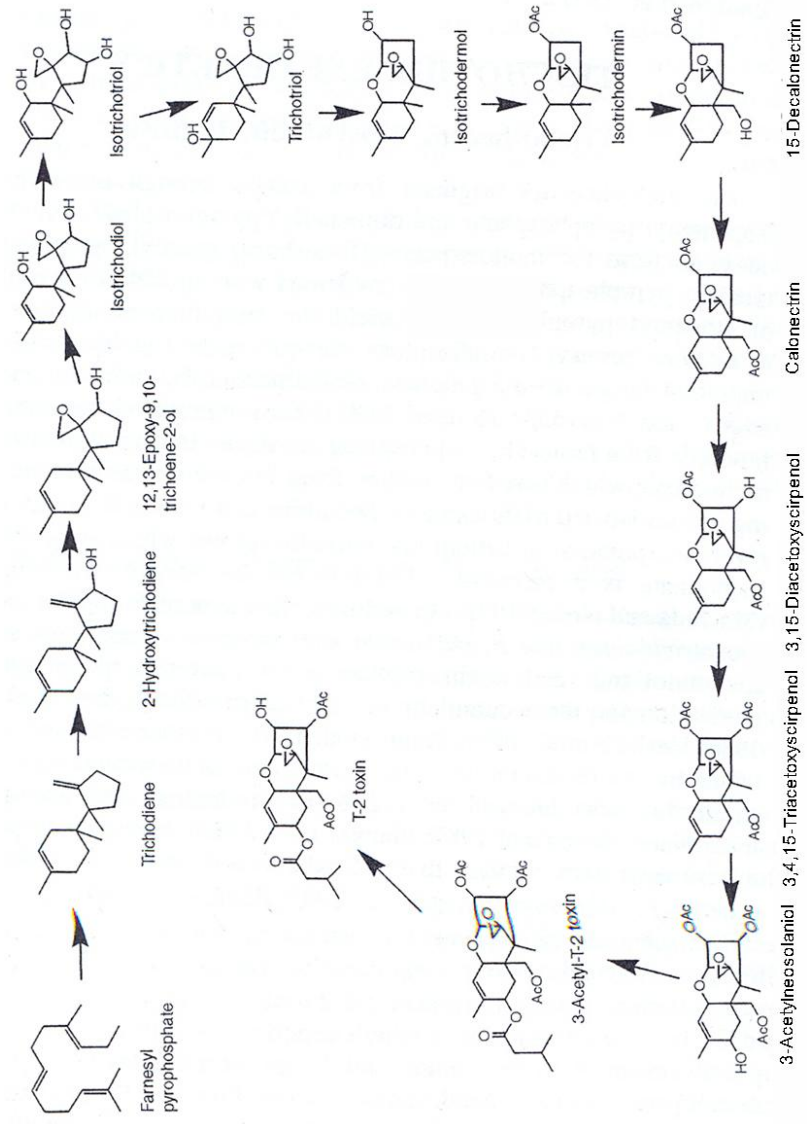
1.3.3.2. Trikotesenlerin Biyosentez Mekanizması

Trikotesen, monoterpen (10 karbonlu) jenaril pirofosfat şeklinde yoğunlaşmış olan izopentenil pirofosfat ve dimetil pirofosfatta mevalonat aracılığıyla asetattan köken alır. Jeranil pirofosfat sırasıyla seskiterpen (15 karbonlu) *trans*, *trans*-farnesil meydana getirmek için isopentil pirofosfat molekülünün ilave edilmesi ile yoğunlaşır. Seskiterpenler, steroller, eremofilanler, sativanlar ve botrydialler gibi değişik önemli fungal doğal ürünleri meydana getirir. Trikotesen biyosentezi, hidrokarbon ara düzey trikodini vasıtasıyla farnesil pirofosfattan oluşmaktadır. Trikodinden oksijenasyon, izomerizasyon, siklizasyon ve esterifikasyon gibi bir seri olayın sonucunda diasetoksiskirpenol, T-2 toksin, deoksinivalenol ve nivalenol gibi daha kompleks trikotesenler meydana gelir. Trikotesenin karakterizasyonu *F.sporotrichioides* mutant straini kullanılarak C-3 ve C-15'deki hidroksilasyonun C-4 ve C-8'deki hidroksilasyonu ile takip edilmesiyle şematize edilmiştir. *F.sporotrichioides*'in UV ile indüklenen mutant strainin katı substrat fermentasyonu sonucu trikotriol ve izotrikotriol, trikotriolün 11 α -hidroksi izomeri gibi diğer biyosiklik bileşikler meydana gelir (Desjardin 2006).

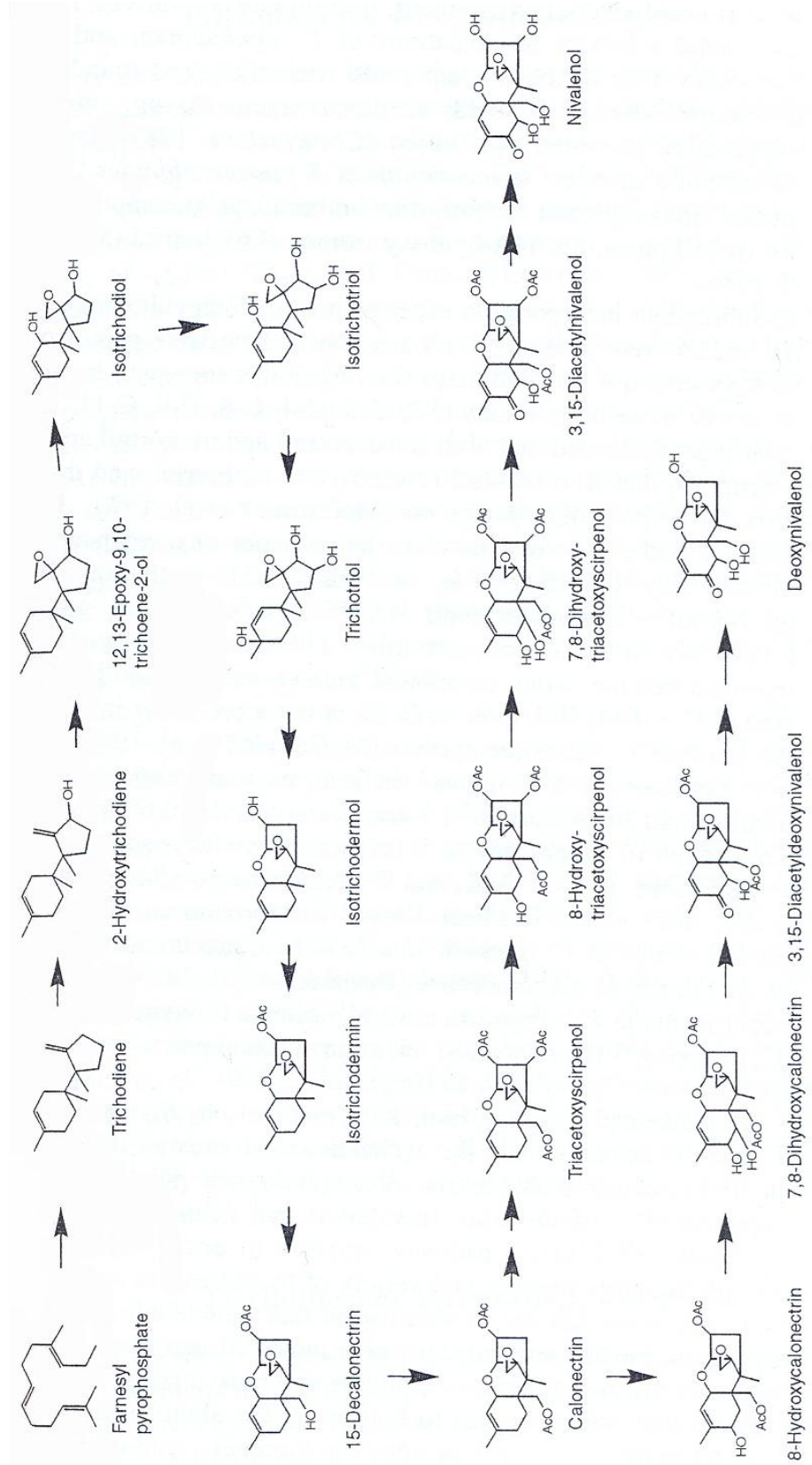
F. sporotrichioides kültürü ile yapılan birleşme deneylerinin diasetoksiskirpenol ve T-2 toksinin olası prekürsör sayısı ile (örneğin; bir veya daha fazla pozisyonunda hidroksilasyonlu trikotesenler) düzeltilmesi hem isotrikotriol ve hem de trikotriolün T-2 toksin prekürsörü olduğunu açıkça ortaya koymuştur. *F. sambucinum* ve *F. sporotrichioides*'deki trikotesen biyosentezine

ait oksijenasyon adım sırası; C-11 (izotrikotriol) → C-9 (trikotriol → izotrikodermol) → C-15 (didekalonefrin) → C-4 (diasetoksiskirpenol) → C-8 (neosolaniol→T-2 toksin) (Şekil 1.9a ve b). Bu çalışmalar *Fusarium* türlerindeki trikotesen biyosentezinde bir prekürsör olmayan C-3, C-4, C-7, C-8 ve C-15’de oksijenasyonlaşmayan temel trikotesen bileşiklerini de belirlemiştir. *F.culmorum* ile yapılan birleştirme deneyleri izotrichodiol ve izotrichodermol’ün 3-asetildeoksinivalenol’ün prekürsörü olduğunu göstermiştir. Trikodienin izotrikotriole dönüşümü C-2, C-11 ve C-12, C-13’de en az 3 oksijenasyonu gerektirmektedir. *F. sporotrichioides*’ün işaretleme çalışmaları 11 α -hidroksitrikodienin apotrikotesene ait bir prekürsör olabileceğini göstermiştir.

Özetle, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sambucinum* ve *F.sporotrichioides*’in trikotesen biyosentezinde siklizasyon ve çoğunlukla da oksijenasyonda ortak yol izlerler. *F. culmorum* / *F. graminearum* (nivalenol) ve *F. sambucinum* / *F. sporotrichioides* (T-2 toksin)’e ait yol izleri arasındaki ana dallanma noktası kalonektrinde meydana gelmektedir (Şekil 1.9a ve b) (Desjardin 2006).



Şekil 1.9a. Triketesen biyosentez yol izi. *F. sporotrichioides*'de T-2 toksin biyosentetik yol izi (Desjardin 2006).



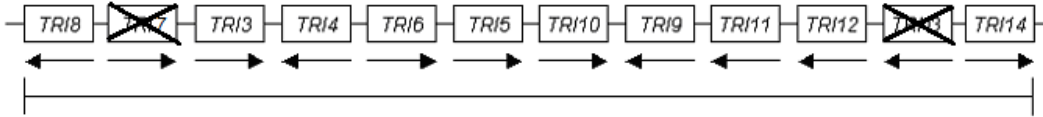
Şekil 1.9b. Triketesen biyosentez yol izi. *F.graminearum* nivalenol ve deoksinivalenol biyosentetik yol izi (Desjardin 2006).



F. sporotrichioides



F. graminearum (NIV)



F. graminearum (DON)

Şekil 1.11. *F. sporotrichioides* ve *F. graminearum*'un nivalenol (NIV) ve deoksinivalenol (DON) üreten strainlerinde trikotesen biyosentez yol izindeki gen kümesi (Desjardin 2006).

Trikodien sentaz geni ilk olarak *Tox5* olarak isimlendirilmiş olup günümüzde *TRI5* gen kümesi olarak yeniden adlandırılmıştır. *TRI5* geninin bozulması çalışmaları herhangi bir belirlenebilir yeni metabolit birikimi olmaksızın trikotesen biyosentezinin kaybıyla sonuçlanmıştır.

Bir substrat molekülüne moleküler oksijenin eklenmesini katalizleyen sitokrom P450 monooksijenaz heme-esaslı enzimlerin bir üst ailesidir. Fungal sitokrom P450 hidrokarbon degradasyonunu, steroid hidroksilasyonunu, fitoaleksinin degradasyonunu ve trikotesen, fumonisin ve aflatoksin gibi birkaç mikotoksinin biyosentezini katalizler. *TRI5* gen kümesinde yer alan trikodien oksijenaz *TRI4* geni sitokrom P450'nin bir üst ailesine ait üyelere benzer proteinleri kodlamaktadır. *TRI4* bozulması ile yapılan çalışmalar hidrokarbon prekürsörü trikodienin birikmesi ve trikotesen üretiminin kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu veriler *TRI4* geninin trikotesen biyosentezinin ilk oksijenasyonunun bir ya da

daha fazla aşamasını katalizleyen sitokrom P450 monooksijenazı kodladığını göstermektedir (Desjardin 2006).

İzotrikodermin 15-oksijenaz geni *TRI5* gen kümesinde yer alan ve *TRI11* olarak isimlendirilen diğer bir gendir. *TRI11* bozulmasına dayalı çalışmalar izotrikodermin, 8-hidroksi izotrikodermin, 8-hidroksi izotrikodermol ve 3,4,8-trihidroksitrikotesen birikimi ve T-2 toksin üretiminin kaybıyla sonuçlanmıştır. Bu veriler C-15'in oksijenasyonunu katalizleyen sitokrom P450 monooksijenazın *TRI11* tarafından kodlandığını ortaya koymuştur.

TRI5 gen ailesindeki diğer bir gen olan kalonektrin 4-oksijenaz genidir ve *TRI13* olarak adlandırılmıştır. *F. graminearum*'un nivalenol üreten strainlerinde *TRI13* geninin bozulma çalışmaları 4-deoksinivalenolün birikmesi ve nivalenol üretiminin kaybıyla sonuçlanmıştır. *F. sporotrichioides*'in T-2 toksinini üreten strainlerinde *TRI13* geninin bozulma çalışmaları ise C-4: 8-hidroksikalonektrin, 4-deoksi-T-2 toksin ve 4-deoksi-3-asetil T-2 toksindeki bir hidroksil grubundan yoksun üç trikotesenin birikmesi ve T-2 toksini üretiminin kaybedilmesi ile sonuçlanmıştır. Bu veriler *Fusarium* türlerindeki C-4'ün oksijenasyonunu katalizleyen sitokrom P450 monooksijenazın *TRI13* tarafından kodlandığını göstermektedir. *F. sporotrichioides* ve *F. graminearum* *TRI13* dizisi karşılaştırıldığında deoksinivalenol üreten strainlerdeki *TRI13* geninin T-2 toksin ve nivalenol üreten strainlerinki ile % 61 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *ΨTRI13* olarak adlandırılan genin ise deoksinivalenol üreten strainlerde korunmuş olduğu belirlenmiştir (Desjardin 2006).

Gen kümesinin diğer bir üyesi olan gen ise *TRI1* 'dir ve triasetoksiskirpenol 8-oksijenazı kodlamaktadır. *F. sporotrichioides*'in T-2 toksinini üreten strainlerinde *TRI1* geninin bozulması 4,15 deasetoksiskirpenolün birikmesi ve T-2 toksin üretiminin kaybıyla sonuçlanmıştır. Dahası C-8 oksijenasyonda bloke edilmiş olan UV ile indüklenmiş mutantlarda *TRI1* geni ile transformasyon sonucu T-2 toksin üretimi onarılmıştır. *F. graminearum*'da *TRI1* geninin bozulması ise kalonektrin ve C-7 ya da C-8'de oksijenlenmiş olmayan 3-deasetilkalonektrinin birikmesi ve deoksinivalenol üretimin kaybıyla sonuçlanmıştır. Bu veriler C-8 hidroksi grubunun bilinmeyen bir enzim tarafından bir keto grubuna okside edildiğini, *TRI1* sitokrom P450 tarafından edilmediğini

göstermektedir. Ayrıca bu veriler *F. sporotrichioides*'deki *TRI1* tarafından kodlanan sitokrom P450 monooksijenazın C-8'in oksijenasyonunu, *F. graminearum*'daki *TRI1* genine ait olanın ise hem C-7 hem de C-8'in oksijenasyonunu katalizlediğini göstermektedir.

TRI3, *TRI101*, *TRI8*, *TRI7* ve *TRI16* genleri ester gruplarının eklenmesi ya da çıkartılmasını sağlayan enzimleri kodlamaktadır. *TRI3* geni trikotesen 15-O-açıltransferazı kodlar ve bu genin bozulması 3,15 didekalonektrin, 15-dekalonektrin, isotrikodermol ve isotikodermin birikimi ile ve T-2 toksin üretiminin kaybıyla sonuçlanmıştır. Bu gen C-15 hidroksil grubunun asetilasyonunu katalizleyen enzimi kodlamaktadır. *TRI101* geni trikotesen 3-O-asetiltransferaz enzimini kodlar ve bu genin bozulması farklı özelliklerde trikotesenin üretimiyle sonuçlanmıştır. Bu veriler doğrultusunda *TRI101* geni tarafından kodlanan enzimin C-3 asetil koruyucu grup ile ara ürünlerin meydana getirildiğini göstermektedir. Trikotesen 3-O-asetil transferaz asetilatı kodlayan gen *TRI8* olarak adlandırılmaktadır ve bu genin *F. graminearum*'da bozulması C-3'de 3,15 diasetildeoksinivalenol, kalonektrin ve 7,8-hidroksikalonektrin olmak üzere asetilenmiş üç bileşiğin birikmesi ve 15-asetildeoksinivalenol üretiminin kaybıyla, *F. sporotrichioides*'de kaybı ise C-3'de 3,4,15 triasetoksiskirpenol, 3-asetil neozolaniol ve 3-asetil-T-2 toksin gibi asetilenmiş 3 bileşiğin birikmesi ve T-2 toksin üretiminin kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu veriler *TRI8*'in birkaç trikotesenin C-3 asetil grubunun spesifik deasetilasyonunu katalizleyen bir enzim kodladığını işaret etmektedir. *TRI7* ise trikotesen 4-O-asetiltransferaz genidir ve T-2 toksin üreten *F. sporotrichioides* strainlerinde bozulması sonucu C-4 asetil grubundan yoksun HT-2 toksinin birikmesi ve T-2 toksin üretiminin kaybı meydana gelmektedir. *F. graminearum*'un nivalenol üreten strainleride bu genin bozulması nivalenolün birikmesi ve 4-asetilnivalenol üretiminin kaybıyla sonuçlanmıştır. Bu veriler her iki *Fusarium* türünde C-4 hidroksil grubunun asetilasyonunu katalizleyen enzimin *TRI7* geni tarafından kodlandığını göstermektedir. *TRI7* geni ise deoksinivalenol üreten strainlerde karşılaşılan bir gen olarak belirlenmiştir. Trikotesen 8-O-açıltransferaz geni *TRI16* olarak adlandırılır ve T-2 toksin üreten *F. sporotrichioides* strainlerinde bozulması sonucu C-8-hidroksillenmiş bir bileşik olan neosolaniolün birikmesi ve T-2 toksin

üretiminin kaybı meydana gelmektedir. Bu veri *TRI16* geninin *F.sporotrichioides*'de C-8 hidroksil grubunun açılasyonunu katalizleyen bir enzimi kodladığını göstermektedir. Deoksinivalenol C-8'de hidroksil grubundan ziyade keto grubu içerdiğinden dolayı *F.graminearum*'da *TRI16* enziminin fonksiyonu gözlemlenememiştir. Dizi olarak benzer olmasına rağmen fonksiyonel olarak farklılıklar içeren gen *ΨTRI16* olarak adlandırılmıştır (Desjardin 2006).

TRI6, *TRI12*, *TRI10* ve *TRI15* genleri transkripsiyon faktörleri ve taşıyıcılar arasında yer almaktadır. Trikotesen diğer pek çok fungal doğal ürünlere benzer olarak normal gelişim için gerekli değildir. Bundan dolayı *Fusarium* türlerindeki trikotesen biyosentetik yol izindeki genler ekspresse edilmezler fakat daha ziyade gelişimsel ve çevresel sinyallerin sorumluluğunda ekspresse edilirler. Bir transkripsiyon faktörü olarak varsayılan gen *TRI6* olarak adlandırılır ve *TRI5* genine yakın bir yerde bulunmaktadır. *TRI6* geninin bozulması trikotesen prekürsörü trikodienin düşük seviyede birikmesi ve tüm trikotesen üretimin kaybıyla sonuçlanmaktadır. Ayrıca *TRI6*'nın C-terminusunda üç yapısal olarak ilişkili Cys₂His₂ tipi çinko parmakları içerdiği tahmin edilmektedir. Bu veriler trikotesen biyosentezinde çinko parmak tipi transkripsiyon düzenleyicisini olarak fonksiyon gösteren bir proteinin *TRI6* geni tarafından kodlandığını göstermektedir. Trikotesen akış pompası *TRI5* gen kümesinde yer almaktadır ve *TRI12* olarak isimlendirilir. *TRI12* geninin kaybı kompleks ortamda gelişimin azalması, trikotesen üretim seviyesinin azalması ve ilave trikotesen varlığında gelişimin azalması ile sonuçlanmıştır. Bu veriler *TRI12*'nin trikotesen biyosentezinde ve trikotesenden korunmada bir role sahip olduğunu göstermektedir. Düzenleyici gen olan *TRI10* geni ise *TRI5* gen kümesinde yer alan bir gen olup bozulması durumunda trikotesen ve trikotesen ara ürünlerinin tamamen kaybı gerçekleşmektedir. Diğer bir gen olan *TRI15* geni transkripsiyonel faktör olarak varsayılır ve bu gen çinko parmak tipi proteine benzer şekilde fakat negatif olarak fonksiyon gösterir ve trikotesen biyosentezinin negatif düzenleyicisidir. *TRI5* gen kümesinde yer alan fakat henüz tam fonksiyonu belirlenememiş olan iki gen ise *TRI9* ve *TRI14*'dür (Desjardin 2006).

1.3.3.3. Trikotesenin Etki Mekanizması

Trikotesenin deri, bağırsak, kan ve diğer organların hızlıca gelişen hücreler için akut toksik olduğu gözlemlenmiştir. 1968 yılında, nivalenol ve 4-asetilnivalenolün hayvan hücrelerinde ve hücresiz sistemlerde ribozomal protein sentezini inhibe ettiği fakat *E.coli* gibi bakterilerdeki hücresiz sistemleri inhibe edemediği belirlenmiştir. Memeli hücrelerdeki ve *Saccharomyces cerevisiae*'daki ribozomlarda, nivalenol polifenil alaninin poli urasil yönetimindeki sentezini ve polilizin poliadenin yönetimindeki sentezini inhibe etmiştir fakat aminoasıl-tRNA sentetaz tarafından amino asitlerin aktivasyonu üzerinde etkili değildir. Ayrıca deoksinivalenol ve T-2 toksini buğday ve mısırdaki ribozomlarda protein sentezini inhibe etmiştir. İleri çalışmalar ile tüm trikotesenlerin 60S ribozomal alt üniteye tek bir bölgeye bağlandığı polipeptitlerin uzaması ve sonlanması için gerekli olan peptidotransferaz aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Hayvansal hücrelerde protein sentezinin inhibisyonunda trikotesenlerin yapısal aktivite ilişkisi geniş ölçüde derlenmiştir ve tüm çalışmalar 12,13 epoksid halkasının aktivite için gerekli olduğunu doğrulamıştır. Bu çalışmaların bir kaçı hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonunun ve esterifikasyon sayı, pozisyon ve tipinin, trikotesenlerin protein sentezini başlangıç aşamasında mı ya da uzama-sonlanma aşamalarında mı inhibe edeceği konusunda etkili olabileceğini ileri sürmüştür. Pek çok araştırmacı trikotesenin ana etki bölgesinin ribozomal peptidiltransferaz olduğu ve bu toksinin geniş bir biyolojik etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. Ayrıca son çalışmalar, trikotesenlerin ve diğer peptidiltransferaz inhibitörlerinin sadece protein translasyonunu bloke etmediğini ayrıca hücre sinyal transferinde bulunan mitojen aktif protein kinazdan sorumlu bir ribozomal stresi de tetiklemektedir (Desjardin 2006).

Çoğu trikotesen hem mikotoksin hem de zootoksik ajanlardır. Bazı trikotesenler antifungal, antiviral ve antibakteriyeldir. Ciltte yanma, kaşıntı, şişkinlik, peteşik kanama, kuruma, çatlama, pul pul dökülme; ayrıca enterit, kusma, oral nekroz, gastroenterik nekroz gibi toksisite belirtileri göstermektedir. Bu bileşikler oldukça güçlü enflamatuvar etkiler ve ödem gibi önemli sistemik etkilere sahiptirler; özellikle abdominal ödem diğer dokularda toksik etki

gözlenmeyecek kadar düşük konsantrasyonlarda toksinle dahi görülebilen bir etkidir. Bu belirtilere ilaveten bu grup toksinlerin yüksek dozlarda beyinde ve kalp kaslarında dejenerasyon ve kanamalara neden oldukları saptanmıştır. Testis, timus ve lenf nodüllerinde ciddi nodüller oluşturmuşlardır ve bazı hayvanlarda gastrointestinal kanal (GİK) enflamasyonları gözlenmiştir. İnsanlarda düşük doz etkileri bulantı, kusma, anemi, hemoraji, diyare ve immunosupresyondur (Girgin ve ark. 2001).

Trikotesenler doğada sık bulunurlar ve Rusya’da kışı tarlada geçirerek önemli derecede sıcaklık değişimlerine maruz kalmış ve dolayısıyla kontamine olmuş tahıl tüketimine bağlı olarak oluşan “alimentary toxic aleukie” (ATA)’dan sorumlu tutulmuşlardır. ATA’nın klinik bulguları cilt toksisitesi, kemik iliği hasarı, hemorajiler ve diğer bazı sendromlar ile karakterizedir. ATA 1942–47 yılları arasında Sibiry’a yakınlarındaki Orenbur’da popülasyonun %10’undan fazlasının ölümüyle ilişkili bulunmuştur. Semptomları T–2 ile benzer şekilde kusma, diyare, deri enflamasyonui lökopeni, çoklu hemoraji ve kemik iliği hasarı ile karakterize edilmiştir. Bu nedenle T–2 toksininin ATA’daki etiyolojik etmen olduğu tahmin edilmektedir.

T–2 toksini ve NIV gibi trikotesenler aktif olarak üreyen hücrelerde karyorhekzisi indüklerler, kemik iliği hücrelerinde belirgin azalış oluştururlar ve protein ve DNA sentezini inhibe eder ve HL–60 hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) indüklemeye yetenekleri vardır. T–2 toksini ile insan periferik lenfosit hücrelerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada toksinin periferik lenfosit hücrelerini etkilediği, dolaşımdaki beyaz kan hücreleri sayısında azalma ve apoptozise neden olduğu saptanmıştır (Girgin ve ark. 2001).

Trikotesenler aynı zamanda kimyasal savaş silahları olarak da kullanılmaktadır. 1970’lerin sonlarında Güneydoğu Asya ve Afganistan’da kimyasal silah olarak kullanıldıkları bildirilmiştir. Daha yakın zamanda ise Irak, Birleşmiş Milletler Özel Komisyonu (UNSCOM) tarafından biyolojik silah olarak kullanılmak amacıyla trikotesen üretmekle suçlanmıştır. Kimyasal silah olarak kullanılan trikotesenler, T–2 toksin, DON, diasetilnivalenol ve NIV’dür.

Trikotesenler, tahıllarda sık bulunmaları nedeniyle ekonomiye olduğu kadar insan sağlığı için de tehdit olmayı sürdürmektedir. Bu nedenle başta tarım

ürünleri olmak üzere gıdaları enfekte etmeleri Dünya çapında sağlıkla ilgili büyük sorun olmaya devam etmektedir (Girgin ve ark. 2001).

1.3.4. Fumonisinler

Fumonisinler; *Fusarium moniliforme*, *F. dlamini*, *F. nygamai*, *F. subglutinans*, *F. napiforme*, *F. proliferatum* ve *F. anthophilum* gibi çeşitli küfler tarafından üretilmesine rağmen en önemli kaynakları *F. moniliforme* (*F. verticilloides* olarak yeniden adlandırılmıştır)'dır. Fumonisinler nongenotoksik karsinojenlerdir (Girgin ve ark. 2001). Üretimleri için optimum koşullar nem, yaklaşık 20 °C sıcaklık ve 11–13 haftalık bir süredir.

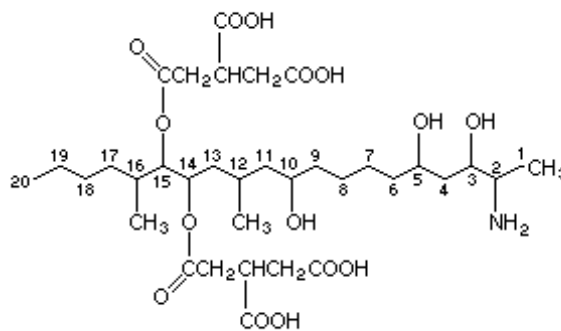
Fumonisinler; 4 farklı B serisi (B1, B2, B3, B4), 3 farklı A serisi (A1, A2, A3) ve 3 farklı P serisi (P1, P2, P3) olmak üzere 10 farklı tipte toksin çeşidine sahiptir (Şekil 1.12). Bunlardan fumonisin B1 2-amino-12, 16 dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroksieikosan ve propan-1,2,3-trikarboksilik asitin diesteridir. Hem C-14 hem de C15 hidroksil grupları asitin terminal karboksi grubu ile esterlenmiştir. Fumonisin B1'in keşfini omurga üzerinde bir serbest hidroksil grubundan yoksun olan fumonisin B2 ve fumonisin B3'ün izolasyonu ve yapısal karakterizasyonu takip etmiştir. Bu üç B serisi fumonisin, *F. verticilloides*, *F. proliferatum* ve diğer fumonisin üreten pek çok tür ile doğal olarak kontamine olmuş tahıl ürünlerinde meydana gelen fumonisinlerin çoğunluğunu oluşturur. Omurga üzerinde her iki hidroksil grubundan yoksun olan fumonisin B4 azınlıkta bir metabolittir.

B serisi fumonisinlerin terminal metil grubundan yoksun olan C serisi fumonisinler diğer türler tarafından iz miktarda üretilse de ağırlıklı bir şekilde *F. oxysporum* tarafından üretilmektedir. P serisi fumonisinler, B serisi fumonisinlerin 3-hidroksipiridinyum grubu yerine, A serisi fumonisinler ise B serisi fumonisinlerin N asetil amid grubu yerine bir amin taşırlar.

B serisi fumonisinlerin dışındaki fumonisinler laboratuardaki optimum kültür koşulları altında çok düşük seviyede üretilirler ve doğal olarak kontamine olmuş olan tahıllarda önemli seviyede üretilemezler. Fumonisinler nispeten basit uzun zincirli alkollerden meydana geldiği için, UV ışığı

absorplayan kromofora ve floresana sahip değildir. Bundan dolayı fumonisinlerin serbest amino gruplarına türevlendirilir ve HPLC ile floresans dedeksiyonu kullanılarak belirlenebilir. Ancak A ve P serisi fumonisinler amino grubuna sahip olduklarından dolayı türevlendirmeye dayalı HPLC tekniği ile belirlenmeleri mümkün değildir. Fumonisinlerin geniş bir aralığı türevlendirme olmaksızın kütle spektrofotometre yöntemi kullanılarak belirlenebildiği gibi, yüksek seviyelerde İTK yöntemi ile de belirlenebilirler (Dejardins 2006). Fumonisinler su, asetonitril:su (1:1 h/h) ve metanol içerisinde çözünabilirler. Ancak asetonitril:su ortamında kararlı halde iken, metanol içerisinde kararlı değildir

(<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm#SubSectionNumber:1.1.1>).



Fumonisinler	Karbon Pozisyonu		
	C-2	C-5	C-10
Fumonisin B1	NH ₂	OH	OH
Fumonisin B2	NH ₂	OH	H
Fumonisin B3	NH ₂	H	OH
Fumonisin B4	NH ₂	H	H
Fumonisin A1	N-asetil	OH	OH
Fumonisin A2	N-asetil	OH	H
Fumonisin A3	N-asetil	H	OH
Fumonisin P1	N-hidroksipridinyum	OH	OH
Fumonisin P2	N-hidroksipridinyum	OH	H
Fumonisin P3	N-hidroksipridinyum	H	OH

Şekil 1.12. Fumonisinlerin yapısı (Dejardins 2006)

1.3.4.1. Fumonisinle Kontamine Gıdalar

İnsan ve hayvan beslenmesindeki fumonisin kontaminasyonunun en önemli kaynaklarından biri mısır olmasına rağmen fumonisinler çok farklı gıda ve yemlerde oluşabilirler. Fumonisin üreten *Fusarium* türleri doğada ve zirai ekosistemde geniş bir yayılıma sahip olduğundan dolayı, zirai ticaretten fumonisinlerin tamamen elemine edilmesi mümkün değildir. Çevresel koşullar uygun olduğu zaman, fumonisin tarlada tahılları kontamine edebilir ve depolama koşulları da küf gelişimi ve fumonisin üretimi için uygun olur ise, toksin miktarı önemli ölçüde artar.

Yapılan düzenlemeler ile gıda ve yemlerdeki fumonisin kontaminasyonunu kontrol altına alınarak sağlık üzerinde önemli bir etki oluşturmamaya kadar indirilebilmektedir.

Toplumsal eğitim düzeyinin artması ile birlikte ürün yönetimi ve depolama standartları, fumonisine insan maruziyetinin sınırlandırılması, kapsamlı gözetimi ve düzenlenmesi iyileştirilmektedir. Az gelişmiş ülkelerde ise aksine fumonisin ve diğer mikotoksinler ile gıda kontaminasyonuna karşı bilinç düşüktür. Kullanılabilir verilerin az olmasına rağmen, az gelişmiş ülkelerdeki popülasyonun özellikle mısırdaki önemli seviyelerde fumonisine maruz kaldığı düşünülmektedir (Desjardins 2006).

Önemli kontaminasyon kaynağı olan mısır, mısır kaynaklı gıdalara ilaveten bebek gıdalarındaki fumonisine ait maksimum sınır değerler fumonisin B1 ve B2 açısından belirlenmiştir ve Çizelge 1.6'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Fumonisinler Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri

(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

Gıda Maddesi	Maksimum limit (FB₁ + FB₂) (µg/kg)
FUMONİSİNLER	
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	4000
Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, doğrudan insan tüketimine sunulan mısır bazlı ürünler	1000
Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerez	800
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları (işlenmiş mısır bazlı olanlar)	200

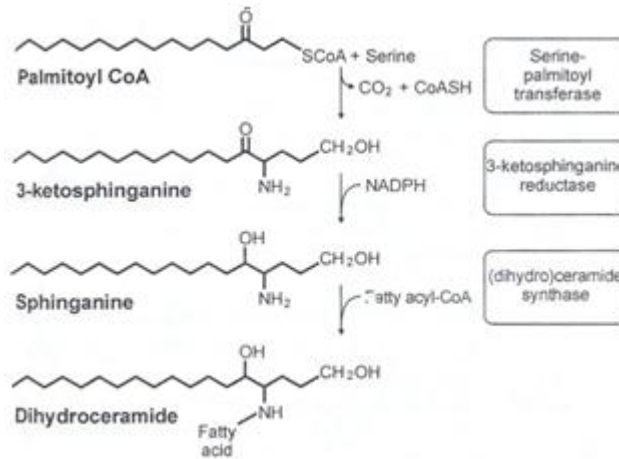
Çizelge 1.6. (Devam) Fumonisinler Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri
(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelletler (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	1400
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	2000

1.3.4.2. Fumonisinin Biyosentez Mekanizması

Fumonisinler, trikotesenler ve aflatoksinler gibi polisiklik mikotoksinlerin ayrıntılı yapısı ile kıyaslandığında nispeten basit bir yapıya sahiptir. Fumonisinin sfinganin ve diğer sifingoidlere yapısal benzerliği fumonisin biyosentezinin sifingolipid biyosentezi ile benzer olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Şekil 1.13 ve 14). Sifingolipid biyosentezi serin palmitoyltransferaz enzimi tarafından katalizlenerek fatty-açıl-koenzim A ile bir amino asitin kondanzasyonu ile başlar. Fumonisinler benzer şekilde sentezleniyor ise sonrasında alanin serin ile ve bir C-18 fatty açıl-koenzim A da palmitoyl koenzim A ile yer değiştirir. *F. verticilloides* yararlı izotop birleşme çalışmaları fumonisin B1'e ait C-1 ve C-2'nin biyosentetik prekürsörlerinde bulunduğunu belirlemiştir. Çoklu bölgede etiketlenmiş alanin ile yapılan ileri çalışmalar alaninin diğer prekürsörlere degradasyonla değil, doğrudan bağlandığını doğrulamıştır. *F. verticilloides* kültürüne, [^{13}C] asetat ve [^{14}C] asetatın ilave edilmesi etiketin birleşmesiyle sonuçlanmıştır ve buda fumonisin B1 molekülündeki C-3 vasıtasıyla C-20'nin asetatdan türevlendiğini işaret etmektedir. Dahası çift sayılı atomlar asetatın metil gruplarından türevlenmiştir ve tek sayılı karbon atomları asetatın karboksil gruplarından türevlenmiştir. Ancak asetat bağlanma deneyleri fumonisinin yağ asitinden mi yoksa poliketitten mi türevlendiğini belirleyememiştir. Çünkü her iki bileşikte asetattan türevlenmiştir. Fumonisin biyosentezi için gereken bir poliketit sentaz olarak FUM1 (eski adı FUM5)'in identifikasyonu alaninin bir yağ asitinden ziyade bir poliketit ile bağlantı kurduğunu belirtmiştir (Desjardins 2006).

İlaveten izotop bağlama çalışmaları fumonisin molekülüne ait farklı bileşiklerin biyosentetik kaynaklarına ait çeşitliliğini göstermiştir. C-14 ve C-15'deki trikarbolilik asit parçası siklik asit siklusundaki gibi glutamik asitten türevlenmiştir. C-12 ve C-16'daki metil grupları metiyoninin S-metil gruplarından türevlenmiştir. Dahası Fumonisin poliketit sentazda bir metiltransferaz domaininin varlığı, poliketit omurgasının oluşumu esnasında metil gruplarının bağlandığını işaret etmektedir. Son olarak, oksijen izotop bağlama deneyleri asetil karbonil grubundan ziyade moleküler oksijenden türevlenmiş olan C-5, C-10, C-14 ve C-15'deki fumonisin omurgasına oksijenin bağlandığını belirlemiştir. Böylece terminal karboksilik asit fonksiyonlu ve iki metil gruplu düz 18 karbon zincirli hipotetik poliketit prekürsör B serisi fumonisinler tamamen meydana gelmiştir (Desjardins 2006).



Şekil 1.13. Hayvan sistemlerindeki sifingolipid biyosentez yol izi (Desjardins 2006).

Farz edilen poliketitten *F. verticilloides*'deki fumonisin B1'e önderlik eden alanin, karbonil redüksiyon, oksijenasyon, esterifikasyon ve dehidrogenasyon dizisi hemen hemen tamamen bilinmektedir.

F. verticilloides'deki fumonisin biyosentez yol izi poliketit senteziyle başlar, bir amino asit ile yoğunlaşır ve 5 oksijenasyon, 2 esterifikasyon ile takip edilir. Fumonisin biyosentezi şüphesiz ki düzenleyici gen ağının ekspresyonunu da gerektirir, fakat spesitik fumonisin düzenleyici genler henüz rapor edilmemiştir. Hem fumonisin biyosentezi hem de *F. verticilloides* siklin tipi transkripsiyonal düzenleyici olan *FCC1* ve bir pH düzenleyici gen olan *PAC1* tarafından etkilenir. *F. verticilloides*'in Mendelian genetik analizi, fumonisin

Bu gen kümesinin birinci üyesi fumonisin poliketit sentaz geni olan *FUM1*'dir. Fumonisin poliketit sentaz, tek bir translasyon ürünü üzerinde yer alan 7 fonksiyonel alanlı (ketoaçilsentaz, açıltransfereaz, açıl taşıma proteini, ketoaçilredüktaz, dehidrataz, metiltransferaz ve enoyilredüktaz) tekrarlayan tip I poliketit sentazdır. Bundan dolayı *FUM1* β -karbonil'in doymuş karbona tamamen indirgenmesi için gerekli olan tüm üç fonksiyonel bölgeyi (ketoaçilsentaz, dehidrataz, enoyilredüktaz) içermektedir. *FUM1* geninin bozulması kültür ortamındaki fumonisin üretiminde % 99 oranında azalma ile sonuçlanmıştır. Bu veri *FUM1* geninin fumonisin biyosentezindeki ilk adımı katalizleyen gen olduğunu işaret etmektedir.

FUM13, *FUM1*'in komşusu olan fumonisin C-3 karbonil redüktaz genidir. *FUM13* geninin bozulması fumonisin B1, B2, B3 ve B4 ve Fumonisin B3 ve B4'ün 3-keto homologlarının birikiminde % 90'dan fazla azalma olduğu belirlenmiştir. Bu veriler *FUM13* tarafından kodlanan bir enzimin poliketit karbonilin hidroksil grubuna redüksiyonunu katalizlediğini göstermektedir.

FUM3, *FUM1*'in komşusu olan fumonisin 5-oksijenaz genidir ve *FUM9* olarak da gösterilir. *FUM3* geninin bozulması; fumonisin B1 ve B2 üretiminde ve fumonisin B3 ve B4'ün biriktirilmesinde kayıplar ile sonuçlanmıştır. Bu veri *FUM3* tarafından kodlanan deoksijenazın C-5'in oksijenasyonunu katalizlediğini göstermektedir (Desjardins 2006).

FUM1'in komşusu olan ve fumonisin omurgasında yer alan 4 gen trikarbalilik asit esterifikasyonunda yer almaktadır. Bu genler *FUM7*, *FUM10*, *FUM11* ve *FUM14*'tür. *FUM7* geninin bozulması trikarbalilik esterde ilave karbon-karbon çift bağı ile fumonisinin orta düzeyde birikmesi ile sonuçlanmıştır. *FUM10*, *FUM11* ve *FUM14*'ün bozulması, bir ya da her iki trikarbalilik gruptan yoksun fumonisin B3 ve B4 homologlarının birikimi ile sonuçlanmıştır. Bu veriler ilgili 4 genin trikarbalilik asit grupları veya onlara ait fumonisin omurgası üzerindeki C-14 ve C-15 esterifikasyonların biyosentezinde yer aldığını göstermektedir.

FUM6 ve *FUM8*, *FUM1* gen kümesinde ilaveten gerekli olan diğer genlerdir. *FUM6* varsayılan bir fumonisin oksijenaz genidir ve NADPH-bağımlı P450 redüktaza birleşik sitokrom P450 monooksijenaz ile karşılaştırıldığında bu

enzimin üyelerine yüksek bir benzerlik göstermektedir. *FUM6*'nın bozulması fumonisin biyosentez derecelerinde birikme olmaksızın fumonisin üretiminin kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bundan dolayı bu veriler *FUM6* tarafından kodlanan sitokrom P450'nin fumonisin biyosentezinde bilinmeyen enzimler tarafından katalizlenen spesifik reaksiyonlar için gerekli olduğunu göstermektedir. Diğer bir varsayılan gen ise *FUM8* aminotransferaz genidir ve aminoasit ve açıl koenzim A'nın kondenzasyonunu katalizleyen pridoksal fosfat bağımlı aminotransferazın bir grubuna önemli derecede benzerlik göstermektedir. Enzimin bu grubuna ait üyeler sifingolipid biyosentez yolunun ilk kısımlarındaki serin ve palmitoyl-koenzim A'nın kondenzasyonunu katalizleyen serin palmitoyltransferazı içermektedir. *FUM8* geninin bozulması fumonisin biyosentez derecelerinde birikme olmaksızın fumonisin üretiminin kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bundan dolayı bu veriler *FUM8* tarafından kodlanan enzimin fumonisin biyosentezi için gerekli olduğunu göstermesine rağmen, spesifik reaksiyonlar bilinmeyen enzimler tarafından katalizlenmektedir (Desjardins 2006).

FUM1 gen kümesinde belirtilen 9 gene (*FUM1*, *FUM3*, *FUM6*, *FUM7*, *FUM8*, *FUM10*, *FUM11*, *FUM13* ve *FUM14*) ilaveten 6 farklı gen, düzenleyici gen olarak bulunmaktadır. Bunlarda 2 sitokrom P450 monooksijenaz olduğu varsayılan *FUM12* ve *FUM15* genlerinin bozulmasına dayalı olarak yapılan son çalışmalar, *FUM15* in fumonisin biyosentezi için gerekli olmadığını, ancak *FUM12*'nin bir fumonisin 10-oksijenazı kodladığını göstermektedir. *FUM16* ile yapılan bozulma çalışmaları ile bu gen tarafından fatty açıl-koenzim A sentazın kodlandığı tahmin edilmektedir. *FUM1* gen kümesindeki diğer 3 düzenleyici gen fumonisine kendini koruma yeteneğini vermektedir ve bunlar *FUM17*, *FUM18* ve *FUM19*'dur. *FUM19* geni tarafından kodlanan aminoasitler, toksinlerin hücrel konsantrasyonunu azaltmak için aracı olarak görev yapan pek çok ilaca karşı dirençli taşıyıcılar olan ATP bağlama kutularına önemli derecede benzerlik göstermektedir. *FUM19*'un bozulması mısır kültüründe fumonisin üretimi üzerine herhangi bir etkisi olmaz iken, sıvı kültürde fumonisin B3'ün oranı üzerine etkili olmuştur. *FUM17* ve *FUM18*, *FUM19*'un üst kısmında yer alan iki gendir ve benzer proteinleri üretirler. *FUM17* ve *FUM18* genleri domateste görülen ve fumonisin toksininine direnç oluşturulmasını sağlayan *ASC-1* genine çok

benzerdir. Her iki genin de bozulma çalışmalarında her hangi bir fumonisin üretim kaybı ile karşılaşılmamıştır ve bu genlerin fumonisinden korunmayı sağladığı düşünülmektedir (Desjardins 2006).

1.3.4.3. Fumonisin'in Etki Mekanizması

Fumonisinlerin sfingolipid metabolizmasını bozma olasılığından yola çıkarak fumonisin yapısı sfinganin ve diğer uzun zincirli sfingoide kuvvetli bir şekilde benzemektedir. 1991 yılında fumonisin B1 sıçan karaciğer hepatositlerinde kompleks sfingolipidlerin sfingoid esasında [¹⁴C] serinin izlenmesi ile belirlenmiştir. 2-amino-1,3-hidroksi alkanoller ya da hidroksil, metil grupları ve diğer modifikasyonları taşıyan alkenlere ait bir grup sfingoid (SO) temeliyle karşılaştırıldığında hayvanlar, bitkiler ve funguslar arasında farklılıkların olduğu görülmüştür (Desjardins 2006). Sfingolipidler hücre membranının önemli bileşenlerinden olan uzun zincirli serbest bazlardır ve mekanizmalarının bozulması hücre büyümesi, farklılaşması ve davranışında önemli değişikliklere neden olur. Fumonisinler sfinganin (SA) N-açıl transferaz (seramid sentetaz) enzimin inhibisyonu ile SA'nın N-açilsfinganinlerle (dihidroseramidlere) dönüşümünü inhibe eder. Bu olay serbest SA'nın birikmesi ve dokularda SA/SO oranının artmasıyla sonuçlanır ve toksinlerin alımından sonra erken bir safhada ortaya çıkar (Girgin ve ark. 2001).

Sfingoid temel, yeni biyosentezle ya da hücrel sfingolipidlerin çevrilmesiyle oluşabilir. Yeni sfingolipid biyosentezi serin palmitoyltransferaz enzimi ile fatty açıl koenzim A'nın genellikle palmitoyl koenzim A'ya ve serinin 3-ketosfinganine dönüştürülmesi ile başlar. Bu reaksiyon sfingofunginler gibi bazı fungal metabolitler ile durdurulabilirken fumonisin tarafından durdurulamaz. Sfingolipid biyosentezinin ikinci adımı fumonisinler tarafından durdurulamayan 3-ketosfinganin redüktaz enzimiyle 3-ketosfinganinin sfinganine indirgenmesidir. Ancak fumonisin yol izinde yer alan ve fatty açıl-koenzim A'nın ve sfinganinin dihidroseramide dönüşümünü katalizleyen üçüncü enzim olan (dihidro)seramid sentetazın spesifik inhibitörüdür. Bu enzim sfingosinin seramide dönüşümünü de katalizlemektedir. Ayrıca fumonisin sfingolipid

metabolizmasında yer alan dihidroseramidteki 4,5-*trans*-çift bağlarını keserek seramid oluşumunu katalizleyen dihidroseramid desaturaz, seramidi serbest sifingosine katalizleyen seramidaz, sifingosin kinaz ve sifingosin 1-fosfat fosfataz gibi diğer enzimleri inhibe etmediği belirlenmiştir.

Dihidroseramid sentazın inhibisyonu sifingolipid metabolizması üzerinde çeşitli etkilere sahip olabilir. İlk oluşan etki yüksek toksik özelliğe sahip olan ve fumonisin kaynaklı hayvansal toksikozlarda önemli role sahip olan sifinganin birikiminin meydana gelmesidir. İlaveten yeni sifingolipid sentezinin durdurulmasıyla kompleks sifingolipidler tükenir ve membran yapısı ve folat reseptör gibi reseptör fonksiyonları değişir. Seramid ve 1 fosfatlı sifingoidi içeren kopleks sifingolipidler sinyal bileşikleri için prekürsör olarak fonksiyon gösterdiklerinden dolayı hücresel düzenleme yol izinde geniş bir alanda etki oluşturur. Sonuç olarak fumonisinler geniş bir biyolojik etkiye sahip olmalarına rağmen, temel etki bölgesi (dihidro)seramid sentazdır (Desjardins 2006).

Fumonisinler atlarda lökoensefalomalazi (LEM), domuzlarda pulmoner ödemle ilişkili olan ajanlardır. LEM Meksika, ABD, Mısır ve Güney Afrika'da bilinen bir hastalıktır. Eşeklerde ve atlarda beyin beyaz cevher kısmında nekroz oluşturmaktadır. Ayrıca *F.moliforme* ile kontamine mısır tüketiminin aynı zamanda Güney Afrika ve Çin'deki özefagal kanser vakaları ile de ilişkili olduğu sanılmaktadır. Bilinen altı fumonisinden FB1 ve FB2'nin N-asetil türevleri olan FA1 ve FA2 *F.moliforme* kültürleri tarafından en az üretilen ve en az toksisiteye sahip olan türevleridir. Bu iki yapısal analog ve FB4 doğada bulunmazlar.

Fumonisinler toksik etkilerini göstermek için metabolik aktiviteye ihtiyaç duymayan bileşiklerdir. Bu özellikleri FB1 ve FB2 ile beslenen sıçanların idrar, kan ve hepatositlerinde metabolite rastlanmamasıyla doğrulanmıştır. FB1 ile sıçan ve maymunların kanında yapılan toksikokinetik çalışmalarda eliminasyon yarı ömrünün 18–40 dakika arası olduğu belirlenmiştir. FA1 ve FA2 toksisitesi düşük olan bileşiklerdir fakat hidrolizleriyle oluşan ürünler (PA1 ve PA2) ana bileşikler kadar toksisite gösterebilirler (Girgin ve ark. 2001).

Daha çok FB1 ve FB2 olmak üzere fumonisinlerin, hayvanlar üzerinde türe bağlı olarak nörotoksisite, nefrotoksisite, immünosupresyon (ve bazen de immünostimulasyon), gelişim bozuklukları, karaciğer tümörleri olmak üzere

çeşitli toksik etkileri vardır. Hayvanlarla yapılan toksikolojik incelemeler en hassas türün atlar olduğunu göstermiştir. LEM riskini azaltmak için at yemlerinde maksimum 5 µg/g fumonisin miktarına izin verilmesi tavsiye edilmiştir. Pulmoner ödem elgellemek için ise benzer şekilde domuzlarda 10 µg/g'lık miktara sığır ve kümes hayvanlarında ise fumonisin etkilerine duyarlılıkları diğer türlere göre daha düşük olduğundan dolayı 50 µg/g'a kadar fumonisine izin verilmektedir.

Fumonisinler kanser başlatmasında ve ilerlemesinde genotoksik kanserojenleri taklit ederler. Γ -glutamil transpeptidaz (GGT) ve glutatyon-S-transferazın plasental formunu (GSTP) indükler. Bu enzimler genotoksik kanserojenler tarafından başlatılan olası preneoplastik lezyonların histolojik belirteçleridirler. Fumonisinler genotoksik karsinojenlerden kanser başlatma safhaları ve uzun süreli maruziyeti gerektirmesi nedeniyle farklılık gösterirler. Bu safha genotoksik karsinojenler için normalde birkaç saat veya gün içinde tamamlanmaktadır.

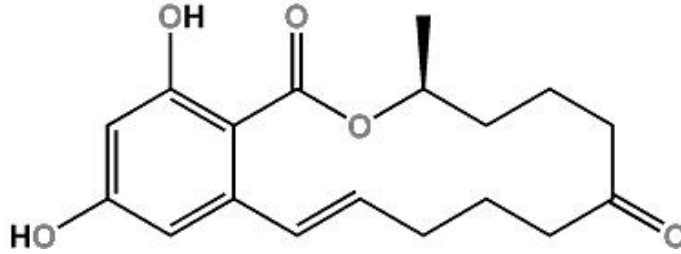
FB1 normal yiyecek hazırlama işlemlerinin çoğuna dayanıklı olan bir bileşiktir. Su da dahil olmak üzere pek çok polar solventte çözünür ve apolar çözücülerde çözünürlüğü yoktur. Fumonisinlerle kontamine olmuş olan yiyecekler ve yemler için bilinen hiçbir detoksifikasyon yöntemi bulunmamaktadır.

Mısırdaki ince partiküllü materyal (<3 mm) en yüksek miktarda fumonisin düzeyine sahiptir. İnce materyalin ayrılmasıyla fumonisin düzeylerinde belirgin azalma gözlenmiştir. Öğütme işlemi ve amonyak uygulanması da fumonisin derişimini düşürmektedir. Bir başka yöntem ise mısırın 0,1 M kalsiyum hidroksitte 24 saat 25 °C'de muamele edilmesidir. Tüm bu farklı uygulamalar fumonisinlerin mısır tohumlarının dış perikarp tabakasında konsantre olduğunu göstermektedir (Girgin ve ark. 2001).

1.3.5. Zearalenon

Zearalenon; nonaketid prekürsörlerin farklı siklizasyonu ve modifikasyonu ile türevlenmiş olan fungal metabolitlerin geniş bir ailesine aittir. Zearalenonlar siklizasyonla rezorsiklik asit lakton formuna türevlenirler ve yapısal olarak bazı fungusların ürettiği antibiyotik metabolitlerine oldukça benzerdirler.

Pek çok *Fusarium* türünün zearalenon ürettiği belirlenmiştir ve bunlar; *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* ve *F. semitectum*'dur.



Zearalenon	Karbon Pozisyonları					
	C-4	C-5	C-7-C-8	C-11	C-12	C-14
Zearalenon	OH	H	C=C	H	=O	H
α ve β -zearalenon	OH	H	C=C	H	OH	H
α ve β -zearalenon	OH	H	C=C	H	OH	H
11-Hidroksizearalenon	OH	H	C=C	OH	=O	H
14-Hidroksizearalenon	OH	H	C=C	H	=O	OH
4-Asetilzearalenon	OAc	H	C=C	H	=O	H
5-Formilzearalenon	OH	CHO	C=C	H	=O	H

Şekil 1.16. Zearalenon yapısı (Desjardins 2006).

Zearalenon adı ilk kez 1966 yılında izole edilen bir küf türü olan *Gibberella zeae*'nin kombinasyonundan türemiştir. Zearalenonlar, rezosiklik asit lakton yapıları üzerinde hidroksil gruplarının varlığı ve redüksiyon durumu ve asetillenmelerine göre farklılaşırlar (Şekil 1.16). *Fusarium* türleri tarafından üretilen zaeralenonlar temelde homologturlar fakat α -zearalenol, β -zearalenol ve 4-asetilzearalenon gibi diğer metabolitler doğal olarak kontamine olmuş gıdalarda ya da laboratuarda optimum kültür koşulları altında çok düşük seviyelerde meydana gelebilirler. Amerika'da α -zearalanol (zeranol) sığır gelişimini stimüle etmek için kullanılmasına rağmen 1985 yılından bu yana Avrupa'da bu tür kullanımlar yasaklanmıştır. Zearalenon ile ilgili ilk belirleme ve ölçüm çalışmaları İTK kullanılarak yapılsa da floresan dedeksiyona dayalı HPLC yöntemleri etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Desjardins 2006; Tunail 2000).

1.3.5.1. Zearalenonla Kontamine Gıdalar

Zearalenon çok çeşitli bitkisel ürünleri enfekte edebilir. Buğday, arpa ve özellikle mısır gibi tahıl tohumları insan ve hayvan beslenmesindeki zearalenon kontaminasyonunun en önemli kaynaklarıdır. Küf enfeksiyonu için çevresel koşullar uygun olduğu zaman, zearalenon tarlada tahılları kontamine edebilir ve depolama koşulları da fungal gelişim ve zearalenon üretimi için uygun olur ise, toksin miktarı önemli ölçüde artar. Diğer *Fusarium* toksinleri gibi Zearalenon üreten *Fusarium* türleri doğada ve zirai ekosistemde geniş bir yayılıma sahip olduğundan dolayı, zirai ticaretten zearalenonların tamamen elimine edilmesi mümkün değildir. Tüm ana zearalenon üretici *Fusarium*'lar aynı zamanda trikotesen üreticileri olduğundan dolayı, zearalenon kontaminasyonunun sağlık üzerinde önemli bir etki oluşturamayacak derişimlere kadar indirebilmek için her iki tip mikotoksin seviyesini de indirmek gerekmektedir.

Gelişen ülkelerde mikotoksin izleme programı sıklıkla ithalat ürünleri üzerine odaklanmış ve sınırlandırılmıştır. Ancak az gelişmiş ülkelerdeki popülasyonun mısır ve diğer tahıl tohumlarındaki zearalenona maruz kaldığı düşünülmektedir (Desjardins 2006; Tunail 2000).

Zearalenon kontaminasyonunda ana kaynaklar arasında yer alan tahıllar ve bu tahıllarda meydana getirilen pek çok tipteki gıda ürünü için Türk Gıda Kodeksi tarafından maksimum sınır değerler belirlenmiştir ve bu sınırlar Çizelge 1.7'de belirtilmiştir.

Çizelge 1.7. Zearalenon Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri

(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

<u>Gıda Maddesi</u>	<u>Maksimum limit</u> <u>(µg/kg)</u>
ZEARALENON	
İşlenmemiş tahıllar (mısır hariç)	100
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	350
Doğrudan tüketime sunulan tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl unları, kepek (son ürün olarak) ve embriyo	75
Rafine mısır yağı	400
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar (mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç)	50

Çizelge 1.7. (Devam) Zearalenon Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerleri
(<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>)

Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar	100
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	20
500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelletler (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	200
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	300

1.3.5.2. Zearalenonun Biyosentez Mekanizması

Zearalenon birbirini izleyen karbon atomlarındaki $[1-^{13}\text{C}]$ asetat ve $[2-^{13}\text{C}]$ asetatın birleşmesiyle oluşan asetattan köken alan nonaketidlerdir. *F.graminearum*'un genom sekansının kullanıma açılması 15 poliketit sentaz geninin identifikasyonu ile takip edilmiştir. Gen dağılım analiziyle, iki ardışık poliketit sentazın zearalenon biyosentezi için gerekli olduğu bulunmuştur (Desjardins 2006).

1.3.5.3. Zearalenon Etki Mekanizması

Zearalenonların steroidal hormonların aktivitesini etkileyerek hayvanlardaki üreme sistemleri üzerini etkiledikleri gözlemlenmiştir. İlk çalışmalarda, zearalenon ve bazı türevleri hayvan sistemlerinde yapılan bazı biyolojik deneylerde östrojenik ve anabolik etkiler meydana getirmiştir. Bu ilk çalışmaların bazıları zearalenonların steroidal olmayan yapılarına rağmen steroidal hormonlardaki özelliklerde 17 β -östradiol benzeri yapılarındaki hedef bölgelerle etkileşim kurduklarını göstermiştir. Zearalenonlar çeşitli hayvan hücrelerindeki ve hücrece serbest sistemlerdeki östrojen reseptörlerine bağlanırlar, fakat bu bağlanma endojen substrat 17 β -östradiolünkünden 10 kat ile 100 kat daha

az aktivitelidir. İlaveten, zearalenon östrojenik aktivite konusunda 17β -östrodiol'den 1000 kat daha az etkilidir. Ayrıca C-12 keto grupta ya da C-7-C-8 vinil grupta redüksiyon sonucu oluşan zearalenon türevleri biyolojik çalışmalarda zearalenondan daha aktiftirler (Desjardins 2006).

Endokrinoloji alanındaki son çalışmalar insan ve diğer memelilerde östrojen reseptörü α ve östrojen reseptörü β olarak adlandırılan ve birbirine çok benzer olan iki reseptör bölge belirlemiştir. Saflaştırılmış rekombinant insan reseptör proteinleri ile in vitro koşullarda gerçekleştirilen deneylerde zearalenon her iki östrojen reseptörüne yüksek bağlanma eğilimi göstermiştir. Ayrıca bu çalışma transfekte edilmiş insan embriyonal böbrek hücrelerinde hem östrojen reseptör α 'nın hem de β 'nın transkripsiyonal aktivitesinin zearalenon tarafından stimüle edildiği gösterilmiştir. Östrojenik aktivite üzerine gerçekleştirilen bu deneyde, zearalenon insan diyetinde yaygın bir şekilde kullanılan birkaç fitoöstrojenik izoflavonoitten daha fazla aktivite göstermiştir. Zearalenon çok geniş biyolojik etkiye sahip olmasına rağmen pek çok yazar ana etki bölgesinin östrojen reseptörleri olduğu konusunda hem fikirdir. Son çalışmalar östrojenin sadece bayan ve erkeklerin çeşitli doku gelişim ve fonksiyonunu etkilemekle kalmayıp, kemik, merkezi sinir sistemi ve kardiovaskular sistem gibi diğer sistemleri de etkilediğini göstermektedir. Bu nedenle ilave çalışmalar zearalenonun insan ve diğer hayvanların üreme sistemleri dışındaki diğer sistemleri nasıl etkilediği aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Desjardins 2006).

Zearalenonun nispeten düşük akut toksisitesinin yanında çoğu hayvan türünde belirgin östrojenik ve anabolik etkileri vardır. Zearalenona uzun süreli maruziyet vulvovajinit ile sonuçlanır. Vulvovajinite ilaveten, domuzlarda yapılan deneylerde kontamine mısır alımı; düşük infertilizasyonu hipertrofi ile sonuçlanmıştır. Erkek domuzlarda ise üreme organları ile ilgili herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Çeşitli ülkelerde zearalenonun tolerans sınır değeri 30-1000 $\mu\text{g/kg}$ arasında değişmektedir (Girgin ve ark. 2001).

1.4. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksin oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunmakla beraber bunların başında çevresel faktörler gelir. Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği, atmosfer bağıl neminden etkilendiğinden sıcaklıkla birlikte bağıl nem öncelikle küf sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini ardından da toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Tarım ürününün veya gıdanın çeşidi, kimyasal kompozisyonu, ürünün yetiştirildiği klima zone, ürünün olgunluk durumu, hasat, işlemler, depolama bulaşan küflerin spektrumuna etki eden diğer faktörlerdir. Her şeyden önce tarımsal ürünün veya gıdanın küf spektrumunda bulunan küflerin potansiyel mikotoksin üreticisi olup olmadıkları önem taşır. Kontamine küfler mikotoksin üreticisi olsalar bile toksinin sentezlenmesine; ürünün nem içeriği, sıcaklık, işleme ve depolamada havanın bağıl nemi etkindir. Ayrıca atmosferik oksijen, diğer modifiye atmosfer gazları, ışık, süre, pH gibi faktörlerin de etkisi vardır (Tunail 2000).

A. flavus'un et ürünlerinde çok az, buna karşılık su içeriği çok daha düşük olan tahıllarda sıklıkla ve daha fazla aflatoksin oluşturması veya tahıllar içinde mısırın OTA ile kontaminasyona en fazla eğilimli ürün olması hem gıdanın kompozisyonu hem de çevresel faktörlerle açıklanabilecek bir durumdur.

Küflerin gıda maddeleri üzerinde gelişebilmeleri ve toksin oluşturmaları atmosferin bağıl nem oranı arttıkça kolaylaşır. Bir başka ifade ile küflerin gıdalarda gelişme ve toksin oluşturmaları gıdanın düşük su aktivitesi (AS) değeri ile sınırlandırılabilir veya engellenebilir. Küfler bakterilerle kıyaslandıklarında daha düşük bağıl nemde gelişebilirler. Optimum gelişmeleri için minimum AS: 0,97 – 0,99 değerlerini talep etmelerine karşın minimum AS: 0,80 – 0,85 değerlerinde de rahatlıkla çimlenebilir ve gelişebilirler. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium*' un minimum AS değerleri karşılaştırıldığında *Penicillium* ve *Fusarium*'ların daha yüksek minimum AS değerleri istedikleri, mikotoksin üreticisi bazı önemli *Aspergillus* türlerinin minimum AS: 0,80 değerlerinin altında, minimum AS: 0,70 – 0,71 değerlerinde bile gelişebildikleri görülmüştür (Tunail 2000).

Küfler genellikle geniş sıcaklık aralığında gelişirler. Mikotoksinlerin yüksek düzeyde sentezlenmeleri, küflerin optimum gelişme sıcaklıklarında veya biraz daha altında gerçekleşir. Aflatoksin üreten küfler minimum 6–8 °C’ lerde maksimum 50–60 °C’ lerde üreyebildikleri halde toksin oluşumu için minimum 10–13 °C ve maksimum 42 °C sıcaklık isterler. Bunların optimum gelişmeleri 35–38 °C olduğu halde maksimum toksin konsantrasyonuna 25–30 °C lerde ulaşılır. *Penicillium* ve *Fusarium*’ ların düşük sıcaklıklarda (< 5 °C) gelişebilmelerine karşılık *Aspergillus* türleri bu sıcaklıklarda üreyemez ve toksin oluşturamaz. İçlerinden sadece *A. ochraceus* diğer *Aspergillus* türlerine oranla daha düşük sıcaklık derecelerinde OTA sentezleyebilir (Tunail 2000).

Mikotoksin oluşumuna pH’ nın, atmosferdeki oksijenin, ışığın ve CO₂’ in etkileri laboratuvar denemeleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu araştırmalar aflatoksin ve patulin üzerine yoğunlaşmıştır. Küflerin gelişebilmek için daha fazla asit ortamları tercih ettikleri, bununla beraber pH 1,5 – 8,5 arasında gelişebildikleri bilinmektedir. Aflatoksin üreticileri pH 2,5 – 6,0 arasında toksin oluştururlar, ancak yüksek miktardaki üretimi pH 5,0’ den başlayarak daha yüksek pH’ larda gerçekleştirirler. Hypomycetes sınıfında bazı küflerin atmosfer oksijeni azaldığında üremelerinin yavaşladığı ancak durmadığı görülür. Enerjilerini oksidatif fosforilasyon ile sağlayan bu küfler, oksijen yokluğunda veya azalmasında alkol fermentasyonunu alternatif yol olarak kullanabildiklerinden gelişmelerini sürdürebilirler.

Laboratuvarlarda *A. flavus*’ un besiyeri üzerinde gelişmesi ve toksin oluşturması üzerine ışığın etkisinin araştırıldığı denemelerde, aflatoksinin karanlıkta daha fazla sentezlendiği bulunmuştur. Soğuk hava depolarında % 20–40 CO₂ içeren atmosfer, depolanan meyvelerde küf gelişimine ve patulin oluşumuna imkân vermez. *A. flavus* ile yürütülen bir çalışmada; % 99 bağıl nem, 30 °C sıcaklık ve % 20 CO₂ ortamında, küfün bol misel geliştirmesine karşılık, aflatoksin üretiminde önemli ölçüde azalma sağlanmıştır. CO₂ miktarı % 80’ lere çıkarılsa bile misel oluşumunun engellenemediği ancak aflatoksin oluşumunun daha da azaldığı belirlenmiştir (Tunail 2000).

1.5. Mikotoksinleri Belirleme Yöntemleri

1.5.1. Kültürel Yöntemler

Aflatoksinler, sitrinin, kojik asit, mikofenolik asit, 3-nitropropionik asit, okratoksinler, patulin, penisilik asit, PR-toksin, T-2 toksin ve zearalenon gibi ekstrasellüler mikotoksinlerin belirlenmesi için kültürel yöntemler kullanılabilmektedir (Filtenborg ve ark. 1983). Kültürel yöntemler; ucuz olması, büyük bir cihaz gerektirmemesi, teknik beceri seviyesi gelişmiş ve gelişen ülkeler için uygun olması gibi bazı avantajlara sahiptir (Abbas ve ark. 2004). Ancak roquefortin C, penitrem A, sterigmatosistin ve diğer hücre içi mikotoksinlerin belirlenebilmesinin mümkün olmaması (Filtenborg ve ark. 1983), mikotoksin tipinin ayırt edilememesi, miktarının belirlenememesi, analitik yöntemlere göre düşük hassasiyete sahip olması gibi bazı dezavantajlara da sahiptir.

Mikotoksijenik küflerin belirlenmesi için kullanılan kültürel yöntemler; 1) β -siklodekstrin gibi bazı maddeler ile ortamın zenginleştirilmesine dayalı mavi floresan yöntemi (FL), 2) Koloni alt kısmında sarı pigmentin belirlenmesi ve 3) Kültürün amonyum hidroksit buharı ile muamele edilmesi sonrası sarı pigmentin erik kırmızısına dönüşmesinin belirlenmesidir.

1) Mavi Floresan Yöntemi: Mikotoksinlerin mavi fluorsan özelliği, uygun ortamlarda geliştirilen kültürlerin mikotoksin üretme yeteneklerini belirleme yönünde kullanılmaktadır. Bu amaçla; patates dekstroza agar ve coconut (Hindistan cevizi) agar gibi katı ortamlar kullanılabildiği gibi siklodekstrin ve iyodin gibi çeşitli floresan uyarıcılar ile zenginleştirilmiş katı ortamlar, mısır likörünün ilave edilmesi ile czapeks agarın modifiye edilmesi sonucu elde edilen aflatoksin üretme yeteneği ortamı (APA) kullanılabilmektedir. Ancak katı ortamda üretilmiş olan mikotoksinin gözlemlenmesi oldukça basittir. Gelişme süresinin sonrasında uzun dalga boylu UV ışığı altında mavi floresan gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmektedir (Arseculeratne ve ark. 1969; Filtenborg ve ark. 1983; Dyer ve McCammon 1994; Heenan ve ark. 1998; Abbas ve ark. 2004).

2) Sarı Pigment Belirleme: Kültürel ortamda sarıdan turuncuya kadar değişen koloni arka yüzeyinin oluşması mikotoksijenik küflerin ayrımında kullanılmaktadır. Kültür gelişimi esnasında kültür merkezinde başlayan parlak sarı rengin mikotoksijenik küflerde daha yoğun olduğu belirlenmiştir ve mikotoksijenik küflerin ayrımında kullanılmıştır. Ancak tüm ortamlarda mikotoksin ve mikotoksijenik küflerin ayrımında geçerli bulunmamıştır (Abbas ve ark. 2004). Fakat diğer bir ortam olan *Aspergillus flavus parasiticus* agar (AFPA) kültür gelişimi ile oluşan turuncu renkli koloni arka yüzeyinin oluşması ile aflatoksijenik küflerin ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (Dyer ve McCammon 1994; Samson ve ark. 2010).

3)

4) Amonyum Hidroksit Buharı ile Muamele: Bu yöntemde incelenen küf patates dekstrozu agar gibi bir ortamda petrinin ortasında tek bir koloni olarak geliştirilir. Petri ters olarak tutularak petri kapağına 1–2 damla konsantre amonyum hidroksit solüsyonu damlatılır. Aflatoksin üreten kolonilerinin alt yüzü hızlı bir şekilde erik kırmızısına dönüşür. Kolonilerde renk değişimi YES ve coconut agar (CCA) gibi zenginleştirilmiş ortamlar kullanıldığında daha kuvvetli ve belirgin olmaktadır (Abbas ve ark. 2004).

1.5.2. Analitik Yöntemler

Mikotoksinlerin canlılar üzerinde alındıkları dozlara ve kişisel dirence bağlı olarak ölümle sonuçlanan akut etkileri olabileceği gibi kanserojen, teratojen, tremorgen, hemoraljik, dermatitik, hepatotoksik, nefrotoksik ve nörotoksik etkilerinden de söz edilmektedir. Mikotoksinler sahip oldukları etkileri oldukça düşük dozlarda gösterebilmekte ve bu miktarda olan kontaminasyon seviyelerinin tespiti, çok duyarlı ve kesin sonuçlar veren yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla değişik gıda maddelerinden mikotoksinlerin ayırımı ve teşhisi için birçok farklı yöntem geliştirilmiştir (Var ve ark. 2004).

Mikotoksinlerin analizinde, ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography / İTK), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High-Performance Liquid Chromatography / HPLC), gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (Gas

Chromatography–Mass Spectrometry / GC/MS), enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / ELISA) ve enzim aktivitesine bağlı immunoteknik (Enzyme Multiplied Immunoassay/EMIT) uzun zamandır kullanılmaktadır. Ancak bunların dışında floresan polarizasyon immuno yöntemi (Flouresans Polarization Immunoassay / FPIA) de mikotoksinlerin ölçümünde deneme aşamasındadır ve kullanılabileceği yönünde olumlu sonuçlar alınmıştır (Oruç 2005).

Analizi yapılacak olan mikotoksinlerin öncelikle örneklenmesi, ekstraksiyonu ve ekstraktın temizlenmesi, yoğunlaştırılması sonrasında da kromatografik ayırım, kalitatif ve kantitatif tayininin yapılması mikotoksinlerin analizlerinde izlenen temel bir yoldur.

1.5.2.1. Örneklemeye

Alınacak örneklerin alındığı kitleyi temsil edebilecek durumda olması gerekmektedir (Var ve ark. 2004). Örnek değişkenliğini etkileyen iki önemli değişken vardır. Bunlardan birincisi; örnek seçim prosedürü, ikincisi ise parti içerisindeki kontamine olmuş partiküller içindeki dağılımdır. Genellikle uygun örneklem ekipmanının ve yönteminin kullanılmasıyla örnek seçimi üzerindeki etki en aza indirilebilir. Kontamine olmuş partiküllerdeki dağılımdan kaynaklanan sorun ise örnek hacminin arttırılması ile sağlanabilir (Whitaker, 2001).

1.5.2.2. Ekstraksiyon ve Ekstrenin Temizlenmesi

Ekstraksiyondaki amaç mikotoksinin kullandığımız solventle karşı karşıya gelmesi ve bu maddelerin moleküler düzeyde çarpışmasının sağlanmasıdır. Kullanılan solventin seçiminde ise analizi yapacak mikotoksinin polarlık derecesi gözönünde tutulur. Ekstraksiyon işleminde dikkat edilecek diğer bir konu da, ekstraksiyonda kullanılan solventle birlikte su ilave edilmesidir. Bunun nedeni, suyun gıda maddesinin içine penetre olma özelliğinden kaynaklanmaktadır.

Böylece su ile birlikte solventin ürün içine girmesi sağlanmaktadır. Örneğin, aflatoksin analizlerinde başlıca 3 ekstraksiyon kullanılmaktadır. Bunlar:

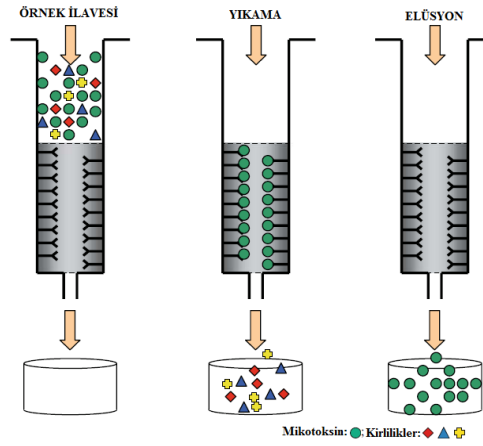
1. Kloroform-su ekstraksiyonu
2. Metanol-su ekstraksiyonu
3. Asetonitril-su ekstraksiyonu

Ekstrakte üründe aflatoksinin yanı sıra protein, lipit, renk maddeleri gibi analiz sonucunu etkileyebilecek kirlilik maddeleri de bulunmaktadır. Amaç bu kirlilik maddelerini ortamdan uzaklaştırmak, toksinin ise fazda kalmasını sağlamaktır.

Örneklerden mikotoksinlerin ayrıştırılması amacıyla başlıca 3 farklı ekstraksiyon ve ekstre temizleme yöntemi uygulanmaktadır. Bunlar; CB (AOAC metod I), BF (AOAC yöntem II) ve AOAC resmi yöntemidir (Var ve ark. 2004). Elde edilen ekstrede istenmeyen ürünlerin uzaklaştırılması ve ekstrenin temizlenmesi için iki temizleme yöntemi kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi; immuno aktif kolonlarda, ikincisi ise, katı faz ekstraksiyon kolonu temizleme sistemi ile yapılmaktadır (Zheng ve ark. 2006). Son yıllarda özellikle HPLC kullanımında ekstraksiyon immuno aktif kolonlarda yapılmaya başlanmıştır. Bu ekstraksiyon yöntemi İTK için de önerilmiştir.

İmmuno Aktif Kolonlarda Temizleme (İAK)

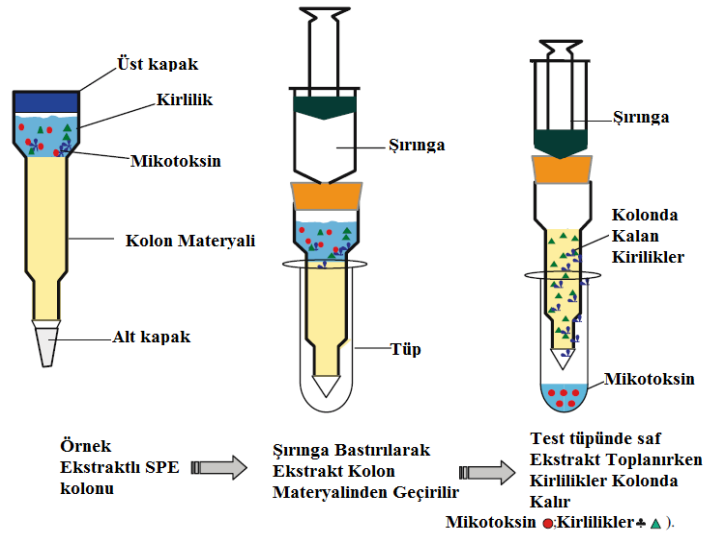
İAK mikotoksin analizlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İAK katı destek üzerine immobilize edilmiş olan anti-mikotoksin antikoru içerir. Örnek ekstraktı belirli mikotoksinler için spesifik antikorları içeren İAK'na uygulanır. Bu aşamada mikotoksin antikorlara tutunur ve sonrasında su geçirilerek mikotoksin dışındaki diğer kirlilikler kolondan uzaklaştırılır. Daha sonra söz konusu toksin için uygun çözücü geçirilerek antikorlara bağlı olan mikotoksin kazanılır (Şekil 1.17) (Zheng ve ark. 2006).



Şekil 1.17. İAK prensibi (Zheng ve ark. 2006)

Katı-Faz Ekstraksiyon (SPE)

SPE yöntemi oldukça hızlı ve ekonomik bir yöntemdir. En yaygın kullanılan kolon materyali silika jel, C₁₈ bağlı silika jel, florisil ya da iyon değiştirme reçineleridir. Örneğin uygulanması ile SPE materyali analizati adsorbe eder, sonrasında elüsyon işlemi uygulanır. Bu işlemde mikotoksin elüe edilirken, mikotoksin dışında kalan kirlilikler kolon materyalinde kalır (Şekil 1.18) (Zheng ve ark. 2006).



Şekil 1.18. SPE kolonunun prensibi (Zheng ve ark. 2006)

1.5.2.3. İnce Tabaka Kromatografi (İTK)

Mikotoksin analizlerinde sabit faz olarak silika jel, hareketli faz olarak ise çeşitli çözücü karışımları kullanılabilir. Sabit faz olan silika jel polar özellikte, hareketli faz ise daha az polar özelliktedir. Hareketli faz sabit faz üzerinde belirli bir hızla hareket ederken polaritesi düşük olan moleküller hareketli faz ile daha hızlı taşınırken, polaritesi yüksek olan moleküller silika jele daha sıkı tutulduğundan yavaş taşınırlar. Örnek ekstraktlarının ve standartların, plakaya azaltılmış ışık altında ve mümkün olduğu kadar çabuk bir şekilde spotlanması gerekmektedir (Var ve ark. 2004). İTK yöntemi fizikokimyasal analizlerde yaygın olarak tercih edilmektedir. Çünkü her bir örnekte birden fazla mikotoksin bulunabilir ve bunlar İTK yöntemi ile belirlenebilir. Temel prensip her bir bileşiğin belirli organik çözücüde göç etme hızlarının farkına dayalı olarak göç faktörlerinin (R_f) belirlenmesi ve ilgili saf standartlar ile kıyaslanmasına dayanmaktadır. Ancak bu yöntemde dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta ise kimyasal olarak farklı maddelerin birbiri ile benzer R_f değerlerine sahip olabileceğidir (Muro-Cacho 2004; Turner ve ark. 2009).

1.5.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC)

HPLC, mikotoksinler ve mikotoksinler gibi düşük molekül ağırlıklarına sahip diğer bileşiklerin analizinde son yıllarda üzerinde en çok çalışılan cihazlarından birisidir (Var ve ark. 2004). HPLC’de hareketli faz sıvı (asetonitril, metanol, etanol, tetrahidrofuran, etil asetat, su gibi çözücüler) ve sabit faz çok küçük katı parçacıklardan (kolonun dolgu maddeleri olan silisyum dioksit, alüminyum oksit, gözenekli polimer ve iyon değiştirici reçineler gibi) oluşmaktadır. HPLC ile mikotoksin analizinde bilinmesi gereken en önemli faktörlerden biri, hangi mikotoksinin hangi dedektörle aranacağını bilmesidir. Örneğin aflatoksinler (AFM1 dahil), fumonisinler ve OTA analizlerinde floresans dedektör; trikotesenlerin analizinde UV veya DAD dedektörü kullanılmalıdır. Ayrıca mikotoksinler kütle dedektörü (MS/Mass Specrometer) ile de LC-MS veya

LC-MS/MS sistemi şeklinde analizi yapılır. Ancak kütle dedektörleri diğer dedektörlerden daha pahalıdır. Aflatoksin, fumonisin, okratoksin analizinde temelde C₁₈ kolonları ve mikotoksinlerin ekstraksiyon aşamasında toksinlerin daha konsantre ve saf olarak elde edilebilmesi için genellikle İAK kullanılmalıdır (Oruç 2005; Turner ve ark. 2009).

1.5.2.5. Gaz Kromatografi (GC)

Gaz kromatografide (GC), hareketli faz hidrojen, azot ve helyum gibi gazlardan oluşur. Sabit faz sıvı veya katı olabilir ve çok küçük katı parçacıklardan (kolonun dolgu maddeleri olan silisyum dioksit, alüminyum oksit, gözenekli polimer ve iyon değiştirici reçineler gibi) oluşmaktadır. İki tür gaz kromatografisi vardır: Gaz katı kromatografisi (GSC) ve gaz-sıvı kromatografisi (GLC). Gaz-sıvı kromatografisi daha fazla kullanım alanı bulmuş ve prensip olarak analitin gaz halindeki hareketli faz ile bir katının yüzeyine tutturulmuş durgun sıvı faz arasında dağılımı üzerine kurulmuştur. Numune (analit) kromatografik kolonun girişine enjekte edilir ve buharlaştırılır. İnert bir hareketli gaz fazı ile elüsyon yapılır. Diğer kromatografik yöntemlerin aksine gaz faz analitin molekülleri ile etkileşmez; gazın tek işlevi, analiti kolon boyunca taşımaktır. Mikotoksinlerin analizinde GC'ye kütle spektrometre (MS) dedektörü bağlanarak mikotoksinler atomlarına kadar parçalanabilmekte ve böylece ölçümleri yapılabilmektedir. Ancak mikotoksinlerin analizi GC/MS ile yapılabilmekle birlikte diğer sistemler daha pratik olduğundan GC/MS pek tercih edilmemektedir (Oruç 2005; Turner ve ark. 2009).

1.5.2.6. Kapiler Elektroforez (CE)

Birbiri ile yakın ilişkili toksinlerin ayrımında kullanılan hassas bir yöntemdir. Bileşiklerin etkin ayrımı; elektriksel yük ve kütlelerine bağlı olarak elektriksel bir akım alanında göç etme farklılıklarına göre gerçekleşmektedir. Hızlı ayırım, organik çözücü olmaksızın sıvı tampon ortamında

gerçekleştirilmektedir. CE sisteminin floresan dedektör ile birlikte kullanımı, mikotoksinlerin belirlenmesi ve ölçümünde etkin bir sonuç oluşturmaktadır (Maragos ve Greer 1997; Pena ve ark. 2002; Turner ve ark. 2009).

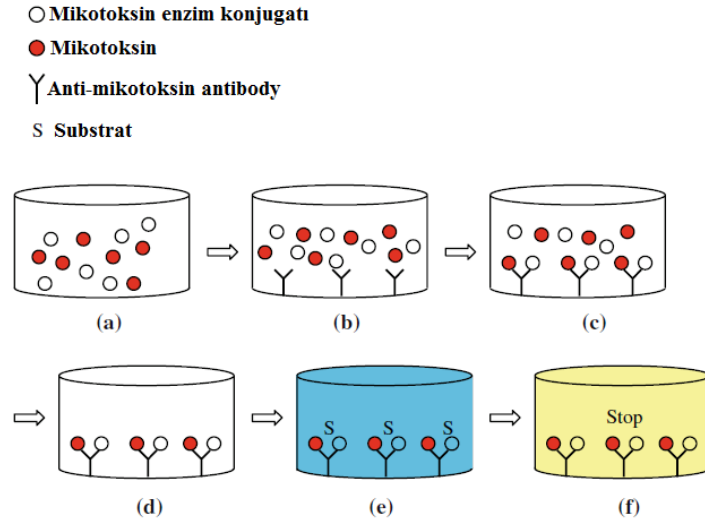
1.5.2.7. Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant Yöntemi (ELISA)

ELISA yöntemi 10 yıldan fazla süredir mikotoksin analizinde kullanılmaktadır. Spesifik antikorların spesifik mikotoksinlerin üç boyutlu yapısı ile bağlanma yeteneğine sahiptir (Zheng ve ark. 2006). Önemli olan bir nokta ise; mikotoksinlerin antijenik özellik göstermemesidir. Mikotoksinlerin antijenik özellik göstermeleri için bir protein veya polipeptid zincirine bağlanmaları gerekir. Mikotoksinlerin antijenik özellik göstermeleri için protein olarak genellikle serum albumini, gamma globulin ve polyisine kullanılmaktadır. Okratoksin, patulin ve penisillik asit gibi reaktif gruplara sahip mikotoksinler direk bağlanma reaksiyonları gösterirler. Buna karşın aflatoksin ve trikotesenleri kapsayan birçok toksin ise reaktif gruplara sahip değildirler ve bu nedenle reaktif karboksil veya başka bir grubun öncelikle toksin molekülüne bağlanması gerekmektedir (Var ve ark. 2004). Genellikle katı yüzeylere bağlanmış az miktarda antikor (antibadi) ile örneklerde bulunan toksin ve toksin ile işaretlenmiş enzimlerin bağlanma mücadelesini temel almaktadır. Yapılan yıkama sonrası bağlanmamış enzimler ayrılmakta, kullanılan belirli substrat ile meydana gelen renkli madde miktarı ile toksin miktarı ters orantılı olarak bulunan toksin miktarının hesaplanmasını sağlamaktadır (Oruç 2005).

1.5.2.8. Diğer Analiz Yöntemleri

Yaygın olarak kullanılan kromatografik ve immünolojik yöntemlere ilaveten sürekli gelişen ve yenilenen teknoloji ile mikotoksin analiz yöntemlerine yeni ve hızlı teknikler eklenmektedir. Bunlar arasında; membran esaslı immünoassay, florometrik analiz, floresan polarizasyonu, dalga boyu kaybı

teknolojisi, moleküler dalgalı polimerler, mikroarray teknolojisi, luminex xMAP teknolojisi, biyosensörler bulunmaktadır (Zheng ve ark. 2006).



Şekil 1.19. Mikotoksin analizinde ELISA prensibi **a)** Konjugat ile örnek karıştırılır, **b)** Karıştırılmış içerik antibody ile kaplanmış kuyucuklara aktarılır, **c)** Mikotoksin – antikor bağlanması için 1 saat inkübasyon uygulanır, **d)** Bağlanmamış olan içerik yıkama işlemi ile uzaklaştırılır, **e)** Renk oluşumu için substrat ilave edilir, **f)** Reaksiyon stop solüsyonu ile durdurulur (Zheng ve ark. 2006).

1.6. Gıda Kaynaklı Küflerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

1.6.1. Gıda Kaynaklı Küflerin İzolasyonu

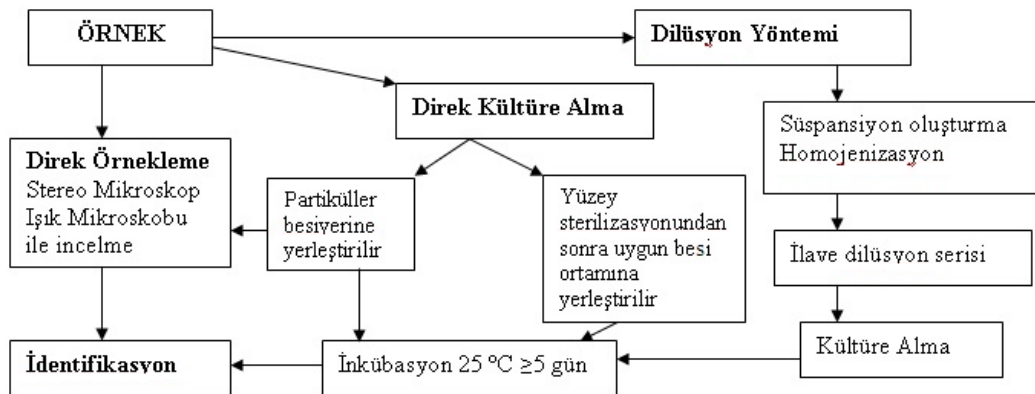
Genelde gıdalardaki mikolojik içeriğin örneklenmesi yöntemleri bakteriyolojik ortamların modifikasyonuna ya da doğrudan mikolojik ortamların kullanılmasına dayanmaktadır. Ancak, bakteriler ve insan patojeni küfler yüksek su aktiviteli ortamlarda, yüksek sıcaklıklarda ve düşük karbonhidrat kaynağında gelişebilirken bunun tam aksine gıda kaynaklı küfler tipik saprofitlerdir, düşük su aktivitesinde, düşük sıcaklıklarda ve kompleks karbonhidrat içeriğine sahip substratlarda gelişim göstermektedir. Gıda örneğindeki küflerin belirlenebilmesi için; direk örnekleme, doğrudan uygun besi ortamına inokülasyon ve dilüsyon

işlemi uyguladıktan sonra uygun besi ortamına inokülasyon olmak üzere 3 farklı yöntem ile gerçekleştirilebilir.

Direk örnekleme yöntemi fungal gelişimin çıplak gözle veya stereo mikroskop ile incelenmesi mümkün olan örnekler için kullanılabilir. Makroskobik incelemeye ilaveten ilgili örnekten preparat hazırlama veya selotap yöntemi ile örneğin mikroskobik incelenmesi ve identifikasyon çalışması gerçekleştirilebilir (Şekil 1.20).

Diğer bir yöntem olan direk inokülasyon ise tüm örneklerin mikolojik incelemesinde kullanılan etkin bir yöntemdir. Bu yöntemde tahıllar ve yer fıstığı gibi örnekler bir bütün halinde besiyeri yüzeyine yerleştirilirken, meyve ve sebze gibi gıdalar parçalandıktan sonra besiyerine uygulanırlar. Bu yöntem yüzeyi kontamine olmuş ve olmamış olan gıdalar için kullanılabilir. Ancak yüzeyi kontamine olmuş bir gıda kullanılacak ise örneğin yüzeyinin yıkanması ve yüzey dezenfeksiyonunun gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Şekil 1.20).

Dilüsyon işleminin kullanıldığı yöntemde ise örneğin küf içeriğinin doğru bir şekilde yansıtılabilmesi için mümkün olduğunca büyük hacimlerde örnek kullanılması oldukça önemlidir. Genellikle başlangıç dilüsyonu olarak örneğin 10 kat dilüe edilmesi kullanılmaktadır. Bu aşamada örneğin uygun boyutlara parçalanması ve homojen olarak karışmasının sağlanması önemlidir. Ancak toz halindeki örneklerin homojenize edilmesi yeterlidir. Homojen olarak elde edilen örnekler 10 veya 5 katı dilüsyon ile bir seri halinde dilüe edilir ve kültür ortamına aktarılır (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Gıda kaynaklı fungusların izolasyonu için kullanılan yöntemler (Samson ve ark. 2010)

Kültüre dayalı yöntemlerde temelde 25 °C’de 5 günlük inkübasyon süresi takip edilmektedir. Ayrıca kültüre alma aşamasında besi ortamı seçimi aranan mikobiyota ve incelenen örnek ile ilişkili olarak belirlenmelidir (Çizelge 1.8) (Samson ve ark. 2010).

Çizelge 1.8. Farklı tiplerdeki gıda ürünlerinde bulunan fungusların izolasyonu için kullanılan yöntem ve besi ortamları (Samson ve ark. 2010)

Ürün tipi	Yöntem	Besi yeri*
Fasulye&Bakliyat	Direk inokülasyon	AFPA, CZID, DG18, V8
Ekmek&Çavdar	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	ADYS, MEA, DG18
Ekmek&Buğday	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	DG18, M20
Kakao&Kahve	Direk inokülasyon	AFPA, DG18, MEA
Tahıl, muhafaza edilmiş	Direk inokülasyon	ADYS, DG18, MEA
Tahıl, stoklanmış	Direk inokülasyon	DYSG, MEA
	Yüzey yıkama→Dilüsyon plate	DYSG, MEA
	Yüzey dezenfeksiyonu→Direk inokülasyon	DG18, CZID, V8
Un	Direk inokülasyon	DG18, MEA
	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	DG18, MEA
Kurutulmuş meyve	Direk inokülasyon	DG18, M20, M40 (MY50G)
Taze meyve	Yüzey yıkama→Dilüsyon plate	DRYES, MEA
	Yüzey dezenfeksiyonu→Direk inokülasyon	CZID, V8
Otlar&Baharatlar	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	DG18, MEA
Düşük su aktiviteli ürünler	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	DG18, M20, M40 MY50G
Et ve günlük ürünler	Direk inokülasyon	CREAD, MEA, DG18
	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	CREAD, MEA, DG18
Ceviz	Direk inokülasyon	DRYES, MEA
	Yüzey dezenfeksiyonu→Direk inokülasyon	CZID, V8
Yağ ürünleri	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	CREAD, MEA, DG18
Pastörize ürünler	Homojenizasyon→Dilüsyon plate	MEA, OA 30 °C’de
Tohum	Direk inokülasyon	DRYES, MEA
	Yüzey dezenfeksiyonu→Direk inokülasyon	CZID, V8
Yumru kök	Yüzey yıkama→Dilüsyon plate	DRYES, CZID, V8
	Yüzey dezenfeksiyonu→Direk inokülasyon	DRYES, CZID, V8
Bitki	Yüzey yıkama→Dilüsyon plate	DRYES, MEA
	Yüzey dezenfeksiyonu→Direk inokülasyon	CZID, V8

*CZID; Czapek Iprodione Dikloran Agar, DG18; Dikloran % 18 Gliserol agar, V8; V8 Juice Agar, ADYS; Asetik asit Dikloran Yeast Ekstrakt Sukroz Agar, M20 (ya da M40); Malt ekstraktı; 50 g, Sukroz; 200 ya da 400 g, ZnSO₄.7H₂O; 0,01, CuSO₄.5H₂O; 0,005 g, distile su; 1000 ml, DYSG; Dikloran Yeast Ekstrakt Sukroz Gliserol Agar, CREAD; Kreatin Sukroz Dikloran Agar, OA; Oatmeal Agar

1.6.2. Gıda Kaynaklı Küflerin İdentifikasyonu

1.6.2.1. Morfolojik İdentifikasyon

Fungi alemi içinde yer alan organizmaların yaşam döngülerinde hem eşeyli hem de eşeysiz üreme safhaları yer alır. Fungusların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterler, yaşam döngülerinin eşeyli safhasında oluşturdukları bu üreme yapılarıdır. Ancak eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında oluşturulduğu için bazı fungusların eşeyli safhası ya henüz belirlenememiş ya da bazı funguslarda bu safha tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bundan dolayı günümüzde funguslar iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan, fungusların yaşam döngülerinin eşeyli safhalarında oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kriter alınarak gerçekleştirilen sınıflandırma teleomorfik sınıflandırma olarak adlandırılır. Eşeyli üreme yapıları tesbit edilemediği için, bazı funguslar tallus yapıları ve eşeysiz sporları göz önüne alınarak sınıflandırılırlar, bu sınıflandırma biçimi ise anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

Morfolojik tanılama, incelenen küf örneğinin her bir cins için özelleşmiş kültür ortamlarında (Çizelge 1.9) gelişme yeteneklerinin belirlenmesine dayanmaktadır. Bu nedenle ilgili cinsler için kullanılması gereken besi ortamlarının uygun içerikleri ile kullanılması çalışma sonuçları üzerinde doğrudan etkilidir. Bu tanılama yönteminde pek çok küf 25 °C'de 5–10 gün süre ile karanlıkta inkübe edilir. Ancak bazı küflerin özel inkübasyon koşullarına gerek duyduğu unutulmamalıdır. Örneğin; *Fusarium* tipik spor gelişimini sıra ile değiştirilen karanlık/UV ışığı evreleri sonucunda oluşturmaktadır.

Kullanılan besi ortamında gelişen küf, doğrudan ve mikroskopik inceleme ile doğrulanmalıdır. Bu aşamada misel, üreme yapısı ve sporilasyon yapısı gibi yapısal özellikler hazırlanan preparatta dikkate alınan ayırt edici noktalaradır. Mikroskopik inceleme için hazırlanan preparat pamuk mavisi veya anilin mavisi gibi boya içeren laktik asit olabileceği gibi boyasız laktik asit kullanımı da bazı yapıların aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Preparat hazırlığı esnasında özellikle

Aspergillus ve *Penicillium* gibi bol sporlu küflerin hazırlanmasında, alkol kullanımı, konidiaların hidrofobik özellikte olmalarına dayalı olarak temiz bir mikroskopik görüntü sağlamaktadır (Samson ve ark. 2010).

Çizelge 1.9. Küflerin identifikasyonunda kullanılan kültür ortamları (Samson ve ark. 2010)

Küf	Kültür Ortamı
<i>Aspergillus</i>	CYA, MEA, OA
Kserofilik türleri için	CY20, M20, M40, DG18
<i>Penicillium</i>	CYA, CREA, MEA, YES
<i>Fusarium</i>	PDA, YES, SNA* (*12 saat UV ışığı/12 saat karanlık)

Kültürel ortamda; koloni genişliği, rengi, tekstürü, arka yüzey rengi, çözünür pigment ve eksuda üretme yeteneği gibi özellikler temel olarak değerlendirilen özellikler arasında yer almaktadır.

Kültüre ait mikroskopik özelliklerde ise; konidiofor yapısı, dallanma ve konidiojen karakteri, fertil yapıların yapısı ve konidia tipi, rengi, son olarak tüm yapıların boyutu ve tekstürüdür.

Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin ortak özelliği gözlemlere dayalı olması, fazla zaman alması ve hata yapma olasılığının fazla olmasıdır. Bazı fungusların sınıflandırılmasındaki bu belirsizlik çoğu zaman aynı taksona iki farklı isim verilmesine hatta farklı organizmalara da aynı ismin verilmesine neden olabilmektedir (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

1.6.2.2. Moleküler İdentifikasyon

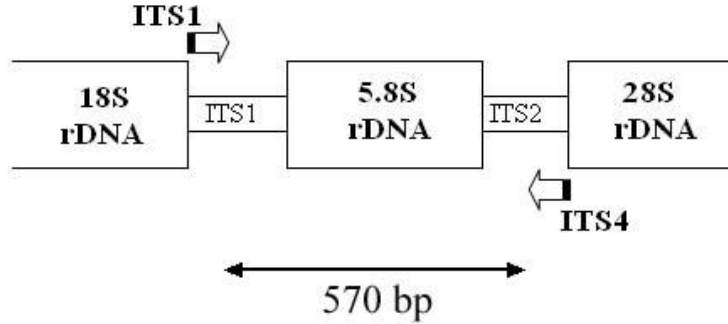
Diğer pek çok filum ve alem için olduğu gibi nüklear ribosomal operondan kaynaklanan DNA dizi verileri küflerin taksonomisi için kullanılmaktadır ve tüm organizmalarda ortak bir özellik olmasından dolayı organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNA'lar üstün moleküllerdir. rRNA eski, fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yayılış gösteren (yaygın) ve filogenetik

farklı ölçülü bir şekilde koruyabilen bir moleküldür. Ayrıca rRNA gibi büyük bir moleküldeki olasılıkların sayısı oldukça fazladır ve iki dizi arasındaki benzerlikler filogenetik bir ilişkiyi işaret etmektedir. rRNA dizi analizlerinin sonuçları ve moleküler genetik çalışmalar organizmalar arasındaki doğru evrimsel ilişkileri yansıtacak şekilde filogenetik ağaçların elde edilmesini sağlamıştır. rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizileri funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında geniş oranda kullanılmaktadır. Funguslarda çekirdek rDNA (rRNA gen kümesi) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur (Samson ve ark. 2010; Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

rRNA gen kümesi hem çekirdek hem de mitokondrilerde bulunur ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana gelir (White ve ark. 1990). Fungal çekirdek rRNA genleri her genomda birkaç yüz kopyası olan, ardışık tekrarlanan yapılar olarak düzenlenmiştir. Her bir birimde üç rRNA geni bulunmaktadır: küçük rRNA geni (18S), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S). Gen kümesinin sonunda yer alan 5S rRNA geni ise fungal taksona bağlı olarak tekrarlayan birim içinde olabilir veya olmayabilir. 5.8S rRNA geni ise funguslarda mitokondriyal genomda bulunmaz. Korunmuş diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde bulunur. LSU ve SSU genleri funguslarda birçok taksonomik çalışmada kullanılmıştır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgeleri, transkripsiyonu yapılmayan bölgeler (internal transcribed spacer-ITS) ve genler arası bölge (intergenic spacer-IGS) olarak adlandırılır. Bunlar alt birim dizilerinden daha değişkendir ve tek bir cins içindeki türler arasındaki ya da tür içi (intraspesifik) populasyonlar arasındaki çalışmalarda geniş oranda kullanılmaktadır. Funguslarda 18S rDNA bölgesi nisbeten yavaş bir şekilde evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların kıyaslanmasında kullanışlıdır. Ancak kodlanmayan bölge (ITS ve IGS) daha hızlı evrim geçirir ve bir tür içindeki suşların ya da bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılması için kullanışlıdır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri de türler arasında değişkendir. Filogenetik çalışmalarda dizi analizi için kullanışlı olduğu

ispatlanmış DNA bölgeleri; çekirdek ve mitokondrial rDNA ve protein kodlayan genlerdir (Şekil 1.21) (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).



Şekil 1.21. Ribozomal genlerin iç transkripsiyon kısımları (ITS)

Son beş yılda, intronca zengin protein kodlayan genlerin dizilenmesi filogenetik tür konseptinin oluşturulmasında oldukça öne çıkmıştır. Protein kodlayan gen olarak β -tubulin (benA) 3–6 ekzon aralığı üç cins (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) için uygulanmaktadır. *Aspergillus* ve telemorfları için ilaveten kullanılan diğer bir protein kodlayan bölge ise calmodilindir. *Fusarium* türlerinin identifikasyonunda da diğer bir gen olarak uzama faktörü 1-alfa (TEF1 α)’ya dikkat çekmektedir (Çizelge 1.10) (Seifert ve Levesque 2004).

Çizelge 1.10. Tür identifikasyonu için önerilen gen bölgeleri ve veri tabanları

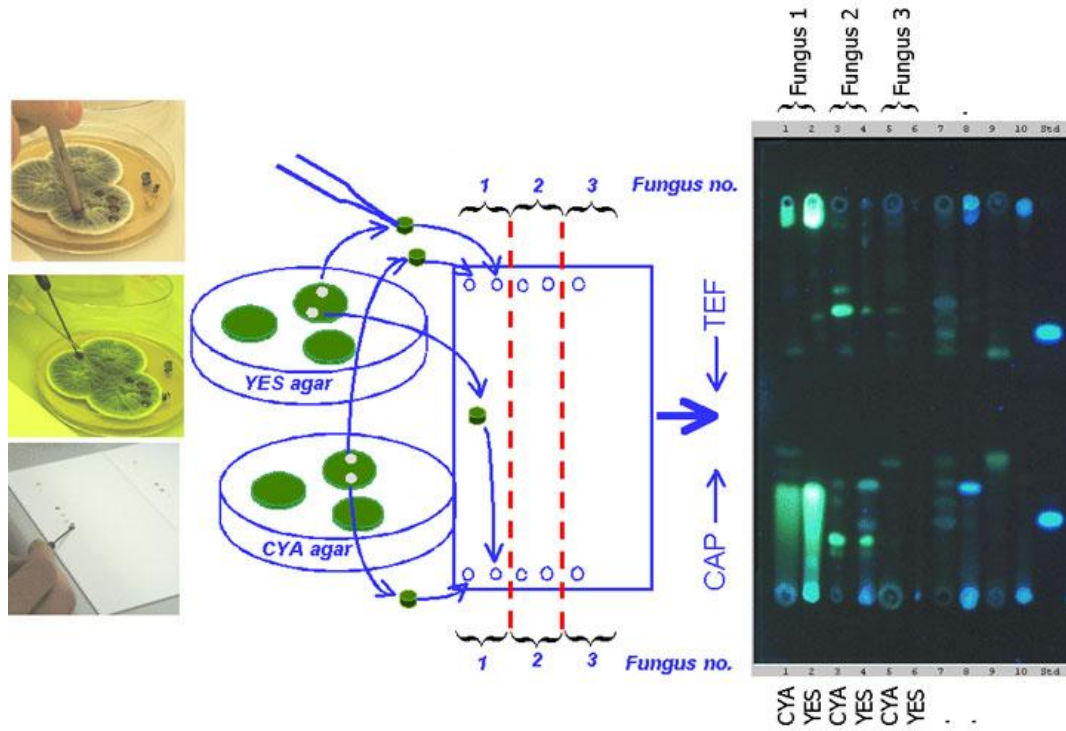
Cins	Veri tabanı	Önerilen bölge
<i>Aspergillus</i> ve telemorfları	GenBank, CBS web sayfası	Kalmodulin
<i>Penicillium</i> ve telemorfları	GenBank, CBS web sayfası	B-tubulin
<i>Fusarium</i>	FUSARIUM-ID database	TEF

1.6.2.3. Kimyasal İdentifikasyon

Morfolojik ve moleküler identifikasyonların yanı sıra, objektif ve geçerli tür identifikasyonu kemo-taksonomi olarak da bilinen sekonder metabolit

profillerinin kullanılması ile başarılabılır. Sekonder metabolit profillerinin kullanılmasındaki bir avantaj identifikasyon ile birlikte mikotoksin üretme potansiyeline sahip küflerinde tahmin edilebilmesidir. Kemo taksonomi İTK gibi kolay ve hızlı tarama imkânı veren bir yöntem ile yapılabileceği gibi HPLC gibi hassas bir analitik yöntem ile de yapılabilmektedir. Her iki yöntemde de ekstrakte edilen örnek uygun organik fazda ayrılmaktadır. Dedeksiyon ise İTK ortamında UV ışığı (254 ve 366 nm) altında, HPLC’de ise 200–600 nm arasında DAD ile yapılmaktadır (Şekil 1.22).

İTK ve HPLC analizleri için, 25 °C’de 14 gün boyunca geliştirilmiş olan kültürden gerçekleştirilmektedir. Sekonder metabolit için kullanılan en uygun ortamlar türe bağlı olmakla birlikte YES ve dikloran yeast ekstrakt sukroz agar (DRYES) gibi şeker ve yeast ekstraktı içeren ortamlardır (Samson ve ark. 2010).



Şekil 1.22. İnce tabaka kromatografisi ile sekonder metabolit analizi işlem şeması (<http://www2.biocentrum.dtu.dk/mycology/analysis/tlc/index.html>)

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Un Örnekleri

Olası mikotoksijenik küf içerikleri yönünden incelenecek olan çeşitli un örnekleri Eskişehir ilindeki farklı marketlerden tedarik edilmiştir. 12 buğday unu, 3 kepekli un, 3 mısır unu, 3 galeta unu, 1 pirinç unu, 1 soya unu, 1 glutensiz un ve 1 çavdar unu olmak üzere toplam 25 farklı un örneği alınmıştır. İncelemeye alınan un örneklerinin seçiminde yaygın olarak tüketilen ve satışa sunulan un tipleri tercih edilmiştir. İncelenen un örneklerine ait ambalaj, üretim ve son kullanma tarihi bilgileri Çizelge 2.1’de verilmiştir. Un örnekleri +4 °C’ de saklanmış ve 2 gün içinde incelemeye alınmıştır.

Çizelge 2.1. Un örneklerine ait ambalaj, üretim ve son kullanma tarihleri

Örnek Numarası	Örnek Adı	Ambalaj	Üretim Tarihi	Son Kullanma Tarihi
1	Buğday Unu	1 kg	-	18.06.09
2	Sert Buğday Unu	1 kg	-	14.07.08
3	Özel Karışımli Buğday Unu	1 kg	26.08.08	26.08.09
4	Galeta Unu	500 g	12.04.08	12.04.09
5	Pirinç Unu	250 g	30.10.07	30.10.08
6	Kepekli Un	1 kg	28.07.08	28.04.09
8	Geleneksel Buğday Unu	1 kg	-	24.07.09
9	Yulaf unu karışımli Buğday Unu	1 kg	-	06.09
10	Vitaminli ve Mineralli Buğday Unu	1 kg	18.08.08	18.08.09

Çizelge 2.1. (Devam) Un örneklerine ait ambalaj, üretim ve son kullanma tarihleri

Örnek Numarası	Örnek Adı	Ambalaj	Üretim Tarihi	Son Kullanma Tarihi
11	Galeta Unu	300 g	04.09.08	04.08.09
12	Buğday Unu	1 kg	02.07.08	02.07.09
13	Buğday Unu	1 kg	18.04.08	18.04.09
14	Buğday Unu	1 kg	17.07.08	17.07.09
15	Glutensiz Un	500 g	27.06.08	27.06.09
16	Galeta Unu	500 g	18.08.08	18.08.09
17	Kepekli Un	1 kg	-	06.08.09
18	Mısır Unu	500 g	-	07.06.09
19	Mısır Unu	500 g	-	06.02.08
20	Soya Unu	500 g	21.11.07	21.11.08
21	Buğday Unu	1 kg	18.08.08	18.08.09
22	Tam Buğday Unu	1 kg	-	03.04.09
23	Kepekli Un	1 kg	-	18.09.08
24	Buğday Unu	1 kg	-	12.06.09
25	Çavdar Unu	1 kg	-	10.09
26	Mısır Unu	1 kg	-	10.09

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.2.1. Rose Bengal Kloramfenikol Agar (RBCA) (Fluka 17211)

Mikolojik pepton	5 g
Dekstroz	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g
Rose-Bengal	0,05 g

Kloramfenikol	0,1 g
Agar	15,5 g
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Yukarıda içeriği verilen hazır RBCA litrede 32,15 g olacak şekilde tartılıp çözülünceye kadar ısıtılmış ve 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edildikten sonra küflerin izole edilmesi aşamasında kullanılmıştır.

2.1.2.2. Dikloran-Rose Bengal Agar Base (DRBCA) (Fluka 17147)

Peptic digest of animal tissue	5 g
Dekstroz	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g
Rose-Bengal	0,025 g
Dikloran	0,002 g
Agar	13 g
Distile su	1000 ml
pH	5,6

Yukarıda içeriği verilen hazır DRBCA litrede 31,5 g olacak şekilde tartılıp çözülünceye kadar ısıtılmış ve 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra 0,1 g/ml kloramfenikol besiyerine ilave edilmiştir ve bu besiyeri küflerin izole edilmesi aşamasında kullanılmıştır.

2.1.2.3. Czapek Dox Agar (CZ) (Fluka 70185)

Sukroz	30 g
Sodyum nitrat	3 g
Potasyum klorid	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7,3

Belirtilen besiyeri litrede 50 g olacak şekilde hazırlanıp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml şeklinde dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri küf izolatlarının tek spor izolasyonu için kullanılmıştır.

2.1.2.4. Malt Ekstrakt Agar (MEA)(Merck 1. 05398)

Malt ekstrakt	30 g
Pepton	3 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Yukarıda içeriği verilen hazır MEA litrede 48 g olacak şekilde tartılıp çözülünceye kadar ısıtılmış ve 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml şeklinde dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri küf izolatlarına ait tek sporların geliştirilmesi için kullanılmıştır.

Ayrıca tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanıp tüplerde yatık halde donması sağlanmıştır. Hazırlanan yatık MEA tüpleri, izolatların stoklanmasında kullanılmıştır.

2.1.2.5. Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Malt Ekstrakt (Merck)	20 g
Pepton	1 g
Glukoz	20 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml

Ortam içerikleri belirtilen miktarlarda tartılıp distile suda çözüldükten sonra 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, standart boyuttaki steril petrilere 25’ er ml olacak şekilde dağıtılmıştır (Pitt 1979; Klich 2002). Bu besiyeri *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin teşhisinde kullanılmıştır.

2.1.2.6. Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA)

KH ₂ PO ₄	1 g
Czapek Concentrate (CC) (Çözelti 1)	10 ml
Yeast autolysate veya extract	5 g
Sukroz	30 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Ortam içerikleri belirtilen miktarlarda tartılıp distile suda çözündürüldükten sonra 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, standart boyuttaki steril petrilere 25’ er ml, küçük boy (5 cm çapında) steril petrilere ise yaklaşık 10 ml olacak şekilde dağıtılmıştır

(Pitt 1979; Klich 2002). Bu besiyeri *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin teşhisinde kullanılmıştır.

2.1.2.7. % 25 Glycerol Nitrate Agar (G25N)

KH ₂ PO ₄	0,75 g
Czapek Concentrate (CC)	7,5 g
Yeast autolysate veya extract	3,7 g
Glycerol	250 g
Agar	32 g
Distile su	750 ml

Belirtilen besiyeri içeriğine göre hazırlanıp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril küçük boy (5 cm çapında) petrilere yaklaşık 10’ ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır (Pitt 1979). G25N ortamı *Penicillium* türlerinin teşhisinde kullanılmıştır.

2.1.2.8. % 20 Sukrozlu Czapek Yeast Autolysate Agar (CY20S)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek Concentrate (CC)	10 ml
Yeast autolysate veya extract	5 g
Sukroz	200 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Belirtilen besiyeri içeriğine göre hazırlanıp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir ve daha sonra steril petrilere 25’ er ml dağıtılmıştır (Klich 2002). Hazırlanan besiyeri *Aspergillus* türlerinin teşhisinde kullanılmıştır.

2.1.2.9. Czapek Dox Agar (CZ)

Czapek Concentrate (CC) (Çözelti 1)	10 ml
K ₂ HPO ₄	1 g
Sukroz	30 g
Agar	17,5 g
Distile su	1000 ml

Belirtilen besiyeri içeriğine göre hazırlanıp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml olacak şekilde dağıtılmıştır (Klich 2002). Hazırlanan besiyeri *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin teşhisinde kullanılmıştır.

2.1.2.10. Potato Dextroz Agar (PDA) (Merck 1.10130)

Patates ekstraktı	4 g
Glukoz	20 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Yukarıda içeriği belirtilen hazır PDA litreye 39 g olacak şekilde tartılıp agar çözününceye kadar ısıtılır ve 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml olacak şekilde dağıtılır. Hazırlanan besiyeri *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin dışında kalan diğer izolatların teşhisinde kullanılmıştır.

2.1.2.11. Yeast Extract Sucrose Agar (YES)

Yeast ekstrakt	20 g
Sucrose	150 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Belirtilen besiyeri içeriğine göre hazırlanıp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml olacak şekilde dağıtılmıştır (Samson ve ark. 2010). Hazırlanan besiyeri mikotoksijenik türlerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

2.1.2.12. Cocconut Agar Medium (CAM)

Hindistan cevizi	100 g
Sıcak su	300 ml

Yukarıda belirtilen içerik 5 dakika boyunca blender ile karıştırılmış ve kumaş süzektan süzölmüştür. Süzöntünün pH’ı 2 N’lik NaOH kullanılarak pH 7’ye ayarlandıktan sonra 6 g agar ilave edildikten sonra kaynatılmıştır. 50 °C’ye kadar soğutulduğunda pH’sı kontrol edildikten sonra 115 °C’de 10 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri aflatoksijenik ve okratoksijenik küflerin belirlenmesinde kullanılmıştır (Heenan ve ark. 1998).

2.1.2.13. *Aspergillus flavus/parasiticus* Agar (AFPA)

Yeast ekstraktı	20 g
Bacto pepton	10 g
Demir Amonyum Sitrat	0,5 g
Bacto Agar	20 g
Distile su	1000 ml
pH	5,0

Belirtilen besiyeri içeriğine göre hazırlanıp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm. basıncında otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml olacak şekilde dağıtılmıştır (Donner 2008). Hazırlanan besiyeri aflatoksijenik küflerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2.1.3.1. Czapek Concentrate (CC)

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05 g
Su	100 ml

Hazırlanan çözelti czapek yeast autolysate agar içeriğinde kullanılmıştır (Klich 2002).

2.1.3.2. Lacto-Cotton Blue Mounting Medium (LCB Mounting Medium)

Gliserol	250 ml
% 85’ lik Laktik asit	100 ml
Cotton blue stok	3 ml
Distile su	50 ml

Cotton blue stok çözeltisinin hazırlanışı 2 aşamada yapılmıştır:

1) kuvvetli bir şekilde karıştırılan laktik asite (99 ml % 85’ lik) cotton (Anilin) blue (1 g) kristalleri ilave edilmiştir. Daha sonra, bir Büchner porselen hunideki #50 Whatmann 90 mm filtre kağıdından (Fisher Scientific, Los Angeles, California) geçirilerek çözelti vakumla filtre edilmiştir. Çözeltiye havadan

bulaşmayı önlemek için porselen huninin üzeri kapalı halde çalışılmıştır. Filtrasyondan sonra stok boya çözeltisinin berraklığı kontrol edilmiş ve temiz bir lam üzerine bir damla stok boya solüsyonu damlatılıp lamel kapatılır ve 400X’ de incelenmiştir. Boya partikülleri yaklaşık olarak 2 µm ya da daha küçük olmasına dikkat edilmiştir. Büyük boya partikülleri görüldüğünde, uygun berraklığa kadar boya çözeltisinin tekrar filtrasyonu yapılmıştır.

2) Su, laktik asit ve gliserin karıştırıcı üzerinde bir saat boyunca karıştırılıp sonunda çözelti üzerine 3 ml cotton blue stok çözeltisi homojen olarak ilave edilerek bir saat boyunca karıştırılmıştır. Havadan herhangi bir bulaşmayı engellemek için erlen ağzı parafilm ile kapatılmıştır (Sime 2002).

2.1.3.3. Tris-acetate-EDTA (TAE) 50X

Tris Base	242 g
Glasial Asetik Asit	57,1 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	100 ml

Çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve 1:49 oranında distile su ile karıştırılarak 1X TAE olarak elektroforez işlemlerinde kullanılmıştır (Sambrook ve Russell 2001).

2.1.3.4. PBS

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,15 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Distile su	1000 ml
pH	7,2

1X konsantrasyonundaki PBS un örneklerinden okratoksin A ekstraksiyonu işleminde kullanılmıştır.

2.2. METOD

2.2.1. Un Örneklerinden Küflerin İzolasyonu

Un örneklerinde bulunan küflerin izolasyon işleminde Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC) (Fluka 17211) ve Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (Fluka 17147) ortamları kullanılmıştır. Tüm örneklerin mikolojik incelemesi için oldukça etkili bir yöntem olmasından dolayı “Direk Ekim” ve “Seyreltme” yöntemleri tercih edilmiştir. Direk ekim yöntemi, izolasyon ortamına örnek partiküllerinin doğrudan aktarılması ve yüzeye yayılmasının sağlanmasını kapsamaktadır (Samson ve ark. 2004a). Direk ekim yöntemi ile un örneklerinin incelenmesinde 0,1 g örnek kullanımı gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek 2 adet RBC ve 2 adet DRBC ortamlarına inokule edilerek 4 paralel halinde izolasyon işlemine tabi tutulmuştur. Petri kapları 25°C’lik etüvde 14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ilk 3. gününden itibaren gelişen koloniler tek spor izolasyonu işlemine alınmıştır.

14 günlük inkübasyon sonunda, her örnek için, petrilerde bulunan tüm küf kolonileri sayılmıştır. Sayım işlemi petri kaplarının ters yüzlerinden ve işaretlemek suretiyle yapılmıştır. 10-100 koloni/petri arasında küf kolonisi bulunan petriler toplam canlı sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır (Bragulat ve ark. 1995). Bu şekilde, her örnek için petrilerde bulunan toplam küf koloni sayıları bulunmuş ve petri sayısına (her un örneği 4 paralel ekilmiştir) bölünmüştür. Böylece ortalama koloni sayısı bulunmuştur. Bulunan sayı, izolasyon aşamasında 0,1 g örneğin kullanılmış olmasından dolayı 10 ile çarpılarak, her un örneği için 1 g hacimde mevcut olan toplam küf sayısı (kob/g) hesaplanmıştır.

Direk ekim yönteminin uygulanması ile 10-100 koloni/petri aralığının üzerinde küf kolonisi içeren örnekler için “Seyreltme Yöntemi” kullanılmıştır. Bu yöntemle göre incelenen örneğin un olmasından dolayı ilk dilüsyon 1:19 oranında yapılmıştır (Köşker 2000). Yöntemin temel prensipleri doğrultusunda 10 g örnek 190 ml steril distile su içinde çalkalama yoluyla homojenize edilerek 10^{-1} dilüsyon

elde edilmiştir. Elde edilen 10^{-1} dilüsyonundan 1 ml alınarak 9 ml steril fizyolojik suya ilave edilmesi ile 10^{-2} dilüsyon serisi oluşturulmuştur. Her iki dilüsyon için 2 adet RBC ve 2 adet DRBC besi ortamları “Yayma Plak Yöntemi” ile kullanılmıştır. 100 µl dilüe örnek ile inokule edilen petri kapları 25°C’lik etüvde 14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ilk 3. gününden itibaren gelişen koloniler tek spor izolasyonu işlemine alınmıştır.

10-100 koloni/petri aralığına uygun petrilerin sayımı sonucu her örnek için petrilere bulunan toplam küf sayıları bulunmuş ve petri sayısına (her un örneği 4 paralel ekilmiştir) bölünmüştür. Böylece ortalama koloni sayısı bulunmuştur. Bulunan sayının, 1:19 oranında dilüsyon oranının kullanılmış olmasından dolayı 2 (Köşker 2000), dilüsyon faktörü ve petrilere 100 µl inokulasyon yapılmış olmasından dolayı da 10 ile çarpılması sonucu incelenen un örneği için 1 g hacimde mevcut olan toplam küf sayısı (kob/g) hesaplanmıştır.

2.2.2. Tek Spor İzolasyonu ve Kültürlerin Muhafazası

Tek spor izolasyonunun yapılması için; incelenen un örneklerinin inokule edildiği RBC ve DRBC ortamlarında gelişen kolonilerden transfer iğnesi ile az miktarda örnek alınmıştır ve 500 µl steril % 0,1’lik Tween 80 ortamı içinde homojenize edilmiştir. Hazırlanan spor süspansiyonundan öze yardımı ile alınan örnek Czapek Dox Agar (CZ) ortamına “Çizgi Ekim Tekniği” ile inokule edilmiştir ve petriler 25 °C’de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Choi ve ark. 1999). İnkübasyonun sonunda tek bir spora ait germinasyon bölgesi agar blok halinde kesilerek Potato Dekstrose Agar (PDA) ortamına aktarılmıştır. Petriler 25 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda saf halde gelişmiş olan isolatlar yatık Malt Ekstrakt Agar (MEA) tüplerine tek nokta halinde inokule edilmiştir. Tüpler 25 °C’de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda mikotoksijenik fungusların belirlenmesi ve identifikasyonu işleminde kullanılmak üzere +4 °C’de muhafazaya alınmıştır. Ayrıca PDA ortamında geliştirilmiş olan saf küf kültürlerinden % 15 yağsız süt tozu ortamında 2 seri halinde liyofilize kültürü de hazırlanmıştır. Bu amaç için

600 µl steril % 15 yağsız süt tozu içeren steril cryo viallere saf filamentli fungus kültüründen bol miktarda aktarılmıştır. Cryo viallerde hazırlanan kültürler 1 gece boyunca – 85 °C’de bekletilmiştir. Donması sağlanmış olan örnekler 0,08 vakum ve – 55 °C altında liyofilize edilmiştir.

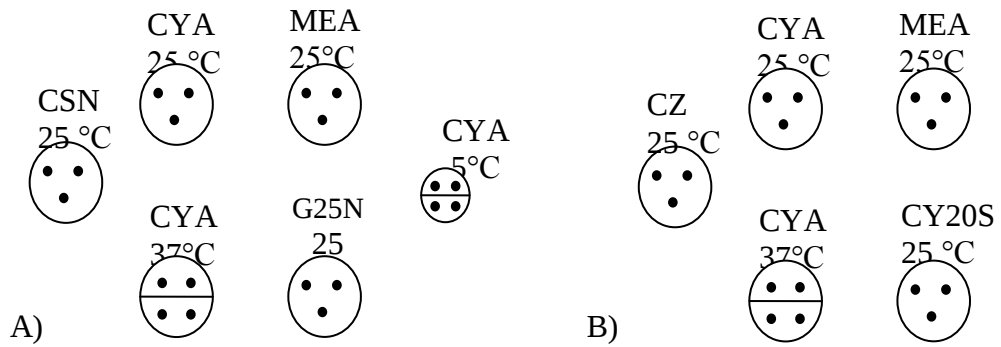
2.2.3. İncelenen Un Örneklerinden İzole Edilen Küflerin Geleneksel Teknikler ile teşhisi

Geleneksel teknikler ile identifikasyonu sürecinde öncelikle cins düzeyinde devamında ise tür düzeyinde identifikasyon gerçekleştirilmiştir. Cins düzeyindeki identifikasyon için tüm izolatlar MEA ortamına üç nokta halinde inokule edilmiş ve 28 °C’de beş gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir örnek laktofenol blue ortamında preparat haline getirilip ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikroskopik yapılar “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” (Barnett ve Hunter 1998)’e göre değerlendirilerek cins düzeyinde identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Penicillium cinsine ait türlerin teşhisinde “Toprak Mikrofungusları Cilt V” (Hasenekoğlu 1991), “The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*” (Pitt 1979), “A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species” (Pitt 2000a) ve “Introduction to Food and Airborne Fungi” (Samson ve ark. 2004) adlı eserler esas alınmıştır. Her bir tür 3 ayrı Czapek Yeast Autolysate (CYA) Agar besiyerinde 5, 25 ve 37 °C’ lerde, MEA, % 25 Glycerol Nitrate Agar (G25N) ve Creatine Sucrose Agar (CSN) besiyerlerinde 25°C’ de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2.1a). İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki kolonilerin makroskopik olarak; mm cinsinden büyüklüğü, şekli, üstten ve alttan rengi, eksudasyon ve pigmentasyon olup olmadığı incelenmiştir. Stereo mikroskop ile koloni tekstürü, konidial başlıkların tipi belirlenmiştir. Işık mikroskobu ile konidioforun uzunluğu, genişliği, çeper özelliği, fiyalidlerin uzunluğu ve genişliği, konidinin şekli, büyüklüğü, çeper özelliği tespit edilmiştir.

Aspergillus cinsine ait türlerin teşhisi “Identification of Common *Aspergillus* Species” (Klich 2002), “Introduction to Food and Airborne Fungi”

(Samson ve ark. 2010) ve “Toprak Mikrofungusları Cilt I” (Hasenekoğlu 1991)’e göre yapılmıştır. Her bir tür; 2 ayrı CYA besiyerinde 25 ve 37 °C’ de, % 20 Sukrozlu Czapek Yeast Autolysate Agar (CY20S), MEA ve CZ besiyerlerinde 25 °C’ de 7 gün inkübe edilmiştir (Şekil 2.1b). İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki kolonilerin makroskobik olarak; mm cinsinden büyüklüğü, şekli, üstten ve alttan rengi, eksudasyon ve pigmentasyon olup olmadığı incelenmiştir. Stereo mikroskop ile koloni tekstürü, konidial başlıkların tipi belirlenmiştir. Işık mikroskobu ile konidiaforun uzunluğu, genişliği, çeper özelliği, vesikülün şekli, genişliği, fiyalidlerin uzunluğu ve genişliği, konidinin şekli, büyüklüğü, çeper özelliği tespit edilmiştir.



Şekil 2.1. A) *Penicillium* B) *Aspergillus* cinsine ait türlerin tanımlanmasında kullanılmış olan besiyerleri, inokulasyon ve inkübasyon sıcaklıklarının şematik gösterimi (Pitt 1979; Klich 2002).

Aspergillus ve *Penicillium* cinsleri dışındaki Moniliaceae familyasına ait diğer türler ile Dematiaceae ve Mucoraceae familyalarına ait türler PDA ya da MEA ortamlarında ekilerek 25°C’ de 7 gün inkübe edilmiştir. Bu türlerin teşhisinde “Toprak Mikrofungusları Cilt I-VII” (Hasenekoğlu 1991) “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” (Barnett ve Hunter 1998) ve “Introduction to Food and Airborne Fungi” (Samson ve ark., 2004a; Samson ve ark. 2010)’den yararlanılmıştır.

Ayrıca her bir izolatin makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Olympus 7.2 Megapiksel fotoğraf makinesi ile resimlenerek arşiv haline getirilmiştir.

İdentifiye edilen tüm türlerin yazar isimleri www.indexfungorum.org sitesi kullanılarak kontrol edilmiştir.

2.2.4. Elde Edile İzolatların İTK Yöntemi ile Sekonder Metabolit Profillerinin İncelenmesi ve Kimyasal Karakterizasyonun Gerçekleştirilmesi

CYA ve MEA ortamlarına üç nokta ekim tekniği ile inokule edilerek 25 °C’de 14 gün süreyle geliştirilen izolatlar metabolit profillerini belirlemek amacı ile genel amaçlı silika jel 60 üzerine spotlanmıştır. İşlem uygulamasında belirtilen besi ortamlarında geliştirilen kolonilerin kenar orta ve diğer kolonilerle ortak olan kısmından ve agar delici yardımı ile 6 mm’lik agar bloklar oluşturulmuştur. Uygulamada İTK plaka iki yönlü olarak kullanılmıştır. Her bir agar bloğun miselyal yönü kloroform/metanol (2:1) karışımı ile ıslatıldıktan sonra İTK plaka üzerine yerleştirilmiştir. Agar bloklar sırasıyla CYA ve MEA besi ortamlarından olmak üzere İTK plaka her iki yönüne de spotlanmıştır. Spotlama işleminden sonra plakanın bir yönü intrasellüler metabolitlerin incelenmesi amacıyla kloroform:aseton:isopropanol (85:15:20 h/h/h) (CAP) ile diğer yönü ise ekstrasellüler metabolitleri incelemek üzere toluen:etil asetat%90: formik asit (5:4:1 h/h/h) (TEF) ile elue edilmiştir (Frisvad ve Filtenborg 1983; Samson ve ark. 2010). İşlem sonrasında İTK plaklar 365 nm ve 312 nm’de incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Belirtilen dalga boylarındaki incelemede her bir izolatın sahip olduğu metabolitler ve bunların diğer izolatlar ile kıyaslanması yapılarak, mikotoksin üretme yetenekleri değerlendirilmiştir. Bu incelemede CAMAG HPTLC cihazı kullanılmıştır.

İTK ortamında aflatoksin üretme yeteneğinin belirlenmesi için aflatoksin standart karışımı (Supelco) 2 µl, 5µl, 10 µl ve 20 µl hacimlerde İTK plakasına spotlanmıştır. Aflatoksinin ekstrasellüler bir metabolit olması nedeniyle TEF ortamında elüsyonu ve amonyum solusyonu ile muamelesi gerçekleştirilmiştir.

OTA üretme yeteneğinin belirlenmesi için OTA standardı (Biopure BRM 001008) referans olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 2 µl, 5 µl, 10 µl ve 20 µl hacimlerinde OTA İTK plakasına spotlanmış ve TEF ortamında yürütülmüştür. 15 dakika amonyum buharında muamele edilmiştir.

Aflatoksin ve OTA standartları eşliğinde her bir izolatın İTK plağı mavi, mavi-yeşil band varlığı yönünden 365 ve 312 nm’de incelenmiştir.

2.2.5. Literatürel Olarak Mikotoksijenik Olduğu Bilinen İzolatların Kültür Ortamında Mikotoksijenik Özelliklerinin İncelenmesi

Literatürlerde mikotoksijenik olduğu belirtilen izolatların aflatoksin ve okratoksin üretme yeteneklerine sahip olup olmadıklarını kültürel yöntemler ile kontrol etmek amacıyla izolatlar CYA, Yeast Extract Sucrose Agar (YES) ve Cocconut Agar Medium (CAM) besi ortamlarına üç nokta ekim yöntemi ile inokule edilmiş ve 25 °C’de 7 günlük inkübasyondan sonra petriler arka yüzlerinden olmak üzere 365 nm’de incelenmiştir. İncelemede mavi ve yeşil floresans ışık veren izolatlar kaydedilmiştir. İncelenen izolatlar arasında aflatoksijenik ve okratoksijenik küflerin ayrımında *A. parasiticus* NRRL 465 aflatoksin, *A. ochraceus* NRRL 3174 OTA üretimi için pozitif kontrol olarak kullanılırken, inokulasyon yapılmamış olan petriler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İlaveten *A. flavus* olarak identifiye edilen tüm izolatlar *Aspergillus flavus/parasiticus* Agar (AFPA) ortamında koloni arkasının turuncu olmasına bağlı olarak aflatoksin üretme yetenekleri yönünden incelenmiştir.

2.2.6. Aflatoksinlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Belirlenmesi

2.2.6.1. Standart ve HPLC Koşulları

Çalışmada Supelco marka (46304-U) Aflatoksin karışım kiti kullanılmıştır. Standart, un ve aflatoksijenik küf örneklerinin HPLC ile incelenmesi tri-floroasetik asit (TFA) ile türevlendirme işleminden sonra 20 µl’lik numune enjeksiyonun 16 dakikalık analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz 1100 seri Hewlett Packard HPLC sistemi (1100 seri Hewlett Packard Degasser (G1322A), QuatPump (G1311A)) ile yapılmıştır. Dedeksiyon ise 1200 seri Agilent Floresans dedektör (G1321A) ile gerçekleştirilmiştir. Numune su: asetonitril:metanol (3:1:1 h/h/h)’den oluşan hareketli faz ile Nucleosil C₁₈ (5 µm 250 mm x 4.6 mm) kolondan 1 ml akış oranı ile geçirilmiştir. Aflatoksinlerin dedeksiyonu ekzidasyon

360 nm emisyon 440 nm floresan dedektör ile gerçekleştirilmiştir (Ip ve Che 2006; Sánchez-Hervás ve ark. 2008).

2.2.6.2. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Supelco marka (46304-U) Aflatoksin karışım kiti farklı konsantrasyonlarda (Çizelge 2.2) kullanılarak belirtilen koşullarda kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacı ile incelenmiştir. Çizelge 2.2’ de belirtildiği gibi standart son hacmi 100 µl olacak şekilde vidalı kapaklı cam deney tüpleri içerisinde metanol ile seyreltilip 50 °C’de bir gece boyunca tutularak uçması sağlanmıştır. Uçma işlemi tamamlandıktan sonra 200 µl n-hekzan ve 50 µl TFA ilave edilmiş ve 30 sn. vortekslenmiştir. 5 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 950 µl mobil faz ilave edilmiş ve 30 sn. boyunca vortekslenmiştir. 5 dk. oda sıcaklığında sabit bir şekilde bekletildikten sonra alt faz alınıp 0.45 µm por çaplı membran filtreden geçirildikten sonra HPLC sisteminde incelenmiştir (AOAC 1995). Türevlendirme işlemi tamamlanan standartlara ait son toksin derişimleri Çizelge 2.3’de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacı ile belirlenen 8 farklı konsantrasyona belirtilen türevlendirme yöntemi uygulandıktan sonra HPLC sisteminde incelenmesi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin ortalama değerleri kullanılarak her bir aflatoksin için saptama (LOD) ve tayin (LOQ) sınırı belirlenmiştir (ICH3 1995).

Çizelge 2.2. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan aflatoksin standart karışımı konsantrasyonları

Std No	Standart (µL)	Metanol (µL)	G2 (M)	B2 (M)	G2/B2 (ng)	G1 (M)	B1 (M)	G1/B1 (ng)
1	100	0	9×10^{-7}	9.5×10^{-7}	7.5	3×10^{-6}	3.2×10^{-6}	25
2	50	50	4.5×10^{-7}	4.75×10^{-7}	3.75	1.5×10^{-6}	1.6×10^{-6}	12.5
3	25	75	2.25×10^{-7}	2.375×10^{-7}	1.875	0.75×10^{-6}	0.8×10^{-6}	6.25
4	12.5	87.5	1.125×10^{-7}	1.18×10^{-7}	0.937	0.375×10^{-6}	0.4×10^{-6}	3.125
5	6.3	93.7	0.56×10^{-7}	0.59×10^{-7}	0.468	0.18×10^{-6}	0.2×10^{-6}	1.56
6	3.1	96.9	0.28×10^{-7}	0.29×10^{-7}	0.234	0.09×10^{-6}	0.1×10^{-6}	0.78
7	1.6	98.4	0.14×10^{-7}	0.145×10^{-7}	0.117	0.046×10^{-6}	0.05×10^{-6}	0.39
8	0.8	99.2	0.07×10^{-7}	0.074×10^{-7}	0.05	0.023×10^{-6}	0.025×10^{-6}	0.19

Çizelge 2.3. HPLC sisteminde incelenen standartların son konsantrasyonları (ng/ml)

Std No	G1/B1	G2/B2
1	0,019	0,005
2	0,039	0,0117
3	0,078	0,0234
4	0,156	0,0468
5	0,3125	0,0937
6	0,625	0,187
7	1,25	0,375
8	2,5	0,75

2.2.6.3. *A. flavus* İzolatlarından Aflatoksinlerin Ektraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi

Literatür bilgisinin yanı sıra kültürel ortamlarda ve İTK üzerinde aflatoksijenik olduğu düşünülen *A. flavus* izolatları HPLC ile incelenmiştir. Bu amaç için her bir *A. flavus* izolatı Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA) ortamına 3 nokta ekim yöntemi ile ekilip 25 °C’de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 6 mm çaplı agar delici ile bir koloninin kenar, orta ve diğer koloni yönünden olmak üzere 3 adet agar blok alınıp steril ependorfa aktarılmıştır. 900 µl metanol ilave edildikten sonra 1 saat karanlık alanda bekletilmiştir. Bu işlemden sonra 13.000 rpm’de 20 dk. santrifüj edilip üst faz 0.45 µm por çaplı membran filtreden vidalı kapaklı cam deney tüpü içine filtre edilmiştir (El Khoury ve ark. 2008; Sánchez-Hervás ve ark. 2008). Elde edilmiş olan tüm hacim 50 °C’de bir gece boyunca tutularak uçurulduktan sonra TFA ile türevlendirilmiştir. Türevlendirilmiş örnek HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Aflatoksijenik küflerin HPLC ile incelenmesinde herhangi bir inokulasyon yapılmamış olan CYA ortamından alınan 3 agar blok aynı işlemlere tabi tutularak negatif kontrol olarak kullanılmıştır. CYA ortamında aynı koşullarda geliştirilen *A. parasiticus* NRRL 465 ise pozitif kontrol (<http://nrrl.ncaur.usda.gov>) olarak kullanılmıştır.

İncelenen *A.flavus* izolatlarına ait aflatoksin miktarının hesaplanmasında öncelikle pik normalizasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla:

$$\text{Pik normalizasyonu } (y_{\text{norm}}) = \text{Alan } (y) / \text{Göz Zamanı } (RT)$$

formülü kullanılmıştır.

Normalizasyonu gerçekleştirilen pik verileri enjeksiyon hacmindeki aflatoksin miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Bu amaçla her bir aflatoksine ait kalibrasyon eğrisinden elde edilen kesim noktası (a) ve eğim (b) verileri eşliğinde (Çizelge 2.4);

$$y = bx + a$$

formülü kullanılarak enjekte edilen numunedeki aflatoksin miktarı (ng/ml) hesaplanmıştır. Burada;

y: Pik alanı (y_{norm})

x: Enjeksiyon hacmindeki aflatoksin miktarı (ng/20 μ l)'dır.

LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde ise aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır:

$$\text{LOD} = (\sigma(y_{\text{norm}}) / \text{eğim}) \times 3,3$$

$$\text{LOQ} = \text{LOD} \times 3$$

Çizelge 2.4. Her bir aflatoksine ait kesim noktası (a) ve eğim (b) değerleri

	Kesim noktası (a)	Eğim (b)
B1	5,9023	0,0985
G1	2,4743	0,0654
B2	4,0734	0,0224
G2	2,3501	0,0147

Her bir izolat için 3 agar bloğun ekstraksiyon işlemine alınması ve tüm hacmin TFA ile türevlendirmeye tabi tutulması yöntemi takip edilmiştir. Bu

nedenle izolatların aflatoksinleri üretme yetenekleri ng/ml cinsinden değerlendirilmiştir. Bu amaçla enjeksiyon hacminde hesaplanan aflatoksin miktarları (ng/20 µl) mililitredeki aflatoksin miktarının hesaplanması için kullanılmıştır.

$$\text{Aflatoksin miktarı (ng/ml)} = x \times 50$$

Burada;

x: Enjeksiyon hacmindeki aflatoksin miktarı (ng/20 µl) ($y=bx+a$ 'den hesaplanır)

50: ml katsayısıdır.

2.2.6.4. Un Örneklerinden Aflatoksinlerin Ektraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi

İmmuno Aktif Kolon Verimliliğinin Belirlenmesi

Un örneklerindeki aflatoksinlerin numuneden saflaştırılması ve HPLC sisteminde incelenmesi amacı ile aflatoksin B1, G1, B2 ve G2'ye spesifik bölgeler içeren özel kolon kullanılmıştır. Kullanılan İAK aflatoksinleri incelenen aflatoksinleri tutma verimliliğini belirlemek için kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan sekiz farklı konsantrasyondan üçü seçilerek iki paralel halinde İAK'ye uygulanmıştır. Elde edilen eluant TFA ile türevlendirildikten sonra HPLC sisteminde incelenmiştir. Her bir aflatoksin için belirlenen yüzde (%) verimlilik belirlenmiştir.

Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) aynı şartlar altında yapılan belli bir sayıdaki ölçümün sonucunda elde edilen miktarının birbirine olan yakınlığının ölçüsü olarak ifade edilir. Uygulanan yöntem sonunda elde edilen verilerin kesinliğini belirlemek için 100 µl hacmindeki aflatoksin karışım standardı sırasıyla İAK ve türevlendirme işlemlerine tabii tutulduktan sonra HPLC sisteminde analiz

edilmiştir. İşlem dört kez tekrar edilmiştir. Çalışma sonuçları ve elde edilen veriler doğrultusunda standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (RSD, %RSD) değerleri hesaplanmıştır.

Un Örneklerindeki Aflatoksin Miktarının Ölçülmesi

Un örneklerinden aflatoksinlerin izolasyonunda Thieu ve ark. (2008)'nın hayvan yemleri için kullanmış oldukları yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için 25 g un örneği tartılıp üzerine 50 ml metanol:su (6:4 v/v) ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 30 dk. boyunca 140 rpm'de çalkalanmıştır. Çalkalama sona erdiğinde tüm numune glass fiber filtreden geçirilmiştir. Tüm filtrat 0.45 µm por çaplı selüloz asetat filtreden filtre edilmiştir. Elde edilen filtratın 5 ml'si aflatoksin B1, G1, B2, G2 spesifik İAK (VICAM 12022)'na tabi tutulmuştur. Bu aşamada örneğin kolondan 3 ml/dk hızda akması sağlanmıştır. Numune geçişi tamamlandıktan sonra 10 ml ultra saf (MQ) su ile yıkanıp 10 ml hacminde hava geçişi uygulanmıştır. Kolon üzerine önce 500 µl metanol ilave edilip 1 dk süre ile beklenmiştir. Metanolün kolondan elüsyonu başlatılmıştır. Bu aşamada ikinci 500 µl ilave edilmiştir. Son hacim 1 ml olan elüant 50 °C'de kurutulduktan sonra türevlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Türevlendirilmiş numune HPLC sisteminde incelenmiştir. Un örneklerinde aflatoksin miktarının incelenmesi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen un örneklerine ait aflatoksin miktarının hesaplanmasında öncelikle pik normalizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla;

$$\text{Pik normalizasyonu } (y_{norm}) = \text{Alan } (y) / \text{Göz Zamanı } (RT)$$

formülü kullanılmıştır.

Normalizasyonu gerçekleştirilen pik verileri enjeksiyon hacmindeki aflatoksin miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Bu amaçla her bir aflatoksine ait kalibrasyon eğrisinden elde edilen kesim noktası (a) ve eğim (b) verileri eşliğinde (Çizelge 2.4);

$$y = bx + a$$

formülü kullanılarak enjekte edilen numunedeki aflatoksin miktarı hesaplanmıştır.

Burada;

y: Pik alanı (y_{norm})

x: Enjeksiyon hacmindeki aflatoksin miktarıdır.

Elde edilen veriler doğrultusunda incelenen un örneklerindeki aflatoksin miktarlarını hesaplamak için;

$$C(\mu\text{g/kg}) = \frac{m \times V_1}{V_2 \times W} \text{ formülü kullanılmıştır (Workshop, 2008).}$$

C: Örnekteki aflatoksin miktarı ($\mu\text{g/kg}$)

m: HPLC'ye enjekte edilen örnekte kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmış olan aflatoksin miktarı (ng)

V₁: İAK'dan elue edilen hacim (1 ml)

V₂: HPLC'ye enjekte edilen saflajtırılmış örnek hacmi (0.02 ml)

W: İAK'na uygulanan örnek ağırlığı (2.5 g)

W değerinin hesaplanması:

$$W(g) = (M \times V_1 \times V_2) / (V_3 \times V_4)$$

M: Ekstraksiyon işlemine alınan örnek hacmi (25 g)

V₁: Dilüsyon işlemine alınan filtrat hacmi (-)

V₂: İAK'na uygulanan ekstrakt miktarı (5 ml)

V₃: Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücü hacmi (50 ml)

V₄: Dilüe edilen ekstrakt hacmi (-)

2.2.7. OTA'nın HPLC ile Belirlenmesi

2.2.7.1. OTA Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada 20 ng/ml OTA (Biopure BRM 001008) AOAC 2000.03 (AOAC 2000)'e göre hazırlanıp referans olarak kullanılmıştır. Buna göre 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonundaki OTA toluen:asetik asit (99:1 h/h) ortamında çözölmüştür. 330 – 370 nm arasında spektrumu alındığında, maksimum

absorbsiyonunun olduğu dalga boyu 333 nm olarak belirlenmiştir. Devamında hazırlanmış olan OTA solüsyonunun konsantrasyonunu belirlemek için absorbans değeri 333 nm’de ölçülmüştür. Aşağıda belirtilen eşitlik kullanılarak hazırlanan OTA çözelti ml’indeki OTA miktarı belirlenmiştir.

$$\mu\text{g/ml } C_{OTA} = \frac{A_{\max} \times MW \times 1000}{\epsilon \times \delta}$$

Burada;

A: OTA’nın 333 nm’deki absorbans değeri

MW: Moleküler ağırlığı

ε: Molar absorptivite (5,440)

δ: 1’dir.

333 nm’de belirlenen absorbans değeri (0.267) doğrultusunda OTA miktarı 20 µg/ml olan çözümden 100 µl alınarak 900 µl toluen:asetik asit (99:1 h/h) ortamına aktararak 2 µg/ml konsantrasyona seyreltilmiştir. Elde edilen bu son konsantrasyondan 100 µl, 10 ml’lik balon jöjeye alınıp 50 °C’de 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında 10 ml enjeksiyon solüsyonu (0,2 µm filtreden filtre edilmiş olan metanol:su:asetik asit 30:70:1 h/h/h) ile çözülerek son konsantrasyonun 100 ng/ml olması sağlanmıştır.

2.2.7.2. HPLC Koşulları

OTA’nın HPLC ile analizi esnasında MQ su: metanol: asetonitril:asetik asit (30:60:10:2 h/h/h/h) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Ayrım Nükleosil C₁₈ 5 µm, 250 mm x 4.6 mm kolon ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon ise 333 nm ekzidasyon, 460 nm emisyon dalga boylarında floresan detektör ile sağlanmıştır. Uygulama 1100 seri Hewlett Packard HPLC sistemi (1100 seri Hewlett Packard Degasser (G1322A), OuatPump (G1311A)) ile yapılmıştır. Dedeksiyon ise 1200

seri Agillent Floresans dedektör (G1321A) ile gerçekleştirilmiştir (Sanchez-Hervás ve ark. 2008; Mazaheri 2009). Enjeksiyon hacmi 20 µl, akış; 1 ml/dk.'dır.

2.2.7.3. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Stok solüsyonu son konsantrasyonu 100 ng/ml olacak şekilde hazırlanmış ve kalibrasyon amaçlı kullanılmıştır. Kalibrasyon için dört farklı konsantrasyon serisi hazırlanmıştır (Çizelge 2.5). Her bir kalibrasyon solüsyonu 3 paralel olarak enjekte edilmiştir. Pik normalizasyonu aşağıda belirtilen eşitlik kullanılarak belirlenmiştir;

$$Pik\ normalizasyonu\ (y_{norm}) = Alan\ OTA\ (A_{OTA}) / Alan\ IS\ (A_{IS})$$

Çizelge 2.5. OTA kalibrasyon konsantrasyonları

	Kal.1	Kal.2	Kal.3	Kal.4
Enjeksiyon solüsyonu (µl)	640	500	300	100
Diflunisal (İç Standart, IS)	300	300	300	300
5.01x10⁻⁶ M Asetonitrilde (µl) (Uysal ve ark. 2009)				
OTA (100 ng/ml)	60	200	400	600
Son konsantrasyon IS	1.51x10 ⁻⁸	1.51x10 ⁻⁸	1.51x10 ⁻⁸	1.51x10 ⁻⁸
Son konsantrasyon OTA	6 ng	20 ng	40 ng	60 ng

2.2.7.4. Matrikste Doğrusallık, İmmuno Aktif Kolon Verimliliğinin Belirlenmesi ve Kesinlik (Tekrar Edilebilirlik)

Un örneklerindeki OTA'nın saflaştırılması ve HPLC sisteminde incelenmesi amacı ile OTA'ya spesifik bölgeler içeren özel immuno aktif kolon kullanılmıştır. Kullanılan İAK OTA tutma verimliliğini belirlemek için kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan konsantrasyonlar OTA içermeyen un örneğine ilave edilmiştir. Bunun için 4 adet 25 g OTA içermeyen un

örneği (22 no'lu un örneği) hazırlanmıştır ve her birine sırası ile 60 ng, 200 ng, 400 ng ve 600 ng OTA ilavesi gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğe OTA ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve sonra HPLC sisteminde incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda matrikste kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı, çalışmanın verimliliği ve tekrar edilebilirliği belirlenmiştir.

2.2.7.5. Okratoksijenik İzolatlardan OTA Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi

Literatürde OTA ürettiği belirtilen, kültürel ortam ve İTK yöntemi ile OTA ürettiği belirlenen toplam 54 izolat HPLC'de incelenmek üzere CYA ortamına üç nokta ekim tekniği ile inokule edilmiş ve 25 °C'de 7 günlük inkübasyondan sonra bir koloninin kenar, orta ve diğer koloniler ile ortak olan yönünden olmak üzere 3 agar blok alınmış ve tartılmıştır. Ependorf içine aktarılan agar bloklar 1 ml metanol ortamında 1 saat boyunca 140 rpm'de çalkalanmıştır. İşlem sonunda 13.000 rpm'de 20 dakikalık santrifüj sonrasında süpernatant alınıp 0.45 µm por çaplı selüloz asetat filtreden filtre edilmiştir. Elde edilen tüm hacim 50 °C'de uçurulmuştur. Çalışmada herhangi bir inokulasyon içermeyen CYA ortamı negatif kontrol olarak ve *A. ochraceus* NRRL 3174 ise pozitif kontrol olarak aynı uygulamaya tabi tutulmuştur (El-Khoury ve ark. 2008; Sanchez-Hervás ve ark. 2008). Kurutulmuş olan ekstrakt 700 µl enjeksiyon solüsyonu ile çözülmüştür. Sonrasında 300 µl IS ilavesinden sonra degaze edilerek HPLC sisteminde incelenmiştir.

Normalizasyonu gerçekleştirilen pik verileri enjeksiyon hacmindeki OTA miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Bu amaçla OTA'ya ait kalibrasyon eğrisinden elde edilen kesme noktası (a: -0,0255) ve eğim (b: 0,053534) verileri eşliğinde;

$$y = bx + a$$

formülü kullanılarak enjekte edilen numunedeki OTA miktarı (ng/ml ve ng/g) hesaplanmıştır. Burada;

y: Pik alanı (y_{norm})

x: Enjeksiyon hacmindeki aflatoksin miktarı (ng/20 µl)

2.2.7.6. Un örneklerinden OTA ekstraksiyonu ve HPLC ile inlenmesi

25 g un örneği temiz bir erlen içine tartılıp 100 ml ekstraksiyon solventi (su:asetonitril 4:6, h/h) ile 30 dk 140 rpm'de homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında numune glass fiber filtre kâğıdından filtre edilmiştir. 4 ml filtrat 44 ml PBS ile seyreltilmiş ve 48 ml'lik son hacmin tamamı OTA spesifik İAK (VICAM) geçirilmiştir. Sonrasında 10 ml su ve 10 ml hava geçirdikten sonra 1 ml metanol ilave edilip 5 dk. kolon içinde bekletilmesi sağlanmıştır. Süre tamamlandıktan sonra temiz bir vial e örnek elüsyonu sağlanmıştır. Elüsyon işlemi 4 kez 1 ml'lik metanolün geçirilmesinden sonra tamamlanmıştır (AOAC 2000). Elde edilen elüent 50 °C'de 1 gece boyunca kurutulduktan sonra 700 µl enjeksiyon solüsyonunda çözülmüştür. 300 µl IS ilavesi yapıldıktan sonra degaze edilmiş ve HPLC sistemine enjekte edilmiştir. HPLC sisteminde elde edilen pik bilgisi kalibrasyon eğrisinde değerlendirilerek numunedeki OTA miktarı µg/kg cinsinde belirlenmiştir.

2.2.8. Mikotoksijenik Küflerin Moleküler İdentifikasyonu

2.2.8.1. Moleküler İdentifikasyona Alınacak İzolatların Seçimi

İncelenen un örneklerinden elde edilen ve kültürel teknikler, İTK ve HPLC yöntemlerine dayalı olarak mikotoksijenik olduğu belirlenen 130 izolat metabolit profilleri yönünden incelenmiştir. Metabolit profillerinin elde edilmesi Samson ve ark. (2010)'a göre yapılmıştır. Buna göre izolatlar YES ortamına üç nokta inokulasyon tekniği ile ekilmiş ve 25 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda iki koloninin dışa bakan kenarı, içe bakan kenarı ve ortasından olmak üzere 6 agar blok agar delici kullanılarak alınmıştır. Agar blokların üzerine 1 ml hacminde % 1 oranında formik asit içeren metanol:diklorometan:etil asetat (1:2:3, h/h/h) karışımı ilave edilmiştir. Örnekler ekstraksiyon için 30 dakika boyunca sonikatöre tabii tutulmuştur. Sonikasyon sonunda elde edilen ekstrakt 20 µl hacminde İTK'ya spot edilmiştir. Hazırlanan İTK plakası TEF

(toluen:etilasetat:formik asit (%90) (5:4:1, h/h/h) ortamında 10 cm uzunluğunda elüsyona tabii tutulmuştur. Elüsyon işleminden sonra 20 dk. çeker ocak altında kurutulmuştur. Metabolit profillerinin karşılaştırılması 365 nm’de gerçekleştirilmiştir.

2.2.8.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için cam boncuk ve vorteksleme yöntemi (Van Burik ve ark. 1998) modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla küf izolatları MEA ortamına üç nokta ekim yöntemi ile inokule edilerek 25 °C’de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda bir öze dolusu örnek 400 µl liziz tamponu içerisine alınmıştır. 1/3 oranında nitrik asitle yıkanmış cam boncuk ve 400 µl fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1, h/h/h) ilave edildikten sonra 30 dk boyunca kuvvetli bir şekilde vortekslenmiş, süre sonunda 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüj işleminden sonra üst faz temiz bir ependorf tüpe aktarıldıktan sonra eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1, h/h/h) ilave edilerek 5 dk boyunca ters-düz yapılmıştır. 13.000 rpm’de 5 dk boyunca santrifüj edildikten sonra oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Elde edilen örneğe 3 µl RNaze enzimi ilave edilmiş ve 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneğin 0.1 hacimi kadar 3 M sodyum asetat ve 2 hacmi kadar da soğuk saf etanol ilave edilmiştir. Örneklerin homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra 1 gece boyunca – 20 °C’de inkübasyonu yapılmış ve süre sonunda 13.000 rpm’de 5 dk boyunca santrifüj edilerek oluşan üst faz boşaltılmıştır. Ependorfun dip kısmında meydana gelen pellet 200 µl steril MQ su ile çözülmüş ve üzerine 0,1 hacim kadar 0.3 M sodyum asetat ve 2 hacim kadar soğuk saf etanol ilave edilmiştir. Örnek homojen olarak karıştırıldıktan sonra –20 °C’de 1 saat inkübasyona tabii tutulmuş ve süre sonunda 13.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatantı boşaltılmış ve pelletin havada kuruması sağlanmıştır. Kuruma işleminden sonra 50 µl steril MQ su ile çözülmüş ve elde edilen DNA örneği 1 kb marker eşliğinde, 6X yükleme boyası ile 3 µl hacminde % 5 oranında etidium bromür (10 mg/ml) içeren % 1’lik agaroz

jele yüklenecek, 1X TAE tamponunda 90V'da 50 dk yürütme işleminden sonra UV transilluminatorde (Uvitec) incelenmiştir. DNA örnekleri – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.8.3. İncelenecek Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu

Literatürel olarak mikotoksin üretme yetenekleri bilinen ve kültürel, İTK ve HPLC ile bu özellikleri yönünden incelenen küfler moleküler identifikasyon işlemine alınmıştır. Bu işlem için İTK yöntemi ile metabolit profillerine dayalı olarak farklı profiller sergileyen izolatlar seçilmiştir. Seçilen izolatlardan *Aspergillus* ve *Penicillium* genusu üyeleri için ITS1-5.8S-ITS4 ve β -Tubulin gen bölgeleri, *Aspergillus* genusu üyeleri için ilaveten kalmodulin gen bölgesi PCR ile amplifiye edilmiştir. Bu amaçla; 2.5 μ l 10X PCR tamponu, 2.5 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l, 2.5 mM deoksiniükleotidtrifosfatlar karışımı (dNTP Mix; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 μ M primerler (Çizelge 2.6) 0.25 μ l Taq polimeraz (5 unit/ μ l), 11.75 μ l nükleazsız su ve 1 μ l kalıp DNA olmak üzere toplam 25 μ l hacimlik reaksiyon kullanılmıştır. Reaksiyonlar için Bio-Rad i-cycler, Techne Thecogene ve Techne TV-5000 Thermal Cyclerlar kullanılmıştır. Her bir gen bölgesi için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir:

ITS1-58S-ITS4	β-Tubulin	Kalmodulin
94 °C'de 5 dk	95 °C'de 3 dk	94 °C'de 10 dk
(Denatürasyon)	(Denatürasyon)	(Denatürasyon)
35 döngü	30 döngü	35 döngü
94 °C 45 sn	95 °C 1 dk	94 °C 50 sn
56 °C 30 sn	65 °C 55 sn	55 °C 50 sn
72 °C 2 dk	72 °C 1 dk	72 °C 1 dk
72 °C 6 dk	72 °C 10 dk	72 °C 7 dk
4 °C Süresiz	4 °C Süresiz	4 °C Süresiz
(Samson ve ark 2010)	(Glass ve Donaldson, 1995)	(Serra ve ark 2006)

Elde edilen PCR ürünleri % 5 ethidium bromür (10 mg/ml) içeren % 1'lik agaroz jele 6X'lik yükleme boyası kullanılarak yüklenmiş ve 1X TAE tamponunda 90V 50 dk boyunca yürütülerek UV transilluminatorde (Uvitec) incelenmiştir.

2.2.8.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması SV-Jel ve PCR Clean-up Sistem (Promega A9282) kullanılarak kit kullanım klavuzuna uygun bir şekilde yapılmıştır. Bu amaçla % 1'lik agaroz jelde yürütülen örnekler UV transilluminator (Uvitec)'de gözlenerek, istenen band steril bistüri ile agaroz jelden kesilmiştir. PCR ürünü içeren agaroz parçaları temiz bir ependorfa aktarılıp tartılmış ve her bir 10 mg agaroz için 10 µl membran bağlama solüsyonu ilave edilmiştir. 10 dk boyunca 55 °C'lik su banyosunda bekletilerek agaroz parçalarının erimesi sağlanmış ve bu süre boyunca 5 dk ara ile örnekler çalkalanmıştır. Agaroz parçaları eridikten sonra her bir çözdürülmüş örnek toplama tüplerine yerleştirilmiş olan SV mini kolonlara aktararak oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. Süre sonunda sonra 16.000 g'de 1 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılmış ve SV mini kolona 700 µl membran yıkama solüsyonu ilave edilmiştir. 16.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek toplama tüpünde toplanan sıvı boşaltılmıştır. Yıkama işlemi 500 µl'lik membran yıkama solüsyonu ile 16.000 g'de 5 dk'lık santrifüj işlemi yapılarak tekrar edilmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı boşaltılmış ve santrifüj işlemi 16.000 g'de 1 dk olarak tekrar edilmiştir. Bu aşamada kolonlar temiz bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 50 µl nükleazsız su ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra 16.000 g'de 1 dk boyunca santrifüj edilerek saf PCR ürününün ependorf tüpüne alınması sağlanmıştır.

Saflaştırılmış PCR ürünleri % 5 ethidium bromür (10 mg/ml) içeren %1'lik agaroz jele 6X'lik yükleme boyası kullanılarak yüklenmiş ve 1X TAE tamponunda 90V 50 dk boyunca yürütülmüş ve UV transilluminatorde (Uvitec) incelenmiştir.

2.2.8.5. PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

Saf halde PCR ürünleri elde edilmiş olan ITS1-5.8S-ITS4 rRNA, β -tubulin ve kalmmodulin gen bölgelerinin dizi bilgileri Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

Dizi analizine alınan her bir örnek için toplam hacmi 10 μ l olan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu reaksiyonlar 2 μ l ilgili gen bölgesinin saflaştırılmış PCR ürünü, 0.65 μ l 2.5 μ M primer (ITS1, ITS4, Bt2b ve CL2) (Çizelge 2.6), 6 μ l Beckman Quick Start Kit ve 1.35 μ l nükleazsız su kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir reaksiyon için kullanılan şartlar aşağıda belirtilmiştir:

30 döngü

96 °C 20 saniye

50 °C 20 saniye ve 60 °C 4 dakika

Amplifikasyon sonrasında bağlanmamış primerlerin ve işaretli dNTP'lerin uzaklaştırılması için Agencourt Clean SEQ magnetik boncuk sistemi yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 10 μ l'lik reaksiyon hacmine sahip olan her bir örneğe 5.5 μ l stop solüsyonu (25 μ l nükleazsız su, 10 μ l 3 M sodyum asetat pH 5.2, 10 μ l 100 mM Na₂-EDTA ve 5 μ l 20 mg/ml glikojen) ilave edilmiştir. Her bir örneğe vortekslenmiş Agencourt Clean SEQ magnetik boncuk ve 55 μ l % 73'lük izopropanol (Sigma I9516) ilave edilip homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Örnekler 10 dk magnet üzerinde olmaksızın bekletildikten sonra magnet üzerine yerleştirilmiş ve 5 dk boyunca bekletilmiştir. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra süpernatant pipet ile atılmış ve 200 μ l % 73'lik izopropanol ilave edilip 3 dk bekletilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiş ve daha sonra 10-20 dk oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Örnekler 40 μ l örnek yükleme solüsyonu (SLS) ile çözülmüş ve magnet üzerinde 5 dk bekletilmiştir. Oluşan süpernatantın 35 μ l'si 96'lık platelere aktarılmış ve ayırma tamponu içeren ikinci bir plate ile birlikte kapiler sisteme verilmiştir.

Çizelge 2.6.Çalışmada kullanılan primerler

Primerler	Baz dizisi (5'-3')	Bölge	Ürün boyutu	Kaynak
V9G-F	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	ITS	1100 bp	Samson ve ark. 2010
LS266-R	GCATTCCCAAACAACCTCGACTC			
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	β-Tubulin	550 bp	Glass ve Donaldson 1995
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC			
CL1	GA(AG)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC	Kalmodulin	500-700 bp	Serra ve ark. 2006
CL2	TTTTGCATCATGAGTTGGAC			
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS Dizi analizi		White ve ark. 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS Dizi analizi		White ve ark. 1990

2.2.8.6. İncelenen Gen Dizilerinin Analizi

İncelenen izolatlar ait ITS bölgesi, β -tubulin'in bir kısmı ve kalmodulin gen bölgelerine ait dizi bilgileri NCBI "National Center for Biotechnology Information", (www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankasındaki verilerle BLAST (Altschul ve ark. 1997) programı üzerinden karşılaştırılarak filogenetik benzerlikleri incelenmiştir. Her bir veri MEGA v. 4.0 (Tamura ve ark. 2007) programındaki ClustalW kullanılarak hizalanmıştır. İncelenen izolatlar ve NCBI gen bankasındaki en yakın karşılıklarına ait evrimsel gelişim süreci Tamura-Nei modeline (Tamura ve Nei 1993) dayalı olarak Neighbor Joining (NJ) (Satiou ve Nei 1987) yöntemi ile 1000 tekrarlı (Bootstrap 1000) olarak incelenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. İncelenen Un Örneklerinden Filamentli Fungusların İzolasyonu

İncelenen un örneklerinin direk veya dilüsyonlarının RBCA ve DRBA ortamlarına uygulanmasını takip eden 25 °C'deki 14 günlük inkübasyonda 3. günden itibaren farklı morfolojilere sahip küf kolonilerinin geliştiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.1).

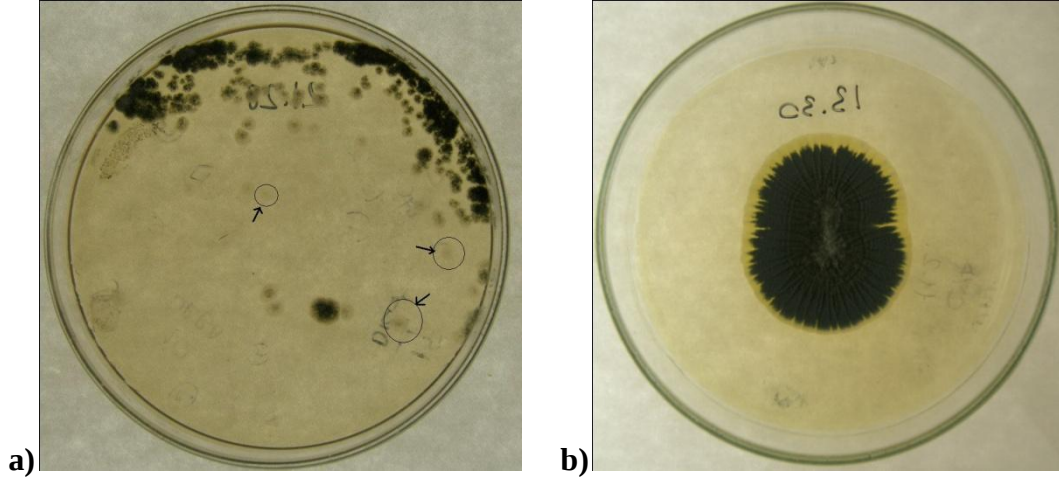


Şekil 3.1. İncelenen örneklere ait izolasyon ortamında elde edilen filamentli fungus kolonileri

3.2. Tek Spor İzolasyonu ve Kültürlerin Muhafazası

Czapek Dox Agar (CZ) ortamına “Çizgi ekim tekniği” ile inokule edilip 25 °C’de 24-48 saat süreyle inkübe edilmesiyle tek düşmüş olan sporların germinasyonu gözlemlenmiştir (Şekil 3.2a). Bu germinasyon alanının kesilerek MEA ortamına aktarılması ve uygun koşullarda inkübe edilmesi sonrasında tek bir spordan meydana gelen koloni elde edilmiştir (Şekil 3.2b). Tek ırka ait koloniden +4 °C’de muhafaza etmek üzere yatık MEA tüplerine inokulasyon ve inkübasyon sonrasında aynı tip koloninin kontaminasyonsuz bir şekilde gelişmiş olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.3a) ve muhafazaya alınmıştır. Ayrıca +4 °C’de liyofilize

halde muhafaza edilmek üzere hazırlanan cryo-viallerde ise nem kalmamış olduğu kontrol edilerek muhafazaya alınmıştır (Şekil 3.3b).



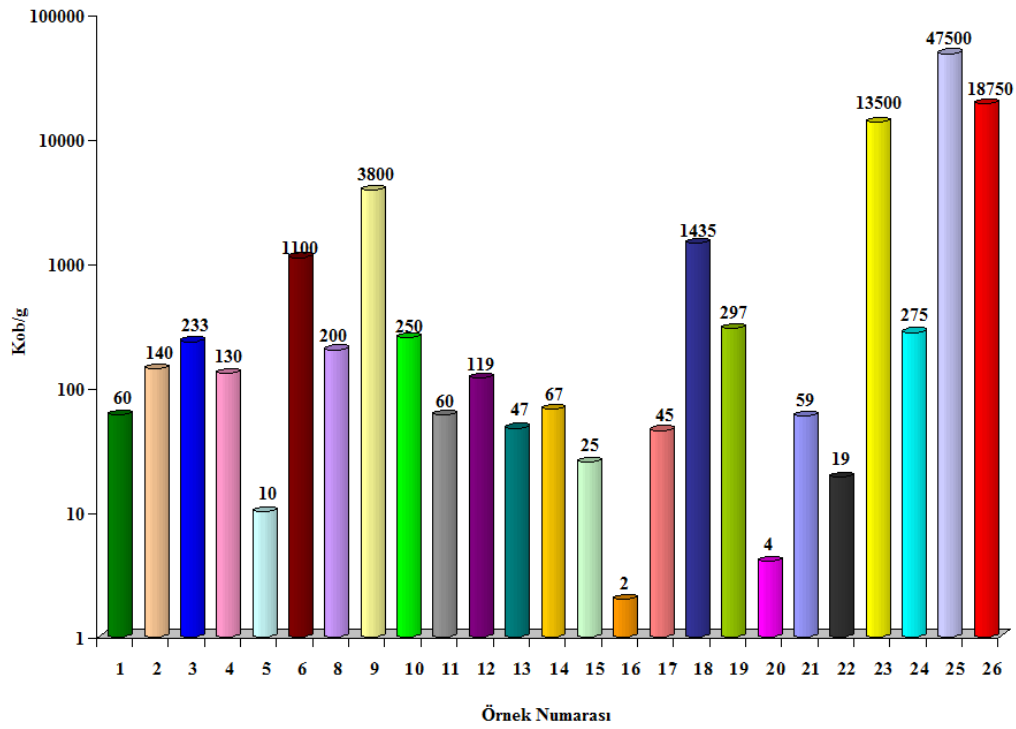
Şekil 3.2. A) Tek spor izolasyonunda elde edilen germinasyon bölgeleri, B) Tek spor izolasyonu ile elde edilen saf kültür



Şekil 3.3 A) Yatık MEA tüplerinde hazırlanan mikofungus stoğu, B) Mikorfungusların % 15'lik yağsız süt tozu ortamında hazırlanan liyofilize stokları

İncelenen un örneklerinin gramında bulunan ve direk ekim yöntemi veya dilüsyon yöntemi ile belirlenen toplam canlı küf sayısı Şekil 3.4'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek küf içeriği 47.500 kob/g ile 25 no'lu çavdar

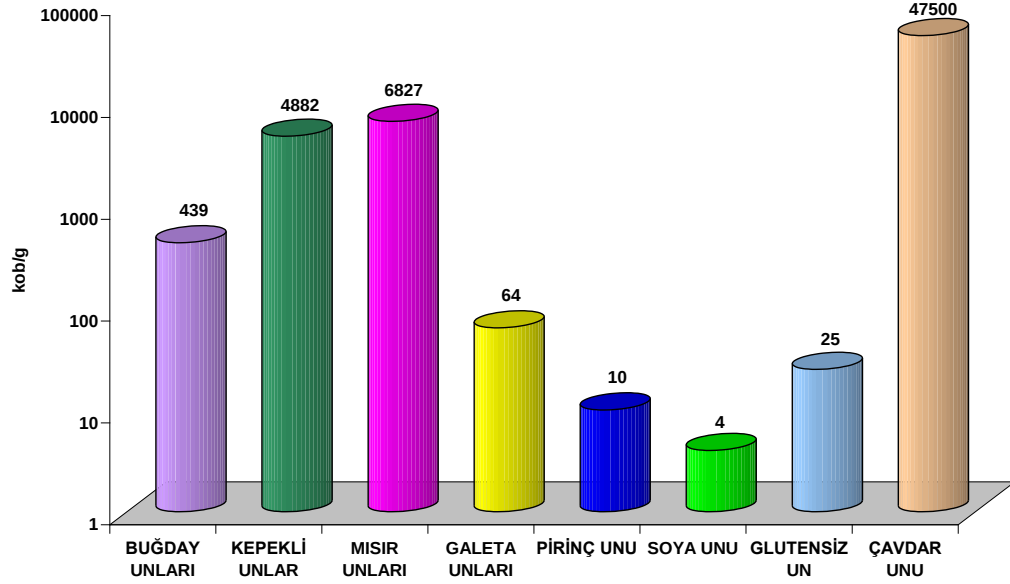
ununda belirlenmiştir. Bunu 18.750 kob/g ile 26 no'lu mısır unu, 13.500 kob/g ile 23 no'lu kepekli un, 3.800 kob/g ile 9 no'lu yulaf unu karışımı buğday unu, 1.435 kob/g ile 18 no'lu mısır unu ve 1.100 kob/g ile 6 no'lu kepekli un takip etmektedir. Diğer un örnekleri ise (1 no'lu buğday unu, 2 no'lu sert buğday unu, 3 no'lu özel karışimli buğday unu, 4 no'lu galeta unu, 5 no'lu pirinç unu, 8 no'lu buğday unu, 10 no'lu vitaminli ve mineralli buğday unu, 11 no'lu galeta unu, 12 no'lu buğday unu, 13 no'lu buğday unu, 14 no'lu buğday unu, 15 no'lu glutensiz un, 17 no'lu kepekli un, 19 no'lu mısır unu, 21 no'lu buğday unu, 22 no'lu buğday unu, 24 no'lu buğday unu) 10 ile 297 kob/g arasında bir küf yükü göstermiştir. 16 no'lu galeta unu (2 kob/g) ve 20 no'lu soya unu (4 kob/g) koloni sayısı açısından toplam canlı sayımında değerlendirilebilir aralığın (10-100 kob/petri) dışında olmasına rağmen, elde edilmiş olan küflerin mikotoksijenik potansiyellerinin değerlendirilmesi için göz ardı edilmemiştir.



Şekil 3.4. İncelenen un örneklerdeki toplam fungus sayısının örneklere göre dağılımı

İncelenen un örneği gruplarına göre ortalama küf sayısının dağılımı Şekil 3.5'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en fazla küf yükü 47.500 kob/g ile çavdar ununda belirlenmiştir. Bunu 6.827 kob/g ile mısır unları, 4.882 kob/g ile

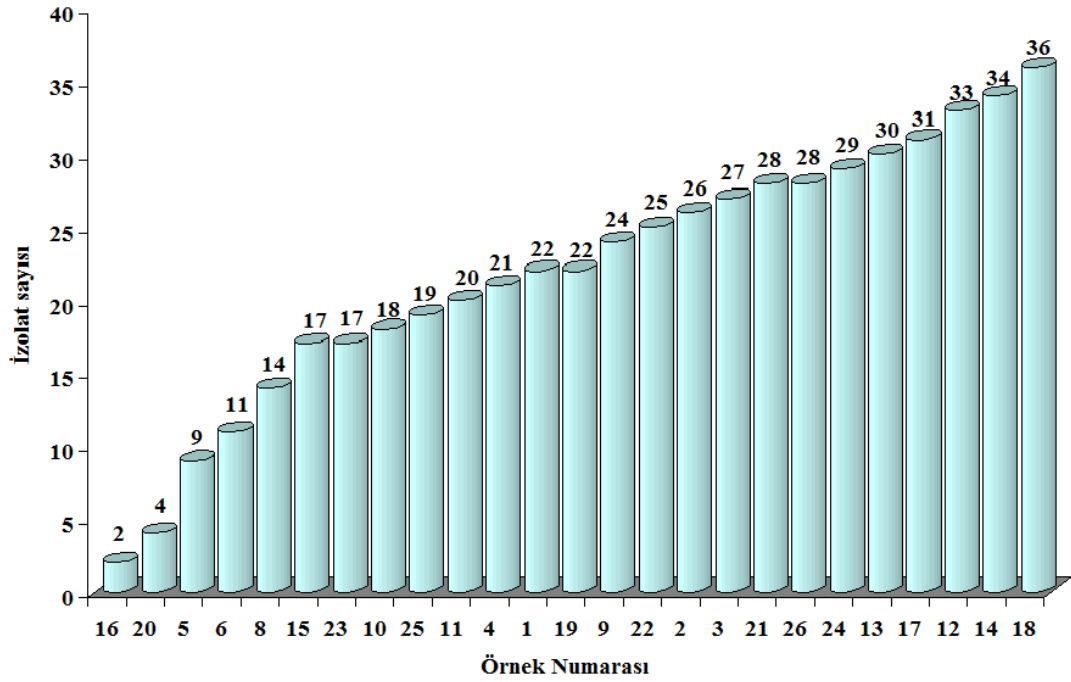
kepekli unlar ve 439 kob/g ile buğday unları takip etmektedir. Diğer un gruplarının ise (soya unu, pirinç unu, glutensiz un ve galeta unları) 4 ile 64 kob/g aralığında bir filamentli fungus içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir.



Şekil 3.5. İncelenen un örneği tiplerine göre ortalama fungus sayısının dağılımı

25 farklı un örneğinin filamentli fungus içeriği yönünden incelenmesi sonucunda toplam 547 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolat sayısının un örneklerine göre dağılımı Şekil 3.6'da verilmiştir. Elde edilebilen toplam izolatin 36 adeti (% 6,58) 18 no'lu mısır unu, 34 adeti (% 6,22) 14 no'lu buğday unu, 33 adeti (% 6,03) 12 no'lu buğday unu 31 adeti (% 5,67) 17 no'lu kepekli un, 30 adeti (% 5,48) 13 no'lu buğday unu, 29 adeti (% 5,30) 24 no'lu buğday unu, 28 adeti (% 5,12) 26 no'lu mısır unu ve 21 no'lu buğday unundan elde edilmiştir. Diğer un örneklerden ise (16 no'lu galeta unu, 20 no'lu soya unu, 5 no'lu pirinç unu, 6 no'lu kepekli un, 8 no'lu buğday unu, 15 no'lu glutensiz un, 23 no'lu kepekli un, 10 no'lu vitaminli ve mineralli buğday unu, 25 no'lu çavdar unu, 11 no'lu galeta unu, 4 no'lu galeta unu, 1 no'lu buğday unu, 19 no'lu mısır unu, 9 no'lu Yulaf unu karışıklı Buğday Unu, 22 no'lu Buğday Unu, 2 no'lu Sert

buğday unu, 3 no'lu buğday unu) 2-27 adet (% 0,37-4,94) arasında izolat elde edilmiştir.



Şekil 3.6. İncelenen un örneklerinden elde edilebilen izolat miktarları

3.3. İncelenen Un Örneklerinden İzole Edilen Filamentli Fungusların Klasik Teknikler ile teşhisi

25 farklı un örneğinden elde edilen 543 adet izolatın klasik teknikler ile incelenmesi sonucu 14 farklı cinse ait 55 tür belirlenmiştir. Bu türlerin 1 tanesi *Acremonium* sp. (% 1,8), 1 tanesi *Alternaria* sp. (% 1,8), 13 tanesi *Aspergillus* sp. (% 23,6), 2 tanesi *Cladosporium* sp. (% 3,6), 2 tanesi *Eurotium* sp. (% 3,6), 1 tanesi *Fennelia* sp. (% 1,8), 3 tanesi *Fusarium* sp. (% 5,5), 1 tanesi *Mucor* sp. (% 1,8), 2 tanesi *Paecilomyces* sp. (% 3,6), 23 tanesi *Penicillium* sp. (% 41,8), 1 tanesi *Rhizopus* sp. (% 1,8), 1 tanesi *Scopulariopsis* sp. (% 1,8), 2 tanesi *Trichoderma* sp. (% 3,6), 1 tanesi *Ulocladium* sp. cinsi üyesidir. Bu cinslere ilaveten 1 adet Steril misel (% 1,8) tanımlanmıştır. Her bir numuneye ait identifikasyon sonuçları Çizelge 3.1-3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. 1 ve 2 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

1 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	2 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus candidus</i> Link	9	<i>Aspergillus candidus</i> Link	3
<i>Aspergillus flavus</i> Link	2	<i>Aspergillus flavus</i> Link	2
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	3	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	2
<i>Penicillium solitum</i> Westling	6	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	2
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1
		<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	5
		<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	5
		<i>Penicillium miczynskii</i> K.M. Zalessky	2
		<i>Penicillium rugulosum</i> Thom	1
		<i>Penicillium solitum</i> Westling	1
		<i>Penicillium waksmanii</i> K.M. Zalessky	2

Çizelge 3.2. 3 ve 4 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

3 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	4 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus candidus</i> Link	7	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	4
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	2	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	1
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	1	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	1	<i>Penicillium commune</i> Thom	13
<i>Cladosporium</i> sp. Link	1	<i>Penicillium solitum</i> Westling	1
<i>Fennellia nivea</i> (B.J. Wiley & E.G. Simmons) Samson	10	<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1		
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	1		
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	1		
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	1		
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	1		

Çizelge 3.3. 5 ve 6 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

5 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	6 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus candidus</i> Link	1	<i>Aspergillus candidus</i> Link	7
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1	<i>Aspergillus flavus</i> Link	1
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	1	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	1	<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	1
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	2		
<i>Ulocladium atrum</i> Preuss	1		

Çizelge 3.4. 8 ve 9 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

8 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	9 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus candidus</i> Link	1	<i>Aspergillus candidus</i> Link	3
<i>Aspergillus flavus</i> Link	1	<i>Aspergillus flavus</i> Link	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	1	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	1	<i>Cladosporium</i> sp. Link	1
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	1	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	1
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	11
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	2	<i>Penicillium decumbens</i> Thom	1
<i>Fennellia nivea</i> (B.J. Wiley & E.G. Simmons) Samson	1	<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	1
<i>Penicillium decumbens</i> Thom	1		
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	2		
<i>Mucor</i> sp.	1		
<i>Trichoderma reesei</i> E.G. Simmons	1		

Çizelge 3.5. 10 ve 11 numaralı numunelere ait izolatların identifikasyon sonuçları

10 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	11 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Acremonium</i> sp. Link ex. Fr.	1	<i>Aspergillus flavus</i> Link	10
<i>Aspergillus candidus</i> Link	1	<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	7
<i>Aspergillus flavus</i> Link	2	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	1
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	1	<i>Penicillium commune</i> Thom	2
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	1		
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1		
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1		
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	6		
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	1		
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	1		

Çizelge 3.6. 12 ve 13 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

12 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	13 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	1	<i>Aspergillus candidus</i> Link	5
<i>Aspergillus candidus</i> Link	10	<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	3
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	2	<i>Aspergillus flavus</i> Link	2
<i>Aspergillus flavus</i> Link	8	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	1	<i>Mucor</i> sp. Mich. ex Fr.	1
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	1	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	5
<i>Mucor</i> sp. Mich. ex Fr.	2	<i>Penicillium decumbens</i> Thom	1
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	1	<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	3
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1	<i>Penicillium miczynskii</i> K.M. Zalessky	1
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	2	<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	8
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	2		
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	2		
<i>Rhizopus</i> sp.	1		

Çizelge 3.7. 14, 15 ve 16 numaralı numunelere ait izolatların identifikasyon sonuçları

14 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	15 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus flavus</i> Link	10	<i>Aspergillus candidus</i> Link	10
<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	1	<i>Aspergillus flavus</i> Link	1
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	2	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	1
<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	1	<i>Penicillium</i> sp.	1
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	3	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	1
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	1	<i>Penicillium restrictum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott	3
<i>Fusarium</i> sp.	1	<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1	16 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	8	<i>Aspergillus candidus</i> Link	1
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	5	<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	1		

Çizelge 3.8. 17 ve 18 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

17 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	18 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus candidus</i> Link	4	<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	1
<i>Aspergillus flavus</i> Link	6	<i>Aspergillus candidus</i> Link	2
<i>Aspergillus foetidus</i> Thom & Raper	1	<i>Aspergillus flavus</i> Link	10
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	6	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	3
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	2	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	3
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	2	<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	1
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	1
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	3	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	6
<i>Penicillium decumbens</i> Thom	2	<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	3
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	1	<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	1
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	1	<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	1
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	1	<i>Trichoderma reesei</i> E.G. Simmons	1
		<i>Trichoderma viride</i> Pers.	1

Çizelge 3.9. 19, 20 ve 21 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

19 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	21 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus flavus</i> Link	3	<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	1
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1	<i>Aspergillus candidus</i> Link	4
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	6	<i>Aspergillus flavus</i> Link	8
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	7	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	2
<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	1	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	2	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	3
20 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı		2
		<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	1	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	1	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	2
<i>Paecilomyces clavispurus</i> Hammill	2	<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	3
		<i>Penicillium decumbens</i> Thom	1
		<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	1
		<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	1

Çizelge 3.10. 22, 23 ve 24 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

22 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	23 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus candidus</i> Link	6	<i>Aspergillus candidus</i> Link	4
<i>Aspergillus flavus</i> Link	1	<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	4
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	3	<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	3
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	1	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	1
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	3	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	1
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	1	24 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1	<i>Aspergillus candidus</i> Link	11
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	4	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	1

Çizelge 3.10. (Devam) 22, 23 ve 24 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

22 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	24 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	3	<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	1	<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	1
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	5	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	1
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	1	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	4	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	1
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	1	<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	5
<i>Penicillium paxilli</i> Bainier	2	<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	5
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier	1

Çizelge 3.11. 25 ve 26 numaralı un örneklerine ait izolatların identifikasyon sonuçları

25 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı	26 no'lu örnek izolatları	İzolat sayısı
<i>Aspergillus flavus</i> Link	1	<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	2
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1	<i>Aspergillus candidus</i> Link	1
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1	<i>Aspergillus flavus</i> Link	4
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	1	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	6	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	1
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	2	<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1
<i>Penicillium rugulosum</i> Thom	6	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	1
Steril misel (Kahverengi)	1	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	2
		<i>Penicillium citrinum</i> Thom	5
		<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	1
		<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	3
		<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	1
		<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	2
		<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	2
		<i>Trichoderma viride</i> Pers.	1

Çalışmada elde edilen türlerin numunelerdeki dağılımına bakıldığında (Çizelge 3.12) *A. candidus* 25 örneğin 19'unda (%73), *A. flavus* 18'inde (% 69), *P. citrinum* 17'sinde (% 65), *A. niger* ve *P. griseofulvum* 12'sinde (% 46), *Eurotium chevalieri* ve *P. verrucosum* 10'unda (% 38) gözlemlenmiş olup en yaygın türler olarak belirlenmiştir. Diğer 47 türün ise incelenen numunelerde farklı oranlarda dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.12. İdentifiye edilen türlerin incelenen un örneklerindeki dağılımı

Tür	İzole Edildiği Numuneler	Bulunduğu Toplam Numune Sayısı	%
<i>Acremonium</i> sp. Link ex. Fr.	10	1	4
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	12	1	4
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	18, 21, 26	3	12
<i>Aspergillus candidus</i> Link	1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 26	19	73
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	12, 13	2	8
<i>Aspergillus flavus</i> Link	1, 2, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26	18	69
<i>Aspergillus foetidus</i> Thom & Raper	17	1	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen	8, 12, 13, 15, 20	5	19
<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	14	1	4
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	2, 3, 5, 9, 14, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26	12	46
<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	14	1	4
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	3, 20, 21	3	12
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	8, 22	2	8
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	2, 8, 10, 12, 17, 18, 22	7	27
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	3, 6, 10, 14, 17, 21, 22, 24, 26	9	35
<i>Cladosporium</i> sp.Link	3, 9	2	8

Çizelge 3.12. (Devam) İdentifiye edilen türlerin incelenen un örneklerindeki dağılımı

Tür	İzole Edildiği Numuneler	Bulunduğu Toplam Numune Sayısı	%
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	2, 7, 17, 22	4	15
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	8, 10, 16, 17, 21, 23, 24, 25, 26	9	35
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	5, 6, 8, 11, 14, 18, 19, 23, 24, 25	10	38
<i>Fennellia nivea</i> (B.J. Wiley & E.G. Simmons) Samson	3, 8	2	8
<i>Fusarium oxysporium</i> Schltdl.	18, 26	2	8
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	9, 18, 19, 26	4	15
<i>Fusarium</i> sp. Link ex. Fr.	14	1	4
<i>Mucor</i> sp. Mich. ex Fr.	8, 12, 13	3	12
<i>Paecilomyces clavispurus</i> Hammill	20	1	4
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	5, 24	2	8
<i>Penicillium</i> sp. Link ex. Gray	15	1	4
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	4, 23	2	8
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	4, 7, 12	3	12
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	3, 4, 10, 12, 14, 21, 24	7	27
<i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx	7	1	4
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	3, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26	17	65
<i>Penicillium commune</i> Thom	4, 11	2	8
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	2, 3, 21, 22	4	15
<i>Penicillium decumbens</i> Thom	7, 8, 9, 13, 17, 21	6	23
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	26	1	4

Çizelge 3.12. (Devam) İdentifiye edilen türlerin incelenen un örneklerindeki dağılımı

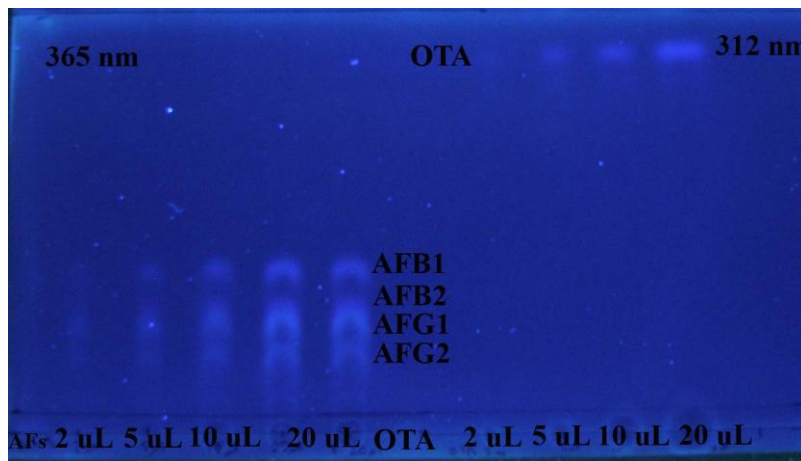
Tür	İzole Edildiği Numuneler	Bulunduğu Toplam Numune Sayısı	%
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	1, 2, 3, 8, 10, 12, 13, 14, 17, 21, 22, 24	12	46
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	7, 9, 18, 19, 22, 25, 26	7	27
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	10, 17, 25	3	12
<i>Penicillium miczynskii</i> K.M. Zalesky	2, 13	2	8
<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	18, 19, 26	3	12
<i>Penicillium paxilli</i> Bainier	22	1	4
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	18, 19, 26	3	12
<i>Penicillium restrictum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott	15	1	4
<i>Penicillium rugulosum</i> Thom	2, 25	2	8
<i>Penicillium solitum</i> Westling	1, 2, 4	3	12
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	3, 4, 12, 13, 14, 15, 17, 21, 24, 26	10	38
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	14	1	4
<i>Penicillium waksmanii</i> K.M. Zalesky	2	1	4
<i>Rhizopus</i> sp. Ehrenberger	12	1	4
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier	24	1	4
<i>Trichoderma reesei</i> E.G. Simmons	8, 18	2	8
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	18, 22, 26	3	12
<i>Ulacladium artrum</i> Preuss	5	1	4
Steril misel (Kahverengi)	25	1	4

İncelenen un örneklerinde en önemli mikotoksinlerden ikisi olan aflatoksin ve OTA üreticilerinin (*A. flavus*, *A. niger*, *A. alliaceus*, *A. ochraceus*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum*) baskın bir miktarda (23 örnekte; % 88,5) olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra diğer önde gelen mikotoksinlerden fumonisin, deoksinivalenol ve zearalenone üreticilerinin (*Fusarium oxysporium*, *F. solani*, *Fusarium* sp.) ise incelenen örneklerde oldukça düşük (5 örnekte; % 19) oranda

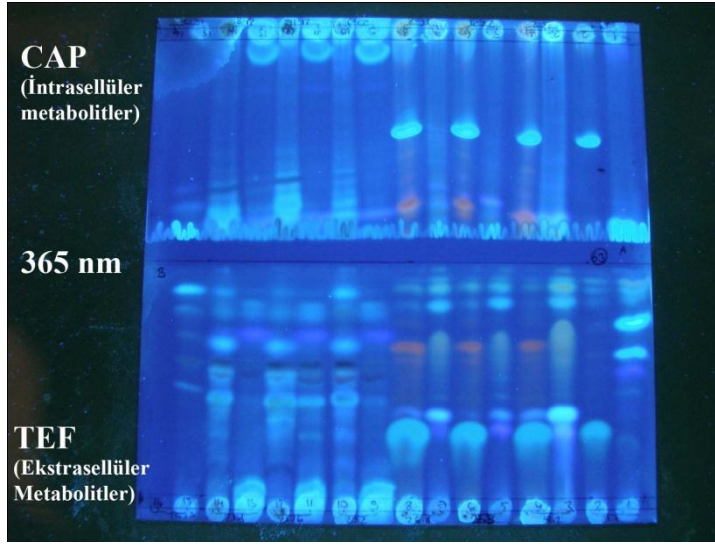
olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.12). Bu nedenle saf kültür ve numunede mikotoksin belirleme ve moleküler identifikasyon çalışmalarında aflatoksin ve aflatoksijenik küfler ile OTA ve okratoksijenik küfler üzerinde durulmuştur.

3.4. Elde Edilen İzolatların İTK Yöntemi ile Sekonder Metabolit Profillerinin İncelenmesi ve Kimyasal Karakterizasyonu

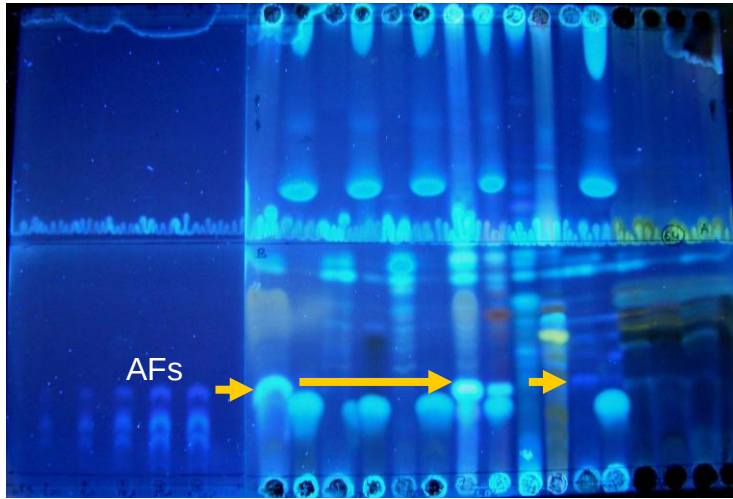
Aflatoksin standart karışımı ve OTA standardının İTK plakada 365 ve 312 nm’de incelenmesi sonucu aflatoksin karışımı 4 farklı band (Aflatoksin B1, B2, G1, G2) halinde gözlemlenmiştir. OTA ise R_f değeri aflatoksinden daha fazla olarak tek band şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 3.7). CYA ve MEA ortamlarında geliştirilen küflerin CAP ve TEF olmak üzere iki farklı organik çözücü eşliğinde intrasellüler ve ekstrasellüler metabolit profilleri İTK plakasında incelendiğinde ise birbirinden farklı tür ve strainlerin farklı metabolit profillerini yansıttığı belirlenmiştir (Şekil 3.8). İTK plakaların 365 nm’de yapılan incelemede spotlanan aflatoksin ve OTA standartları esas alınarak incelenen izolatların bu tür metabolitlere sahip olup olmadığı değerlendirilmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Her bir izolatın CYA ve MEA ortamlarındaki metabolit profilleri CAMAG HPTLC tarayıcı ile taranarak izolatlara ait metabolit sayısı (Şekil 3.11) ve bu metabolitlerin R_f değerleri belirlenmiştir (EK1).



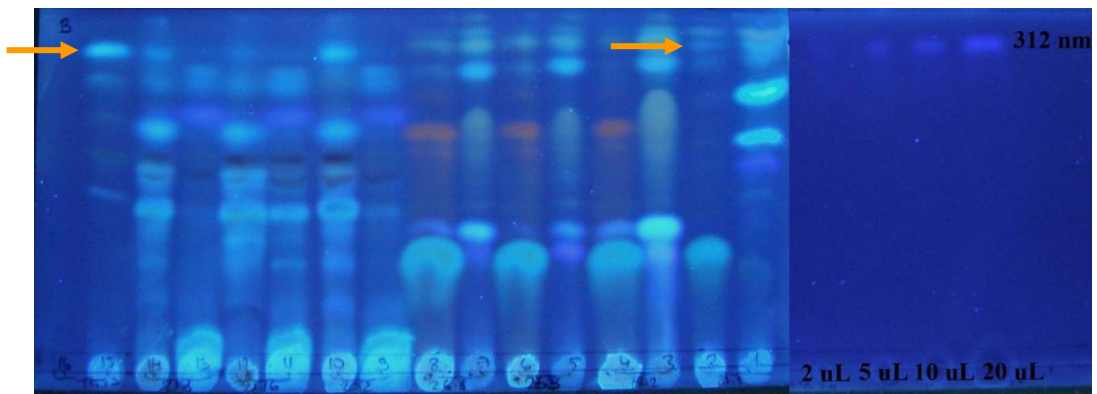
Şekil 3.7. İTK plakasında 365 nm’de aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2) ve 312 nm’de OTA’ nın görüntüsü



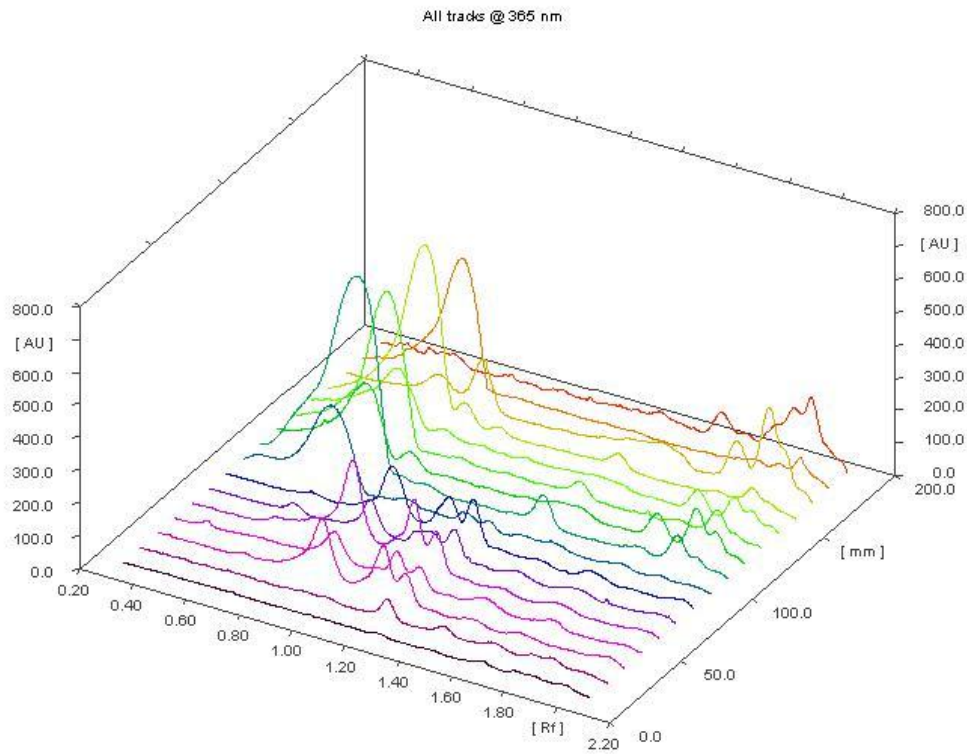
Şekil 3.8. İTK plağında metabolit profili örneği



Şekil 3.9. İncelenen küf izolatlarının ekstrasellüler metabolitlerinin aflatoksin standardı ile karşılaştırılması



Şekil 3.10. İncelenen küf izolatlarının ekstrasellüler metabolitlerinin OTA standardı ile karşılaştırılması



Şekil 3.11. Şekil 3.8’de verilen İTK plakasındaki intrasellüler metabolitlerin 365 nm’de CAMAG HPTLC ile analiz grafiği

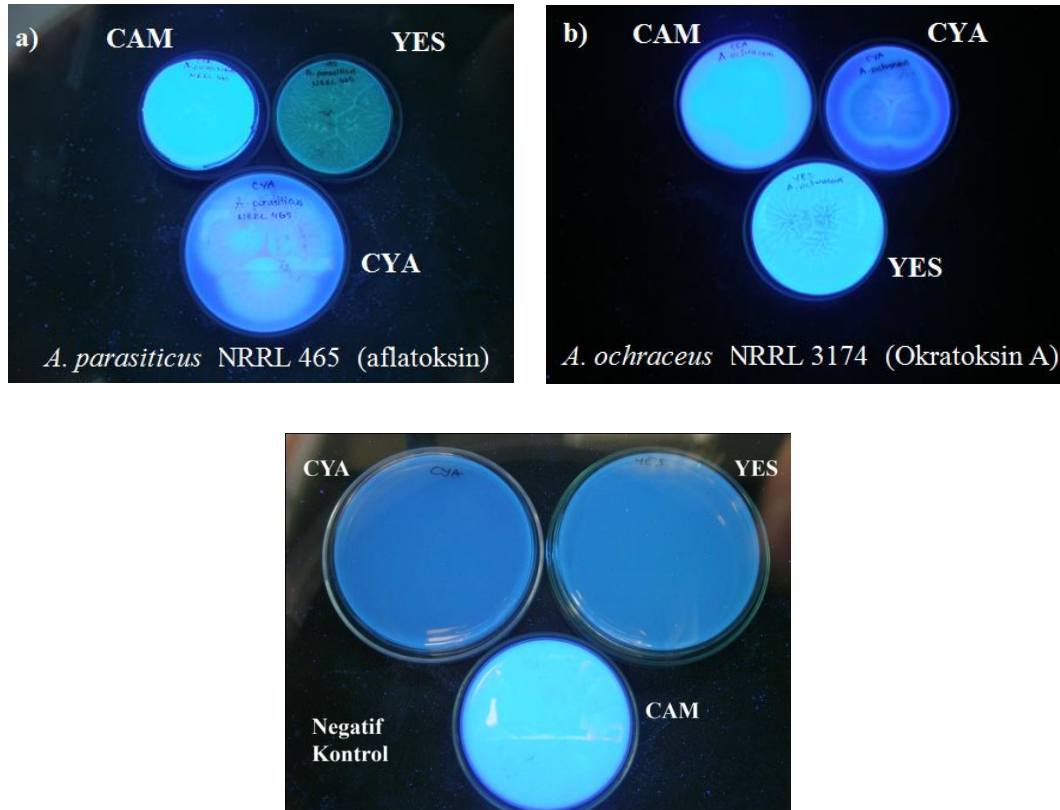
3.5. Literatürde Mikotoksijenik Olduğu Belirtilen İzolatların Kültür Ortamında Mikotoksijenik Özelliklerinin İncelenmesi

İdentifikasyonu tamamlanmış 543 izolattan 130 tanesinin literatürel olarak (Klich 2002; Samson ve ark. 2004a; Pitt 2000a) mikotoksijenik olduğu bildirilmiş türler olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.13).

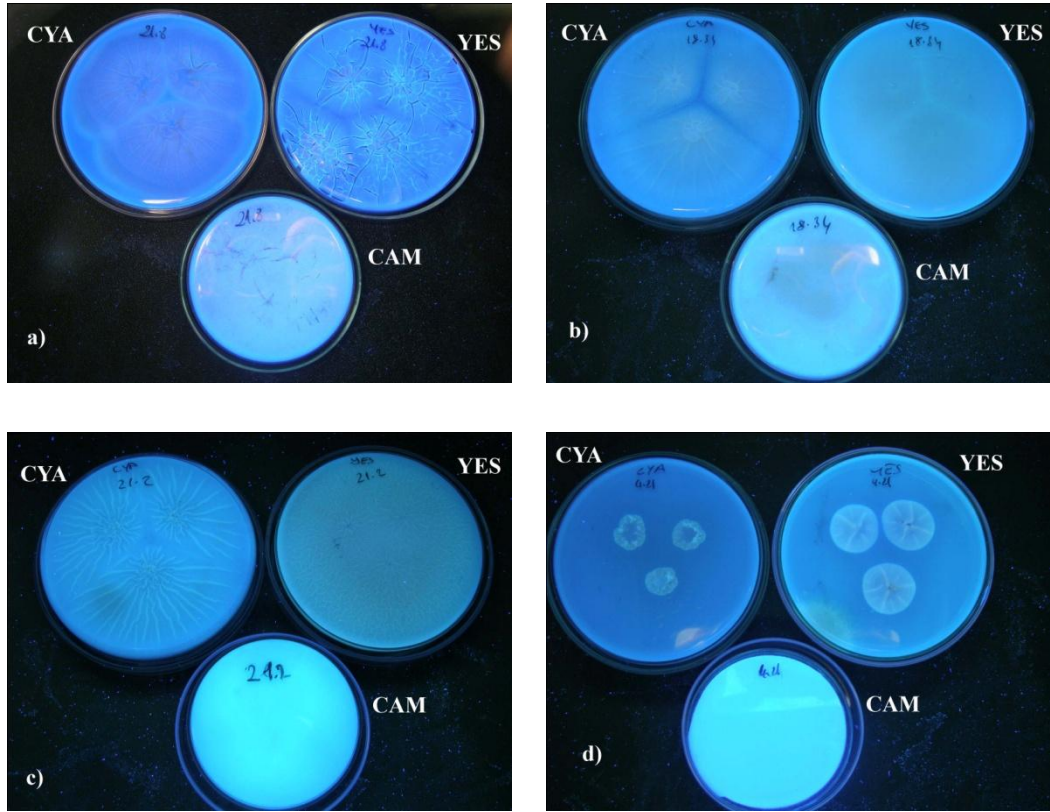
Çizelge 3.13’de açıklanan 130 izolatın aflatoksin ve OTA üretme yeteneklerine sahip olup olmadıklarını kültürel yöntemler ile kontrol etmek amacıyla tüm izolatlar pozitif ve negatif kontroller eşliğinde (Şekil 3.12) CYA, Yeast Extract Sucrose Agar (YES), Cocnut Agar Medium (CAM)’daki gelişmeleri 365 nm’de (Şekil 3.13) ve AFPA besi ortamındaki gelişmeleri (Şekil 3.14) ise koloni arkasının turuncu renkli olmasına bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.13. Geleneksel teknikler ile identifiye edilen mikotoksijenik tür, mikotoksijenik özellikleri, örneklere göre dağılımları ve izolat sayıları

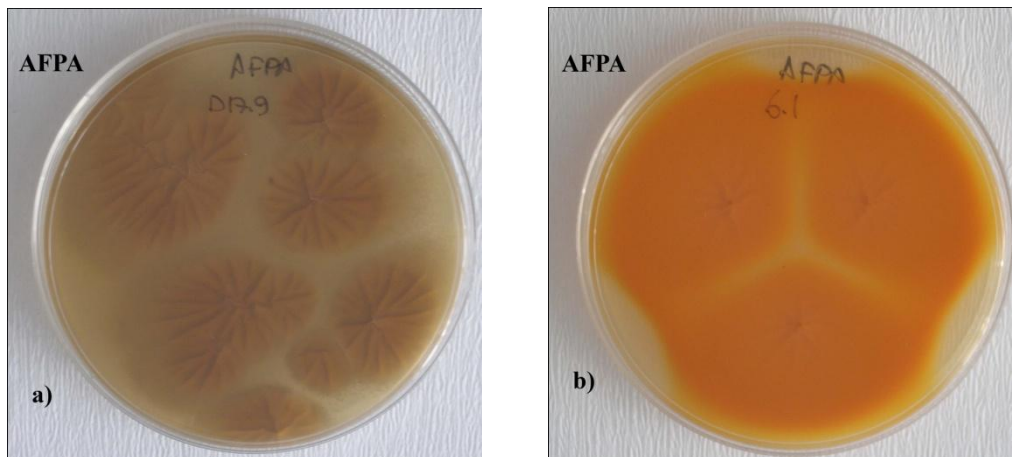
Tür	Önemli toksik metabolitleri	İzole Edildiği Numuneler	İzolat sayısı
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	Okratoksin A	18, 21, 26	4
<i>Aspergillus flavus</i> Link	Aflatoksin	1, 2, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26	76
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	Okratoksin A, Naphtho- γ -pyrones, Malformins	2, 3, 5, 9, 14, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26	24
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	Okratoksin A, Penilic acid, Xanthomeginin, Viomellein, Vioxanthin	3, 20, 21	4
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	Okratoksin A, Citrinin	3, 4, 12, 13, 14, 15, 17, 21, 24, 26	22
TOPLAM			130



Şekil 3.12. Kültürel yöntemlerde A) *A. parasiticus* NRRL 465 (aflatoksin; pozitif), B) *A. ochraceus* NRRL 3174 (OTA; pozitif) ve C) negatif kontrolün 365 nm'deki görüntüleri



Şekil 3.13. Küf izolatlarının kültürel ortamlarda ve 365 nm'deki görüntüleri; a) İzolat 21.8 (*A. ochraceus*) (OTA; pozitif), b) İzolat 18.34 (*A. flavus*) (aflatoksin; pozitif), c) İzolat 21.2 (*A. niger*) (OTA; pozitif), d) İzolat 4.21 (*Penicillium verrucosum*) (okratoksin A; pozitif)



Şekil 3.14. Küf izolatlarının AFPA ortamında görüntüleri; a) İzolat 17.9 (*A. flavus*); aflatoksin negatif, b) İzolat 6.1 (*A. flavus*); aflatoksin pozitif

CYA, YES ve CAM olmak üzere 3 farklı kültürel ortamda ve 365 nm altında gerçekleştirilen inceleme sonucu mavi-yeşil floresan ışımaya ve AFPA ortamında turuncu arka renge sahip olan izolatlar Çizelge 3.14’de verilmiştir.

Çizelge 3.14. İdentifiye edilen izolatların İTK ve kültürel ortamlardaki floresans özellikleri

İzolat No	Tür	AFPA (Turuncu Renk)	Kültürel Yöntem (365 nm)			İTK	
			YES	CYA	CAM	365 nm	312nm
<i>Aspergillus parasiticus</i> (NRRL 465)			+	+	+	Mavi, Yeşil	-
<i>Aspergillus ochraceus</i> (NRRL 3174)			+	+	+	-	Mavi
1.11	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
1.12	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
2.16	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
2.17	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
2.18	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
2.19	<i>A.flavus</i>	+	+	-	-	Yeşil	-
3.9	<i>A.ochraceus</i>		+	+	+	-	Mavi
3.23	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
3.24	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
4.21	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	Mavi
5.4	<i>A.niger</i>		+	+	+	-	-
6.1	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
8.7	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
9.9	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
9.10	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-

Çizelge 3.14. (Devam) İdentifiye edilen izolatların İTK ve kültürel ortamlardaki floresans özellikleri

İzolat No	Tür	AFPA (Turuncu Renk)	Kültürel Yöntem (365 nm)			İTK	
			YES	CYA	CAM	365 nm	312nm
9.11	<i>A.niger</i>		+	-	-	-	-
9.12	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
9.27	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
10.11	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
10.14	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
11.1	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
11.4	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
11.5	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
11.6	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
11.7	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
11.8	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	
11.10	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
11.11	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
11.12	<i>A.flavus</i>	+	+	-	-	Yeşil	-
11.13	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.1	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.15	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.16	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
12.17	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.2	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.3	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.4	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.5	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-

Çizelge 3.14. (Devam) İdentifiye edilen izolatların İTK ve kültürel ortamlardaki floresans özellikleri

İzolat No	Tür	AFPA (Turuncu Renk)	Kültürel Yöntem (365 nm)			İTK	
			YES	CYA	CAM	365 nm	312nm
12.25	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
12.29	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
13.1	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
13.6	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
13.9	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
13.12	<i>P.verrucosum</i>		+	+	+	-	-
13.16	<i>P.verrucosum</i>		+	-	+	-	-
13.20	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
13.25	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
13.27	<i>P.verrucosum</i>		+	-	-	-	-
13.29	<i>P.verrucosum</i>		+	-	-	-	-
13.30	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
14.1	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.2	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Yeşil	-
14.8	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
14.9	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.10	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.11	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.21	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.22	<i>A.niger</i>		+	-	-	-	-
14.23	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.24	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.28	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
14.29	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
15.1	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-

Çizelge 3.14. (Devam) İdentifiye edilen izolatların İTK ve kültürel ortamlardaki floresans özellikleri

İzolat No	Tür	AFPA (Turuncu Renk)	Kültürel Yöntem (365 nm)			İTK	
			YES	CYA	CAM	365 nm	312nm
15.4	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
17.1	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
17.2	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
17.3	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
17.4	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
17.6	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
17.7	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
17.8	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Yeşil	-
17.9	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
17.10	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
17.14	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Yeşil	-
17.20	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
17.31	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
17.36	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
18.2	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	Mavi
18.9	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
18.10	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
18.11	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
18.12	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
18.13	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
18.20	<i>A.niger</i>		-	+	-	-	-
18.22	<i>A.niger</i>		-	+	+	-	Mavi
18.23	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Yeşil	-

Çizelge 3.14. (Devam) İdentifiye edilen izolatların İTK ve kültürel ortamlardaki floresans özellikleri

İzolat No	Tür	AFPA (Turuncu Renk)	Kültürel Yöntem (365 nm)			İTK	
			YES	CYA	CAM	365 nm	312nm
18.24	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
18.25	<i>A.niger</i>		-	+	-	-	Mavi
18.34	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
18.35	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
18.38	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Yeşil	-
19.2	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
19.3	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
19.4	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
19.15	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
20.2	<i>A.ochraceus</i>		+	+	+	-	Mavi
21.1	<i>A.alliaceus</i>		+	+	+	Mavi, Yeşil	Mavi
21.2	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
21.3	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
21.6	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
21.8	<i>A.ochraceus</i>		+	+	+	-	Mavi
21.11	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
21.15	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
21.16	<i>A.ochraceus</i>		+	+	+	-	Mavi
21.17	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
21.18	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
21.25	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
21.24	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
21.27	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
22.1	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-

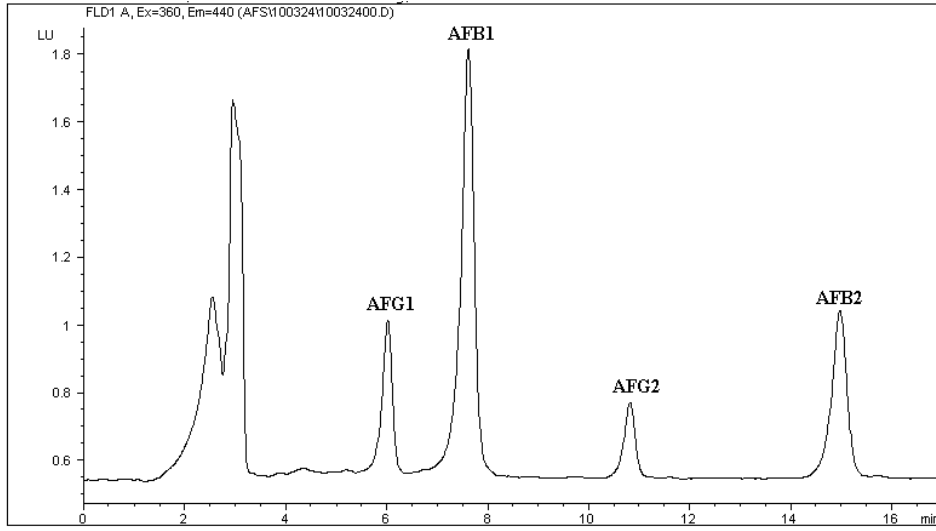
Çizelge 3.14. (Devam) İdentifiye edilen izolatların İTK ve kültürel ortamlardaki floresans özellikleri

İzolat No	Tür	AFPA (Turuncu Renk)	Kültürel Yöntem (365 nm)			İTK	
			YES	CYA	CAM	365 nm	312nm
22.2	<i>A.niger</i>		+	+	+	-	Mavi
22.3	<i>A.niger</i>		+	+	+	-	Mavi
22.15	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
24.3	<i>P.verrucosum</i>		+	+	+	-	-
24.19	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
24.25	<i>P.verrucosum</i>		+	+	+	-	-
24.26	<i>P.verrucosum</i>		+	+	+	-	-
24.27	<i>P.verrucosum</i>		-	+	-	-	Mavi
25.1	<i>A.niger</i>		+	-	+	-	-
25.11	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
26.2	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
26.3	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	Mavi
26.7	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-
26.8	<i>A.alliaceus</i>		+	+	+	Mavi, Yeşil	Mavi
26.9	<i>A.flavus</i>	+	+	-	+	Yeşil	-
26.10	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
26.11	<i>A.flavus</i>	+	+	+	+	Mavi, Yeşil	-
26.13	<i>A.niger</i>		-	-	-	-	-
26.20	<i>P.verrucosum</i>		-	-	-	-	-

3.6. Aflatoksinlerin HPLC ile Belirlenmesi

3.6.1. Aflatoksin Standardına Ait HPLC Sonuçları

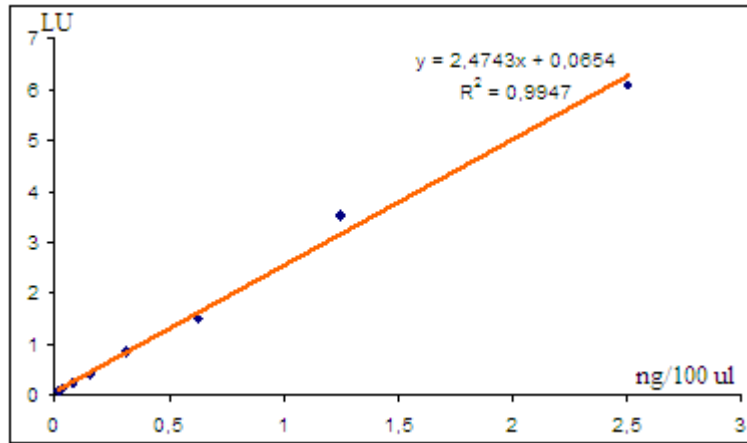
TFA ile türevlendirme yapılan aflatoksin karışımının HPLC koşullarında incelenmesi sonucu sırası ile G1, B1, G2 ve B2 olarak farklı zaman dilimlerinde sinyal verdiği ve işlemin 16 dakikada tamamlandığı belirlenmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Aflatoksin standart karışımına ait kromatogram örneği (Standart No: 3)

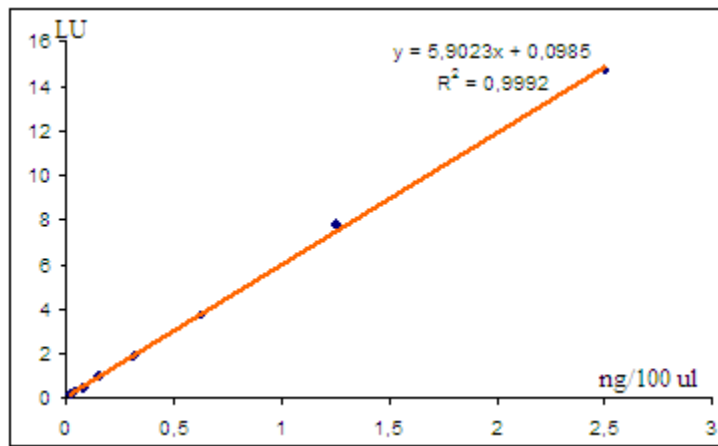
3.6.2. Kalibrasyon Eğrisi

Sekiz farklı standart konsantrasyon kullanması sonucu her bir aflatoksin için kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve minimum dedeksiyon değeri, minimum geçerli ölçüm miktarı ve R^2 değeri her bir kalibrasyon eğrisi için hesaplanmıştır (Şekil 3.16-19).



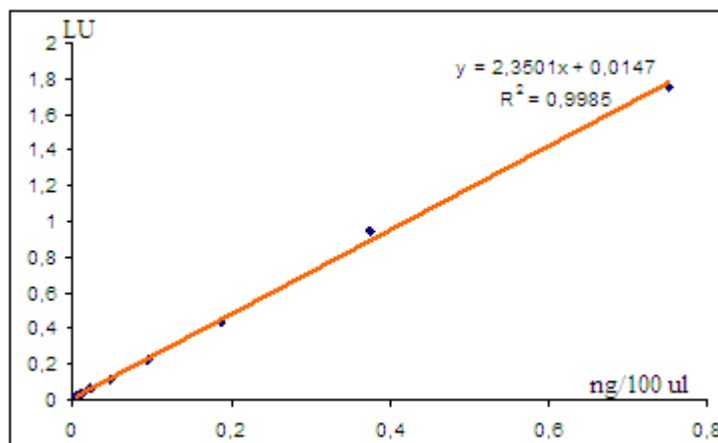
Şekil 3.16. Aflatoxin G1

LOD	2,24074 ng/100 µl
LOQ	6,72221 ng/100 µl



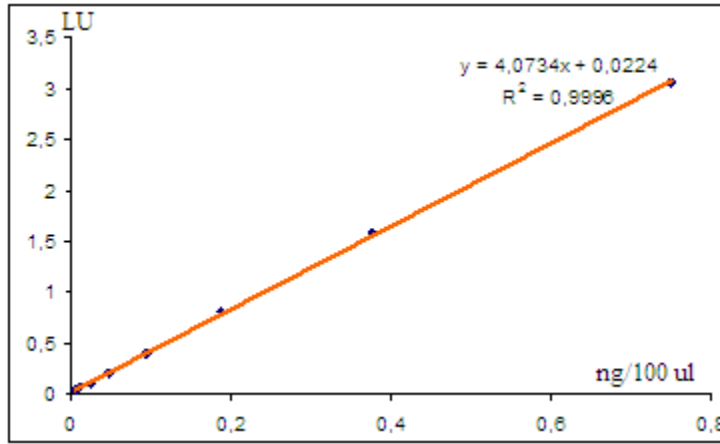
Şekil 3.17. Aflatoxin B1

LOD	0,85437 ng/100 µl
LOQ	2,56310 ng/100 µl



Şekil 3.18. Aflatoxin G2

LOD	0,36420 ng/100 µl
LOQ	1,09261 ng/100 µl



Şekil 3.19. Aflatoksin B2

LOD

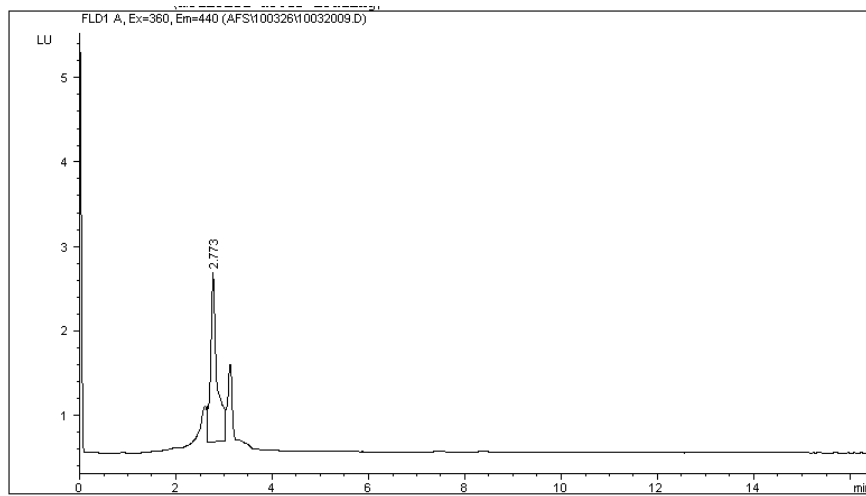
0,17663 ng/100 µl

LOQ

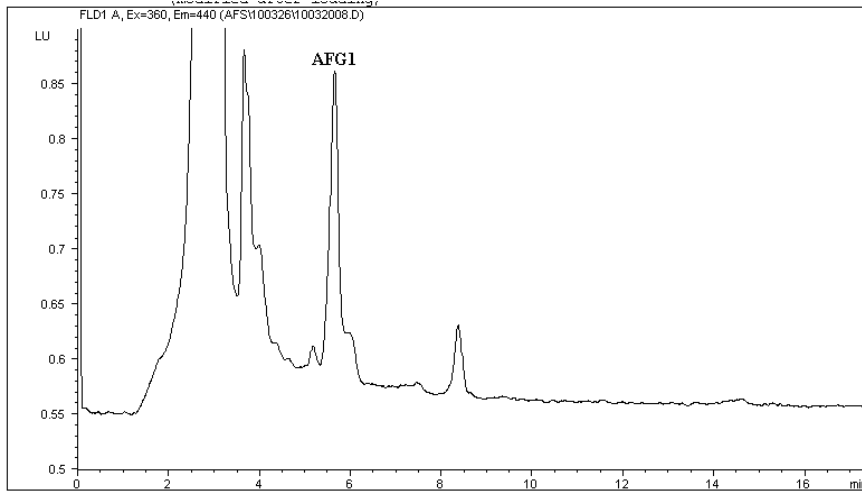
0,52988 ng/100 µl

3.6.3. *A. flavus* İzolatlarından Aflatoksinlerin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi

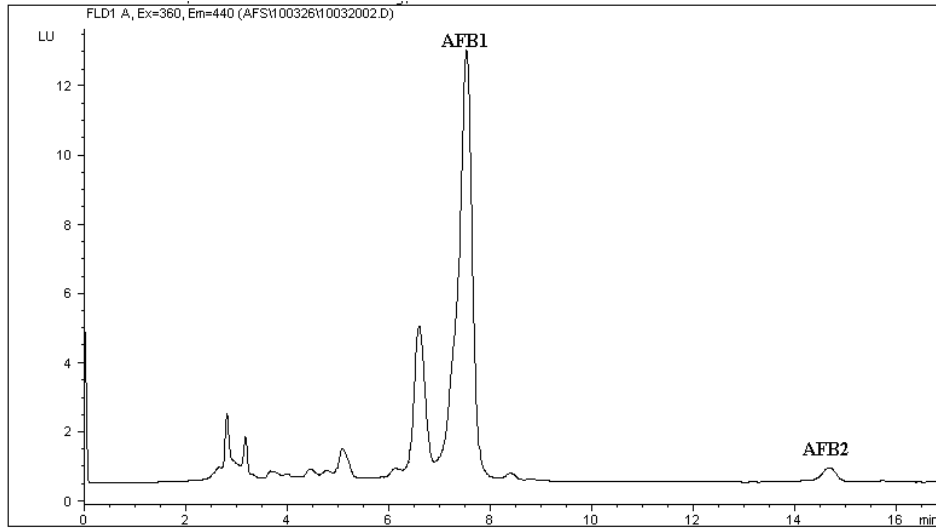
İncelenen toplam 130 mikotoksijenik küfden literatürlerden aflatoksijenik olduğu bilinen 76 adet izolatın aflatoksin üretme yeteneği negatif (Şekil 3.20) ve pozitif kontrol (Şekil 3.21) eşliğinde HPLC sistemi ile incelenmiş ve saf kültürden elde edilen ekstraktlardaki aflatoksin miktarı ng/ml cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 3.22, Şekil 3.23) (Çizelge 3.15).



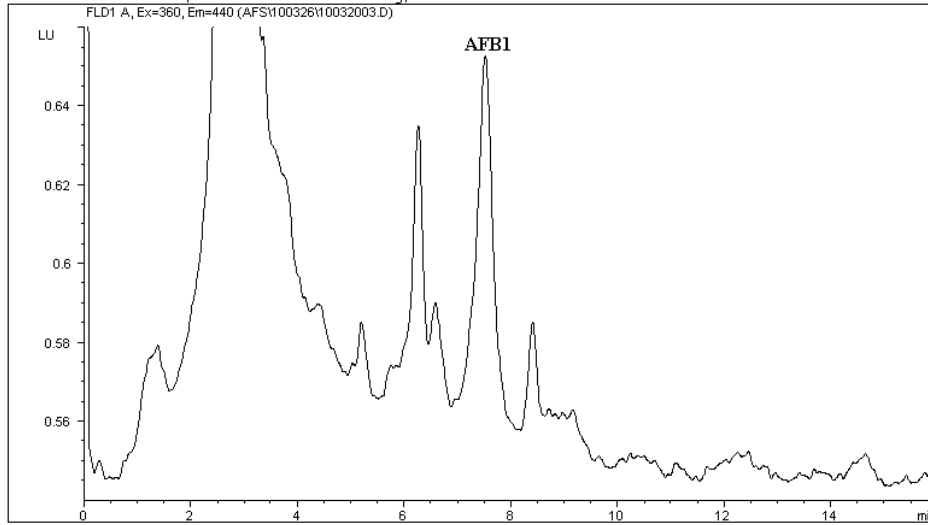
Şekil 3.20. Negatif kontrole ait kromatogram



Şekil 3.21. *A. parasiticus* NRRL 465'a ait kromatogram



Şekil 3.22. İzolat 18.35'e ait kromatogram



Şekil 3.23. İzolat 12.5'e ait kromatogram

Çizelge 3.15. Aflatoksin üretme yeteneğine sahip *A. flavus* izolatları

SIRA NO	İZOLAT NO	G1 ng/1 mL	B1 ng/1 mL	B2 ng/1 mL	G2 ng/1 mL
1	2.18	0,803	0,337	0,000	0,000
2	9.9	0,000	0,000	0,669	0,000
3	9.10	5,554	639,091	5,441	0,000
4	10.11	0,000	7,602	0,000	0,000
5	11.1	3,342	0,000	0,000	0,000
6	11.4	7,562	0,000	0,000	0,000
7	11.5	7,844	0,000	0,000	0,000
8	11.6	8,140	2,662	0,000	0,000
9	11.7	0,000	0,924	0,000	0,000

Çizelge 3.15. (Devam) Aflatoksin üretme yeteneğine sahip *A. flavus* izolatları

SIRA NO	İZOLAT NO	G1 ng/1 mL	B1 ng/1 mL	B2 ng/1 mL	G2 ng/1 mL
10	11.10	3,749	6,460	0,000	0,000
11	11.11	0,000	1,249	0,819	0,000
12	11.12	1,906	0,023	0,000	0,000
13	11.13	4,547	2,798	0,000	0,000
14	12.1	3,559	3,328	0,000	0,000
15	12.4	0,000	0,0239	0,000	0,000
16	12.5	0,000	1,429	0,000	0,000
17	12.15	0,851	0,000	0,000	0,000
18	12.17	0,000	1,984	0,000	0,000
19	12.25	0,003	0,000	0,000	0,000
20	13.1	0,000	132,284	0,963	79,791
21	14.2	2,670	42,187	0,245	0,000
22	14.9	0,000	0,624	0,000	0,000
23	14.10	0,000	1,874	0,000	0,000
24	14.21	3,336	0,000	0,000	0,000
25	14.24	1,106	0,000	0,000	0,000
26	14.29	0,000	1,472	0,000	0,000
27	15.1	2,280	1,161	0,000	0,000
28	17.7	0,198	66,946	0,853	0,000
29	17.8	0,000	1,28851481	0,000	0,000
30	17.10	0,000	80,529	1,285	0,000
31	17.14	0,000	8,433	0,000	0,000
32	18.9	0,000	197,186	1,317	0,000
33	18.10	7,624	8,564	0,000	0,000
34	18.11	0,000	0,063	0,000	0,000
35	18.12	0,962	1592,167	23,337	0,000
36	18.13	0,339	870,766	11,263	0,000

Çizelge 3.15. (Devam) Aflatoksin üretme yeteneğine sahip *A. flavus* izolatları

SIRA NO	İZOLAT NO	G1 ng/1 mL	B1 ng/1 mL	B2 ng/1 mL	G2 ng/1 mL
37	18.34	0,000	685,577	2,749	0,000
38	18.35	2,167	261,336	7,007	0,000
39	18.38	0,000	20,668	0,082	0,000
40	19.4	0,000	308,377	2,899	0,000
41	19.15	1,427	3,203	0,000	0,000
42	21.3	2,402	4,293	0,000	0,000
43	21.6	1,4230	6,325	0,000	0,000
44	21.15	0,531	0,000	0,000	0,000
45	21.17	0,154	0,795	0,000	0,000
46	21.18	1,605	12,576	0,274	0,000
47	21.24	2,526	16,585	0,603	0,000
48	21.25	0,347	18,642	0,931	0,000
49	21.27	3,317	1,332	0,039	0,000
50	25.11	2,334	176,820	1,8655	0,000
51	26.2	2,753	0,000	0,000	0,000
52	26.9	0,667	121,871	3,087	0,000
53	26.10	24,455	10438,330	126,913	0,000
54	26.11	44,510	9799,654	92,345	0,000

3.6.4. Un Örneklerinden Aflatoksinlerin Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi

3.6.4.1. İmmuno Aktif Kolon Verimliliği

Kalibrasyon eğrisini oluşturma üzere kullanılan 3 farklı standart derişiminin aflatoksin spesifik İAK'a uygulanması sonucu belirlenen % geri kazanım verimliliği Çizelge 3.16'de verilmiştir.

3.6.4.2. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

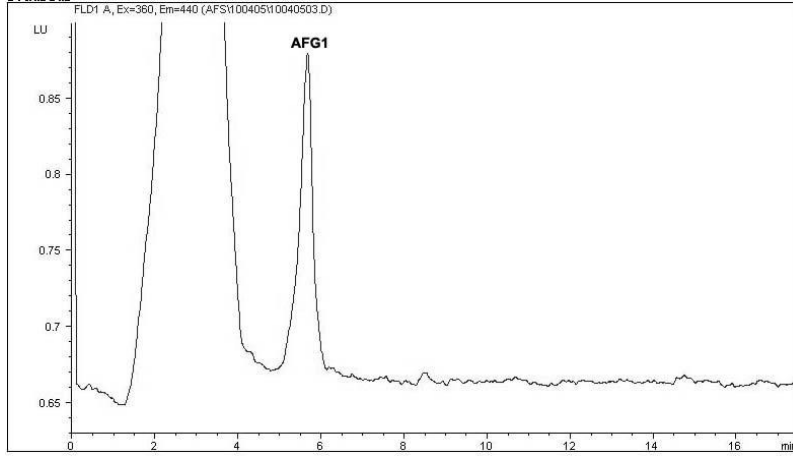
100 µl hacmindeki aflatoksin standart karışımının immuno aktif kolona uygulanması ve TFA ile türevlendirilmesi işleminin dört tekrarlı uygulanması sonucu elde edilen sonuçların kesinliği % RSD her bir aflatoksin için elde edilmiştir (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. İAK verimliliği (%) ve kesinliği (% RSD)

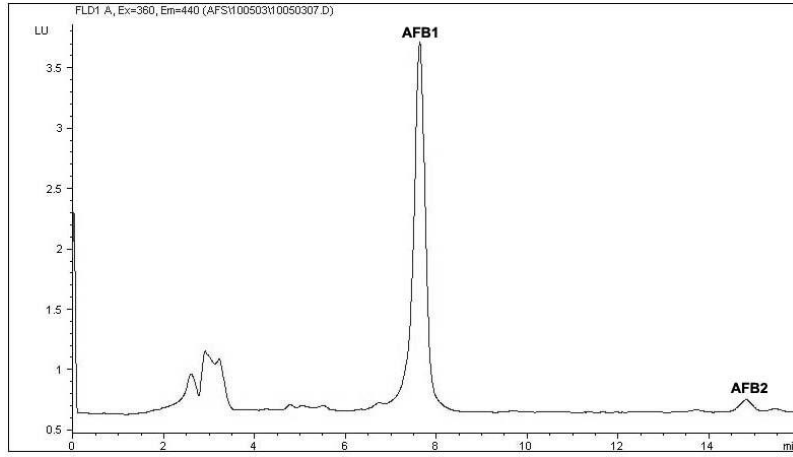
Aflatoksin tipi	% Verimlilik	Kesinlik (%RSD)
B1	% 84	2,2
B2	% 70	6,8
G1	% 99	0,5
G2	% 95	4,5

3.6.4.3. Un Örneklerindeki Aflatoksin Miktarı

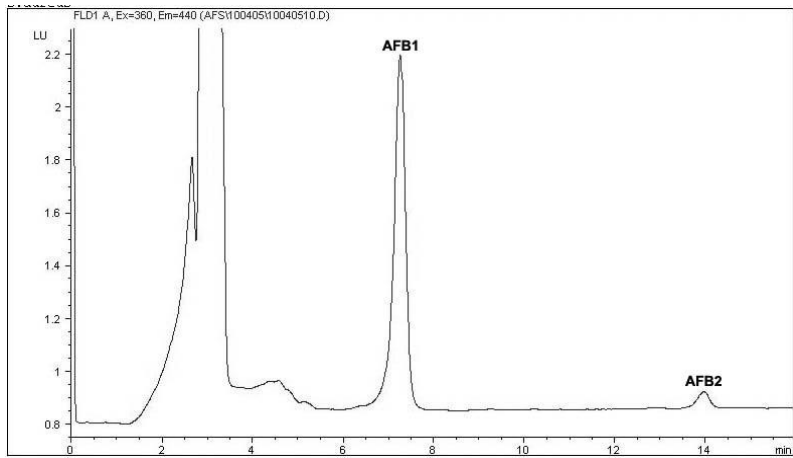
Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'ye spesifik İAK kullanılarak un örneklerinden elde edilen ekstraktın HPLC sisteminde incelenmesi sonucu standart ile aynı göç zamanına ve pik karakterine sahip kromatogramlar (Şekil 3.24, 25, 26) elde edilmiş ve aflatoksin varlığı belirlenen un örneklerindeki toksin miktarı µg/kg cinsinden hesaplanmıştır (Çizelge 3.17). Elde edilen veriler doğrultusunda aflatoksin üretme yeteneğine sahip izolatlar ile bu izolatların izole edildiği un örneklerindeki aflatoksin miktarı Çizelge 3.18'de kıyaslanmıştır.



Şekil 3.24. 12 no'lu un örneğine ait kromatogram



Şekil 3.25. 18 no'lu un örneğine ait kromatogram



Şekil 3.26. 26 no'lu un örneğine ait kromatogram

Çizelge 3.17. Aflatoksin içeren un örnekleri ve aflatoksin miktarları

Un Örneği (Enjeksiyon sırası)	G1 (µg/kg)	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)
UN1(3)	0,000	0,026	0,030
UN4(2)	0,070	0,000	0,000
UN12(1)	6,573	0,000	0,000
UN15(3)	0,125	0,000	0,000
UN18(1)	0,000	23,212	0,796
UN18(2)	0,000	19,487	0,436
UN18(3)	0,000	24,453	0,475
UN19(2)	0,000	0,135	0,000
UN19(3)	0,000	0,187	0,000
UN20(2)	0,000	0,153	0,000
UN24(1)	0,000	0,716	0,000
UN26(1)	0,000	11,548	0,390
UN26(2)	0,000	15,707	0,199
UN26(3)	0,032	17,699	0,208

Çizelge 3.18. Aflatoksijenik izolatlar ve un örneklerindeki aflatoksin miktarının kıyaslanması

İZOLAT NO	G1 ng/1 mL	B1 ng/1 mL	B2 ng/1 mL	G2 ng/1 mL	G1 (µg/kg)	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)	UN ÖRNEĞİ
1.11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,03	0,03	UN1
1.12	0,000	0,000	0,000	0,000				
2.18	0,80	0,34	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN2
2.19	0,000	0,000	0,000	0,000				
6.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN6
8.7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN8
9.9	0,000	0,000	0,67	0,000	0,000	0,000	0,000	UN9
9.10	5,55	639,09	5,44	0,000				
9.12	0,000	0,000	0,000	0,000				
9.27	0,000	0,32	0,000	0,000				

Çizelge 3.18. (Devam) Aflatoksijenik izolatlar ve un örneklerindeki aflatoksin miktarının kıyaslanması

İZOLAT NO	G1 ng/1 mL	B1 ng/1 mL	B2 ng/1 mL	G2 ng/1 mL	G1 (µg/kg)	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)	UN ÖRNEĞİ
10.11	0,000	7,60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN10
10.14	0,000	0,000	0,000	0,000				
11.1	3,34	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN11
11.4	7,56	0,000	0,000	0,000				
11.5	7,84	0,000	0,000	0,000				
11.6	8,12	2,66	0,000	0,000				
11.7	0,000	0,93	0,000	0,000				
11.8	0,000	0,000	0,000	0,000				
11.10	3,75	6,46	0,000	0,000				
11.11	0,000	1,25	0,82	0,000				
11.12	1,91	0,02	0,000	0,000				
11.13	4,55	2,80	0,000	0,000				
12.1	3,56	3,33	0,000	0,000	6,57	0,000	0,000	UN12
12.2	0,000	0,000	0,000	0,000				
12.3	0,000	0,000	0,000	0,000				
12.4	0,000	0,02	0,000	0,000				
12.5	0,000	1,43	0,000	0,000				
12.15	0,85	0,000	0,000	0,000				
12.17	0,000	1,98	0,000	0,000				
12.25	0,003	0,000	0,000	0,000				
13.1	0,000	132,28	0,96	79,79	0,000	0,000	0,000	UN13
13.6	0,000	0,000	0,000	0,000				
14.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN14
14.2	2,67	42,19	0,25	0,000				
14.9	0,000	0,62	0,000	0,000				
14.10	0,000	1,87	0,000	0,000				
14.11	0,000	0,000	0,000	0,000				
14.21	3,34	0,000	0,000	0,000				
14.23	0,000	0,000	0,000	0,000				
14.24	1,11	0,000	0,000	0,000				
14.28	0,000	0,000	0,000	0,000				
14.29	0,000	1,47	0,000	0,000				

Çizelge 3.18. (Devam) Aflatoksijenik izolatlar ve un örneklerindeki aflatoksin miktarının kıyaslanması

İZOLAT NO	G1 ng/1 mL	B1 ng/1 mL	B2 ng/1 mL	G2 ng/1 mL	G1 (µg/kg)	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)	UN ÖRNEĞİ
15.1	2,28	1,16	0,000	0,000	0,13	0,000	0,000	UN15
17.6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN17
17.7	0,20	66,95	0,85	0,000				
17.8	0,000	1,29	0,000	0,000				
17.9	0,000	0,000	0,000	0,000				
17.10	0,000	80,53	1,29	0,000				
17.14	0,000	8,43	0,000	0,000				
18.9	0,000	197,19	1,32	0,000	0,000	22,38	0,57	UN18
18.10	7,62	8,56	0,000	0,000				
18.11	0,000	0,06	0,000	0,000				
18.12	0,96	1592,17	23,34	0,000				
18.13	0,34	870,77	11,26	0,000				
18.23	0,000	0,000	0,000	0,000				
18.24	0,000	0,000	0,000	0,000				
18.34	0,000	685,58	2,75	0,000				
18.35	2,17	261,34	7,01	0,000				
18.38	0,000	20,67	0,08	0,000				
19.2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,16	0,000	UN19
19.4	0,000	308,38	2,90	0,000				
19.15	1,43	3,20	0,000	0,000				
21.3	2,40	4,29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN21
21.6	1,43	6,33	0,000	0,000				
21.15	0,53	0,000	0,000	0,000				
21.17	0,15	0,80	0,000	0,000				
21.18	1,61	12,58	0,27	0,000				
21.24	2,53	16,59	0,60	0,000				
21.25	0,35	18,64	0,93	0,000				
21.27	3,32	1,33	0,04	0,000				
22.1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	UN22
25.11	2,33	176,82	1,87	0,000	0,000	0,000	0,000	UN25

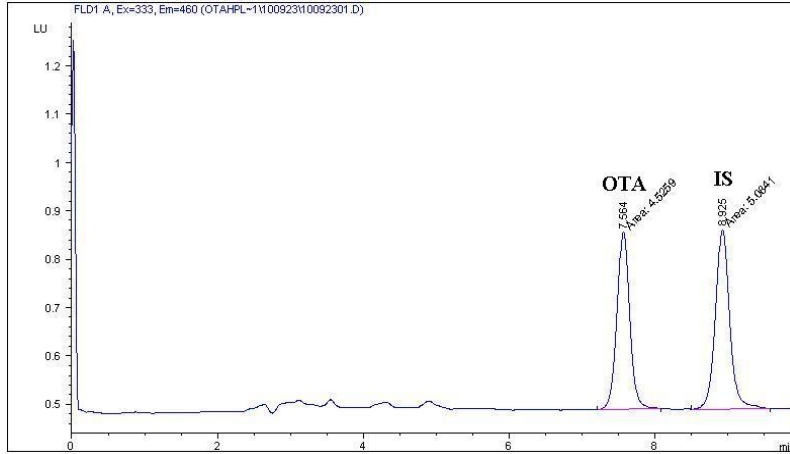
Çizelge 3.18. (Devam) Aflatoksijenik izolatlar ve un örneklerindeki aflatoksin miktarının kıyaslanması

İZOLAT NO	G1 ng/1 mL	B1 ng/1 mL	B2 ng/1 mL	G2 ng/1 mL	G1 (µg/kg)	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)	UN ÖRNEĞİ
26.2	2,75	0,000	0,000	0,000	0,03	14,99	0,27	UN26
26.9	0,67	121,87	3,09	0,000				
26.10	24,46	10438,33	126,91	0,000				
26.11	44,51	9799,65	92,35	0,000				
					0,000	0,000	0,000	UN3
					0,07	0,000	0,000	UN4
					0,000	0,000	0,000	UN5
					0,000	0,000	0,000	UN16
					0,000	0,15	0,000	UN20
					0,000	0,000	0,000	UN23
					0,000	0,72	0,000	UN24

3.7. OTA'nın HPLC ile Belirlenmesi

3.7.1. OTA Standardına Ait HPLC Sonuçları

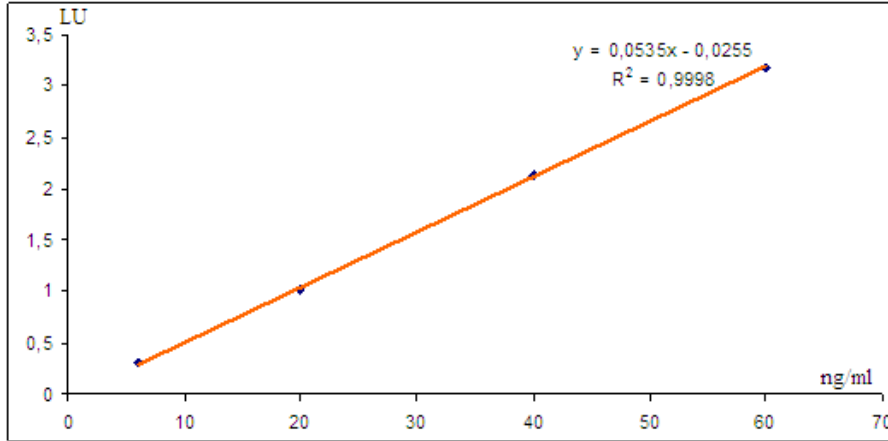
OTA'nın iç standart olarak kullanılan diflunisal (IS) eşliğinde HPLC sistemine uygulanması sonucu sırası ile OTA (R_f : 7,5) ve IS (R_f : 8,9) olarak farklı zaman dilimlerinde sinyal alındığı ve işlemin 10 dakikada tamamlandığı belirlenmiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. OTA standart kromatogramı

3.7.2. Kalibrasyon Eğrisi

Dört farklı konsantrasyonda OTA'nın kullanılması ile $R^2 = 0.9998$ değerine sahip kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Minimum dedeksiyon limiti (LOD); 1,238757 ve minimum geçerli ölçüm değeri (LOQ); 3,716271 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.28).

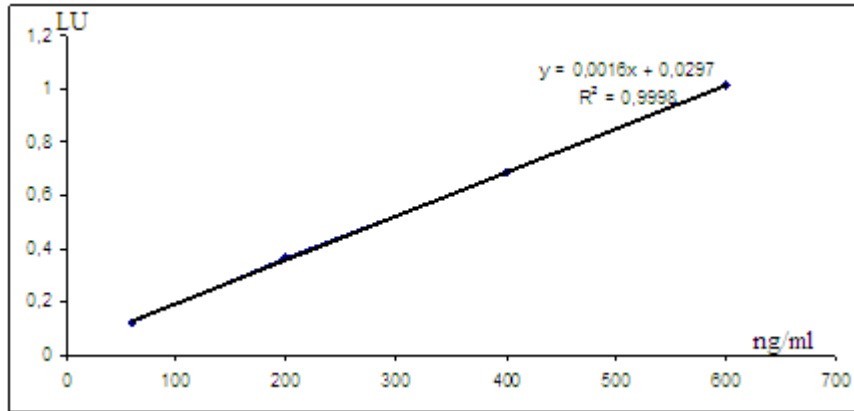


Şekil 3.28. OTA kalibrasyon eğrisi; b: 0,053534, a: -0,0255, LOD: 1,238757 ng/ml, LOQ: 3,716271 ng/ml

3.7.3. Matrikste Doğrusallık, İAK Verimliliğinin Belirlenmesi ve Kesinlik (Tekrar Edilebilirlik)

Kalibrasyon eğrisine denklik gösteren 4 farklı OTA konsantrasyonunun OTA içermeyen un örneğine (22 no'lu un örneği) ilave edilmesi ve HPLC sisteminde 3 tekrarlı ölçümü ile $R^2 = 0.9998$ değerine sahip kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Matriks eşliğinde elde edilen doğrusallığa sahip kalibrasyon eğrisinin LOD değeri 13.22, LOQ değeri ise 39.66 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.29).

Aynı OTA derişimlerinin uygulandığı matriksin OTA spesifik immuno aktif kolona uygulanması ve elde edilen örneklerin HPLC sistemine uygulanması ve işlemin 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmesi sonucu kullanılan immuno aktif kolonlerin geri kazanım verimliliği ve elde edilen verilerin kesinliği (%RSD) hesaplanmıştır (Çizelge 3.19).



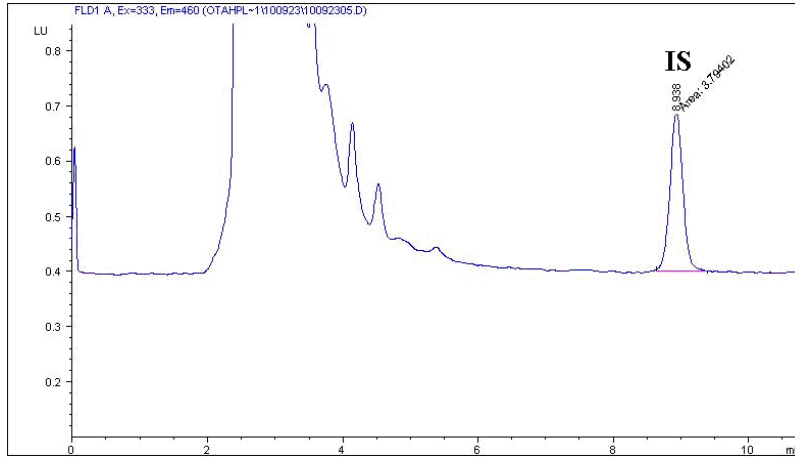
Şekil 3.29. Matrikste kalibrasyon eğrisi; LOD; 13.22 ng/ml, LOQ; 39,66 ng/ml

Çizelge 3.19. İAK'nun verimliliği (%) ve kesinliği (% RSD)

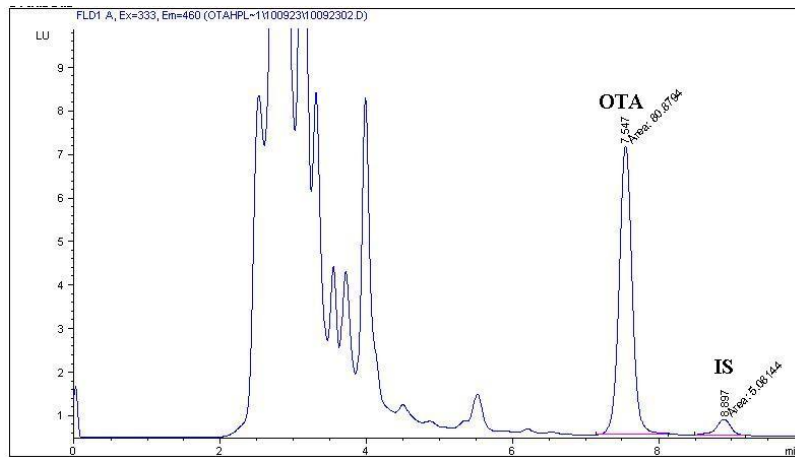
	% Verimlilik	Kesinlik (%RSD)
60 ng	83,31	9,3
200 ng	94,36	5,4
400 ng	79,61	22
600 ng	93,99	4,2

3.7.4. Okratoksijenik İzolatlardan OTA Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi

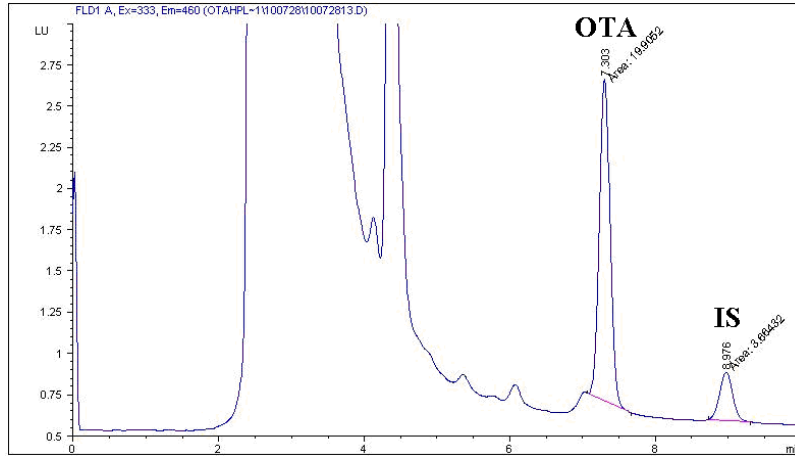
Literatürel olarak OTA üretme yeteneğine sahip olduğu bilinen ve kültürel ve İTK plakasında incelenen 54 adet küf izolatu pozitif ve negatif kontroller eşliğinde HPLC sisteminde incelenmiştir. Pozitif kontrol ve bazı izolatların standart ile aynı göç zamanı ve pik karakterine sahip sinyal verdiği belirlenmiştir (Şekil 3.30-3.32). Elde edilen veriler doğrultusunda incelenen okratoksijenik küflerin OTA üretme yetenekleri araştırılarak hem ölçüm yapılan ekstraktlarda ng/ml olarak hem de kullanılan agar bloklarda ng/g olarak OTA miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 3.20).



Şekil 3.30. Negatif kontrole ait kromatogram



Şekil 3.31. *A.ochraceus* NRRL 3174'un (pozitif kontrol) OTA kromatogramı



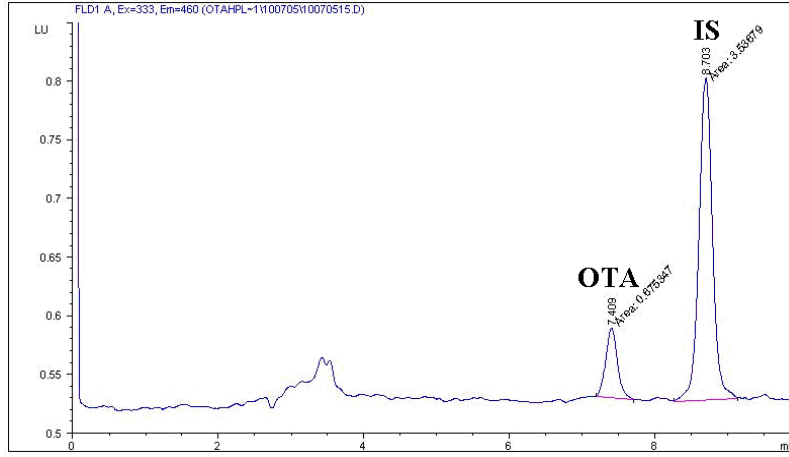
Şekil 3.32. İzolat 24.27 (*P. verrucosum*)’un OTA kromatogramı

Çizelge 3.20. OTA üretme yeteneğine sahip izolatlar ($LOQ_{OTA} = 3.71 \text{ ng/mL}$)

İZOLAT NO	ng/mL	İZOLAT NO	3 bloğun ağırlığı(g)	ng/g
4,21	15,117	4,21	0,32	47,24
5,4	1,181	5,40	0,32	3,69
12,16	1,454	12,16	0,23	6,32
12,29	1,407	12,29	0,25	5,63
13,12	153,515	13,12	0,15	1023,43
13,16	1,681	13,16	0,18	9,34
13,29	1,435	13,29	0,37	3,88
13,30	0,958	13,30	0,18	5,32
14,7	1,756	D14,7	0,15	11,71
14,8	1,352	14,8	0,3	4,51
14,22	1,729	14,22	0,21	8,23
17,1	2,306	D17,1	0,19	12,14
17,3	0,932	D17,3	0,16	5,83
17,5	1,141	D17,5	0,23	4,96
18,2	1,133	18,2	0,25	4,53
21,1	3697,098	21,1	0,13	28439,21
21,2	12,019	21,2	0,28	42,93
24,27	99,992	24,27	0,23	434,75
26,7	1,906	26,7	0,22	8,66
(+) Kontrol	290, 662	(+) Kontrol	0,27	1076,53
(-) Kontrol	0,000	(-) Kontrol	0,27	0,00

3.7.5. Un Örneklerinden OTA Ekstraksiyonu ve HPLC ile Belirlenmesi

25 g'lık un örneklerinden elde edilen ekstraktın OTA'ya spesifik İAK'na uygulanması ile elde edilen numunelerin HPLC sistemine uygulanması ile incelenen un örneklerindeki OTA'ya ait kromatogramlar Şekil 3.33'de verilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda un örneklerindeki OTA miktarları $\mu\text{g/kg}$ cinsinden hesaplanmıştır (Çizelge 3.21). OTA üretme yeteneğine sahip izolatlar ile bu izolatların izole edildiği un örneklerindeki OTA miktarları Çizelge 3.22'de karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



Şekil 3.33. Un18 örneğinde OTA kromatogramı

Çizelge 3.21. Un örneklerindeki OTA miktarı.

ÖRNEK	ug/kg	ÖRNEK	ug/kg	ÖRNEK	ug/kg	ÖRNEK	ug/kg
UN1	1,28	UN8	2,04	UN16	0,89	UN22	0,00
UN2(1)	3,02	UN9	1,32	UN17	0,00	UN23	0,00
UN2(2)	0,809	UN10	0,80	UN18(1)	4,04	UN24	1,15
UN2(3)	0,788	UN11	0,91	UN18(2)	5,116	UN25	1,37
UN3	1,73	UN12	0,87	UN18(3)	5,116	UN26	1,63
UN4	2,19	UN13	0,93	UN19	0,81		
UN5	0,94	UN14	0,00	UN20	0,00		
UN6	1,06	UN15	0,88	UN21	1,29		

Çizelge 3.22. Okratoksijenik izolatlar ve un örneklerindeki okratoksin A miktarının karşılaştırılması

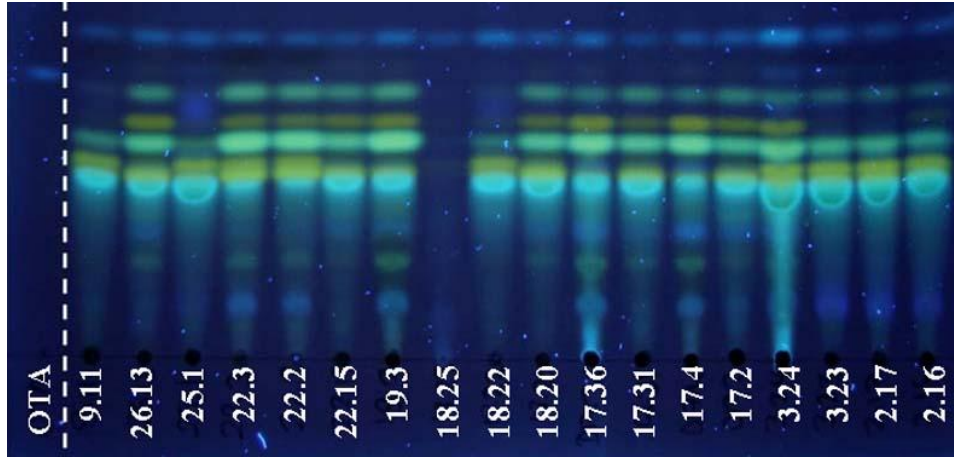
İZOLAT NO	ng/g	UN ÖRNEĞİ	ug/kg	İZOLAT NO	ng/g	UN ÖRNEĞİ	ug/kg
2.17	0,00	UN2	3.02	18.2	4,53	UN18	4,75
2.16	0,00			18.20	0,00		
3.9	0,00	UN3	1,73	18.22	0,00		
3.23	0,00			18.25	0,00		
3.24	0,00			19.3	0,00	UN19	0,81
4.21	47,24	UN4	2,19	20.2	0,00	UN20	0,00
5.4	3,69	UN5	0,94	21.1	28439,21	UN21	1,29
9.11	0,00	UN9	1,32	21.2	42,93		
12.16	6,32	UN12	0,87	21.8	0,00		
12.29	5,63			21.11	0,00		
13.9	0,00	UN13	0,93	21.16	0,00		
13.12	1023,43			22.2	0,00	UN22	0,00
13.16	9,34			22.3	0,00		
13.20	0,00			22.15	0,00		
13.25	0,00			24.3	0,00	UN24	1,15
13.27	0,00			24.19	0,00		
13.29	3,88			24.25	0,00		
13.30	5,32			24.26	0,00		
14.7	11,71	UN14	0,00	24.27	434,75		
14.8	4,51			25.1	0,00	UN25	1,37
14.22	8,23			26.3	0,00	UN26	1,63
15.4	0,00	UN15	0,88	26.7	8,66		
17.1	12,14	UN17	0,00	26.8	0,00		
17.2	0,00			26.13	0,00		
17.3	5,83					UN1	1,28
17.4	0,00					UN6	1,06
17.5	4,96					UN8	2,04
17.20	0,00					UN10	0,80
17.31	0,00					UN11	0,91

17.36	0,00					UN16	0,89
						UN23	0,00

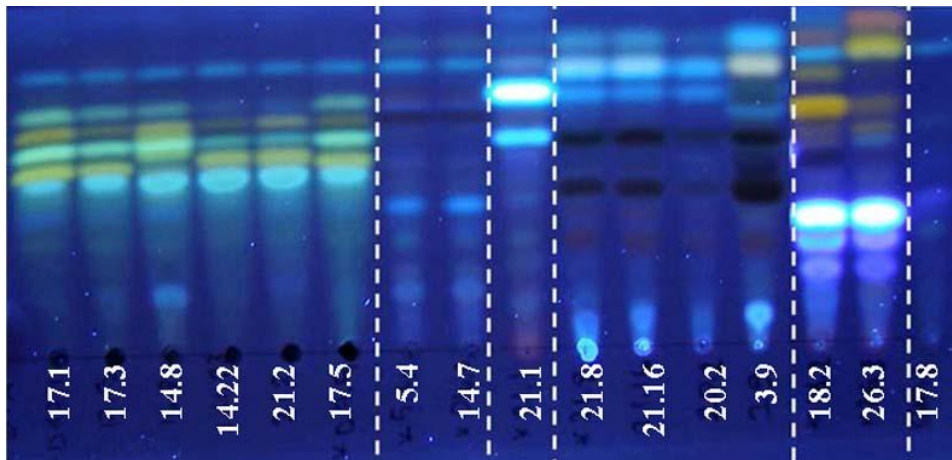
3.8. Mikotoksijenik Küflerin Moleküler İdentifikasyonu

3.8.1. Moleküler İdentifikasyona Alınacak İzolatların Seçimi

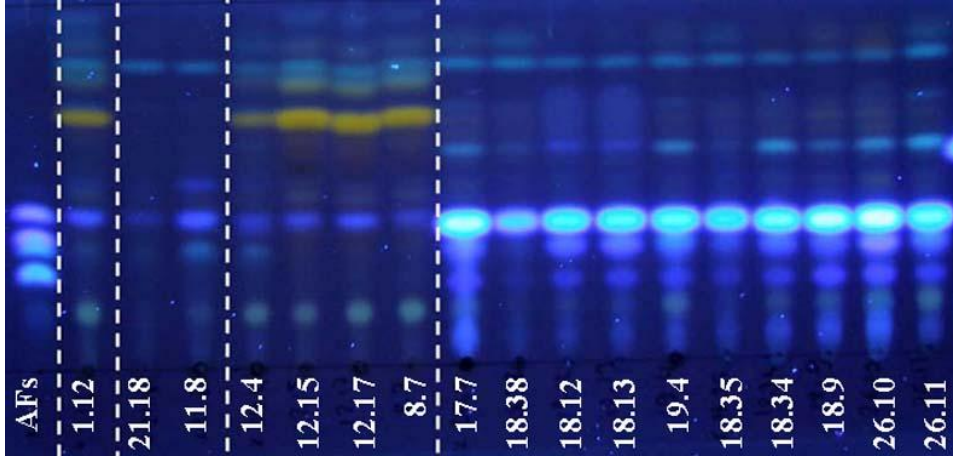
İTK plakasında ve 365 nm’de metabolit profilleri (Şekil 3.34-3.41) yönünden karşılaştırılan 130 izolatın 32 farklı profil sergilediği belirlenmiştir. Elde edilen farklı profilleri temsil eden 32 izolat moleküler identifikasyonu yapılmak üzere seçilmiştir (Çizelge 3.23).



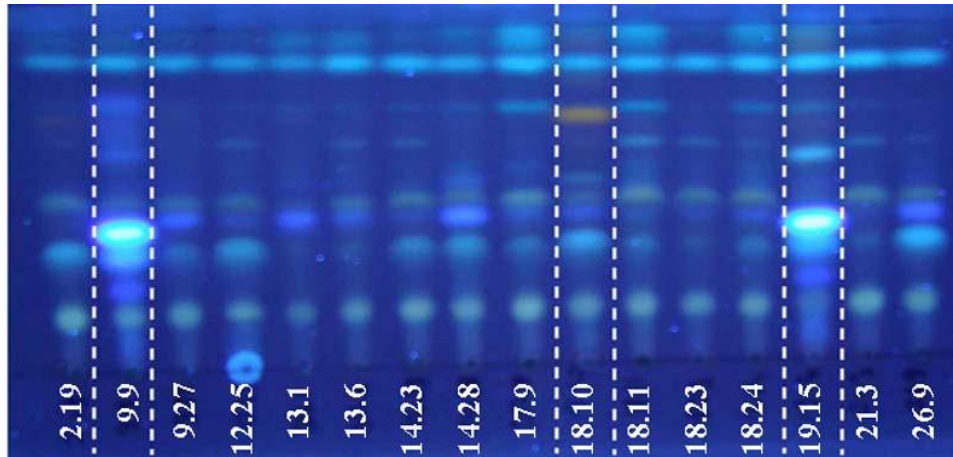
Şekil 3.34. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri



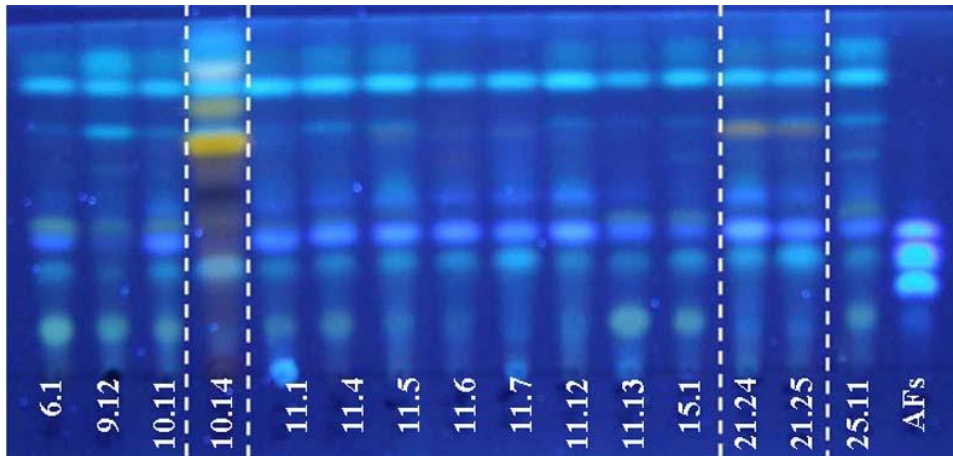
Şekil 3.35. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri



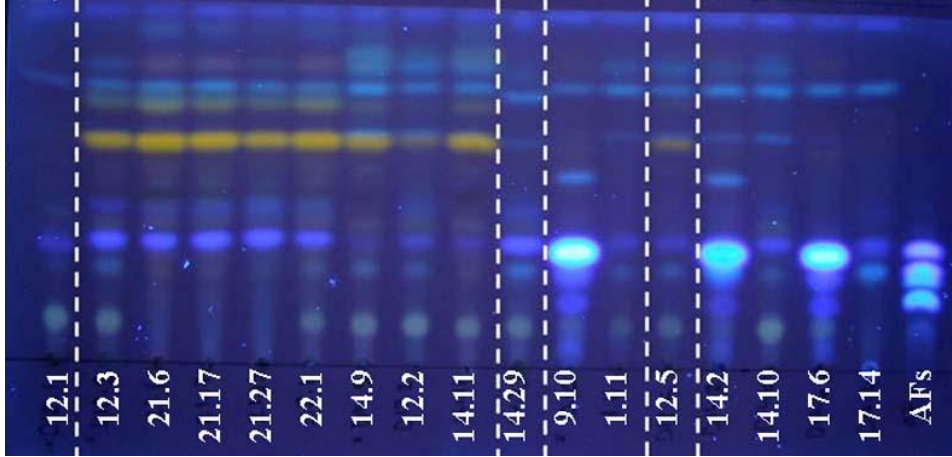
Şekil 3.36. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri



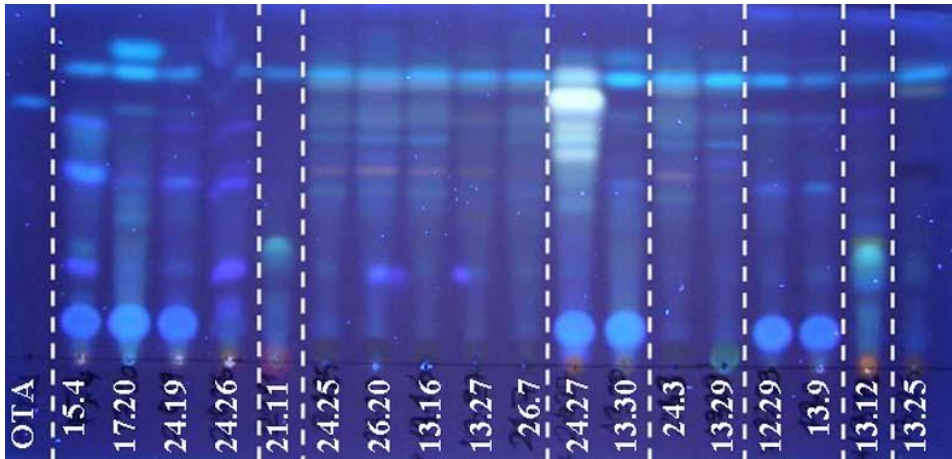
Şekil 3.37. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri



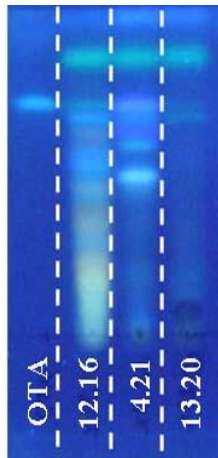
Şekil 3.38. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri



Şekil 3.39. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri



Şekil 3.40. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri



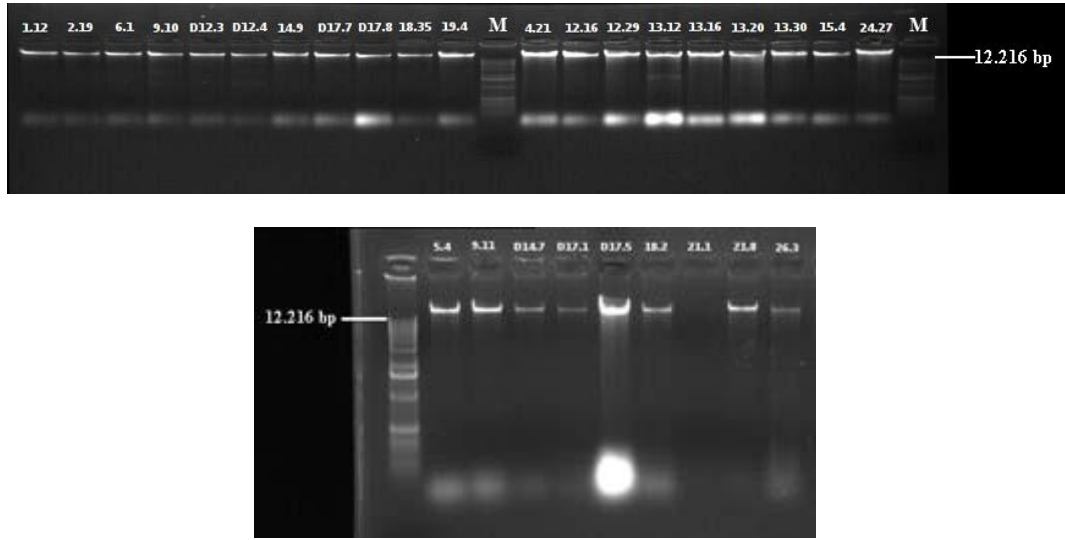
Şekil 3.41. 365 nm’de gözlenen metabolit profilleri

Çizelge 3.23. Moleküler identifikasyona alınan izolatlar ve temsil ettikleri grup

Moleküler identifikasyona alınan izolatlar	Temsil ettiği grup
1.12	12.15, 12.17, 8.7, 18.10, 21.24, 21.25, 21.6, 21.17, 21.27, 22.1, D12.2, 14.11, D12.5, 14.21
12.4	
12.3	
14.9	
18.2	
12.1	14.29, 1.11, D14.10, D17.14, 10.14
17.7	18.38, 18.12, 18.13, 18.34, 18.9, 26.10, 26.11, 9.9, 19.2, 19.15, D14.2, D17.6, 17.10
19.4	
18.35	
9.10	
2.19	9.27, 12.25, D13.1, D13.6, 14.23, 14.24, 14.28, D17.9, 18.11, 18.23, 18.24, 21.3, 21.15, 26.2, 26.8, 26.9, 2.18
6.1	9.12, 10.11, 11.1, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.10, 11.11, 11.12, 11.13, 15.1, 25.11
17.1	3.24, 14.8, D17.2, D17.3, D17.4, D17.31, D17.36, 18.20, 18.25, 19.3, 22.2, 22.3, 22.15, 26.13
17.5	
9.11	2.16, 2.17, 3.23, 14.22, 18.22, 21.2, 25.1
21.8	3.9, 20.2, 21.16
15.4	24.19, 24.26
13.12	21.11, 13.25
13.16	13.27, 13.29, 24.3, 24.25, 26.7, 26.20
13.30	17.20
12.29	13.9
5.4	
14.7	
21.1	
26.3	
21.18	
17.8	
11.8	
4.21	
12.16	
13.20	
24.27	

3.8.2. DNA İzolasyonu

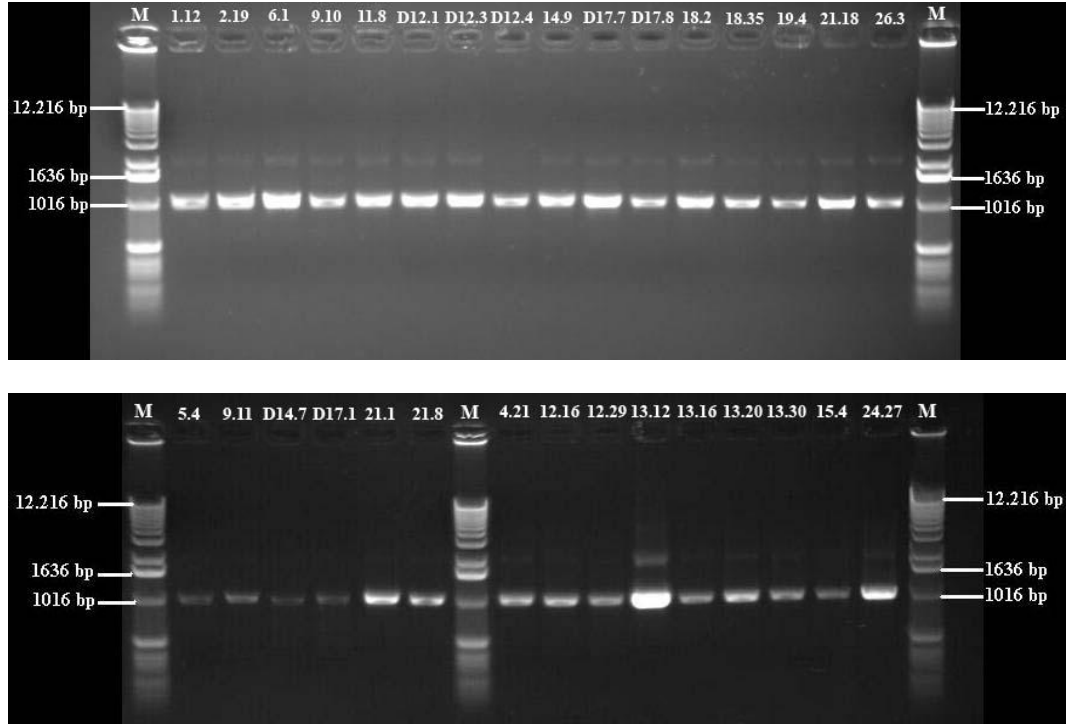
Metabolit profilleri yönünden farklılık gösteren ve moleküler identifikasyona alınacak olan küf izolatlarına ait genomik DNA ekstraksiyon sonucu Şekil 3.42’de verilmiştir.



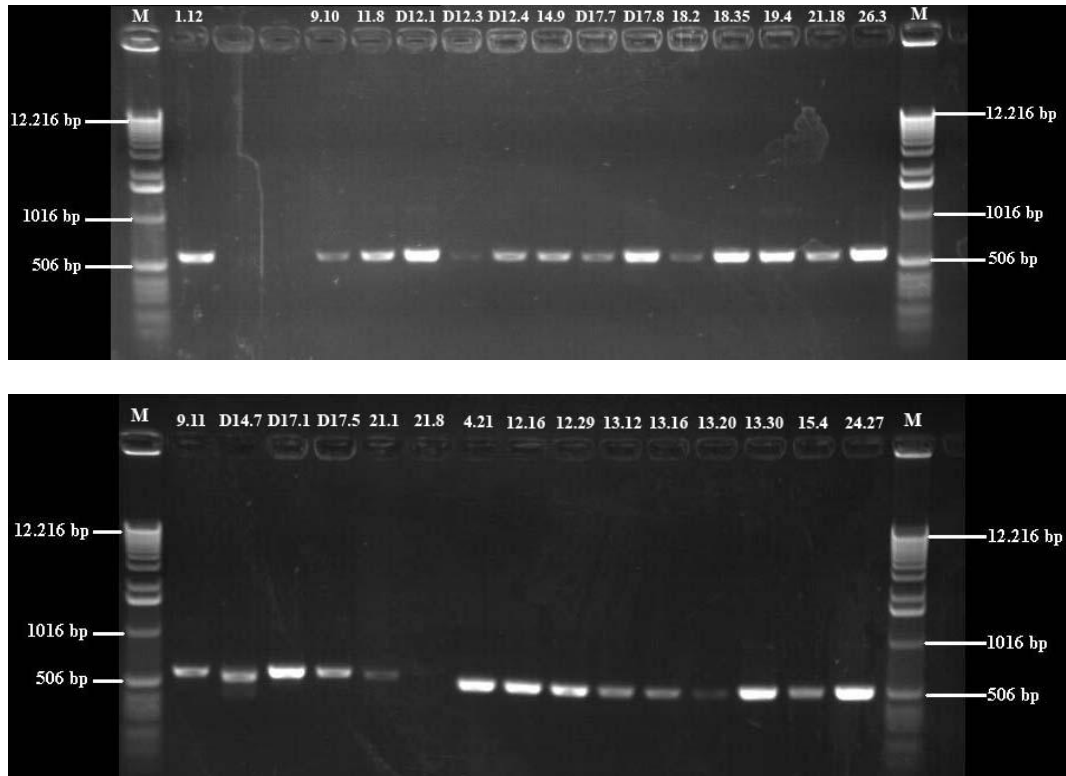
Şekil 3.42. Genomik DNA izolasyon sonucu (M: 1 kb marker)

3.8.3. İncelenecek Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu ve Saflaştırılması

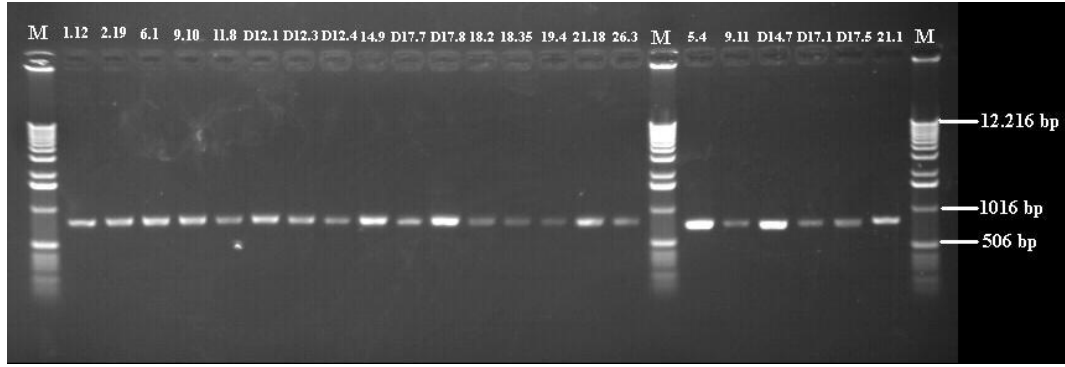
V9G-LS266 primer çifti kullanılarak ITS1-5.8S-ITS4 bölgesi 1100 bp boyutunda (Şekil 3.43), Bt2a ve Bt2b primer çifti kullanılarak β -tubulin (BenA) bölgesi 550 bp boyutunda (Şekil 3.44), CL1 ve CL2 primer çifti kullanılarak kalmodulin bölgesi 550-700 bp boyutunda (Şekil 3.45) amplifiye edilmiş ve SV-Jel ve PCR Clean-up Sistemi ile saf olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.43. Kısmi 18S-ITS1-5.8S-ITS4-Kısmi 26S gen bölgesine ait saflaştırılmış PCR ürünü (M: 1 kb marker)



Şekil 3.44. β -tubulin (BenA) gen bölgesine ait saflaştırılmış PCR ürünü (M: 1 kb marker)



Şekil 3.45. Kalmodulin gen bölgesine ait saflaştırılmış PCR ürünü (M: 1 kb marker)

3.8.4. PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

Aspergillus genusuna ait izolatların kısmi 18S-ITS1-5.8S-ITS4, kısmi β -tubulin (BenA) ve kalmodulin genleri, *Penicillium* genusuna ait izolatların ise 18S-ITS1-5.8S-ITS4 ve kısmi β -tubulin genlerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi bilgileri Blast programı ile değerlendirilerek her bir izolatın NCBI gen bankasında benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir (Çizelge 3.24).

Çizelge 3.24. İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat No	Dizi Analizi İçin Seçilen Primer	Elde Edilen Dizin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
1.12	ITS1	661	559/645	% 86 HQ288050 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 32354
	ITS4	584	555/573	% 96 HQ645940 <i>Aspergillus flavus</i> bs1
	Bt2b	485	476/502	% 94 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	710	688/704	% 97 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
2.19	ITS1	661	624/649	% 96 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	589	571/581	% 98 GU183169 <i>Aspergillus flavus</i> HF5
	Bt2b	479	403/418	% 96 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	632	609/624	% 97 EF661505 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998

Çizelge 3.25. (Devam) İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat No	Dizi Analizi İçin Seçilen Primer	Elde Edilen Dizin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
6.1	ITS1	611	600/609	% 98 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	555	542/554	% 97 EF121332 <i>Aspergillus flavus</i> CICC 2219
	Bt2b	510	502/508	% 98 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	722	701/712	% 98 EF661513 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4822
9.10	ITS1	686	675/691	% 97 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	643	564/577	%97 FJ878674 <i>Aspergillus flavus</i> UOA/HCPF 8749
	Bt2b	497	453/470	% 96 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	645	634/643	% 98 EF661505 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
11.8	ITS1	609	598/608	% 98 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	583	552/567	% 97 GU183169 <i>Aspergillus flavus</i> HF5
	Bt2b	505	498/501	% 99 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	605	598/606	% 98 EF661513 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4822
12.1	ITS1	602	581/599	% 96 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	480	465/481	% 96 FR733822 <i>Aspergillus flavus</i> 786231
	Bt2b	488	477/503	% 94 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	717	638/658	% 96 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
12.3	ITS1	574	494/522	% 94 FR733822 <i>Aspergillus flavus</i> 786231
	ITS4	706	185/203	% 91 HQ645940 <i>Aspergillus flavus</i> bs1
	Bt2b	507	501/505	% 99 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	573	563/572	% 98 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
12.4	ITS1	721	572/630	% 90 HQ288050 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 32354
	ITS4	559	543/564	% 96 HQ645940 <i>Aspergillus flavus</i> bs1
	Bt2b	499	459/479	% 95 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	534	507/534	% 94 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
14.9	ITS1	545	476/494	% 96 AY755519 <i>Aspergillus flavus</i>
	ITS4	513	480/490	% 97 FR733822 <i>Aspergillus flavus</i> 786231
	Bt2b	471	409/424	% 96 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	730	698/719	% 97 EF661505 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998

Çizelge 3.24. (Devam) İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat No	Dizi Analizi İçin Seçilen Primer	Elde Edilen Dizin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
17.7	ITS1	420	395/415	% 95 HQ620618 <i>Aspergillus flavus</i> A5P1
	ITS4	476	453/468	% 96 FJ878674 <i>Aspergillus flavus</i> UOA/HCPF 8749
	Bt2b	510	502/508	% 98 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	697	636/652	% 97 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
17.8	ITS1	574	535/563	% 95 FR733822 <i>Aspergillus flavus</i> 786231
	ITS4	556	503/526	% 95 FR733822 <i>Aspergillus flavus</i> 786231
	Bt2b	503	478/487	% 98 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	722	700/709	% 98 EF661505 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
18.2	ITS1	657	648/653	% 99 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	598	556/573	% 97 GU183169 <i>Aspergillus flavus</i>
	Bt2b	501	495/503	% 98 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	559	514/551	% 93 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
18.35	ITS1	612	588/598	% 98 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	566	539/561	% 96 GU594736 <i>Aspergillus flavus</i>
	Bt2b	492	485/505	% 96 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	607	593/604	% 98 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
19.4	ITS1	623	580/607	% 95 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	564	537/562	% 95 FJ878674 <i>Aspergillus flavus</i> UOA/HCPF 8749
	Bt2b	499	492/502	% 98 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	586	561/586	% 95 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
21.18	ITS1	706	690/706	% 97 EF661566 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998
	ITS4	704	576/582	% 98 FJ878673 <i>Aspergillus flavus</i> UOA/HCPF 10469
	Bt2b	491	477/500	% 95 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	711	696/701	% 99 EF661505 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4998

Çizelge 3.24. (Devam) İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat No	Dizi Analizi İçin Seçilen Primer	Elde Edilen Dizin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
26.3	ITS4	707	579/580	% 99 FJ878673 <i>Aspergillus flavus</i> UOA/HCPF 10469
	Bt2b	477	470/503	% 93 AY017536 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957
	CL2	627	600/610	% 98 EF661514 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 20521
5.4	ITS1	752	409/424	% 96 FR733805 <i>Aspergillus japonicus</i>
	ITS4	478	436/459	% 94 EU440776 <i>Aspergillus japonicus</i>
	Bt2b	369	360/370	% 97 AY820017 <i>Aspergillus japonicus</i> CBS 11580
	CL2	682	660/671	% 98 EU021690 <i>Aspergillus japonicus</i> NRRL 35494
9.11	ITS4	531	519/526	% 98 FR733807 <i>Aspergillus niger</i>
	Bt2b	520	504/513	% 98 EU907906 <i>Aspergillus niger</i> DAOM23922
	CL2	706	663/700	% 94 EF661158 <i>Aspergillus niger</i> NRRL 348
14.7	ITS4	523	486/508	% 95 EU440776 <i>Aspergillus japonicus</i>
	Bt2b	509	428/487	% 87 EF661104 <i>Aspergillus japonicus</i> NRRL 35541
	CL2	684	670/675	% 99 EU021690 <i>Aspergillus japonicus</i> NRRL 35494
17.1	ITS4	569	535/555	% 96 HM037959 <i>Aspergillus tubingensis</i>
	Bt2b	515	512/512	% 100 GQ376122 <i>Aspergillus tubingensis</i> UOA/HCPF 8806
	CL2	561	552/562	% 98 EF661151 <i>Aspergillus tubingensis</i> NRRL 4875
17.5	ITS4	587	287/317	% 90 FJ29358 <i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 122.49
	Bt2b	410	378/430	% 87 FJ828892 <i>Aspergillus tubingensis</i> CM 3123
	CL2	700	677/687	% 98 EF661150 <i>Aspergillus tubingensis</i> NRRL 4851

Çizelge 3.24. (Devam) İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

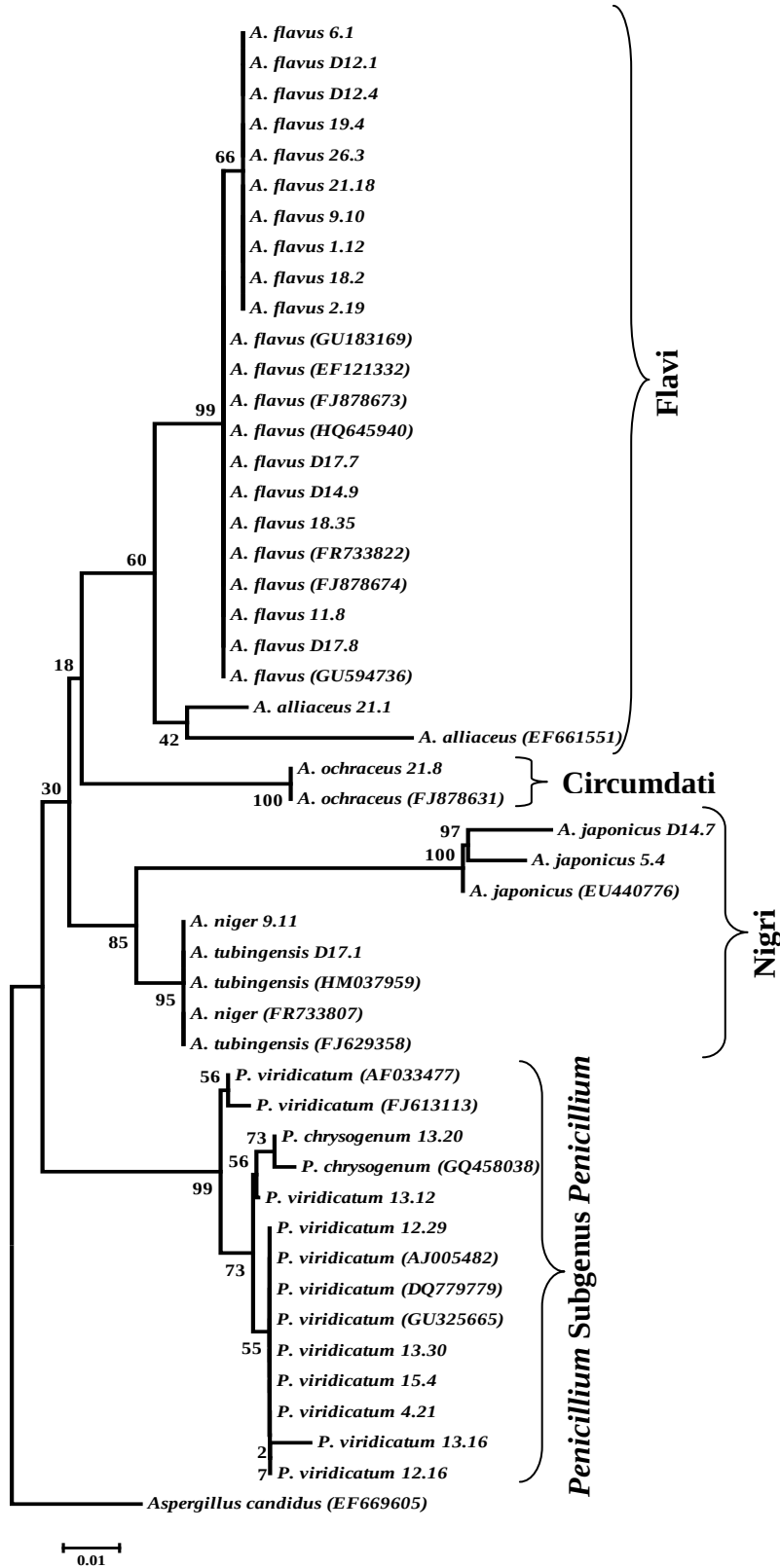
İzolat No	Dizi Analizi İçin Seçilen Primer	Elde Edilen Dizin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
21.1	ITS1	664	574/606	% 94 EF661551 <i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 315
	ITS4	540	521/537	% 97 EF661551 <i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 315
	Bt2b	420	370/386	% 95 FN185734 <i>Aspergillus alliaceus</i> IMI:239398
	CL2	748	721/730	% 98 EF661534 <i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 315
21.8	ITS1	781	765/785	% 97 EU021609 <i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 419
	ITS4	758	570/577	% 98 FJ878631 <i>Aspergillus ochraceus</i> UOA/HCPF 9493
	Bt2b	547	533/539	% 98 FM995527 <i>Aspergillus ochraceus</i> CECT:2093
4.21	ITS4	679	568/570	% 99 AJ005482 <i>Penicillium viridicatum</i> (IBT 5273)
	Bt2b	454	432/449	% 96 AY674294 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 109826
12.16	ITS4	559	541/557	% 97 AJ005482 <i>Penicillium viridicatum</i> (IBT 5273)
	Bt2b	446	428/448	% 95 AY674294 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 109826
12.29	ITS1	579	551/582	% 94 AF033478 <i>Penicillium viridicatum</i> NRRL 961
	ITS4	622	550/562	% 97 AJ005482 <i>Penicillium viridicatum</i> (IBT 5273)
	Bt2b	441	431/443	% 97 AY674294 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 109826
13.12	ITS4	491	481/493	% 97 GU325665 <i>Penicillium viridicatum</i>
	Bt2b	449	428/444	% 96 AY674294 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 109826

Çizelge 3.24. (Devam) İncelenen izolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

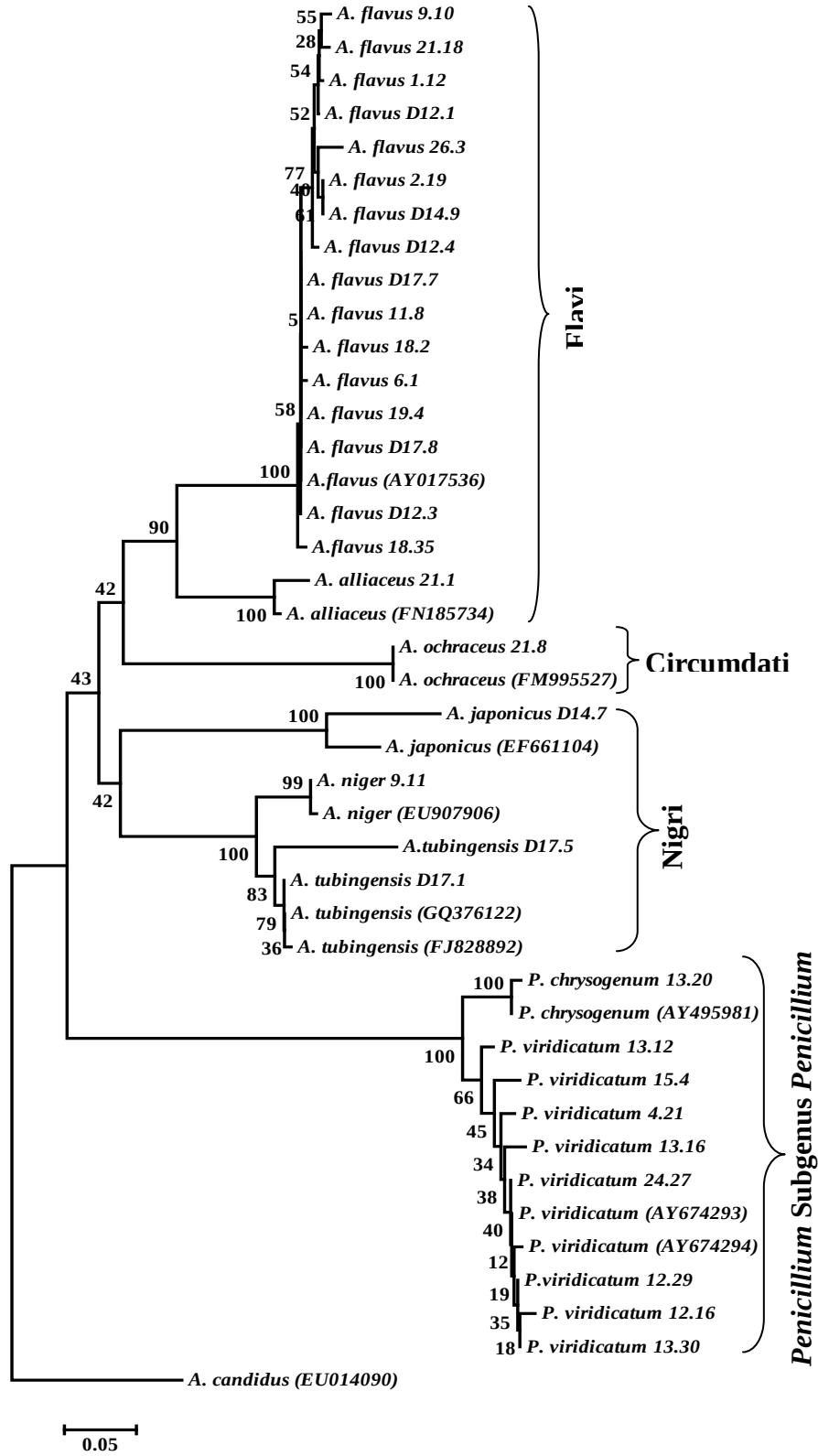
İzolat No	Dizi Analizi İçin Seçilen Primer	Elde Edilen Dizin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
13.16	ITS4	420	418/420	% 99 AF033477 <i>Penicillium viridicatum</i> NRRL 958
	Bt2b	466	443/462	% 95 AY674294 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 109826
13.20	ITS4	643	625/644	% 97 GQ458038 <i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10002
	Bt2b	442	435/440	% 98 AY495981 <i>Penicillium chrysogenum</i> CBS 306.48
13.30	ITS1	531	485/523	% 92 AY373939 <i>Penicillium viridicatum</i> FRR 963
	ITS4	496	482/497	% 96 DQ779779 <i>Penicillium viridicatum</i> NSIPV1
	Bt2b	441	430/441	% 97 AY674294 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 109826
15.4	ITS1	539	501/530	% 94 DQ779779 <i>Penicillium viridicatum</i> NSIPV1
	ITS4	478	427/437	% 97 AJ005482 <i>Penicillium viridicatum</i> (IBT 5273)
	Bt2b	440	386/410	% 94 AY674293 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 101034
24.27	ITS4	777	176/181	% 97 FJ613113 <i>Penicillium viridicatum</i>
	Bt2b	451	444/447	% 99 AY674294 <i>Penicillium viridicatum</i> CBS 109826

3.8.5. İncelenen Gen Dizilerinin Analizi

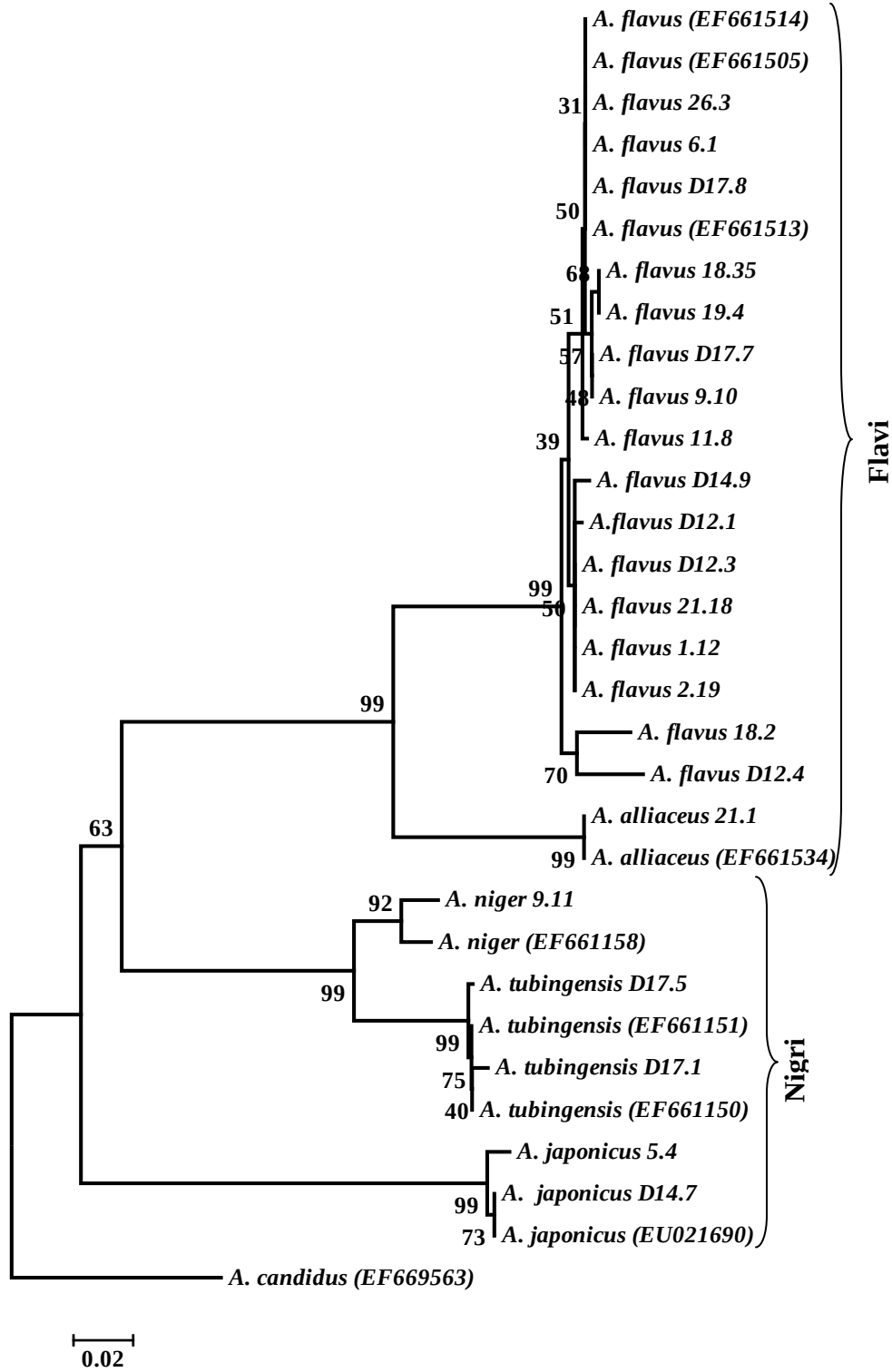
İncelenen izolatlara ait ITS bölgesi, kısmi β -tubulin ve kalmodulin gen bölgelerine ait dizi bilgileri kullanılarak elde edilen soy ağaçları ve evrimsel gelişim süreci Şekil 3.46-3.48’de belirtilmiştir.



Şekil 3.46. İncelenen izolatların ITS dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi: Tamura-Nei modeline dayalı Neighbor Joining yöntemi, Bootstrap;1000. Dış grup: *Aspergillus candidus* (EF669605)



Şekil 3.47. İncelenen izolatların β -tubulin dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi: Tamura-Nei modeline dayalı Neighbor Joining yöntemi, Bootstrap;1000. Dış grup: *Aspergillus candidus* (EU014090)



Şekil 3.48. İncelenen izolatların kalmodulin dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi: Tamura-Nei modeline dayalı Neighbor Joining yöntemi, Bootstrap;1000. Dış grup: *Aspergillus candidus* (EF669563)

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Tarımsal ürünler ve çeşitli gıda maddelerinde bulunan küfler, bu ürünlere ya direkt ya da indirekt olarak bulaşmaktadır (Şen ve Nas 2010). Tahıl kaynaklı gıdalarda küf kontaminasyonu; ham maddenin tarlada gelişimi, hasadı, depolanması, nakliyesi, ürünün işlenmesi ve son ürünün elde edilmesi aşamalarında gerçekleşebilmektedir (Özturan ve ark. 2007). Gıdaların çeşitli küflerle bulaşması ürünün fiziksel ve kimyasal özellikleri yanında görünüşünü de değiştirebilmektedir. Küfler uygun koşullarda gıda ve gıda ürünlerinde çoğalarak bir yandan ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip bozulmasına neden olmakta, diğer yandan da toksik maddeler oluşturmaktadırlar. Bu durum, ekonomik kayıplara neden olduğu gibi, insan sağlığı açısından da potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır (Erdoğan ve ark. 2003; Andersen ve Thrane 2006).

Çok çeşitli tahıl kaynağına dayanan unların; unlu mamüllerin üretilip tüketiciye sunulmasında kullanılması ve her ürün için farklı üretim yönteminin olması HACCP sisteminin bu sektördeki uygulanabilirliğini zorlaştırmakta ve önemli handikaplara neden olmaktadır. İlgili sektörün kontrol altına alınması için ise üretim aşamalarında kritik kontrol ve kalite kontrol noktaları oluşturulmuştur. Bu noktalardan birisi de unlu mamüller sektörünün en önemli ham maddesi olmasından dolayı unlardır. Un; ham madde olarak kullanıldığı gıdanın karakteristik özelliğini verir ve kalitesini birebir etkiler. Bu nedenle kullanılacak olan unun kalitesi kadar, gıda güvenliği açısından bazı nitelikleri taşıması istenmektedir. Unda en yaygın rastlanan tehlike küf gelişimidir. Küf gelişimi düşük su aktivitesine sahip olan tahıl ürünlerinde görülen en yaygın mikrobiyolojik tehlikedir (Ergönül, 2007).

Tahıl kaynaklı gıda ürünlerinin güvenilirlik ve kontrolünü sağlamayı amaçlayan pek çok araştırma yapılmış ve Türk Gıda Kodeksi tarafından da mikrobiyal hijyene ait maksimum sınır değerleri oluşturulmuştur. Karagözlü ve Karapınar (2000) tarafından farklı tahıl ve tahıl kaynaklı unları içeren toplam 100 adet örnek küf kontaminasyonu ve OTA içeriği yönünden incelenmiştir. İncelenen örneklerin tamamının farklı derecelerde küf içeriğine sahip olmasının yanı sıra en

yüksek küf kontaminasyonunun mısır unlarında olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada tüm örneklerdeki küf kontaminasyonunun $<10 \cdot 3 \cdot 10^5$ kob/g olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda incelenen 25 adet tahıl kaynaklı un örneklerindeki küf kontaminasyonunun $2 \cdot 4,8 \cdot 10^4$ kob/g aralığında olduğu belirlenmiştir ve benzer çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Aran ve Eke 1987; Karagözlü ve Karapınar 2000; Aydın ve ark., 2010).

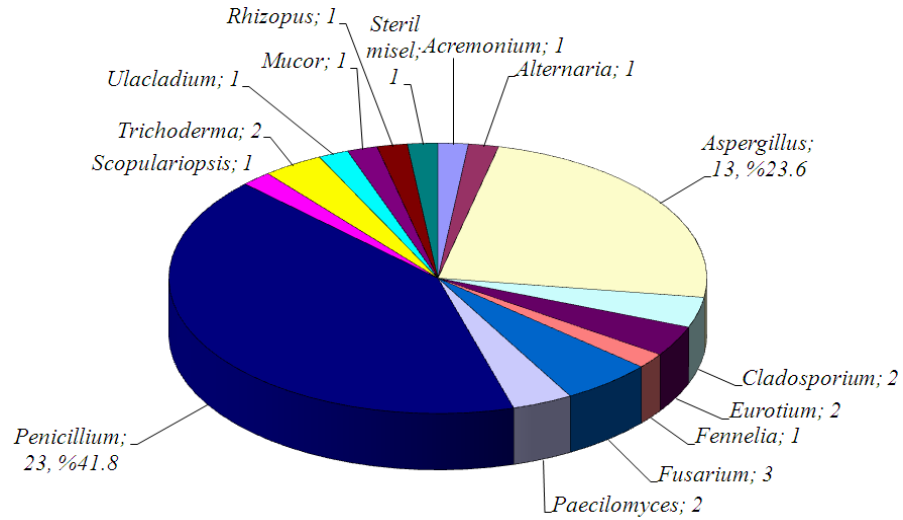
Türk Gıda Kodeksi'nin "Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Resmi gazete, 2009)'ne göre; tahıl unları, soya unu ve diğer unlar (patates unları dahil) için izin verilen maksimum küf sınırı 10^4 kob/g'dır. İncelenen un örnekleri mikrobiyolojik kriterler tebliği ile kıyaslandığında 25 no'lu çavdar unu ve 26 no'lu mısır ununun maksimum sınır değerlerinde olduğu, diğer 23 adet un örneğinin ise maksimum sınır değerinin altında bir küf kontaminasyonu içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Küfler tarafından bitkilerde meydana getirilen hastalıklardan birisi de çavdarmahmuzları (ergotizm)'dir ve çeşitli çavdar tipleri ile yapılan araştırmalarda, bu grup tahılların endofitik küflere karşı düşük dirençlilik göstermelerinden dolayı küf kontaminasyonlarına elverişli olduğu tespit edilmiştir (Vinton ve ark. 2001). Nitekim mısır, özellikle böceklerden kaynaklanan hasarlar sonrasında nem ve sıcaklık koşulları gibi faktörler uygun olduğu takdirde, ayrıca erken hasat sonrasında yeterli kurutma yapılmaması durumunda küf kontaminasyonu ve mikotoksin sentezi için diğer gıdalara göre daha hassas bir gıda olarak değerlendirilmektedir (Karagözlü ve Karapınar 2000).

Gürsoy ve Biçici (2004) tarafından Türkiye'deki mikotoksin ve mikotoksijenik küfler üzerine yapılan araştırmada incelenen tarımsal ürünlerde *Aspergillus*, *Penicillium* genuslarına ait olan 251 tür belirlenmiş olup, bunlar arasında *A. niger*'in en yaygın küf olduğu belirtilmiştir. Benzer bir çalışmada ise Reddy ve Salleh (2011) tarafından 80 mısır örneğinde gerçekleştirilen küf ve mikotoksin belirleme çalışmasında *Aspergillus* ve *Fusarium* cinsi küflerin oldukça baskın olduğu belirlenmiştir. Bu cinslere ait üyelerden *A. flavus*, *A. niger* ve *F. verticilloides*'in yüksek oranda belirlenmiş, mısırlardaki mikotoksijenik küf sorununun Dünya genelinde bir sorun olduğuna dikkat çekilmiş ve kontrol altına almaya yönelik uygulamalar geliştirilmiştir (Reddy ve ark., 2010).

Un fabrikalarının mikrobiyal kontrolü amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada; buğday tohumlarının işlem öncesi deposundan, mekanik temizlenmeleri sonrası, yıkanmalarından sonra, kurutma sonrası, kaba parçalama sonrası, ince parçalama sonrası, birinci kaliteli un ve yüksek kaliteli un aşamalarından olmak üzere toplam 8 farklı aşamadan alınan örneklerdeki mikotoksijenik küf ve mikotoksin içeriği incelenmiştir. Depolanan ve mekanik olarak temizlenmiş olan unlarda *A. flavus*, *A. ochraceus* ve *Penicillium corylophilum*' un, parçalanmış un örneklerinde ise *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium*'un baskın olduğunu belirlemişlerdir (Doolotkeldieva 2010).

Çalışmamızda 25 farklı un örneğinden elde edilen 543 adet izolatın geleneksel teknikler ile incelenmesi sonucu 14 farklı cinse ait 54 tür belirlenmiştir. Un örneklerinden elde edilen küfler arasında ise en baskın cinsin *Penicillium* (% 41,8) olduğu ve bunu *Aspergillus* (% 23,6) cinsi üyelerinin takip ettiği belirlenmiştir ve diğer araştırmalar ile paralellik göstermektedir (Şekil 4.1). Nitekim Türkiye'nin tarımsal ürünler ve bölgelerine göre dominant mikoflora dağılımını kapsayan ve Topal (2003) tarafından oluşturulan rapora göre tarımsal ürünlerdeki Türkiye mikoflorasında en baskın cinsler *Penicillium* (% 65) ve *Aspergillus* (% 19) olarak belirlenmiştir. İncelenen örneklerde en yüksek dağılım gösteren türler ise; *A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Eurotium chevalieri*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum* ve *P. verrucosum*'dur (Çizelge 3.12). Tüm un örneklerinde dağılım göstermemekle beraber alerjik ve mikotoksijenik küf olarak bilinmelerinden dolayı *Alternaria alternata*, *A. alliaceus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *F. oxysporium* ve *F. solani* dikkat çeken diğer türlerdir. Çalışmamızda belirlediğimiz mikrofungus içeriği diğer tahıl ve tahıl kaynaklı mikrofungus çalışmaları ile paralellik göstermektedir (Gümüş ve ark. 2004; Gürsoy ve Biçiçi 2004; Gül 2007; Reddy ve ark. 2010; Doolotkeldieva 2010; Reddy ve Salleh 2011).



Şekil 4.1. İncelenen un örneklerinde tanımlanan küf cinsleri ve tür sayıları.

İncelenen numunelerde en sık rastlanan (% 73) tür olan *A. candidus* tahıllarda depo küfü olarak yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Toprak, hububat, tohumlar, un, ceviz, çeşitli gıda maddeleri, ev içi havası ve gübrelerde varlığı rapor edilmiştir. Terfenilin ve ksantoaskin olarak bilinen iki toksik metabolite sahiptir. Örneklerde yaygın olarak karşılaşılan (% 69) diğer bir tür ise *A. flavus*'dur. Bu tür önemli bir aflatoksin (B1 ve B2) üreticidir. Ceviz, baharat, zeytin, tahıllar ve incir gibi kurutulmuş meyvelerde bulunduğu rapor edilmiştir. İncelenen örneklerde belirlenen diğer bir yaygın (% 65) tür ise *P. citrinum*'dur. Dünya çapında yaygın bir iç ortam küfü olmakla beraber toprak, dış ortam havası, tahıllar ve baharatlarda sıklıkla rastlanılmaktadır. Üretmiş olduğu sitrinin metaboliti Gram (+) bakterilere ve böceklerle karşı oldukça etkili olmasına rağmen toksik bir metabolit olmasından dolayı bu tür amaçlar için kullanılamamaktadır. Sitrinin hayvanlar üzerinde renal toksik bir etki göstermekle birlikte insanlarda da böbrek hasarlarına (nefrotoksik) ve kanserojenik vakalara neden olmaktadır. *A. niger* toprak, bitki, tohumlar, kurutulmuş meyveler, ceviz ve iç ortam havasında rapor edilmiş olan bir küftür ve bazı strainlerinin OTA üretmesi ile dikkat çekmektedir. *P. griseofulvum* ise Dünya çapında yaygın olan diğer bir küftür ve sıklıkla toprak, tahıllar ve yemlerden izole edilmiştir. Bu küfün dört önemli toksini bulunmaktadır. Bunlar; patulin, siklopiyazonik asit, rokfortin C ve griseofulvindir. Bu toksinlerden griseofulvin dermatofit küfler tarafından oluşturulan enfeksiyonların iyileştirilmesinde kullanılmasına rağmen aslen

memeliler için toksiktir ve mitoz bölünmeyi bloke etmesi sonucu tümör oluşumlarına neden olmaktadır. *Eurotium chevalieri* ve *P. verrucosum* türleri ise % 10 olan karşılaşma sıklığı ile identifiye edilen türler arasında dikkat çekmektedir. *E. chevalieri* iç ve dış havada, toprakta, tohumlarda, kurutulmuş meyvelerde ve pamukta belirlenmiştir. Bu küfün belirlenmiş bir mikotoksini olmamakla beraber immün sistemi zayıflamış bireylerde solunum hastalıklarına neden olmaktadır. *P. verrucosum* ise genellikle gıda ve tahıl kaynaklarında izole edilmiş olup bazı strainlerinin OTA ve sitrinin üretmesi ile dikkat çekmektedir (Klich 2002; Samson ve ark. 2004a; Pitt 2000a).

Aspergillus ve *Penicillium* cinsi konidioforlar tarafından taşınan konidiyojen hücrelerden meydana gelen, havaya açık, oldukça küçük ve kuru sporları ile karakterize olmuş olup bu özellikleri onları Dünya genelinde iç-dış havasında yaygın bir küf yapmaktadır. Ayrıca bu küflerin saprofitik özellikli olmaları ve pek çok organik substratı parçalayabilen enzimlere sahip olmaları, onları gıda ürünlerinde de yaygın hale getirmektedir. (Samson ve ark. 2010; Klich 2009). Nitekim iç havadaki küfler üzerine yapılan çalışmalarda gıda kaynaklı küf türleri ile sıklıkla karşılaşmaktadır (Çetinkaya ve ark. 2005; Kalyoncu 2006; Özkara 2006; Karaltı 2006). Mısra ve Jamil (1991) tarafından un değirmenlerinin iç havasındaki küfleri belirlemek üzere gerçekleştirilen bir çalışmada incelenen un değirmenlerinin iç havasında *Aspergillus* cinsine ait üyelerin baskın olduğu ve bunun *Alternaria*, *Cladosporium* ve *Fusarium* tarafından takip edildiği belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar bazı *Aspergillus* türlerinin insanlar üzerindeki alerji potansiyellerine dikkat çekmiştir. İç hava kalitesinin 12 ay boyunca izlenmesi sonucu her ay karşılaşılmış olan *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. melleus*, *A. niger*, *A. niveus* ve *A. terreus* olmak üzere 6 farklı *Aspergillus* türü ile 284 hasta üzerinde gerçekleştirilen alerji testi sonunda % 82'nin üzerinde pozitif alerji sonucu alınmıştır. Küflerin hava yolu ile alerjik reaksiyon oluşturmalarına ilaveten işlenmiş gıdalar yolu ile de insanlara ulaşan ve ölümle sonuçlanan alerjik reaksiyonları da kaydedilmiştir. Bennett ve Collins (2001) tarafından kaydedilen vakada; 19 yaşında, beyaz ve erkek cinsiyetindeki bir kişinin paketlenmiş karışımdan yaptığı gözlemeyi yemesinden sonra nefessiz kalması ve anafilaksi oluşması ile yaşamını kaybetmiştir. Gözleme yapımında kullanılan paketlenmiş

karışımın incelenmesi sonucu 700 kob/g küf içeriği ve *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* ve *Aspergillus* cinslerinin varlığı belirlenmiştir. Kayıtlara göre vakanın 2 gözleme tükettiği ve yaklaşık olarak $2,1.10^3$ küf kontaminasyonuna maruz kaldığı ve bu kontaminasyonun vakanın alerjik geçmişi ile etkileşmesi sonucu sıklıkla karşılaşılmayan bir anafilaksi ölümü olarak literatüre geçmiştir.

Gıdalarda meydana gelen küf gelişiminin mikotoksin üretimi ile sonuçlandığı ve bu mikotoksinlerin alerjik reaksiyonlardan kansere kadar insanlarda farklı hastalıklara sebep olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Var ve ark. 2004; Seifert ve Levesque 2004; Oruç 2005; Zheng ve ark. 2006). Mikotoksinler çok sayıda küf cinsi tarafından üretiliyor olmasına karşın *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* en önemli mikotoksijenik küflerdir. Aflatoksin, OTA, fumonisinler, belirli deoksinivalenol ve zearalenone olmak üzere 5 mikotoksin çeşidi Dünya çapında insan sağlığı için oldukça önemlidir (Topal 2003; Var ve ark. 2004; Seifert ve Levesque 2004; Oruç 2005; Zheng ve ark. 2006; Kabak ve Var 2006; Turner ve ark. 2009). Bu mikotoksinlerin her birinin hangi tip etkilere sahip olduğu belirlenmiştir ve hatta bu mikotoksinlerin insan ölümlerine sebep olabileceği araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (Pitt 2000b). Tarımsal ürünlerin dörtte biri ciddi boyutta mikotoksinlerle kontaminasyona uğrayabilmekte ve insan ve hayvan sağlığı için ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Bu nedenle, tarımsal ürünlerde mikotoksinlerin rutin kontrolleri için mikotoksinlerin, üreticilerinin ve tanı yöntemlerinin iyi bilinmesi gereklidir (Oruç 2005; Topal 2003).

Mikotoksijenik küflerin kültür ortamında hızlı bir şekilde tanınması için pek çok kültür ortamı oluşturulmuş veya modifiye edilmiştir. Ancak bu yöntem temel olarak besi ortamında toksin üretimine dayalı UV altında floresan rengin oluşması (CCA (CAM), YES, CYA'da ve modifikasyonlarında olduğu gibi) (Arseculeratne ve ark. 1969, Filtenborg 1983; Dyer ve McCammon 1994; Heenan ve ark. 1998; Abbas ve ark. 2004; Frisvad ve ark. 2007; Bragulat ve ark. 2001) veya petri arka yüzeyinde renk değişimlerinin gözlemlenmesine (AFPA'da olduğu gibi) dayandırılmıştır (Dyer ve McCammon 1994; Samson ve ark. 2010). Kültür ortamlarında mikotoksin üretimini belirlemek için yaygın olarak kullanılan diğer bir yol ise İTK yöntemi ile ekstrolitlerin taranmasıdır. Ekstrolitlerin belirlenmesi

için mikotoksijenik küf belirleme ortamlarının tercih edilmesi, incelenen küf örneklerinin mikotoksin üretme yetenekleri hakkında belirgin bir sonuç sağlamasına ilaveten metabolit profillerinin de elde edilmesini sağlamaktadır. (Topal 2003; Oruç 2005; Frisvad ve ark. 2007; Hatti ve ark. 2009; Turner ve ark. 2009; Samson ve ark. 2010). İTK yöntemine dayalı olarak mikotoksinlerin belirlenmesine yönelik başlangıç uygulamalarından olan, Scott ve ark. (1970) tarafından gerçekleştirilen çalışmada gıda ve yemlerden izole edilmiş olan küflerin incelenmiş ve 18 farklı mikotoksin tespit edilmiştir. İTK yöntemi ile kültürel ortamdan mikotoksijenik küflerin belirlenmesi ve metabolit profillerinin elde edilmesi Frisvad ve ark. (2007) tarafından oldukça geliştirilmiş ve elde edilen İTK plakalarının HPTLC, ekstraktların ise HPLC ile analizi yapılarak mikotoksin çeşitleri ve miktarları hakkında verimli sonuçlar elde edilmiştir (Samson ve ark. 2010). Çalışmamızda elde edilmiş olan tüm izolatlar CYA ve MEA ortamlarından metabolit profilleri yönünden incelendiğinde, aynı küf türlerinin birbirine yakın R_f değerlerinde aynı metabolit profilleri sergilediği gözlemlenmiş ve mikroskopik identifikasyon sonuçlarını destekleyici veri olarak kullanılmıştır (EK1). İncelenen örneklerinde yüksek oranda bulunan *Penicillium* ve *Aspergillus* cinlerine ait izolatlar CYA, YES, CCA (CAM) ve AFPA ortamlarında mikotoksin üretme yetenekleri yönünden incelendiğinde ise 79 *A.flavus* izolatının AFPA ortamında turuncu petri arka rengine, YES, CYA ve CCA (CAM) ortamlarında ise farklı derecelerde floresan renge sahip olduğu gözlenmiştir. *A. parasiticus* NRRL 465 (aflatoksin pozitif kontrolü) ve *A. ochraceus* NRRL 3174 (okratoksin pozitif kontrolü) ile aynı ışımaları yansıtan toplam 35 (% 26) izolat belirlenmiştir. *A.flavus*'a ait 76 izolattan 22 tanesi (% 28,9), *A.ochraceus*'a ait 4 izolattan 4'ü (% 100), *A.alliaceus*'a ait 4 izolattan 4'ü (% 100), *A.niger*'e ait 24 izolattan 4'ü (% 6,6) ve *P.verrucosum*'a ait 22 izolattan 1 tanesi (% 4,5) pozitif kontroller ile aynı ışımalar göstermiştir (Çizelge 3.14). CYA ortamının kullanılması ile HPLC'ye dayalı belirlemeler sonucunda ise 55 adet *A.flavus* izolatlarının farklı miktarlarda aflatoksin üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlarda 29'u (% 52,72) aflatoksin B1'i, 19'u (% 34,55) aflatoksin B2'yi, 6'sı (% 10,91) aflatoksin G1'i ve 1'inin (% 1,82) de aflatoksin G2'yi LOQ_{AFs} değerlerinin üzerinde üretme yeteneğine sahip olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 3.15). En yaygın aflatoksin

üreticileri *A. flavus* (B1 ve B2), *A. parasiticus* (B1, B2, G1, G2), *A. minisclerotigenes* (B1, B2, G1, G2), *A. nomius* (B1, B2, G1, G2) ve *A. arachidicola* (B1, B2, G1, G2)'dır (Samson ve ark. 2010). *A. flavus*'un aflatoksin üretme yeteneği üzerine gerçekleştirilen pek çok çalışmada bu küfün özellikle aflatoksin B1 ve B2 üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Klich 2009; Yousefi ve ark. 2009; El-Khoury ve ark. 2011). Genel olarak *A. flavus*'un B grubu aflatoksinleri ürettiği kabul edilmesine rağmen, G grubu aflatoksinleri üreten *A. flavus*'ların da varlığı çeşitli literatürlerde rapor edilmiştir (Davis ve ark. 1966; Gabal ve ark. 1994; Giorni ve ark. 2007; Sanchez-Hervas ve ark. 2008; Hatti ve ark. 2009). Bu literatürlere paralel olarak çalışmamızda incelediğimiz *A. flavus*'ların B grubu aflatoksinleri etkin bir şekilde ürettiği, sınırlı bir grubun ise G grubu aflatoksinleri üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Küfler tarafından üretilen diğer bir önemli mikotoksin olan OTA; *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait bazı türler tarafından üretilmektedir. OTA üretme yeteneği gösteren *Aspergillus* 'lar; *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus* olmak üzere siyah *Aspergillus*'ların bazı üyeleridir. OTA üretme yeteneğine sahip olan diğer *Aspergillus* cinsi *Circumdati* (*A. ochraceus* seksiyon) üyeleri ise *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* ve *A. westerdijkiae*'dir. *A. alliaceus* ve *A. albertensis* ise *Flavi* seksiyonunda yer alan okratoksijenik küflerdir. *Penicillium* cinsine ait OTA üretme yeteneğine sahip türler ise *P. verrucosum* ve *P. nordicum*'dur (Serra ve ark. 2003; Samson ve ark. 2004b; Medina ve ark. 2005; Lo'pez-Mendoza ve ark. 2009; Samson ve ark. 2010, Cabanes ve ark. 2010). Çalışmamızda HPLC ile saf kültür ortamında OTA üretme yeteneği yönünden incelenen *Aspergillus* ve *Penicillium* cinlerine ait 54 adet izolattan 19'unun (% 35,19) farklı miktarlarda, 5'inin (% 9,26) ise LOQ_{OTA} değeri üzerinde OTA üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. İncelenen un örneklerinden elde edilen okratoksijenik küfler ise *A. japonicus*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. alliaceus* ve *P. viridicatum* olup özellikle *Aspergillus* cinsine ait okratoksijenik küf sonuçlarımız diğer araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir. İncelenen izolatlardan okratoksijenik *Penicillium* cinslerinin belirlenmesi çalışmasında HPLC ile okratoksin A ürettiği belirlenen 9 izolat kültürel özellikleri ile *P. verrucosum* ile

uyum göstermiştir (Çizelge 3.1-3.11). Bu izolatlara ait ITS-5.8S rDNA ve BenA gen dizilerinin NCBI veri bankası ile kıyaslanması sonucu % 96-99 oranlarında *P. viridicatum* ile benzerlik göstermiş ve bu sonuçlar identifikasyon sonucu olarak alınmıştır. *Penicillium* cinsine ait okratoksijenik küflerin belirlenmesine yönelik yapılan ilk çalışmalarda *P. viridicatum*'un okratoksin A üretme yeteneğine sahip olduğu (Walbeek ve ark. 1969; Pitt 1987; Haggblom 1982) özellikle düşük sıcaklık ve 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda buğday materyali üzerinde okratoksin A üretme yeteneğini sürdürdüğüne dikkat çekilmiştir (Haggblom 1982). İlaveten *P. viridicatum*'un OTA üretme yeteneğinin rapor edildiği (Ayaz ve Yurttagül 2008) ve okratoksijenik *P. viridicatum*'ların güncel sınıflandırmada *P. verrucosum* olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Czaban ve ark. 2006). OTA üretme yeteneği üzerine gerçekleştirilmiş çalışmalara paralel olarak çalışmamızda incelenen un örneklerinde okratoksijenik *Penicillium* cinsinin varlığı belirlenmiştir.

Gıdalarda gelişen bazı küf türleri tarafından üretilen, insanlar ve hayvanlar için toksik olan, fizikokimyasal olarak ısı dirence sahip, aromatik ve antijenik olmayan düşük molekül ağırlıklı mikotoksinlerin (Doolotkeldieva 2010) sentezlenme süreci, bulaşan küfün cinsine, gıdanın işleme-saklama koşullarına göre değişmektedir. Mikolojik sorunların çeşitliliği; ülkelere, ekolojik bölgelere ve ürünün cinsine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle pek çok ülke, kendi özgü küfleri ve bunlara bağlı sorunlarını belirlemekte ve eldeki verilere göre de çözümleri geliştirmek üzere araştırmalar yapmaktadır (Topal 2003). Özturan ve ark. (2007) tarafından Erzurum'da piyasaya sunulan buğday unlarının aflatoksin B1 ve okratoksin A içeriği yönünden incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada incelenen toplam 50 adet buğday ununun 37 (% 74) adedinde toplam aflatoksin varlığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada 9 (% 18) adet un örneğinin Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen maksimum sınır değerlerinin üzerinde olduğu, 8 (% 16) örneğin Türk Gıda Kodeksi tarafından kabul edilen değerler arasında, 13 (% 26) örneğin ise ölçülebilir değerlerin altında aflatoksin B1 varlığı belirlenmiştir. Aydın ve ark. (2008) 100 adet Türkiye kaynaklı buğday unu örneğinde toplam aflatoksin, aflatoksin B1 ve OTA seviyesi incelenmiştir. ELISA yöntemi ile gerçekleştirilen mikotoksin ölçüm çalışmasında incelenen örneklerin

% 45'inin aflatoksin içerdiği, bu örneklerden ise % 2'sinin Avrupa ve Türk Gıda Kodeksi'nin maksimum sınır değerlerinin üzerinde aflatoksin içerdiği belirlenmiştir. Türkiye'deki tahıl ve tahıl kaynaklı unları kapsayan diğer bir çalışma ise Akdeniz Bölgesi piyasasından 20 adet buğday örneği ve aynı buğday ürünlerinden üretilmiş 20'şer adet un, kepek, ruşeyn ve razmol aflatoksin içeriği yönünden incelenmiştir. Bu araştırmada incelenen buğday örneklerinin 5 adedinde yasal sınır olan 0.002 ppm' in biraz üzerinde (0.003-0.004 ppm) B1 aflatoksine rastlanılmıştır (Altan 2006). Baydar ve ark. (2005) tarafından Ankara'daki perakende satış yapılan bazı örneklerdeki aflatoksin ve okratoksin tipleri incelenmiştir. Çalışmada 12 farklı tipte tohum, baklagil, tahıl unları ve nişastadan oluşan 25 örnek incelenmiş ve örneklerin 0,03-3.16 ppb arasında toplam aflatoksin içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen değerler Türkiye ve Avrupa standartlarına uygun olmakla beraber arpa unlarında diğer tahıl tiplerine göre daha yüksek değerlerde aflatoksin varlığının belirlendiğine dikkat çekilmiştir.

Farklı zaman dilimi ve coğrafik bölgelerde incelenen tahıl kaynaklı unlar, aflatoksin kirlilikleri yönünden gözden geçirildiklerinde aflatoksin içermeyen örneğin olmadığı görülmektedir. Tahıl kaynaklı gıdaların Türk toplumu için önemli bir gıda grubu olması ve günlük beslenmenin % 50'sini oluşturmamasından dolayı örneklerde belirlenen düşük seviyelerdeki toksin kontaminasyonu da önemli bir problem halini almaktadır (Baydar ve ark. 2005). Tahıl kaynaklı ürünlerde karşılaşılan mikotoksin sorunu ise hasat öncesi, hasat sırası, depolanması, işlenmesi ve sonrasında toksik küf gelişmesi ve mikotoksin oluşturmaları ile ilişkilidir (Doğan ve Bayezit 1999; Girgin ve ark. 2001; Oruç 2005; Baydar ve ark. 2005; Heperkan 2006; Kabak ve Var 2006; Riba ve ark. 2010). Reddy ve Salleh (2011) tarafından incelenen 80 adet mısır tohumu örneğinden 65 (% 81,2) adedinin 1-135 µg/kg oranında aflatoksin B1 içerdiği, bu örneklerden 18 (% 22,5) adedinin ise uluslararası sınır değerleri üzerinde olduğu belirlenmiştir. Hindistan'da Reddy ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada mısır, mısır ürünleri, pirinç ve buğday olmak üzere 581 tahıl örneği HPLC ile aflatoksin içeriği yönünden incelenmiş ve çalışma sonucunda yabani pirinçlerin aflatoksin içeriği yönünde yüksek insidansa sahip olduğunu belirlemişlerdir. Elde

edilen bu yüksek insidansın çalışma bölgesine ait çevresel özellikler ile bağdaştırılmıştır. Giray ve ark.(2007)'nın buğday numunelerinden HPLC ile yaptıkları aflatoksin belirleme çalışmasında ise aflatoksin B1 miktarının 10,4-144,2 ng/kg, toplam aflatoksin düzeyinin ise 10,4-643,5 ng/kg arasında olduğu belirlenmiştir. Türkiye'deki tahıl kaynaklı ürünlerin ham maddelerine ait mikoflora ve mikotoksin profillerini sergilemek amacı ile NATO destekli gerçekleştirilen ve Topal (2003) tarafından rapor edilen verilere göre mikotoksin açısından en riskli ürünler; buğday, mısır, bulgur, arpa ve pirinç olarak belirlenmiştir. Rapor edilmiş olan bu çalışmalara göre tahıl ve tahıl kaynaklı ürünlerin aflatoksin içerikleri değerlendirildiğinde; işlenmiş gıda ürünü kalitesinin ham madde kalitesi ile doğrudan ilişkili olduğu ve etkilendiği görülmekte ve gıda zincirindeki aflatoksin ve aflatoksijenik küf kontaminasyonunun kontrol edilmesinin özellikle insan sağlığı için önemli olduğuna dikkat çekmektedir.

Nitekim çalışmamızda incelediğimiz 25 çeşit tahıl kaynaklı un örneğinin 19 adedinde (% 76) aflatoksin varlığı belirlenmiştir. 15 adet (% 60) numunede Aflatoksin G1 belirlenmiştir. Ancak sadece 1 (% 6,6) un örneğinde (12 no'lu un örneği) ölçülebilir değerin üzerinde (AFG1 LOQ; 0,6) aflatoksin G1 belirlenmiştir. 12 adet (% 48) numunede Aflatoksin B1 belirlenmiştir. Bu un örneklerinden 3 (% 25) tanesinde (18, 24 ve 26 no'lu un örnekleri) ölçülebilir değerin üzerinde (AFB1 LOQ; 0,25) aflatoksin B1 belirlenmiştir. İncelenen un örneklerinin 7 (% 28) tanesinde Aflatoksin B2 belirlenmiştir ve bu örneklerin 2 (% 29) tanesi (18 ve 26 no'lu un örnekleri) ölçülebilir değerin üzerinde (AFB2 LOQ; 0,05) aflatoksin B2 belirlenmiştir. İncelenen 25 adet un örneğinde Aflatoksin G2'ye rastlanmamıştır. Örneklerin 2 (% 8) (18 ve 26 no'lu un örnekleri) adedinde belirlenen AFB1 düzeyinin Türk Gıda Kodeksinin tahıllar (karabuğday (*Fagopyrum* sp.) dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar alanında değerlendirildiğinde kabul edilebilir sınırlarının üzerinde olduğu saptanmıştır. Örneklerin 3 (%12) (18, 24 ve 26 no'lu un örnekleri) tanesi aynı kategoride aflatoksin G1+B1+B2+G2 düzeyinin kabul edilebilir sınırlarının üzerinde olduğu saptanmıştır.

Un örnekleri ve bu örneklerden izole edilen aflatoksijenik küflerle ilgili sonuçlar incelendiğinde 3 no'lu unda aflatoksin ve aflatoksijenik küf

bulunmazken, 22 no'lu unda ise aflatoksin bulunmadığı ve bu un örneğinden izole edilmiş olan bir adet *A. flavus* izolatının aflatoksin üretme yeteneğinde olmadığı saptanmıştır. 4, 5, 16, 20, 23 ve 24 no'lu un örneklerinde aflatoksijenik küf bulunmamasına rağmen Türk Gıda Kodeksine göre kabul edilebilir düzeylerde aflatoksin varlığı ile karşılaşmıştır. Aksine 6 ve 8 no'lu unlarda ise herhangi bir aflatoksine rastlanmazken her iki undan düşük düzeyde aflatoksin üretme yeteneğine sahip birer adet *A. flavus* varlığı belirlenmiştir. 1 ve 2 no'lu un örneklerinde ve bu un örneklerinden elde edilen *A. flavus* izolatlarında oldukça düşük seviyede aflatoksin G1, B1 ve B2 varlığına rastlanmıştır. 10 no'lu un örneğinde miktarı belirlenemeyen seviyede bir aflatoksin G1 varlığı söz konusudur. Bu un örneğinden izole edilmiş olan iki *A. flavus* izolatının aflatoksin G1 üretme yeteneği bulunmazken, integre edilemeyen düzeyde aflatoksin B2 ve G2 ürettiği, bunun yanı sıra etkin bir şekilde aflatoksin B1 üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. 11 no'lu un örneğinde ise izole edilmiş olan *A. flavus*'ların 1-8 ng/ml aralığında aflatoksin G1 üretmiş oldukları belirlenmiştir. Bu veriye paralel olarak incelenen bu un örneğinde integre edilemeyen bir düzeyde aflatoksin G1 varlığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra bu un örneğine ait *A. flavus* örneklerinde 0.02-6.46 ng/ml aralığında aflatoksin B1 integre edilemeyen düzeyde de aflatoksin B2 üretme yeteneğinin söz konusu olduğu saptanmıştır. 12 no'lu un örneğinden elde edilen izolatların ise farklı seviyelerde Aflatoksin G1, B1 ve B2 üretme yeteneğine sahip olduğu ve bu un örneğinde Türk Gıda Kodeksi tarafından kabul edilebilir seviyenin üzerinde aflatoksin G1 belirlenmiştir. Bunun yanı sıra diğer aflatoksin tiplerine rastlanmamıştır. 13 no'lu un örneğinde herhangi bir aflatoksin bulunmazken, bu un örneğinden elde edilen *A. flavus* izolatının yüksek seviyede aflatoksin G1 ve G2 üretme yeteneğinde olduğu dikkat çekmektedir. 14 no'lu un örneğinde integre edilemeyen seviyede aflatoksin B1 gözlenirken bu un örneğinden elde edilen izolatların aflatoksin B1 yüksek olmak üzere farklı seviyelerde aflatoksin G1 ve B2 üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. 15 no'lu un örneğinde ise kabul edilebilir düzeyde aflatoksin G1 varlığı gözlemlenmiştir. Bu un örneğinden elde edilen *A. flavus* izolatının da aflatoksin G1 ve B1 üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. 17 no'lu un örneğinde ise integre edilemeyen düzeyde aflatoksin G1 ile karşılaşmıştır. Bu un örneğine

ait *A. flavus* izolatları incelendiğinde ise özellikle aflatoksin B1 olmak üzere aflatoksin G1 ve B2 üretme yeteneklerinin olduğu belirlenmiştir. 19 no'lu un örneğinde kabul edilebilir bir düzeyde aflatoksin B1 belirlenirken bu un örneğinden elde edilmiş olan *A. flavus* izolatlarının özellikle aflatoksin B1'i oldukça yüksek seviyede üretebildiği bunun yanı sıra aflatoksin G1 ve B2'yi de üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. 9, 21 ve 25 no'lu un örneklerinde ise integre edilemeyen bir miktarda aflatoksin G1 ve B1 görülürken her iki un örneğinden elde edilen izolatların aflatoksin B1 oldukça etkin bir şekilde olmak üzere aflatoksin G1 ve B2'yi de üretme yeteneklerine sahip oldukları belirlenmiştir. 18 ve 26 no'lu un örneklerinde kabul edilebilir düzeyin üzerinde aflatoksin B1'in yanı sıra aflatoksin G1 ve B2 varlığına rastlanmıştır. Bu un örneklerinden elde edilen *A. flavus* izolatlarının aflatoksin B1'i oldukça yüksek bir oranda üretebildikleri bunun yanı sıra aflatoksin G1 ve B2 toksinleri de yüksek konsantrasyonlarda üretebildikleri dikkati çekmektedir.

İncelenen 25 un örneğinin 2 (% 8) adedinde belirlenen AFB1 düzeyinin Türk Gıda Kodeksinin kabul edilebilir sınırları üzerinde olduğu saptanmıştır. Örneklerin 3 (%12) tanesinin ise aflatoksin G1+B1+B2+G2 düzeyinin kabul edilebilir sınırlarının üzerinde olduğu saptanmıştır. İlaveten; 9, 13, 14, 17, 19, 21 ve 25 no'lu un örneklerinde ölçülebilir olmayan veya Türk Gıda Kodeksinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde aflatoksin varlığına rastlanmıştır. Bu un örneklerinde bulunan *A. flavus* izolatlarının uygun gelişme koşullarında dikkat çekici düzeyde bir aflatoksin üretme yeteneği sergilemesi bahsi geçen un örneklerinin tüketici tarafından uygun koşullarda saklanmaması durumunda bir risk faktörü olabileceklerini işaret etmektedir. Çünkü ürün nemi, ortamın nisbi rutubeti, sıcaklık, ortamda bulunan küf veya sporlarının yoğunluğu, gelişen türlerin toksin oluşturma güçleri, mikroorganizmalar arası rekabet, ürünün ve yetiştirilen çeşidin direnci, böcek veya diğer zararlıların faaliyeti, hava sıcaklığı, atmosferik gazların bileşimi gibi birçok etken aflatoksin oluşumunu etkilemektedir (Çoksöyler 1999).

Gıda örneklerinde karşılaşılan ana mikotoksinlerden bir diğeri olan OTA, ilk olarak 1969 yılında mısırdaki belirlenmiştir (Yıldız 2009). Karagüzlü ve Karapınar (2000) tarafından aşurelik buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi, yulaf unu ve müssliden oluşan toplam 100 adet gıda örneğinde OTA

taraması yapılmıştır. Çalışma 1 adet aşurelik buğday, 2 adet mısır ve 1 adet yulaf ezmesi olmak üzere toplam 4 örnekte 0.27-9.84 ppb düzeyleri arasında değişen okratoksin-A varlığının saptanması ile sonuçlanmıştır. Erzurum'da piyasaya sunulan buğday unlarından 50 adet un örneğinin ELISA yöntemi ile okratoksin A içeriği yönünden incelenmesi sonucu ise 6 (% 12) örneğin Türk Gıda Kodeksine göre kabul edilebilir sınır değerlerin üzerinde olduğu saptanmıştır (Özturan ve ark. 2007). Şeviktürk ve Gönülalan (2007) tarafından Kayseri'de tüketime sunulan tahıl ürünleri üzerine gerçekleştirilen bir araştırmada; 25'er adet buğday unu, pirinç ve bulgur numunesi okratoksin A içeriği yönünden incelenmiştir. Çalışmada buğday ununa ait en yüksek değer $1011,84 \pm 0,08$ ppt olurken, en düşük değer $145,66 \pm 0,09$ ppt olarak tespit edilmiş, ortalama okratoksin A değeri 360,93 ppt olarak kaydedilmiştir. Pirinç numunelerinde yapılan değerlendirmede, en yüksek ve en düşük sonuçlar sırasıyla $381,93 \pm 0,08$ ppt ile $153,76 \pm 0,06$ ppt olup, ortalama değer 241,07 ppt olarak bulunmuştur. Bulgur numunelerinin ise en yüksek okratoksin A değeri $548,80 \pm 0,06$ ppt, en düşük okratoksin A değeri $158,53 \pm 0,07$ ppt ve ortalama okratoksin A değeri 384,10 ppt olarak belirlenmiştir. Baydar ve ark. (2005) tarafından Ankara'daki tohum, bakliyat, tahıl unları ve nişastayı içeren tahıl ürünleri üzerine gerçekleştirilen OTA belirleme çalışması ise incelenen 25 adet örneğin 0,27-4,07 ppb aralığında toksin içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada incelenen numunelerden 3 adedinin Türk Gıda Kodeksine göre kabul edilebilir sınır değerler üzerinde toksin içeriğine (3,45, 3,69, 4,07 ppb) sahip olduğuna dikkat çekilmiştir. Türkiye'nin Avrupa yakasındaki 7 farklı üretim bölgesinden toplanan 100 adet buğday unu örneğinin OTA içeriği yönünden değerlendirilmesi sonucu örneklerde 0,025-10,5 µg/kg toksin içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Aydın ve ark. 2008).

Son yıllarda pirinç, mısır, buğday ve arpa gibi tahıllar ve tahıl ürünleri üzerine yapılan araştırmalar; bu ürünlerin okratoksijenik küfler tarafından kontamine edildiğini göstermektedir. Söz konusu kontaminasyon hasat öncesi ve esnasında gerçekleşmekte ve kurutma, işleme ve depolama sırasında da varlığını devam ettirmektedir (Mills ve ark. 1989; Anli ve Alkis 2010). Özellikle düşük sıcaklıklı iklimlere sahip ülkeler ve depolama koşullarında OTA kontaminasyonu meydana gelmektedir. Çünkü OTA üretici *Penicillium*'lar düşük sıcaklıklarda

gelişme ve OTA üretme yeteneğine sahiptirler ve bu koşullarda OTA üreten *Penicillium* türleri sadece 30 °C'nin altındaki sıcaklıklarda ve a_w 0,80'in üzerindeki gelişebilmeleri nedeniyle *Aspergillus* türlerinden daha fazla kontaminasyonlara yol açmaktadırlar (Lin ve ark. 2005; El Khoury ve ark. 2008).

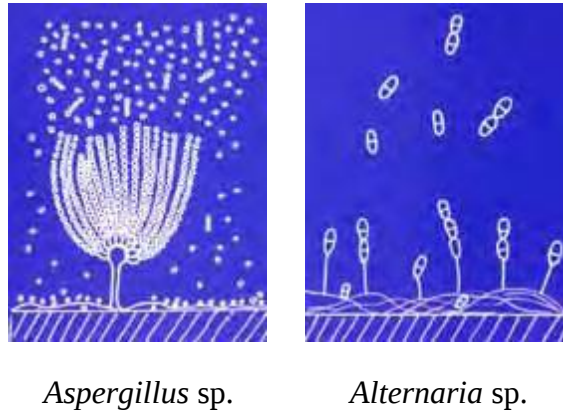
Çalışmamızda incelediğimiz 25 tahıl kaynaklı unun 20 (% 80)'sinde 0,79-5,11 µg/kg aralığında OTA varlığı belirlenmiştir. Bu örneklerden 2 (% 10) tanesinde Türk Gıda Kodeksine göre maksimum sınır değerlerinin üzerinde OTA içerdiği (2 no'lu buğday unu; 3,02 µg/kg, 18 no'lu mısır unu; 4,75 µg/kg) belirlenmiştir. Un örneklerindeki OTA ve okratoksijenik küf içeriğine bakıldığında OTA içeriği sınır değerlerinin üzerinde olan 2'nolu buğday unundan elde edilen ve *Aspergillus niger* olarak tanımlanmış olan 2 küf izolatının OTA üretme yeteneğine sahip olmadığı saptanmıştır. Nitekim bu türün incelenen tüm örneklerinin sadece %6-10'unun OTA üretme yeteneğine sahip olduğu kaydedilmiştir (Samson ve ark. 2010). Ortalama olarak 4,75 µg/kg OTA içeren 18 no'lu mısır örneğinden ise 4 adet okratoksijenik küf toksin üretme yetenekleri yönünden incelenmiş ve *A. alliaceus* olarak tanımlanmış olan bir izolatın 4,53 ng/g okratoksin A üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Nitekim *A. alliaceus* *Flavi* grubunda yer alan önemli bir okratoksijenik küflerdir. (Medina ve ark. 2005; Lo'pez-Mendoza ve ark. 2009; Cabanes ve Bragulat 2010). Çalışmada incelediğimiz diğer 23 un örnekten sadece 3 (% 12) tanesinde (20 no'lu soya unu, 22 no'lu tam buğday unu ve 23 no'lu kepekli un) OTA ve okratoksijenik küf içeriği belirlenmemiştir. 6 (% 24) un örneğinde (1, 6, 8, 10, 11 ve 16 no'lu un örnekleri) ise 0,80-2,04 µg/kg aralığında bir OTA varlığı belirlenmesine rağmen bu örneklerden okratoksijenik küf izolatı elde edilememiştir. 3, 15, 19 ve 25 no'lu olmak üzere 4 (% 16) un örneklerinde ise 0,81-1,77 µg/kg aralığında OTA belirlenmiş olmasına rağmen bu örneklerden izole edilen küflerin OTA üretme yeteneği olmadığı belirlenmiştir. 14 no'lu (buğday unu) ve 17 no'lu (kepekli un) un örnekleri olmak üzere 2 (% 8) un örneğinde ise OTA belirlenmemesine rağmen, bu örneklerde farklı seviyelerde OTA üretme yeteneğine sahip küflerin bulunduğu belirlenmiştir. Diğer 8 (% 32) un örneğinde (4, 5, 9, 12, 13, 21, 24 ve 26) ise Türk Gıda Kodeksinin izin verdiği değer aralığında OTA ve farklı düzeylerde OTA üretme yeteneğine sahip küf bulunduğu belirlenmiştir. Bu

örneklerdeki küflerin OTA üretme yetenekleri incelendiğinde ise (Çizelge 3.22) 47-28.439 ng/g oranı gibi çok yüksek oranlarda OTA üretebilen küflerin varlığı dikkat çekmektedir.

İncelenen örneklerde gıda örneğindeki mikotoksin varlığı-yokluğu ile mikotoksijenik küf varlığı-yokluğu arasında tam bir eşleşmenin olmadığı durumlarla karşılaşılmıştır (Örneğin; 2 no’lu buğday unu örneğinin okratoksijenik küf içermemesine rağmen sınır değerlerinin üzerinde bir OTA’ya sahip olması gibi). Söz konusu durum ile ilgili; gıda örneğine önceden mikotoksin sentezleyen küflerin bulaşp toksin oluşturduğu ve herhangi bir nedenle küflerin canlılıklarını sürdüremedikleri düşünülebilir. Nitekim Karagözlü ve Karapınar (2000) tarafından tahıl ve tahıl ürünlerindeki OTA belirleme çalışmasında benzer sonuçlar ile karşılaşmışlar ve bir gıdada küflerin bulunmamasının o gıdada toksin bulunmayacağına güvencesi olmadığını, küfün toksin ürettikten sonra ortamdaki varlığını sürdüremeyebileceğini, ancak toksinin üründe kalacağını desteklemişlerdir.

Çalışmamızda 25 adet tahıl kaynaklı un örneğinin küf yükü, mikotoksijenik küf yükü, aflatoksinler ve OTA içeriği incelenmiştir. Elde edilen tüm veriler kıyaslandığında ise 18 no’lu mısır ununun Türk Gıda Kodeksinin sınır değerleri üzerinde aflatoksin B1 ve okratoksin A içerdiği, ayrıca bu örneklerden izole edilen mikotoksijenik küflerin de söz konusu toksinleri yüksek seviyede üretebildikleri görülmektedir. Fakat küf yükü açısından bakıldığında ise izin verilen değerler ($<10^4$ kob/g) altında olduğu dikkat çekmektedir. Türk Gıda Kodeksinin “Mikrobiyolojik Kriterler” (Resmi gazete, 2009) ve “Bulaşanlar Tebliği” (<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>) bakış açısıyla değerlendirmeye devam ettiğimizde ise 23 no’lu kepek örneğinin herhangi bir mikotoksin ve mikotoksijenik küf içermemesine rağmen, içerdiği küf yükünün kriterlerin üzerinde ($>10^4$ kob/g) olması nedeniyle ve küflerin pişirme aşamasında ulaşılan yüksek sıcaklıklar nedeniyle elimine edilebilmelerine rağmen (Ergönül 2007) kullanım dışı kalmaktadır. Ayrıca küfler birbirinden oldukça farklı sporulasyon yeteneğine sahiplerdir. Bir *Aspergillus* konidiyoforu oldukça fazla spor üretmektedir, ancak *Alternaria* kolonisi miselyal yapı açısından zenginken her bir konidiyofor sadece birkaç spor üretebilmektedir (Food and Indoor Fungi

Workshop 2010). Herhangi bir örnekten direk ekim veya seyreltme yöntemi ile yapılan kültür çalışmasının koloni sayımı ile takip edilmesi ve buna dayalı olarak küf yükünün belirlenmesi spor oluşturma özelliği yüksek olan küflerin düşük olanlara göre daha sık karşılaşılmaması ve buna bağlı olarak da gerçekten uzaklaşan verilere varılması ile sonuçlanacaktır. Kültüre bağımlı sayım işlemleri Real-Time PCR gibi sayısal analizler yapmayı sağlayan yöntemler (Konietzny ve Greiner 2003; Reischer ve ark. 2004; Mule ve ark. 2006; Russell ve Paterson 2006; Niessen 2007; Yin ve ark. 2009; Del Fiore ve ark. 2010) ile desteklenerek sayım işlemi fenotipik özelliklerin etkisinden çıkarılabilir.



Şekil 4.2. *Aspergillus* ve *Alternaria* üyelerinde sporulasyon özelliklerinin kıyaslanması

Türk Gıda Kodeksinin “Mikrobiyolojik Kriterler” (Resmi gazete, 2009) ve “Bulaşanlar” (<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html>) tebliğlerine göre küf yükü ve bulaşanlar içeriği yönünden kullanıma uygun olmasına rağmen yüksek seviyede mikotoksin üretme yeteneğine sahip küfleri içerdiği belirlenmiş olan ve “**riskli ürün**” olarak nitelendirilen un örnekleri çalışmamızda incelenen örneklerin % 32 (8 adet)’sini oluşturmaktadır. Küfler çevresel koşullar uygun olduğunda gelişimlerine ve toksin üretimlerine devam etmektedirler (Samson ve ark. 2010; Anli ve Alkis 2010; Lin ve ark. 2005). Bundan dolayı riskli ürünlerin raf ömürleri süresince gıda kalitelerinin bozulması ve tüketici sağlığı açısından tehlikeli hale gelmeleri olasıdır. Söz konusu riskli ürünlerin diğer bir önemli bakış açısı ise bu tip gıdaların üretim ve/veya tüketimleri esnasında iç ortam havası için de risk oluşturmalarıdır. İç havada en sık karşılaşılan tür listesi (Samson ve ark. 2010) incelendiğinde çalışmamızda belirlemiş olduğumuz mikotoksijenik küflerin bu liste içerisinde de yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca mikotoksijenik küf yükünün

değerlendirilmesi konusunda da her bir örnekte ne kadar mikotoksijenik küf olduğu değil ne kadar mikotoksin üretme yeteneğine sahip küf olduğuna dikkat edilmiştir. Çünkü literatür bilgisine göre mikotoksijenik olan cins veya türlerin mikotoksin üretme yeteneği yönünden tek bir standartta olmadığı çalışmamızda elde edilen önemli bir veridir. 11 no'lu galeta unundan 10 (% 13,16) adet mikotoksijenik küf izolatu edilmiştir ve bu sayı en yüksek izolat sayısı olarak en yüksek değerlerden biridir. Ayrıca bu 10 adet izolatın 9 (% 90)'u 0,82-8,12 ng/ml (Çizelge 3.18) arasında bir aflatoksin üretme yeteneğine sahip olması da en yüksek pozitif mikotoksin üretme sonucudur. Ancak 26 no'lu mısır örneğinden 4 adet aflatoksijenik küf izole edilmiştir ve bunların tamamı aflatoksin üretme yeteneğinde olmakla beraber bu izolatlardan 3'ünün sadece aflatoksin B1 üretme yeteneği 10.438, 9.799, 122 ng/ml'dir. Bu nedenle bir gıda ürününe mikotoksijenik küf varlığı kadar, bu küflerin mikotoksin üretme yeteneklerinin de gıda kalitesi, risk taşıyor olması ve tüketici sağlığı için önemli bir faktör olarak belirlenmiştir. Küflerin pişirme aşamasında ulaşılan yüksek sıcaklıklar nedeniyle elimine edilebildiği (Ergönül 2007) bir gerçektir, ancak bu küfler tarafından üretilen mikotoksinlerin ise pişirme (>150 °C) ve diğer tip işlemlere (kızartma, fırınlama, haşlama vb.) karşı kararlı olduğu da unutulmamalıdır (Chu ve ark. 1975; Boudra ve ark. 1995; Bruinink ve ark. 1997; Nehad ve ark. 2005; Bullerman ve Bianchini 2007; Kabak 2009, Mariutti ve Valente Soares 2009). Mikotoksinlerin parçalanmasında; mikotoksin başlangıç derişimi, mikotoksin tipi, ısıtma süresi, ısının uygulanan örneğe penetre olması, nem, pH ve iyonik özellikler etkileyici faktörlerdir. Aflatoksinler 237-306 °C gibi oldukça yüksek dekompozisyon sıcaklığına sahiptir ve kuru ısıya karşı yüksek kararlılıktadır. Yemekteki aflatoksin B1 ve B2 pişirme sıcaklığının (>150 °C) üzerindeki sıcaklıklarda % 41, mısırdaki ise haşlama ve kızartma işlemleri ile ortalama % 28 oranında bir bozulma göstermiştir. Okratoksin A'nın ise erime derecesi 169 °C'dir. Kuru kahve tohumlarıyla 200 °C'de gerçekleştirilen kızartma işlemi ile okratoksin A miktarında % 0-12 arasında bir bozulma oluşturulabilmiştir (Ergönül 2007; Kabak 2009).

Çizelge 4.1. İncelenen 25 adet tahıl kaynaklı un örneği küf yükü, mikotoksijenik küf yükü, aflatoksinler ve okratoksin A içeriği yönünden kıyaslanması

Örn. No	Örnek tipi	Küf yükü	Aflatoksinler		Okratoksin A	
		Kob/g	Küf*	Toksin	Küf*	Toksin
1	Buğday Unu	60	2(0)	0,03 B1,B2	0	1,28
2	Sert Buğday Unu	140	2(1)	0	2(0)	3,02
3	Özel Karışımli Buğday Unu	233	0	0	3(0)	1,73
4	Galeta Unu (Riskli ürün)	130	0	0	1(1); 47	2,19
5	Pirinç Unu	10	0	0	1(1); 3,69	0,94
6	Kepekli Un	1100	1(0)	0	0	1,06
8	Geleneksel Buğday Unu	200	1(0)	0	0	2,04
9	Yulaf unu karışımli Buğday Unu (Riskli ürün)	3800	4(2); 639 B1	0	1(0)	1,32
10	Vitaminli ve Mineralli Buğday Unu	250	2(1); 7,6 B1	0	0	0,80
11	Galeta Unu	60	10(9)	0	0	0,91
12	Buğday Unu	119	8(5)	6,57 G1	2(2); 6,32	0,87
13	Buğday Unu (Riskli ürün)	47	2(1); 132 B1, 79 B2	0	8(4); 1023	0,93
14	Buğday Unu (Riskli ürün)	67	10(5); 42	0	3(3); 11,71	0
15	Glutensiz Un	25	1(1)	0,13G1	1(0)	0,88
16	Galeta Unu	4	0	0	0	0,89
17	Kepekli Un (Riskli ürün)	45	6(4); 81 B1	0	8(3); 12,14	0
18	<u>Mısır Unu</u>	1435	10(7); 1592 B1, 23 B2	22,38 B1, 0,57 B2	4(1); 4.53	4,75
19	Mısır Unu (Riskli ürün)	297	3(2); 308 B1	0,16 B1	1(0)	0,81
20	Soya Unu	4	0	0,15 B1	0	0
21	Buğday Unu (Riskli ürün)	59	8(8); 18,64 B1	0	5(2); 28.440	1,29
22	Tam Buğday Unu	19	1(0)	0	3(0)	0
23	<u>Kepekli Un</u>	13500	0	0	0	0
24	Buğday Unu (Riskli ürün)	275	0	0,72 B1	5(1); 434	1,15
25	<u>Çavdar Unu</u>	47500	1(1); 176 B1	0	1(0)	1,37
26	<u>Mısır Unu</u>	18750	4(4); 10438 B1, 126 B2	14,99 B1, 0,27 B2	4(1); 8,66	1,63

* Mikotoksijenik izolat(mikotoksin üretme yeteneği olan izolat); dikkat çekici mikotoksin miktarı ng/ml-g

Ekonomik önemlerinin yanı sıra insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri nedeniyle mikotoksijenik küfler taksonomik ve filogenetik dikkatleri üzerine

çekmektedir. Mikotoksinleri üreten tür listesinin moleküler filogenetik çalışmalar, hassas kimyasal dedeksiyon ve identifikasyon teknikleriyle taksonomik içeriğin değişmesi sonucu oldukça kısılmasına rağmen toksin üreten küf listesi oldukça uzundur (Dijksterhuis ve Samson 2007). Gıda kaynaklı küflerin identifikasyonu uzun yıllar fenotipik ve fizyolojik karakterlerine göre gerçekleştirilmiştir ve küflerin geleneksel yöntemlerle identifikasyonu sıklıkla çevresel organizmaların izolasyonu ve kültüre edilmesi, hastalık semptomlarının tanımlanması, morfolojik ve biyokimyasal testlerle laboratuvarında identifikasyona dayanmaktadır. Fenotipe dayalı identifikasyon sıklıkla zordur ve araştırmada iyi bir tecrübe gerektirir (Atkins ve Clark 2004; Samson ve ark. 2010). Fakat yanlış identifiye edilen strainler ve mikotoksin belirlemedeki yanlışlıklar önemli karışıklıklara neden olmaktadır. Bu nedenle diğer pek çok filum ve alem için olduğu gibi nükleer ribosomal operondan kaynaklanan DNA dizi verileri ve diğer moleküler identifikasyon yaklaşımları küflerin taksonomisi için kullanılmaktadır (Dijksterhuis ve Samson 2007).

Fenotipik özellikler temel oluşturmalarına rağmen PCR ve DNA/RNA prob tekniklerine dayanan bazı moleküler araçlar gündemde önemli bir yere sahiptir. Bu yöntemlerin kullanımı; hızlı ve niceliğe dayalı sonuçlar sağlamaktadır. PCR ve proba dayalı teknikler sayım sonucu da sağlamasına rağmen geleneksel yöntemlerin bu konuda kullanımı ise sayımın yanı sıra örnek ve küf sayısı arasında var olan etkileşimlerin de gözlemlenmesini sağlamaktadır. Artan ve geliştirilen her bir moleküler teknik sayesinde ise sadece küfler hakkında değil onların toplulukları hakkında da bilgi edinmek mümkün hale gelmektedir (Atkins ve Clark 2004). Fungal ribozomal DNA (rDNA)'ya ait içsel transkribe edilen aralıklar (ITS) PCR analizi ile fungusların ayırt edilmesinde büyük öneme sahip olan dizilerdir. Birden fazla primer seti kullanılarak amplifikasyonlara ait diziler oldukça verimli sonuçlar sağlamakta ve fungal barkot olarak tercih edilmektedir (White ve ark. 1990; Skouboe ve ark. 1999; Samson ve Pitt 2000; Martin ve Rygiewicz 2005; Kılıçoğlu ve Özkoç 2008; Samson ve ark. 2010).

Çalışmamızda incelenen un örneklerinden izole edilen ve metabolit profillerine göre belirlenen 32 temsilci mikotoksijenik küf; kısmi 18S-ITS1-5.8S-ITS4-kısmi 26S gen bölgesi, β -tubulin (BenA) ve Kalmodulin gen bölgelerinin

dizilenmesi ile moleküler olarak identifiye edilmiştir. Ele alınan gen bölgelerinden ITS ve β -tubulin *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsleri için kullanılırken, kalmodulin sadece *Aspergillus* cinsi için kullanılmış ve *Penicillium* örneklerinde spesifik olmayan amplifikasyonlar ile sonuçlanmasından dolayı tercih edilmemiştir. *A. candidus*'un dış grup olarak kullanılması ve 1000 tekrarlı (bootstrap) olarak karşılaştırılmaları çerçevesinde, üç gen bölgesine ait dizi bilgilerine dayalı filogenetik ilişki incelendiğinde ise un örneklerindeki mikotoksijenik küflerin 4 farklı gruba ait olduğu belirlenmiştir. Bunlardan aflatoksin üretme yeteneğine sahip olan *A. flavus*'lar ve OTA üretme yeteneğine sahip olan *A. alliaceus*'un *Flavi* seksiyonda (Samson ve ark. 2010) yer almalarının yanı sıra üç gen dizisi için % 60 (ITS), % 90 (BenA) ve % 99 (kalmodulin) bootstrap değer ile *Flavi* grubu içerisinde birbirinden ayrı iki grup oluşturmuşlardır. *A. ochraceus*; *Circumdati* seksiyonda, *A. japonicus*, *A. niger* ve *A. tubingensis* ise *Nigri* seksiyondadır (Samson ve Pitt 2000; Samson ve ark. 2010) ve filogenetik ağaçta aynı grup içerisinde yer almışlardır. *Nigri* grubu *Aspergillus*'lar *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. foetitus* ve *A. niger* kümesini içermektedir. *A. nigri* kümesi ise morfolojik olarak birbirinden ayrımları oldukça güç olan *A. niger* ve *A. tubingensis* türlerini içermektedir (Medina ve ark. 2005; Samson ve ark. 2010). Çalışmamızda üç gen bölgesinin dizilenmesi ile söz konusu türlere ait izolatlar % 98 benzerlik oranları ile doğru olarak tanımlanmıştır. Nitekim bu örnekler her üç gene ait filogenetik ağaçta *A. nigri* ve *A. tubingensis* aynı grupta % 95 (ITS), % 100 (BenA) ve % 99 (kalmodulin) bootstrap değerleri ile aynı grupta yer alırken, *A. japonicus* % 85 (ITS), % 42 (BenA) ve % 63 (kalmodulin) bootstrap değerleri ile ikinci bir grup olarak kendisini göstermiştir. Elde ettiğimiz bu veri temel bilgiler ile paralellik göstermekle birlikte, morfolojik olarak birbirine çok yakın olan küflerin birbirinden ayırımında moleküler tekniklerin güçlü veriler sağladığını göstermektedir. Ayrıca ITS gibi evrensel korunmuşluğa sahip temel gen bölgelerinin yanı sıra protein kodlayan gen bölgelerinin kullanılması sonucu birbiri ile tutarlı sonuçlar elde edilmiş ve filogenetik akrabalık ilişkilerinin yansıtılmasında önemli destekleyici veriler sağlanmıştır. Tervetisillat dallanma yapısında olan *P. viridicatum* izolatları ise *Penicillium* Subgenus *Penicillium*'a aittir (Samson ve ark. 2010) ve filogenetik ağaçta aynı grup içerine

yerleşmişlerdir. Küflerin morfolojik identifikasyonun zorlayıcı olması ve araştırmacının değerlendirme ve tecrübesinden yüksek oranda etkilenmesine ilaveten *Penicillium* cinsi üyeleri *Aspergillus* üyelerine göre daha ince ve küçük yapılara sahiptir. Bu nedenle morfolojik identifikasyonu daha zor gerçekleştirilmektedir (Pitt 1979; Klich 2002; Pitt 2000a). Nitekim çalışmamızda kültürel özellikleri doğrultusunda okratoksijenik bir *Penicillium* olarak kaydedilen 13.20 kod numaralı *Penicillium* izolatu ITS ve β -tubulin gen bölgelerinin dizilenmesi sonucu okratoksijenik olmayan *P. chrysogenum* (% 98) olarak tanımlanmıştır. Yoğun sklerotia üretmesi ile *Flavi* seksiyonundan olan *A. alliaceus* olarak morfolojik identifikasyonu tamamlanmış olan 26.3 kodlu izolatu ise moleküler identifikasyonlar sonucu *Flavi* seksiyonundaki *A. flavus* olduğu ve bu izolatu yoğun sklerotia üretme yeteneğine sahip “S” formu bir *A. flavus* olduğu sonucuna varılmıştır. Bu tür yanlış identifikasyonlar mikotoksijenik tür listesinin oldukça uzamasına neden olan gerçek dışı veriler oluşturmakta ve araştırmacıları yanıltmaktadır. Ancak morfolojik özelliklerinin temelinde moleküler identifikasyonu takip edilmesi bu tür yanlış identifikasyon verilerinin oluşmasını engelleyecektir (Samson ve ark. 2010; Atkins ve Clark 2004; Dijksterhuis ve Samson 2007). Çalışmamızda morfolojik özelliklerin incelenmesi moleküler identifikasyon ile takip edilmiş ve ayrıca evrimsel olarak yüksek korunmuşluğa sahip olan rDNA bölgesine ilaveten protein sentez eden ilave gen bölgesinin (BenA) incelenmesi ile veriler güçlendirilerek bilim dünyasına doğru veriler kazandırılmaya özen gösterilmiştir.

Mikotoksijenik küflerin filogenetik ağaçta yerleşimleri ile mikotoksin üretme yetenekleri kıyaslandığında ise mikotoksin üreten ve üretmeyen küflerin filogenetik ilişkiyi etkileyecek bir ayırım ile sonuçlanmadığı belirlenmiştir. Aflatoksin üreten ve üretmeyen *A. flavus* izolatları farklı bootstrap değerleri ile aynı grup içerisinde yer almışlardır. Nitekim Tran-Dinh ve ark., (1999) toksijenik ve toksijenik olmayan *A. flavus* ve *A. parasiticus*’un moleküler özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada; RAPD profillerini sonucu söz konusu iki türün iki grup halinde yerleşerek filogenetik olarak farklı fakat akraba olan gruplar olduklarını ve toksijenik ve non-toksijenik türlerin ise kendi içerisinde ayrı bir grup oluşturmadığına dikkat çekmişlerdir. Ayrıca *A. flavus*’ların “L” ve “S” formları

olmak üzere iki morfolojik form sergilediği ve bununda filogenetik ilişkiye yansıdığı ancak aflatoksin üretme yetenekleri ile ilişkili olmadığı araştırmacılar tarafından açıklığa kavuşturulmuştur.

Sonuç olarak;

1) İncelen örneklerin küf içeriği yükünün $2-4,8 \times 10^4$ kob/g aralığında olduğu belirlenmiştir. Raf ömrü henüz dolmamış olan bu gıdaların Türk Gıda Kodeksinin maksimum sınır değerlerine ulaşan ve aşan küf içeriğine sahip oldukları ortaya konulmuştur.

2) İncelenen tahıl kaynaklı un örneklerinin büyük bir kısmının mikotoksijenik küf içeriğine sahip olduğu, bu mikotoksijenik küflerin 4-28.000 ng/g arasında değişen mikotoksin üretme yeteneğine sahip oldukları ve bunun gıda kalitesini etkileyip tüketici sağlığı için risk teşkil ettiği ortaya konulmuştur.

3) İncelenen örneklerden elde edilen mikotoksijenik küfler arasında *A. flavus*'un baskın olduğu ve bunu *P. viridicatum*'un takip ettiği belirlenmiştir. Ayrıca dizi analizi sonrası *A. alliaceus*, *A. ochraceus*, *A. japonicus*, *A. niger* ve *A. tubingensis* varlığı belirlenen diğer mikotoksijenik küflerdir.

4) İncelenen 25 örnekten 24'ün aflatoksin ve okratoksin A içerdiği, dolayısıyla da piyasada var olan tahıl kaynaklı unların mikotoksin sorununa sahip olduğu tespit edilmiştir.

5) Mikotoksin içeriği açısından 2 un örneğinin ise okratoksin A, 3 un örneğinin aflatoksin içeriği yönünden henüz raf ömrü sürecinde Türk Gıda Kodeksi maksimum sınır değerlerinin üzerinde olduğu ve un örneklerindeki aflatoksin sorununun ise B grubu aflatoksinler konusunda olduğu belirlenmiştir.

6) Yapılan çalışma ile Eskişehir'de piyasaya sunulan farklı tahıl kaynaklı unların küf, mikotoksijenik küf ve mikotoksin içeriği ilk defa ortaya konulmuştur.

Öneriler ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalar:

Gıda maddesinin içerisindeki küf potansiyelinin kültürel yöntemler ile sayılması, her bir küfün vejetatif yapı ve sporlanma özellikleri yönünden farklı olması nedeni ile yanımlara yol açabileceği ve bu yöntemlerin Real-Time PCR gibi miktar belirlemeye imkan sağlayan moleküler teknikler ile desteklenmesinin verimli sonuçlar meydana getireceği düşüncesine varılmıştır.

Un örneklerinin küf ve mikotoksijenik küfleri yoğun bir şekilde barındırdığı dolayısıyla mikrobiyal kriterler açısından uyumsuzlukların söz konusu olmasına ilaveten, bu tür gıdaların alerji, elverişli koşullarda mikotoksin içeriğinin kontrol dışı artması ve iç hava kontaminasyonlarına yol açacağı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda; gıda örneklerindeki mikrobiyolojik kriterlerin sadece toplam küf sayısı olarak değil mikotoksijenik küf ve bu küflerin mikotoksin üretme yetenekleri yönünde Türk Gıda Kodeksi tarafından yasal çerçevelere dahil edilmelidir.

Söz konusu gıda tipi hasat öncesi, esnası ve sonrası aşamalarında çevresel kaynaklı kontaminasyonlara oldukça açıktır. Dolayısıyla zirai ve gıda işleme süreci son ürün kalitesini son derece etkilemektedir. Bu koşullarda tolere edilebilir küf kontaminasyonu olağandır ancak bu kontaminasyonda mikotoksijenik küf grubunun da varlığı çalışmamız sonucunda doğrulanmıştır. Bu koşullarda söz konusu gıdanın raf ömrü boyunca kontrolsüz mikotoksin üretiminin olmaması için hangi koşullarda saklanması ile ilgili bilgilerin gıda ambalajı üzerinde yer alması üretici, satıcı ve tüketici grubun bilinçlendirip toplum sağlığının üst düzeylere taşınması sağlanabilecektir. Bu amaç için un ambalajları ile ilgili yasalara, muhafaza koşullarının da ilave edilmesi önerilmektedir.

Çalışmada aflatoksin ve OTA üreticileri olarak bilinen türlere ait izolat sayısının fazla olması nedeni ile bu toksinler ve üreticilerine yoğunlaşmıştır. Tahıl kaynaklı unlardaki diğer 3 ana mikotoksin (trikotesen, fumonisinler, zearelanon) ve üreticilerinin potansiyeli gelecek çalışmalarda belirlenecektir.

Bu çalışmada 25 un örneğinden toplam 547 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlarda 32 temsilci mikotoksijenik küfe ait 3 gen bölgesi dizilenebilmiştir. Gıda örneğinden elde edilen tüm izolatlar öncelikle ITS bölgesi

ve bu bölgeye ilaveten protein kodlayan bölgeler dizilenerek tahıl kaynaklı unlarda bulunan küfleri belirlemek için en uygun fulgal barkotun belirlenmesi gelecek çalışmalarda tamamlanacaktır.

Gıdalarda bulunan mikotoksijenik küf potansiyelini hızlı yöntemler ile belirlemek amacıyla aynı örneklerden kültür bağımsız ve mikotoksin üretmekten sorumlu gen bölgeleri esas alınarak ileriye yönelik çalışmalar yapılacaktır.

Son olarak, mikotoksin sorununun çözülebilmesi için ele almış olduğumuz gıda grubuna ait zincirin diğer aşamalarındaki sorun kaynaklarını belirleme ve mikotoksin detoksifikasyonu için potansiyel organizma ve koşulların değerlendirilmesine yönelik çalışmaların yapılması planlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abbas, H.K., Shier, W.T., Horn, W. ve Weaver, M.A. (2004), *Cultural Methods for Aflatoxin Detection*, Journal of Toxicology, **23**, 295–315.
- Altan, A. (2006) *Adana ve Mersin illerinden toplanan buğday ve değirmen ürünlerine ait örneklerin mineral, bazı ağır metal, pestisit ve aflatoxin içeriklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. ve Lipman, D.J. (1997), *Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs*. Nucleic Acids Res. **25**, 3389-3402.
- Anderson, B. ve Thrane, U. (2006). “Food-borne fungi in Fruit and Cereals and their production of mycotoxins”, *Advances in food mycology*, Eds: Hocking A.D, Samson R.A, Pitt J.I., Thrane U., Springer. USA.
- Anli, E. ve Alkis, İ.M. (2010), *Ochratoxin A and brewing technology: A review*, Journal of the Institute of Brewing, **116**, 23-32.
- AOAC (1995). Natural poisons. In *Official Methods of Analysis*, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- AOAC, (2002), *AOAC Official Method 2000.03, Ochratoxin A in barley*, AOAC International.
- Aran, N. ve Eke, D. (1987), *Mould mycoflora of some Turkish cereals and cereal products*, World Journal Of Microbiology and Biotechnology, **3**, 281-287.
- Arseculeratne, S.N., De-Silva, L.M., Wijesundera, S. ve Bandunatha, H.S.R. (1969), *Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin*, Applied Microbiology, **18**, 88-94
- Atkins, S.D. ve Clark, I.M. (2004), *Fungal molecular diagnostics: a mini review*, J.Appl.Genet. **45**, 3-15.
- Ayaz, A. ve Yurttagül, M. (2008), *Besinlerdeki Toksik Öğeler- I,1. Baskı*, Klasmat Matbaacılık, Ankara.

- Aydın, A., Günsen, U. ve Demirel, S. (2008), *Total Aflatoxin, Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Levels in Turkish Wheat Flour*, Journal of Food and Drug Analysis, **16**, 48-53.
- Aydın, A., Aksu, H. ve Günsen, U. (2010), *Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice*, Environmental Monitoring and Assessment, DOI 10.1007/s10661-010-1688-9.
- Barnett H.L., Hunter B.B. (1998), *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4. Baskı. 218 pp. APS PRESS, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Baydar, T., Engin, A.B., Girgin, G., Aydın, S. ve Şahin G. (2005), *Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey*, Ann Agric Environ Med, **12**, 193–197.
- Bennett, A.T. ve Collins, K.A. (2001) *An unusual case of anaphylaxis. Mold in pancake mix*, Am J Forensic Med Pathol.;**22**, 292-295.
- Boudra, H., Le Bars, P. ve Le Bars J. (1995), *Thermostability of ochratoxin a in wheat under two moisture conditions*, Applied and Environmental Microbiology, **61**, 1156–1158.
- Brase S., Encinas A., Keck J. ve Nising C.F. (2009) *Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites*, Chem.Rev., **109**, 3903-3090.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castella, G. ve Cabañes, F.J., (1995). *Dyes as fungal inhibitors: effect on colony enumeration*, Journal of Applied Bacteriology, **79**, 578-502.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L. ve Cabañes, F.J. (2001), *An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture*, International Journal of Food Microbiology **71**, 139–144.
- Bruinink, A., Rasonyi, T. ve Sidler, C. (1997), *Reduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization. In vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures*, Toxicology **118**, 205-210.
- Bullerman, L.B. ve Bianchini A. (2007), *Stability of mycotoxins during food processing*, International Journal of Food Microbiology **119**, 140–146.

- Cabanes, F.J. ve Bragulat, M.R. (2008), "Ochratoxin A in profiling and speciation", *Aspergillus in the genomic era* (Ed: Varga, J., Samson, R.A.). p. 57-70. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Cabanes, F.J., Bragulat, M.R., Castellá, G. (2010), *Ochratoxin A Producing Species in the Genus Penicillium*, *Toxins*, **2**, 1111-1120.
- Chanda, A., Roze, L.V., Kang, S., Artymovich, K.A., Hicks, G.R., Raikhel, N.V., Calvo, A.M. ve Linz J.E. (2009), *A key role for vesicles in fungal secondary metabolism*, *PNAS*, **106**, 19533-19538.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D. ve Ho, W.H., (1999). *Single spore isolation of fungi*. *Fungal, Diversity* **3**, 29-38.
- Chu, F.S., Chang, C.C., Ashoor, S.H. ve Prentice N. (1975), *Stability of Aflatoxin B, and Ochratoxin A in Brewing*, *Applied Microbiology*, **29**, 313-316.
- Czaban, J., Wroblewska, B., Stochmal, A. ve Janda, B. (2006), *Growth of Penicillium verrucosum and production of ochratoxin A on nonsterilized wheat grain incubated at different temperatures and water content*, *Polish Journal of Microbiology*, **55**, 321-331.
- Çetinkaya, Z., Fidan, F., Unlu, M., Hasenekoğlu, I., Tetik, L. ve Demirel, R., (2005). *Assessment of indoor air fungi in western-Anatolia, Turkey*, *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, **23**, 87-92
- Çoksöyler, N. (1999), *Farklı Yöntemlerle Kurutulan Kırmızı Biberlerde Aspergillus flavus gelişimi ve Aflatoksin Oluşumunun İncelenmesi*, *Gıda* **24**, 297-306.
- Davis, N.D., Diener, U.L., ve Eldridge, D.W. (1966), *Production of aflatoxins B1 and G1 by Aspergillus flavus in a semisynthetic medium*, *Applied Microbiology*, **14**, 378-380.
- Del Fiore, A., Reverberi, M., De Rossi, P., Tolaini, V., Fabbri, A.A. ve Fanelli, C. (2010), *Polymerase chain reaction-based assay for the early detection of aflatoxigenic fungi on maize kernels*, *Quality Assurance and Safety of Crops&Foods*, **2**, 22-27.
- Desjardins, A.E. (2006), *Fusarium mycotoxins : chemistry, genetics, and biology*, American Phytopathological Society, USA.

- Dijksterhuis, J. ve Samson, R.A. (2007), *Food Mycology. A multifaceted Approach to Fungi and Food*, CRC Press., The Netherlands.
- Doğan, A. ve Bayezıt, M. (1999), *Kars yöresinde yemlerde aflatoksin B1 düzeylerinin ELISA yöntemi ile araştırılması*, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., **5**, 63-70.
- Donner, M. (2008), *Distribution and molecular characterization of aflatoxin-producing and nonproducing isolates of Aspergillus section Flavi for biological control of aflatoxin contamination in maize in Nigeria*, Doktora Tezi, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Deutschland.
- Doolotkeldieva, T.D. (2010), *Microbiological control of flour-manufacture: dissemination of mycotoxins producing fungi in cereal products*, Microbiology Insights, **3**, 1–15.
- Dyer, S.K. ve McCammon, S. (1994), *Detection of toxigenic isolates of Aspergillus flavus and related species on coconut cream agar*, Journal of Applied Bacteriology, **76**, 75-78.
- El Khoury, A. ve Atoui, A. (2010), *Ochratoxin A: General overview and actual molecular status*, Toxins, **2**, 461-493.
- El Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M. ve Lebrihi A. (2008), *Fungal contamination and aflatoxin B1 and ochratoxin A'in Lebanese wine-grapes and musts*, Food and Chemical Toxicology, **46**, 2244-2250.
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., ve Lebrihi, A. (2011), *Differentiation between Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer*, Journal of Food Science, doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02153.x.
- Erdoğan, A., Gürses, M. ve Sert, S. (2003), *Erzurum'da satışa sunulan köme (Cevizli Pestil Sucuğu) ve kuru incirlerin aflatoksin içeriklerinin saptanması*, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. **34**, 85-88.
- Ergönül, B. (2007), *Ekmek üretiminde kritik kontrol ve kalite kontrol noktalarının belirlenmesi*, Dünya Gıda, **10**, 26-30.

- Filtenborg, O., Frisvad, J.C. ve Svendsen, J.A. (1983), *Simple screening method for moulds producing intracellular mycotoxins in pure cultures*, Applied and Environmental Microbiology, **45**, 581-585.
- Food and Indoor Fungi Workshop, (2010), <http://www.cbs.knaw.nl/service/CoursesDetails.aspx?Rec=1>
- Frisvad, J.C. ve Filtenborg, O. (1983), *Classification of Terverticillate Penicillia Based on Profiles of Mycotoxins and Other Secondary Metabolites*, Applied and Environmental Microbiology, **46**, 1301-1310.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., de Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F.J., Ehrlich, K. ve Samson, R.A. (2007), *Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important Aspergillus mycotoxins*, Studies in Mycology **59**, 31–37.
- Gabal, M.A., Hegazi, S.A. ve Hassanin, N. (1994). *Aflatoxin production by Aspergillus flavus field isolates*, Veterinary and Human Toxicology, **36**, 519-521.
- Gadd, G.M. (1993), *Interactions of fungi with toxic metals*. New Phytol, **124**, 25-60.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. ve Battilani, P. (2007). *Studies on Aspergillus section Flavi isolated from maize in northern Italy*. International Journal of Food Microbiology, **113**, 330-338
- Giray, B., Girgin, G., Engin, A.B., Aydın, S. ve Şahin, G. (2007) *Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey*, Food Control, **18**, 23–29.
- Girgin, G., Başaran, N. ve Şahin, G. (2001), *Dünya’da ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler*, Türk. Hij. Den. Biyol. Derg., **58**, 97-118
- Glass, N.L. ve Donaldson, G.C. 1995. *Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved gene from filamentous Ascomycetes*. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 1323-1330.
- Gül, H. (2007), *Konya ve civarından alınan buğday ve öğütme ürünler ile kepekli ekmeklerin kalıntı ve kontaminasyon içeriği üzerine bir araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Gümüş, T., Arıcı, M. ve Demirci, M. (2004), *A survey of barley, malt and beer contamination with ochratoxin a in Turkey*, J. Inst. Brew. **110**, 146–149.
- Gürsoy, N. ve Biçici, M., (2004). “A review on current situation of toxigenic fungi and mycotoxins formation in Turkey”, *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe* (Ed. Logrieco A., Visconti A.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Haggbloom, P. (1982), *Production of ochratoxin A in barley by Aspergillus ochraceus and Penicillium viridicatum: Effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum Size*, Applied and Environmental Microbiology, **43**, 1205-1207.
- Hasenekoğlu, İ. (1991), *Toprak Mikrofungusları*. Cilt I-VII, Atatürk Üni. Yay. No: 689, Kazım Karabekir Eğt. Fak. Yay. No: 11, Erzurum.
- Hatti, A.D., Pangrikar, P.P., Chavan, A.M., Gadgile, D.P., Kakde, R.B. ve Gaikwad, R.S. (2009), *Qualitative analysis of aflatoxin from Aspergillus flavus isolates*, Recent Research in Science and Technology, **1**, 043–045.
- Heenan, C.N., Shaw, K.J. ve Pitt, J.T. (1998), *Ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius and A.niger isolates and detection using coconut cream agar*, J.Food Mycol., **1**, 67-72.
- Heperkan, D. (2006), The importance of mycotoxins and a brief history of mycotoxin studies in Turkey, ARI The Bulletin of the Istanbul Thecnical University, **54**, 18-27.
- Heperkan, D., Meric, B.E., Sismanoglu, G., Dalkiliç, G. ve Güler, F.K. (2006), “Mycobiota, mycotoxigenic fungi, and citrinin production in black olives”, *Advances in Food Mycology*, (Ed. Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A. ve Thrane, U.), Springer, New York.
- Hocking, A.D., (2006), *Aspergillus and related teleomorphs*, Woodhead Publishing Ltd., Australia.
- ICH3 (1995) “Validation of Analytical Procedures: Methodology, Announcements”, *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use*, Yokohama, Japan, 29 Nov - 1 Dec.

- Ip S. ve Che C. (2006) *Determination of Aflatoxins in Chinese Medicinal Herbs by High-Performance Liquid Chromatography Using Immunoaffinity Column Cleanup Improvement of Recovery*, Journal of Chromatography A, **1135**, 241-244.
- Kabak, B. (2009), *The fate of mycotoxins during thermal food processing*, J Sci Food Agric; **89**, 549–554.
- Kabak, B. ve Var, I. (2006), *Ülkemiz açısından sorun olan mikotoksinler ve riskli gıda maddeleri*, Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu.
- Kalyoncu, F. (2006), *Manisa ili merkezinin bina içi ve bina dışı havasının fungus florasının ve mevsimsel dağılımlarının saptanması*, Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Karagözlü, N. ve Karapınar, M. (2000), *Bazı tahıl ve ürünlerinde okratoksin-A ve fungal kontaminasyon*, Turk J Biol, **24**, 561–572.
- Karaltı, İ. (2006), *İstanbul ilinde hastanelerin içinde ve dışında hava ile taşınan funguslar üzerine araştırmalar*, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kılıçoğlu, M.Ç. ve Özkoç, İ. (2008), *Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler*, OMÜ Zir.Fak.Dergisi, **23**, 65-72.
- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K. ve Yamaguchi, I. (1998). *Trichothecene 3-O-Acetyltransferase Protects Both the Producing Organism and Transformed Yeast from Related Mycotoxins*, The Journal of Biological Chemistry, **273**, 1654-1661.
- Klich M.A. (2002), *Identification of Common Aspergillus Species*, 1. Baskı. pp. 122 Published by The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich, M.A. (2009), *Health effects of Aspergillus in food and air*, Toxicology and Industrial Health **25**, 657-667.
- Konietzny, U. ve Greiner, R. (2003), *The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods*, Brazilian Journal of Microbiology, **34**, 283-300.

- Köşker, Ö., (2000) *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara.
- Lin, L., Chien, P., Fu, Y. ve Shih, D.Y. (2005), *Ochratoxin A contamination in coffees, cereals, red wines and beers in Taiwan*, Journal of Food and Analysis, **13**, 84-92.
- Lo'pez-Mendoza, M.C., Crespo-Sempere, A. ve Martí'nez-Culebras, P.V. (2009), *Identification of Aspergillus tubingensis strains responsible for OTA contamination in grapes and wine based on the acyl transferase domain of a polyketide synthase gene*, International Journal of Food Science and Technology, **44**, 2147–2152.
- Magan, N. ve Aldred, D. (2007), “Why do fungi produce mycotoxins?”, *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food* (Ed: Dijksterhuis, J. ve Samson, R.A.), **25**, 121-133.
- Maragos, C.M. ve Greer, J.I. (1997), *Analysis of Aflatoxin B1 in Corn Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection*, J. Agric. Food Chem., **45**, 4337–4341.
- Mariutti, L.R.B. ve Valente-Soares, L.M. (2009), *Survey of aflatoxins in tomato products*, Ciênc. Tecnol. Aliment, Campinas, **29**, 431-434.
- Martin, K.J. ve Rygiewicz, P.T. (2005), *Fungal specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts*, BMC Microbiology, **5**, 1-11
- Mazaheri, M. (2009), *Determination of Aflatoxins in Importaned Rice to Iran*, Food and Chemical Toxicology **47**, 2064–2066.
- Medina, A., Mateo, R., Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F.M. ve Jimenez, M. (2005), *Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of Aspergillus tubingensis and other members of Aspergillus section Nigri*, Applied and Environmental Microbiology, **71**, 4696-4702.
- Mills, J.T., Abramson, D., Frohlich, A.A. ve Marquardt, R.R. (1989), *Citrinin and ochratoxin A production by Penicillium spp. From stored durum wheat*, Canadian Journal of Plant Pathology, **11**, 357-360.

- Misra, J.K. ve Jamil, Z. (1991), *Fungi in the indoor environment of flour mill in Lucknow*, Grana **30**, 398-403.
- Mngadi, P.T. (2007), Molecular characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic aspergillus isolates, Master Thesis, Science and the Built Environment, Durban University of Technology, Durban.
- Mule, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G. ve Visconti, A. (2006), *Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of Aspergillus carbonarius in grapes*, International Journal of Food Microbiology, **111**, 28-34.
- Muro-Cacho, C., Stedeford, Todd., Banasik, Marek, Suchecki, T.T. ve Persad, A.S. (2004), *Mycotoxins: Mechanisms of toxicity and methods of detection for identifying exposed individuals*, Journal of Land Use, **19**, 537-545.
- Nehad, E.A., Farag, M.M., Kawther, M.S., Abdel-Samed, A.K.M. ve Naguib, K. (2005), *Stability of ochratoxin A (OTA) during processing and decaffeination in commercial roasted coffee beans*, Food Additives and Contaminants, **22**, 761-767.
- Niessen, L. (2007), *PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi*, International Journal of Food Microbiology, **119**, 38-46.
- Oruç, H.H. (2005), *Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri*, Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med., **24**, 105-110.
- Özkara, A. (2006), *Afyonkarahisar ili merkez ilçe hava fungus florasının belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Özkaya, Ş. ve Temiz, A. (2003), *Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları*, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, **1**, 1-21.
- Özturan, K., Ünsal, C., Karakaya, Y., Atasever, M., Ceylan, Z.G., Atasever, M.A. ve Demirkaya A.K. (2007), *Erzurum'da tüketime sunulan buğday unlarının toplam aflatoksin, aflatoksin.B1 ve okratoksin A yönünden incelenmesi*, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., **2**, 172-176.
- Pena, R., Alcaraz, M.C., Arce, L., Rios, A. ve Valcarcel, M. (2002), *Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, **967**, 303-314.

- Pitt, J.I. (1979), *The Genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*, Academic Press INC, London.
- Pitt, J.I. (1987), *Penicillium viridicatum, Penicillium verrucosum and production of Ochratoxin A*, Applied and Environmental Microbiology, **53**, p. 266-269.
- Pitt, J.I. (2000a), *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, 3th edition, Food Science, Australia.
- Pitt, J.I. (2000b), "Toxigenic fungi: which are important?", *Medical Mycology*, Supplement 1, **38**, 17-22.
- Reddy, K.R.N. ve Salleh, B. (2011), *Co-occurrence of moulds and mycotoxins in corn grains used for animal feeds in Malaysia*. Journal of Animal and Veterinary Advances, **10**, 668-673.
- Reddy, K.R.N., Nurdijati, S.B. ve Salleh, B. (2010), *An overview of plant derived products on control of mycotoxigenic fungi and mycotoxins*, Asian Journal of Plant Sciences, **9**, 126-133.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Abbas, H.K., Abel, C.A. ve Muralidharan, K. (2008), *Mycotoxigenic fungi, mycotoxins, and management of rice grains*, Toxin Reviews, **27**, 287-317.
- Reischer, G.H., Lemmens, M., Farnleitner, A., Adler, A. ve Mach, R.L. (2004), *Quantification of Fusarium graminearum in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe*, Journal of Microbiological Methods, **59**, 141-146.
- Resmi gazette, (2009), Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Tebliğ no: 2009/6).
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F. ve Labrihi, A. (2010), *Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products*, Food and Chemical Toxicology, **48**, 2722-2777.
- Russell, R. ve Paterson, M. (2006), *Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR*, Process Biochemistry, **41**, 1467-1474.
- Sabuncuoğlu, S.A., Baydar, T., Giray, B. ve Şahin, G. (2008), *Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyon, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı*

- etkilerinin azaltılması*, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, **28**, 63-92.
- Sambrook, J. ve Russell, D.W. (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. ve Frisvad, J.C. (2004a). *Introduction to Food and Airborne Fungi*, Seven Edition, CBS, The Netherlands.
- Samson, R. A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Mick Frank, J. ve Frisvad, J.C. (2004b), *New ochratoxin A or sclerotium producing species in Aspergillus section Nigri*, Studies In Mycology **50**, 45–61.
- Samson, R.A, Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. ve Andersen, B. (2010), *Food and Indoor Fungi*, CBS KNAW Fungal Diversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Samson, R.A. ve Pitt, J.I. (2000), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramón, D. ve Martínez-Culebras, P.V. (2008), *Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans*, International Journal of Food Microbiology **125**, 336–340.
- Satiou, N. ve Nei, M. (1987), *The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*. Mol. Biol. Evol. **4**, 406-425.
- Scott, P.M., Lawrence, J.W. ve Van Walbeek, W. (1970), *Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts*, Applied Microbiology, **20**, 839-842
- Seifert, K.A. ve Levesque, C.A. (2004), *Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi*, European Journal of Plant Pathology, **110**, 449-471.
- Serra, R., Abrunhosa, Kozakiewicz, Z. ve Venâncio A. (2003), *Black Aspergillus species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes*, International Journal of Food Microbiology **88**, 63– 68.
- Serra, R., Cabañ es, F.J., Perrone, G., Castella, G., Venancio, A., Mule, G. ve Kozakiewicz, Z. (2006), *Aspergillus ibericus: a new species of section Nigri isolated from grapes*. Mycologia **98**, 295–306.

- Sime Ad, A. (2002), *Mounting medium for use in Indoor Air Quality spore-trap analyses*. Mycologia. **94**, 1087-1088.
- Skouboe, P., Frisvad, J.C., Taylor, J.W., Lauritsen, D., Boysen, M. ve Rossen, L. (1999), *Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate Penicillium species*, Mycol. Res. **103**, 873-881.
- Sümer, S. (2006), *Genel mikoloji*, 1.Baskı, Nobel yayın, Ankara.
- Şen, L. ve Nas, S. (2010), *Fındık ve antep fıstığının mikotoksin problemi*, Electronic Journal of Food Technologies, **5**, 49-56.
- Şeviktürk, İ.M. ve Gönülalan, Z. (2007), *Kayseri’de tüketime sunulan bazı tahıl ürünlerinde okratoksin A miktarları*, Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) **16**, 86-90.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei. M. ve Kumar, S. (2007), *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution, **24**, 1596-1599.
- Tamura, K., ve Nei, M. (1993), *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. Molecular Biology and Evolution **10**, 512–526
- Thieu, N.Q, Ogle, B. ve Petterson, H. (2008) *Screening of Aflatoksins and Zearalenone in Feedstuffs and Complete Feeds for Pigs in Southern Vietnam*, Trop. Anim. Health Prod., **40**, 77-83.
- Topal, Ş. (2003), *Türkiye’nin tarımsal ürün ve bölgelerine göre dominant mikoflora dağılımları ve mikotoksin profilleri*, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, **1**, 7-21.
- Trail, F., Mahanti, N. ve Linz, J. (1995), *Molecular biology of aflatoxin biosynthesis*, Microbiology, **141**, 755-765.
- Tran-Dinh, N., Pitt J.I. ve Carter, D. (1999). *Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of Aspergillus flavus and A. parasiticus*, Mycol. Res., **103**, 1485-1490.
- Trucksess, M.W. ve Pohland, A.E. (2001). *Method in Molecular Biology: Mycotoxin Protocols*, **157**, Human Press. USA.

- Tunail, N. (2000), *Funguslar ve mikotoksinleri*, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. ve Piletsky, S.A. (2009), *Analytical methods for determination of mycotoxins: A review*, Analytical Chimica Acta, **632**, 168-180.
- Uysal, Ü.D., Öncü, E.M., Berikten, D., Yilmaz, N., Tuncel, N.B., Kıvanc, M. ve Tuncel, M. (2009). *Time and temperature dependent microbiological and mycotoxin (ochratoxin-A) levels in boza*, International Journal of Food Microbiology, **130**, 43-48.
- Van Burik, J.A., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A. ve Myerson, D. (1998), *Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi*, Med Mycol. **36**, 299–303.
- Var, I., Kabak, B. ve Özkarslı, M. (2004), *Mikotoksin aranmasında kullanılan analiz yöntemleri*, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, **2**, 1-11.
- Vinton, M.A., Kathol, E.S., Vogel, K.P. ve Hopkins, A.A. (2001), *Endophytic fungi in Canada wild rye in natural grasslands*, J. Range Manage. **54**, 390–395.
- Walbeek, W.V., Scott, P.M., Harwiga, J. ve Lawrence, J. W. (1969), *Penicillium vividicatum* Westling: a new source of ochratoxin A, Canadian Journal Of Microbiology. **15**, 1281-1285.
- Whitaker, T.B. (2001), “Sampling techniques”, *Mycotoxin protocols*, (Ed. Trucksess, M.W. ve Pohland, A.E.), Methods in Molecular Biology, Humana Press, USA.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. ve Taylor, J. (1990), “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, (Ed. Innis M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Pres, USA
- Workshop Handbook, (2008), “Determination of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Pistachios by High-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization and Immunoaffinity Column Celan-up”,

Workshop-Training Course on Determination Techniques for Mycotoxins and Toxigenic Fungi in Food Chain, September 29-October 3, Bari/Italy.

Yıldız, G. (2009), *Türkiye’de 2001-2004 yıllarında hayvancılık işletmelerinde kullanılan kaba yemlerde aflatoksin, zearalenon ve okratoksin A kirliliği*, Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg. **49**, 113-124.

Yin, Y., Lou, T., Yan, L., Michailides, T.J. ve Ma, Z. (2009), *Molecular characterization of toxigenic and atoxigenic Aspergillus flavus isolates, collected from peanut fields in China*, Journal of Applied Microbiology, **107**, 1857-1865.

Yousefi, S., Dadgar, S., Safara, M. ve Zaini, F. (2009), *Aflatoxin production by Aspergillus flavus isolates from green– tiger shrimps (Penaeus semisulcatus)*, Iran. J. Microbiol. **1**, 18-22.

Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P. ve Bennett, J.W. (2004a), *Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis*, Applied and Environmental Microbiology, **70**, 1253-1262.

Zheng, M.Z., Richard, J.L. ve Binder, J. (2006), *A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins*, Mycopathologia, **161**, 261-273.

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm#SubSectionNumber:1.1.1>
(07.06.2011)

<http://nrrl.ncaur.usda.gov> (07.06.2011)

www.indexfungorum.org (07.06.2011)

<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Teblig/2008-26.html> (07.06.2011)

<http://www2.biocentrum.dtu.dk/mycology/analysis/tlc/index.html> (07.06.2011)

www.ncbi.nlm.nih.gov (07.06.2011)

EK-1-Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
10.2	<i>Acremonium sp.</i>	0.92, 1.60	0.88, 1.54
12.33	<i>Alternaria alternata</i>	-	1,38
18.2	<i>Aspergillus alliaceus</i>	0.31, 0.78, 0.89, 1.31, 1.71, 1.82	0.51, 0.73, 1.40, 1.68, 1.83
21.1	<i>Aspergillus alliaceus</i>	0.38, 1.73, 1.83, 1.90	0.74, 0.94, 0.97, 1.31, 1.65, 1.72
26.3	<i>Aspergillus alliaceus</i>	0.31, 0.88, 1.30, 1.68, 1.81	0.37, 0.75, 1.43, 1.68, 1.83, 1.94, 2.01
26.8	<i>Aspergillus alliaceus</i>	0.30, 0.88, 1.28, 1.69, 1.79, 1.93	0.49, 0.75, 1.28, 1.42, 1.64, 1.81, 1.93
1.1	<i>Aspergillus candidus</i>	1.93, 1.82, 1.73, 1.63, 1.41, 1.17, 0.57	1.92, 1.82, 1.73, 1.58, 1.39, 1.19, 0.62
1.2	<i>Aspergillus candidus</i>	1.96, 1.78, 1.66, 1.56, 0.92	1.95, 1.80, 1.67, 1.56, 0.96
1.3	<i>Aspergillus candidus</i>	1.86, 1.76, 1.60, 1.36, 1.12, 0.14	1.90, 1.76, 1.59, 1.36, 1.24, 0.25
1.4	<i>Aspergillus candidus</i>	1.81, 1.58, 1.49, 1.12, 0.61	1.94, 1.90, 1.58, 1.39, 1.23, 0.61
1.6	<i>Aspergillus candidus</i>	1.75, 1.69, 1.58, 0.73	1.93, 1.78, 1.68, 1.56
1.8	<i>Aspergillus candidus</i>	1.97, 1.84, 1.64, 1.56, 1.34, 1.22, 0.30, 0.16	1.96, 1.77, 1.59, 1.49, 1.39, 1.10, 0.66, 0.35, 0.15
1.9	<i>Aspergillus candidus</i>	1.89, 1.56, 1.36, 1.16	1.88, 1.79, 1.56, 1.36, 1.13
1.10	<i>Aspergillus candidus</i>	1.86, 1.70, 1.61, 1.48, 1.11	1.93, 1.82, 1.70, 1.55, 1.49, 1.22
1.22	<i>Aspergillus candidus</i>	1.89, 1.58, 1.40, 1.24	1.91, 1.87, 1.58, 1.39, 1.22, 0.60
2.6	<i>Aspergillus candidus</i>	1.03, 1.24, 1.74	1.48, 1.64, 1.78
2.24	<i>Aspergillus candidus</i>	1.88, 1.57, 1.44, 1.14	1.86, 1.71, 1.55, 1.35, 1.12
2.26	<i>Aspergillus candidus</i>	1.93, 1.82, 1.72, 1.56, 1.34, 1.01	1.86, 1.72, 1.54
3.4	<i>Aspergillus candidus</i>	1.71, 1.81	1.32, 1.48, 1.74
3.5	<i>Aspergillus candidus</i>	0.96, 1.37, 1.53, 1.68, 1.76	1.07, 1.38, 1.56, 1.68, 1.77
3.6	<i>Aspergillus candidus</i>	1.12, 1.38, 1.50, 1.63, 1.74	1.05, 1.28, 1.39, 1.52, 1.64, 1.75
3.10	<i>Aspergillus candidus</i>	1.59, 1.73	0.93, 1.29, 1.46, 1.61, 1.72
3.11	<i>Aspergillus candidus</i>	1.00, 1.23, 1.39, 1.49, 1.62, 1.74	0.95, 1.12, 1.35, 1.53, 1.75
3.20	<i>Aspergillus candidus</i>	-	1.53, 1.68, 1.81
3.22	<i>Aspergillus candidus</i>	1.66, 1.77	1.04, 1.69, 1.79
5.7	<i>Aspergillus candidus</i>	0.93, 1.11, 1.42, 1.60, 1.75, 1.92	1,35
6.2	<i>Aspergillus candidus</i>	1.30, 1.60, 1.76, 1.84	0.95, 1.12, 1.28, 1.48, 1.65, 1.78
6.3	<i>Aspergillus candidus</i>	1.07, 1.20, 1.41, 1.56, 1.73, 1.80	0.94, 1.07, 1.21, 1.40, 1.56, 1.73, 1.83
6.4	<i>Aspergillus candidus</i>	1.30, 1.42, 1.56, 1.71, 1.81	0.94, 1.10, 1.22, 1.41, 1.56, 1.72, 1.81
6.7	<i>Aspergillus candidus</i>	1.25, 1.44, 1.78	0.91, 1.07, 1.22, 1.42, 1.55, 1.70, 1.79

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
6.8	<i>Aspergillus candidus</i>	0.87, 1.06, 1.21, 1.41, 1.56, 1.70, 1.79	0.87, 1.05, 1.19, 1.41, 1.56, 1.69, 1.80
6.9	<i>Aspergillus candidus</i>	0.87, 1.05, 1.23, 1.42, 1.55, 1.69, 1.78	0.85, 1.04, 1.40, 1.55, 1.69, 1.79
6.10	<i>Aspergillus candidus</i>	1.23, 1.44, 1.78	0.82, 1.26, 1.42, 1.69, 1.78
8.6	<i>Aspergillus candidus</i>	0.72, 1.45	0.91, 1.09, 1.30, 1.42, 1.63, 1.72, 1.93
9.7	<i>Aspergillus candidus</i>	1.14, 1.57, 1.81	1,86
9.8	<i>Aspergillus candidus</i>	1.37, 1.57, 1.81, 1.94	1.66, 1.82
9.19	<i>Aspergillus candidus</i>	1,34	1.29, 1.45, 1.72, 1.80
10.4	<i>Aspergillus candidus</i>	0.73, 1.37, 1.53, 1.82	
12.10	<i>Aspergillus candidus</i>	-	1,09
12.12	<i>Aspergillus candidus</i>	-	1,02
12.13	<i>Aspergillus candidus</i>	-	-
12.19	<i>Aspergillus candidus</i>	1,07	1.10, 1.78
12.20	<i>Aspergillus candidus</i>	1,39	1.07, 1.80
12.21	<i>Aspergillus candidus</i>	1.56, 1.85	1,15
12.26	<i>Aspergillus candidus</i>	1.13, 1.43	1,16
12.31	<i>Aspergillus candidus</i>	1,36	1.13, 1.40
12.32	<i>Aspergillus candidus</i>	1,75	1,35
13.13	<i>Aspergillus candidus</i>	1.10, 1.45, 1.78	1.04, 1.61, 1.79
13.14	<i>Aspergillus candidus</i>	1.06, 1.42, 1.77	1.15, 1.76
13.19	<i>Aspergillus candidus</i>	1.21, 1.36, 1.68, 1.80	1,41
13.22	<i>Aspergillus candidus</i>	1.11, 1.64	1.18, 1.42, 1.74
15.5	<i>Aspergillus candidus</i>	1.03, 1.35, 1.51, 1.67, 1.82, 1.97	1.21, 1.46, 1.82, 1.95
15.7	<i>Aspergillus candidus</i>	0.95, 1.24, 1.39, 1.49, 1.66, 1.79	1.37, 1.60
15.9	<i>Aspergillus candidus</i>	1.11, 1.29, 1.50, 1.82, 1.97	1.02, 1.23, 1.57, 1.82, 1.96
15.10	<i>Aspergillus candidus</i>	1,72	1,80
15.11	<i>Aspergillus candidus</i>	1,65	1.02, 1.27, 1.39, 1.69
15.12	<i>Aspergillus candidus</i>	1,66	1.06, 1.40, 1.69
15.13	<i>Aspergillus candidus</i>	0.95, 1.40, 1.64	1,37
15.16	<i>Aspergillus candidus</i>	-	1.24, 1.66
15.16	<i>Aspergillus candidus</i>	1.33, 1.60, 1.68	1.48, 1.73
15.17	<i>Aspergillus candidus</i>	1.73, 1.90	1.12, 1.37, 1.72, 1.81, 1.92
16.2	<i>Aspergillus candidus</i>	1.36, 1.74	1,74
17.19	<i>Aspergillus candidus</i>	0.96, 1.25, 1.41, 1.53, 1.68, 1.80, 1.95	1.08, 1.25, 1.44, 1.75, 1.84, 1.93

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
17.26	<i>Aspergillus candidus</i>	-	-
17.28	<i>Aspergillus candidus</i>	-	1.22, 1.73
17.34	<i>Aspergillus candidus</i>	-	1,19
18.17	<i>Aspergillus candidus</i>	1.37, 1.53	1.34, 1.77
18.31	<i>Aspergillus candidus</i>	1.26, 1.60, 1.83	1.27, 1.80
21.10	<i>Aspergillus candidus</i>	1.42, 1.57, 1.77	1.08, 1.52, 1.77
21.13	<i>Aspergillus candidus</i>	1.41, 1.55, 1.78	1,77
21.14	<i>Aspergillus candidus</i>	1.15, 1.37, 1.57, 1.79	1.15, 1.79
21.30	<i>Aspergillus candidus</i>	1.14, 1.39, 1.54, 1.81	1.09, 1.41, 1.54, 1.81
22.12	<i>Aspergillus candidus</i>	1,39	1.10, 1.43
22.22	<i>Aspergillus candidus</i>	1.29, 1.53, 1.84	1.06, 1.32, 1.55, 1.88
23.2	<i>Aspergillus candidus</i>	1.50, 1.77	1.02, 1.89
23.6	<i>Aspergillus candidus</i>	-	-
23.11	<i>Aspergillus candidus</i>	1.11, 1.53, 1.68, 1.89	1.00, 1.58
23.13	<i>Aspergillus candidus</i>	1.09, 1.29, 1.70	1.02, 1.53, 1.67
23.14	<i>Aspergillus candidus</i>	1,01	1.00, 1.54
24.1	<i>Aspergillus candidus</i>	1.00, 1.32, 1.51	0.99, 1.76
24.6	<i>Aspergillus candidus</i>	-	1.10, 1.40, 1.83
24.7	<i>Aspergillus candidus</i>	1.16, 1.35, 1.57, 1.84	1.14, 1.41, 1.62, 1.78, 1.91
24.8	<i>Aspergillus candidus</i>	1.39, 1.55, 1.79	1.00, 1.38, 1.55, 1.78, 1.92
24.9	<i>Aspergillus candidus</i>	1.12, 1.67, 1.75	1,20
24.10	<i>Aspergillus candidus</i>	1.14, 1.38, 1.55, 1.73, 1.88	1.02, 1.25, 1.47, 1.68, 1.87
24.11	<i>Aspergillus candidus</i>	1.42, 1.66, 1.78	1.17, 1.35, 1.66, 1.80
24.12	<i>Aspergillus candidus</i>	1,73	-
24.13	<i>Aspergillus candidus</i>	1.19, 1.44, 1.59, 1.80	1.17, 1.40, 1.80
24.14	<i>Aspergillus candidus</i>	0.25, 0.96, 1.27, 1.60	0.86, 1.12, 1.32, 1.48
24.15	<i>Aspergillus candidus</i>	1.20, 1.47, 1.62, 1.87	1.22, 1.44, 1.86
26.25	<i>Aspergillus candidus</i>	1.23, 1.48, 1.81	1,22
12.6	<i>Aspergillus clavatus</i>	1.26, 1.71, 1.86, 1.99	1.25, 1.73, 1.83, 1.99
12.7	<i>Aspergillus clavatus</i>	1.23, 1.70, 1.82, 2.00	1.26, 1.99
13.5	<i>Aspergillus clavatus</i>	1.26, 1.42	1.70, 1.82
13.8	<i>Aspergillus clavatus</i>	0.19, 0.59, 2.09	0.15, 1.50, 1.65, 1.86, 2.00
13.21	<i>Aspergillus clavatus</i>	-	0.66, 1.72, 1.84

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
1.11	<i>Aspergillus flavus</i>	1.88, 1.75, 1.65, 1.55, 1.31, 1.11, 0.40, 0.26, 0.14	1.84, 1.65, 0.32
1.12	<i>Aspergillus flavus</i>	1.96, 1.66, 0.54, 0.26	1.98, 1.87, 1.74, 1.55, 0.97, 0.38, 0.17
2.18	<i>Aspergillus flavus</i>	1.96, 1.84, 1.70, 1.52, 0.54, 0.18	1.97, 1.86, 1.68, 1.50, 0.39
2.19	<i>Aspergillus flavus</i>	1.87, 1.58, 0.59, 0.42	1.98, 1.82, 1.61, 1.20, 0.16
6.1	<i>Aspergillus flavus</i>	0.16, 0.48, 1.14, 1.27, 1.40, 1.47, 1.74	0.26, 0.75, 1.24, 1.43, 1.62
8.7	<i>Aspergillus flavus</i>	0.27, 1.22, 1.33, 1.53, 1.68	1.10, 1.21, 1.41, 1.62, 1.73, 2.03
9.9	<i>Aspergillus flavus</i>	0.26, 0.98, 1.30, 1.43, 1.77, 2.15	0.18, 0.64, 1.34, 1.70
9.10	<i>Aspergillus flavus</i>	0.06, 0.49, 1.40, 1.68	0.30, 1.75
9.12	<i>Aspergillus flavus</i>	0.17, 0.68, 1.13, 1.28, 1.68, 2.15	0.24, 0.55, 1.23, 1.48, 1.68, 2.15
9.27	<i>Aspergillus flavus</i>	0.33	0.35
10.11	<i>Aspergillus flavus</i>	0.17	0.42, 1.70
10.14	<i>Aspergillus flavus</i>	0.25, 1.27, 1.66	1.25, 1.65
11.1	<i>Aspergillus flavus</i>	0.50, 1.26, 1.40, 1.65	1.24, 1.41, 1.66
11.4	<i>Aspergillus flavus</i>	1.22, 1.42, 1.61	0.34, 1.64
11.5	<i>Aspergillus flavus</i>	1.22, 1.66	0.19, 1.65
11.6	<i>Aspergillus flavus</i>	0.43, 1.31, 1.71, 1.97, 2.05, 2.10	0.25
11.7	<i>Aspergillus flavus</i>	0.30, 2.12	0.53, 1.31, 1.72, 2.04, 2.11
11.8	<i>Aspergillus flavus</i>	0.20, 0.47, 1.27	0.18, 1.72, 1.89
11.10	<i>Aspergillus flavus</i>	0.31, 1.03, 1.74	0.42, 1.34, 1.75
11.11	<i>Aspergillus flavus</i>	0.94, 1.08, 1.40, 1.47, 1.61, 1.74	0.27, 0.41
11.12	<i>Aspergillus flavus</i>	0.11, 0.29, 1.06, 1.29, 1.72	0.11, 1.08, 1.29, 1.72
11.13	<i>Aspergillus flavus</i>	0.31, 1.74, 1.88	0.14, 1.41, 1.72
12.1	<i>Aspergillus flavus</i>	0.15, 0.40, 1.07, 1.69, 1.82	0.13, 0.32, 1.05, 1.70, 1.83
12.2	<i>Aspergillus flavus</i>	0.13, 1.05, 1.59	0.13, 0.28
12.3	<i>Aspergillus flavus</i>	0.34, 1.26, 1.60, 1.69	0.13, 0.28, 1.30, 1.69
12.4	<i>Aspergillus flavus</i>	0.25, 1.63, 1.73	0.28, 1.28, 1.68
12.5	<i>Aspergillus flavus</i>	0.28	0.52, 1.26, 1.59, 1.74
12.15	<i>Aspergillus flavus</i>	0.29, 0.49, 0.95, 1.11, 1.25, 1.36, 1.49, 1.56, 1.77	0.31, 0.87, 1.25, 1.38, 1.57, 1.82
12.17	<i>Aspergillus flavus</i>	0.16, 0.34, 1.35	0.11, 1.39, 1.70
12.25	<i>Aspergillus flavus</i>	0.16, 0.59, 1.05, 1.20, 1.37, 1.85	0.15, 0.46, 0.82, 1.06, 1.53, 1.85
13.1	<i>Aspergillus flavus</i>	0.81, 1.00, 1.37, 1.82	0.17, 0.48, 1.02, 1.49, 1.89
13.6	<i>Aspergillus flavus</i>	0.09, 0.54, 0.83, 0.96, 1.86	0.19, 0.44, 0.93, 1.05, 1.84
14.1	<i>Aspergillus flavus</i>	0.29, 0.74	-

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
14.2	<i>Aspergillus flavus</i>	0.35, 0.86, 1.33, 1.89	0.23, 0.55, 0.82, 0.97, 1.33, 1.75
14.9	<i>Aspergillus flavus</i>	0.21, 0.38, 0.83, 0.95, 1.45, 1.88	1.12, 1.35, 1.92
14.10	<i>Aspergillus flavus</i>	0.19, 0.59, 1.03, 1.20, 1.53, 1.88	0.19, 1.06, 1.34, 1.78
14.11	<i>Aspergillus flavus</i>	1.10, 1.85	0.47, 1.11, 1.88
14.21	<i>Aspergillus flavus</i>	0.40, 0.53, 1.35, 1.54, 1.81	0.27, 0.70, 1.36, 1.47, 1.58
14.23	<i>Aspergillus flavus</i>	0.20, 1.17, 1.82	0.17, 0.40, 0.85, 1.01, 1.15, 1.58, 1.87
14.24	<i>Aspergillus flavus</i>	0.34, 0.82, 0.97, 1.90	0.38, 1.05, 1.76
14.28	<i>Aspergillus flavus</i>	0.37, 0.82, 1.00, 1.98	0.26, 1.18, 1.91
14.29	<i>Aspergillus flavus</i>	0.82, 1.01, 1.95	0.41, 0.96, 1.94
15.1	<i>Aspergillus flavus</i>	0.77, 1.14, 1.44, 1.75	0.43, 0.88, 0.98, 1.96
17.6	<i>Aspergillus flavus</i>	0.54, 0.79, 1.08, 1.16, 2.00	0.49, 0.81, 1.01, 1.99
17.7	<i>Aspergillus flavus</i>	0.49, 1.18, 2.09	0.25, 0.54, 0.78, 1.08, 1.19, 1.92
17.8	<i>Aspergillus flavus</i>	1.23, 1.96	1.10, 1.30, 1.95
17.9	<i>Aspergillus flavus</i>	0.20, 0.63, 0.89, 1.98	0.21, 1.04, 1.18, 1.98
17.10	<i>Aspergillus flavus</i>	0.33, 1.30	0.50, 1.03, 1.36, 1.81, 2.10
17.14	<i>Aspergillus flavus</i>	0.40, 1.03, 1.79	0.63, 0.99, 1.21, 1.79, 1.99
18.9	<i>Aspergillus flavus</i>	0.29, 0.54	0.51
18.10	<i>Aspergillus flavus</i>	1.01, 1.18, 1.79, 2.05	0.16, 0.34, 0.52, 0.98, 1.53
18.11	<i>Aspergillus flavus</i>	0.27, 0.78, 1.26, 1.44, 1.79	0.43, 0.73, 1.04, 1.25, 1.37, 1.75
18.12	<i>Aspergillus flavus</i>	0.36, 1.39	0.18, 0.63, 1.06, 1.22, 1.43, 1.74
18.13	<i>Aspergillus flavus</i>	0.30, 0.45, 0.75, 1.04, 1.81	0.43, 0.74, 1.04, 1.39, 1.74
18.23	<i>Aspergillus flavus</i>	0.65, 1.80, 1.94	0.14, 0.40, 1.03, 1.74, 2.04
18.24	<i>Aspergillus flavus</i>	0.46, 1.04, 1.25, 1.81, 2.05	0.39, 1.80
18.34	<i>Aspergillus flavus</i>	0.28, 0.44, 1.60, 1.70, 1.87	0.27, 0.72, 1.39, 1.49, 1.63, 1.72, 1.92
18.35	<i>Aspergillus flavus</i>	0.15, 0.42, 1.07, 2.04	0.14, 0.54, 1.02, 1.24, 1.81, 2.03
18.38	<i>Aspergillus flavus</i>	0.42, 1.08, 1.36, 1.93	0.14, 1.05, 1.25, 1.82, 2.02
19.2	<i>Aspergillus flavus</i>	0.27, 0.60, 0.84, 1.09, 1.19, 1.52, 1.74	0.28, 0.52, 0.77, 1.02, 1.16, 1.36, 1.46, 1.59, 1.74
19.4	<i>Aspergillus flavus</i>	0.73, 1.02, 1.20, 1.39, 1.70	0.30
19.15	<i>Aspergillus flavus</i>	0.11, 0.40, 1.06, 1.23, 1.74	0.17, 1.74
21.3	<i>Aspergillus flavus</i>	0.14, 0.35	0.17
21.6	<i>Aspergillus flavus</i>	0.22	0.45, 1.30, 1.71
21.15	<i>Aspergillus flavus</i>	0.16, 0.41, 1.49	0.17, 1.01, 1.25, 1.76, 1.92
21.17	<i>Aspergillus flavus</i>	0.15, 0.27, 1.86	0.40, 0.54, 1.03, 1.16, 1.36, 1.73, 1.88, 2.08

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
21.23	<i>Penicillium decumbens</i>	0.80, 0.92, 1.06, 1.22, 1.57, 1.72	0.79, 1.06
21.24	<i>Aspergillus flavus</i>	0.17, 0.32, 0.49, 1.84	0.17, 0.32, 0.64, 0.84, 1.82
21.25	<i>Aspergillus flavus</i>		
21.27	<i>Aspergillus flavus</i>	0.15, 0.37, 0.75, 1.01, 1.16, 1.35, 1.73	0.19, 0.28, 1.84
22.1	<i>Aspergillus flavus</i>	0.59, 1.07, 1.20, 1.33, 1.83	0.17, 0.30, 0.94, 1.82
25.8	<i>Penicillium rugulosum</i>	0.97	1.10, 1.24, 1.38, 1.58
25.11	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-
26.2	<i>Aspergillus flavus</i>	0.47, 0.92, 1.44	0.19, 0.27, 0.53, 1.18, 1.37
26.9	<i>Aspergillus flavus</i>	0.21, 0.35, 1.16, 1.44, 1.79, 1.85	0.18, 1.09, 1.20, 1.39, 1.87
26.10	<i>Aspergillus flavus</i>	0.33, 1.38, 1.55	0.24, 0.55, 0.87, 1.14, 1.36, 1.50, 1.77, 1.87
26.11	<i>Aspergillus flavus</i>	1.03, 1.22, 1.62, 1.97, 2.06	0.51, 0.82, 0.96, 1.20, 1.58, 2.11
17.5	<i>Aspergillus foetidus</i>	0.28, 0.75, 1.18, 1.37, 1.52, 1.82	0.34, 1.35, 1.48
8.14	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.95, 1.09, 1.32, 1.60	0.65, 0.85, 1.16, 1.33, 1.57, 1.75
12.27	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.74, 0.91, 1.09, 1.35, 1.62	0.72, 0.82, 1.11, 1.32, 1.57, 1.86
13.17	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.96, 1.36, 1.59	0.98, 1.19, 1.39, 1.56, 1.78
15.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.20, 1.52, 1.94	-
20.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.22, 1.40, 1.62	1.11, 1.33, 1.45, 1.60
14.7	<i>Aspergillus japonicus</i>	0.67, 1.53, 1.62	1.14, 1.65
2.16	<i>Aspergillus niger</i>	1.41, 1.31, 1.04, 0.51, 0.25	1.39, 1.30, 1.11, 1.06, 0.57, 0.40, 0.23
2.17	<i>Aspergillus niger</i>	1.42, 1.31, 1.17, 1.09, 1.04, 0.59, 0.37, 0.28	1.40, 1.31, 1.16, 1.09, 0.61, 0.35
3.23	<i>Aspergillus niger</i>	1.40, 1.29, 1.08, 1.01, 0.45, 0.18	1.40, 1.30, 1.18, 1.05, 0.44, 0.16
3.24	<i>Aspergillus niger</i>	1.97, 1.55, 1.45, 1.16, 1.07, 0.94, 0.73, 0.51, 0.29	1.97, 1.65, 1.50, 1.32, 1.14, 1.03, 0.92, 0.66, 0.48, 0.26
5.4	<i>Aspergillus niger</i>	0.19, 1.24, 1.66, 2.15	0.13, 1.26, 1.36, 1.62, 1.72
9.11	<i>Aspergillus niger</i>	0.40, 0.50, 1.28, 1.48, 1.59, 1.72, 2.14	0.10, 1.08, 1.27, 1.36, 1.67, 2.13
14.8	<i>Aspergillus niger</i>	0.84, 1.64	1.01, 1.62
14.22	<i>Aspergillus niger</i>	0.92, 1.53, 1.64	0.65, 1.31, 1.52, 1.65
17.31	<i>Aspergillus niger</i>	0.26, 1.13, 1.34	0.24, 1.00, 1.31, 1.72
18.20	<i>Aspergillus niger</i>	0.92, 1.33, 1.68	0.95, 1.33, 1.69
18.22	<i>Aspergillus niger</i>	0.27, 1.16, 1.33, 1.57, 1.69	1.12, 1.56, 1.69

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
18.25	<i>Aspergillus niger</i>	0.34, 0.90, 1.25, 1.50, 1.67	0.30, 1.22, 1.56, 1.70
19.3	<i>Aspergillus niger</i>	0.33, 0.57, 1.08, 1.34, 1.51, 1.76	0.28, 0.98, 1.34, 1.74
21.2	<i>Aspergillus niger</i>	0.91, 1.39, 1.58	0.98, 1.42, 1.62
22.2	<i>Aspergillus niger</i>	0.85, 1.24, 1.45, 1.54	0.96, 1.15, 1.43, 1.56
22.3	<i>Aspergillus niger</i>	0.90, 1.25, 1.42, 1.51	0.92, 1.40, 1.52
22.15	<i>Aspergillus niger</i>	1.14, 1.23, 1.42, 1.53	0.82, 1.52
25.1	<i>Aspergillus niger</i>	0.96, 1.17, 1.37, 1.56	1.09
26.13	<i>Aspergillus niger</i>	1.06, 1.23, 1.44	0.72, 1.19, 1.55
17.1	<i>Aspergillus niger</i>	0.48, 1.27, 1.55	0.89, 1.63, 1.69
17.2	<i>Aspergillus niger</i>	1.15, 1.31, 1.60, 1.72	1.25, 1.56, 1.71
17.3	<i>Aspergillus niger</i>	0.29, 1.16, 1.29, 1.61	1.27, 1.60, 1.72
17.4	<i>Aspergillus niger</i>	0.24, 0.90, 1.33, 1.69	0.22, 0.94, 1.70
17.36	<i>Aspergillus niger</i>	-	-
14.25	<i>Aspergillus niveus</i>	1.22, 1.50, 1.65	1.20, 1.36, 1.68
3.9	<i>Aspergillus ochraceus</i>	1.99, 1.38, 0.58, 0.28	1.96, 1.39, 0.91, 0.55, 0.28
20.2	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.52, 0.76, 1.04, 1.19, 1.42, 1.60, 1.92	0.41, 0.82, 1.06, 1.20, 1.29, 1.43, 1.63, 1.82
21.8	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.56, 0.70, 1.02, 1.20, 1.41, 1.59, 1.90	0.78, 1.01, 1.18, 1.38, 1.61
21.16	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.54, 0.65, 1.01, 1.19, 1.48, 1.60, 1.93	0.56, 0.77, 1.02, 1.18, 1.38, 1.58, 1.91
8.13	<i>Aspergillus sydowii</i>	1.33, 1.71	1.60
22.13	<i>Aspergillus sydowii</i>	1.16, 1.59	1.69
2.1	<i>Aspergillus terreus</i>	1.95, 1.76, 1.69, 1.58, 1.50, 1.31, 0.66	1.94, 1.89, 1.69, 1.57, 1.49, 1.41, 1.32, 0.49, 0.17
2.2	<i>Aspergillus terreus</i>	1.95, 1.79, 1.69, 1.59, 1.43, 1.32, 0.43, 0.22	1.77, 1.59, 1.51, 1.43, 1.32, 0.75, 0.31
8.3	<i>Aspergillus terreus</i>	0.41, 0.72, 1.26, 1.43	0.33, 1.25, 1.37, 1.78
10.13	<i>Aspergillus terreus</i>	0.56, 0.86, 1.12, 1.25, 1.50, 1.59, 1.79	0.97, 1.38, 1.67, 1.81
12.9	<i>Aspergillus terreus</i>	0.61, 0.94, 1.14, 1.33, 1.53, 1.65, 1.80	0.65, 1.19, 1.37, 1.48, 1.67, 1.85
17.27	<i>Aspergillus terreus</i>	1.25, 1.52, 1.70, 1.82	0.96, 1.30, 1.46, 1.66, 1.83
17.35	<i>Aspergillus terreus</i>	1.16, 1.48, 1.68, 1.78	1.00, 1.13, 1.28, 1.56, 1.67
18.4	<i>Aspergillus terreus</i>	1.17, 1.48, 1.64, 1.77	1.02, 1.35, 1.52, 1.66, 1.80
18.27	<i>Aspergillus terreus</i>	0.94, 1.17, 1.28, 1.47, 1.64, 1.76	1.12, 1.29, 1.53, 1.64, 1.86
18.37	<i>Aspergillus terreus</i>	1.09, 1.28, 1.48, 1.64, 1.78	1.11, 1.29, 1.56, 1.78
22.10	<i>Aspergillus terreus</i>	0.90, 1.28, 1.52, 1.66, 1.79	1.15, 1.36, 1.57, 1.67, 1.80

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
22.25	<i>Aspergillus terreus</i>	0.96, 1.18, 1.56, 1.72, 1.80	1.17, 1.47, 1.71, 1.86
3.26	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.83, 1.30, 1.42	1.20, 1.37
6.6	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.07, 1.50	1,68
10.12	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.09, 1.84, 1.95	1.01, 1.28, 1.60, 1.97, 2.06
14.16	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.73, 1.10, 1.30, 1.42, 1.90	0.96, 1.36
14.18	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.96, 1.09, 1.26, 1.40, 1.92	0.92, 1.26, 1.92
14.34	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.96, 1.26, 1.93	0.91, 1.25, 1.92
17.29	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.11, 1.31, 1.45, 1.65	1.16, 1.76
17.30	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.72, 1.43	0.11, 1.25, 1.56
21.7	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.98, 1.12, 1.32, 1.65	0.95, 1.16, 1.28, 1.42, 1.93
21.9	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.02, 1.33, 1.46, 1.90	0.94, 1.16, 1.37, 1.97
21.19	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.06, 1.23, 1.40, 1.56	1,08
22.18	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.45, 1.61	1.07, 1.21, 1.58
24.23	<i>Aspergillus versicolor</i>	1.12, 1.26, 1.51, 1.68, 1.83	1.16, 1.28, 1.52, 1.68, 1.83
26.22	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	1.54, 1.64
2.3	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1.15, 1.45, 1.78	0.84, 1.41, 1.52, 1.77
7.6	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	1.39, 1.57
17.21	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-
22.23	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-
3.1	<i>Cladosporium sp.</i>	-	1,76
9.23	<i>Cladosporium sp.</i>	-	1,32
8.11	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.13, 1.31, 1.40, 1.52, 1.84	1.12, 1.32, 1.42, 1.55, 1.74, 1.95
10.6	<i>Eurotium amstelodami</i>	0.83, 1.23, 1.38, 1.56	1.33, 1.50
16.1	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.11, 1.24, 1.42, 1.58, 1.72, 1.88	1.14, 1.26, 1.44, 1.60, 1.74
17.33	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.13, 1.26, 1.42, 1.58, 1.71, 1.86	1.13, 1.23, 1.43, 1.58, 1.71
21.26	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.14, 1.26, 1.42, 1.58, 1.72, 1.87	1,69
21.28	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.19, 1.27, 1.42, 1.56, 1.71	1.16, 1.26, 1.42, 1.56, 1.71, 1.87
23.5	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.01, 1.35, 1.50, 1.68	1.14, 1.28, 1.37, 1.53, 1.69
23.10	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.13, 1.22, 1.40, 1.63, 1.79	1.02, 1.38, 1.55, 1.73
23.12	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.21, 1.37, 1.60, 1.78	1.64, 1.80

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
23.16	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.16, 1.32, 1.52, 1.72, 1.88	1.35, 1.56, 1.73
23.17	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.14, 1.38, 1.50, 1.69, 1.84	1.40, 1.50, 1.70, 1.86
23.18	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.15, 1.31, 1.59, 1.69, 1.84	1.18, 1.30, 1.52, 1.69, 1.84
24.21	<i>Eurotium amstelodami</i>	0.05, 1.79	0.03, 0.40
25.21	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.15, 1.30, 1.50, 1.68, 1.83	1.29, 1.59, 1.68, 1.84
26.18	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.14, 1.40, 1.49, 1.73	
5.6	<i>Eurotium chevalieri</i>	0.99, 1.53, 1.69, 1.83	1.24, 1.52, 1.64, 1.84
6.11	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.33, 1.66, 1.81	1.32, 1.64, 1.81
8.2	<i>Eurotium chevalieri</i>	0.98, 1.19, 1.35, 1.62, 1.79, 1.97	1.44, 1.64, 1.81
8.5	<i>Eurotium chevalieri</i>	0.97, 1.16, 1.37, 1.62, 1.80	1.12, 1.49, 1.61, 1.80, 1.97
11.2	<i>Eurotium chevalieri</i>	0.92, 1.29, 1.59	1.84
11.3	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.15, 1.23, 1.41, 1.52	1.15, 1.54
11.9	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.11, 1.18, 1.36, 1.47, 1.77	1.38
11.15	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.10, 1.18, 1.36, 1.46, 1.77	-
11.18	<i>Eurotium chevalieri</i>	0.84, 1.33, 1.41, 1.54, 1.71	-
11.19	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.21, 1.37, 1.52	-
11.20	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.12, 1.20, 1.37, 1.48, 1.66, 1.77	-
14.26	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.17, 1.51, 1.67, 1.89	1.13, 1.20, 1.28, 1.49, 1.64, 1.78, 1.89
18.32	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.07, 1.50, 1.66, 1.79	1.26, 1.50, 1.65, 1.79, 1.92
19.19	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.11, 1.56, 1.71	1.27, 1.54, 1.67, 1.81
23.8	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.01, 1.42, 1.64	1.34, 1.52, 1.71, 1.84
23.19	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.25, 1.38, 1.54, 1.82	0.96, 1.17, 1.45
24.27	<i>Eurotium chevalieri</i>	1.28, 1.50, 1.85	0.84, 1.22, 1.75
25.11	<i>Eurotium chevalieri</i>	0.21, 0.55, 1.09, 1.33, 1.76	0.27
3.2	<i>Fennelia nivea</i>	1.07, 1.23, 1.48, 1.59, 1.71, 1.85	1.25, 1.51, 1.61, 1.74
3.3	<i>Fennelia nivea</i>	1.86, 1.49	1.81, 1.68, 1.50, 1.15, 0.97, 0.72
3.7	<i>Fennelia nivea</i>	1.04, 1.20, 1.29, 1.44, 1.55, 1.68, 1.81	1.04, 1.20, 1.30, 1.44, 1.55, 1.76
3.8	<i>Fennelia nivea</i>	1.79, 1.60, 1.45, 1.35, 1.21, 0.97, 0.67	1.80, 1.66, 1.46, 1.37, 1.20, 0.92, 0.73
3.12	<i>Fennelia nivea</i>	1.82, 1.47, 1.19, 0.99	1.80, 1.66, 1.46, 1.36, 1.20, 0.90, 0.60
3.13	<i>Fennelia nivea</i>	1.80, 1.66, 1.53, 1.43, 1.28, 1.14	1.77, 1.67, 1.54, 1.44, 1.29, 1.17, 1.02

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
3.14	<i>Fennelia nivea</i>	1.82, 1.45, 1.34, 1.12, 0.99, 0.78	1.79, 1.67, 1.36, 1.19, 0.83, 0.71
3.18	<i>Fennelia nivea</i>	1.79, 1.64, 1.51, 1.40, 1.25, 1.13, 1.03	1.67, 1.52, 1.42, 1.28, 1.17, 1.02
3.19	<i>Fennelia nivea</i>	1.79, 1.66, 1.51, 1.08, 0.91, 0.77	1.79, 1.67, 1.48, 1.39, 1.22, 0.92, 0.69
3.21	<i>Fennelia nivea</i>	1.69, 1.58, 1.46, 1.19, 1.03	1.70, 1.53, 1.41, 1.14, 1.01
8.4	<i>Fennelia nivea</i>	0.44, 0.78, 1.25, 1.34, 1.49	0.99, 1.16, 1.46, 1.66, 1.74, 2.08
18.5	<i>Fusarium oxysporium</i>	1,88	
26.14	<i>Fusarium oxysporium</i>	1.19, 1.51, 1.71	
9.1	<i>Fusarium solani</i>	-	1,41
18.30	<i>Fusarium solani</i>	1,83	
19.1	<i>Fusarium solani</i>	-	
19.9	<i>Fusarium solani</i>	0.96, 1.22, 1.48, 1.57, 1.69	0.26, 0.98, 1.22, 1.39, 1.58
19.16	<i>Fusarium solani</i>	-	
19.17	<i>Fusarium solani</i>	1,79	
19.20	<i>Fusarium solani</i>	1,76	
19.22	<i>Fusarium solani</i>	1.28, 1.77	
26.4	<i>Fusarium solani</i>	1.29, 1.53, 1.74	
26.17	<i>Fusarium solani</i>	1,70	1,70
14.3	<i>Fusarium sp.</i>	1.17, 1.60, 1.89	
20.3	<i>Paecilomyces clavisporus</i>	1,42	
20.4	<i>Paecilomyces clavisporus</i>	1.19, 1.50	
5.9	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	-	-
24.28	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0.94, 1.25, 1.37, 1.52, 1.81	1.32, 1.63
4.2	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0.90, 1.13, 1.29, 1.41, 1.55	0.91, 1.12, 1.43
4.6	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0.76, 1.12, 1.24, 1.46	0.53, 1.06, 1.30, 1.43, 1.53
4.18	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0.81, 1.10, 1.26, 1.42	0.74, 1.10, 1.28, 1.42
4.19	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0.95, 1.18, 1.60	1.10, 1.41
23.1	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0.89, 1.11, 1.26, 1.39, 1.62, 1.73	0.95, 1.12, 1.32, 1.38, 1.54
4.5	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1,28	1,46
7.2	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1.63, 1.81, 1.92	1.01, 1.62, 1.92
12.28	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1.06, 1.76	1,03
3.25	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1.03, 1.15, 1.33, 1.54	0.98, 1.29, 1.45
4.17	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1,58	-
10.9	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1.27, 1.66	1.21, 1.48

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
12.18	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1.31, 1.68	0.50, 1.23, 1.65
14.33	<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	1.23, 1.68
21.22	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.34, 1.78	0.40, 1.14, 1.69, 1.84, 2.08
24.20	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1.44, 1.69	1,71
7.5	<i>Penicillium citreonigrum</i>	0.90, 1.19, 1.41, 1.63, 1.87	0.62, 1.42, 1.49, 1.65, 1.87
3.15	<i>Penicillium citrinum</i>	1.13, 1.54	1.24, 1.54
5.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-
5.2	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-
9.2	<i>Penicillium citrinum</i>	1.00, 1.29, 1.48, 1.59	1.01, 1.29, 1.44, 1.56, 1.78
9.3	<i>Penicillium citrinum</i>	1.68, 1.79	1.07, 1.86
9.5	<i>Penicillium citrinum</i>	0.80, 1.54	0.49, 0.93, 1.22, 1.54
9.13	<i>Penicillium citrinum</i>	0.16, 1.36, 1.60, 1.79, 2.16	0.08, 1.20, 1.34, 1.54
9.14	<i>Penicillium citrinum</i>	1.20, 1.66	1.36, 1.62
9.15	<i>Penicillium citrinum</i>	1.63, 1.80	1.15, 1.70
9.16	<i>Penicillium citrinum</i>	0.21, 1.01, 1.44	0.24, 0.90, 1.10, 1.38, 1.56
9.17	<i>Penicillium citrinum</i>	0.55, 1.37, 1.58	1.38, 1.58
9.18	<i>Penicillium citrinum</i>	1.07, 1.59, 1.81	1.08, 1.42, 1.78, 1.96
9.25	<i>Penicillium citrinum</i>	0.05, 0.91, 1.24, 1.37, 1.61, 1.73	0.08, 0.93, 1.31, 1.42, 1.52, 1.75
9.26	<i>Penicillium citrinum</i>	0.86, 1.38, 1.57, 1.73	0.04, 0.96, 1.27, 1.38, 1.63, 1.73
10.5	<i>Penicillium citrinum</i>	1.07, 1.75	1,82
10.8	<i>Penicillium citrinum</i>	1.15, 1.28, 1.37, 1.63, 1.77, 1.92	1.18, 1.31, 1.40, 1.68, 1.81
10.16	<i>Penicillium citrinum</i>	1,58	1.11, 1.33, 1.49
10.17	<i>Penicillium citrinum</i>	1.45, 1.63	1.18, 1.39, 1.56
10.18	<i>Penicillium citrinum</i>	1.08, 1.57	1.12, 1.34, 1.50
10.19	<i>Penicillium citrinum</i>	0.82, 1.09, 1.26, 1.59	0.93, 1.14, 1.34, 1.52
11.14	<i>Penicillium citrinum</i>	0.53, 1.35, 1.51	1.48, 1.56
12.23	<i>Penicillium citrinum</i>	1,16	1.21, 1.83, 1.98
12.30	<i>Penicillium citrinum</i>	1.10, 1.57	1.33, 1.59
13.4	<i>Penicillium citrinum</i>	1.01, 1.26, 1.49	1.03, 1.33, 1.56
13.7	<i>Penicillium citrinum</i>	0.33, 0.55, 0.97, 1.52	0.47, 0.86, 1.24, 1.63
13.10	<i>Penicillium citrinum</i>	1,83	1.11, 1.74
13.18	<i>Penicillium citrinum</i>	1.10, 1.58	0.36, 0.60, 1.23
13.23	<i>Penicillium citrinum</i>	1.02, 1.32, 1.72	1,44
14.4	<i>Penicillium citrinum</i>	1.04, 1.37, 1.74	-

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
14.12	<i>Penicillium citrinum</i>	1,67	1.06, 1.31, 1.46
14.19	<i>Penicillium citrinum</i>	-	1.48, 1.59
14.20	<i>Penicillium citrinum</i>	-	1,63
14.27	<i>Penicillium citrinum</i>	-	1.54, 1.58
14.31	<i>Penicillium citrinum</i>	1.03, 1.27, 1.53, 1.69	1.38, 1.63
14.32	<i>Penicillium citrinum</i>	1.34, 1.54	0.99, 1.23, 1.42, 1.54
14.35	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-
15.14	<i>Penicillium citrinum</i>	-	1.52, 1.73
17.11	<i>Penicillium citrinum</i>	-	1,58
17.16	<i>Penicillium citrinum</i>	1.06, 1.28, 1.62	-
17.17	<i>Penicillium citrinum</i>	1.03, 1.81	-
18.6	<i>Penicillium citrinum</i>	1,60	1.02, 1.22, 1.44, 1.65
18.7	<i>Penicillium citrinum</i>	0.21, 1.11, 1.25, 1.45	0.23, 0.96
18.14	<i>Penicillium citrinum</i>	1.10, 1.32, 1.56, 1.74	1,6
18.16	<i>Penicillium citrinum</i>	1.33, 1.55	0.23, 0.94, 1.38, 1.55
18.19	<i>Penicillium citrinum</i>	0.23, 1.01, 1.25, 1.48	1.38, 1.60
18.29	<i>Penicillium citrinum</i>	0.95, 1.34, 1.48, 1.72	1.53, 1.69
18.36	<i>Penicillium citrinum</i>	0.21, 1.00, 1.12, 1.26, 1.46	0.95, 1.16, 1.24, 1.38
19.7	<i>Penicillium citrinum</i>	1.00, 1.24, 1.47, 1.79	1.24, 1.53
19.8	<i>Penicillium citrinum</i>	1.64, 1.72	0.90, 1.23, 1.46, 1.72
19.11	<i>Penicillium citrinum</i>	1.02, 1.50, 1.70	1.57, 1.75
19.12	<i>Penicillium citrinum</i>	-	1.05, 1.29, 1.39, 1.55
19.13	<i>Penicillium citrinum</i>	1.38, 1.62	0.99, 1.23, 1.38
19.14	<i>Penicillium citrinum</i>	1.09, 1.26, 1.46, 1.66	1.54, 1.73
19.21	<i>Penicillium citrinum</i>	1,38	1.03, 1.36, 1.57
21.4	<i>Penicillium citrinum</i>	1.05, 1.50	-
21.22	<i>Penicillium citrinum</i>	1.12, 1.66	1.42, 1.62
22.5	<i>Penicillium citrinum</i>	1.30, 1.62	0.89, 1.29, 1.42
22.8	<i>Penicillium citrinum</i>	1.00, 1.32, 1.49, 1.69	1.57, 1.78
22.9	<i>Penicillium citrinum</i>	1,54	1,66
22.24	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-
23.20	<i>Penicillium citrinum</i>	1,78	1.28, 1.59
24.18	<i>Penicillium citrinum</i>	1,39	-
26.5	<i>Penicillium citrinum</i>	1.30, 1.44, 1.71	1.02, 1.28, 1.40, 1.60

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
26.6	<i>Penicillium citrinum</i>	1.03, 1.26, 1.48	1,53
26.12	<i>Penicillium citrinum</i>	1.02, 1.26, 1.46, 1.65	-
26.16	<i>Penicillium citrinum</i>	1.35, 1.50, 1.62	0.97, 1.27, 1.39, 1.57
26.21	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-
4.1	<i>Penicillium commune</i>	0.92, 1.22, 1.64	1,66
4.4	<i>Penicillium commune</i>	1,61	-
4.7	<i>Penicillium commune</i>	1.01, 1.25, 1.65	1.01, 1.25, 1.61
4.9	<i>Penicillium commune</i>	0.73, 0.94, 1.20, 1.40, 1.50, 1.72	0.99, 1.19, 1.44, 1.54, 1.69
4.10	<i>Penicillium commune</i>	1.27, 1.61	1.26,1.59
4.11	<i>Penicillium commune</i>	0.65, 0.95, 1.25, 1.43, 1.56, 1.78	1.03, 1.23, 1.49, 1.74
4.12	<i>Penicillium commune</i>	0.78, 1.19, 1.37, 1.45, 1.65	0.98, 1.18, 1.42, 1.47, 1.63
4.13	<i>Penicillium commune</i>	0.78, 0.91, 1.18, 1.36, 1.47, 1.67	0.75, 0.94, 1.19, 1.41, 1.49, 1.65
4.14	<i>Penicillium commune</i>	0.39, 0.68, 0.89, 1.16, 1.34, 1.46, 1.64	0.99, 1.18, 1.40, 1.49, 1.64
4.15	<i>Penicillium commune</i>	0.37, 0.75, 0.97, 1.24, 1.42, 1.56, 1.78	0.83, 0.98, 1.22, 1.44, 1.80
4.16	<i>Penicillium commune</i>	0.38, 0.71, 0.90, 1.17, 1.34, 1.49, 1.71	1.02, 1.25, 1.39, 1.51, 1.74
4.20	<i>Penicillium commune</i>	1.29, 1.56	-
4.22	<i>Penicillium commune</i>	0.36, 0.68, 0.88, 1.13, 1.33, 1.57, 1.66	0.77, 0.99, 1.17, 1.42, 1.67
11.16	<i>Penicillium commune</i>	0.28, 0.87, 1.08, 1.48, 1.63	0.78, 1.08, 1.24, 1.43, 1.58
11.17	<i>Penicillium commune</i>	1.06, 1.43, 1.80	1,17
2.10	<i>Penicillium corylophilum</i>	1.17, 1.67, 1.91	1.35, 1.95
2.20	<i>Penicillium corylophilum</i>	0.94, 1.42, 1.55, 1.93	1.12, 1.44, 1.60, 1.88
2.21	<i>Penicillium corylophilum</i>	0.83, 1.14, 1.28, 1.41, 1.51, 1.87	1.52, 1.91
2.22	<i>Penicillium corylophilum</i>	0.99, 1.43, 1.90	1.27, 1.44, 1.86
2.25	<i>Penicillium corylophilum</i>	1.45, 1.92	0.91, 1.48, 1.92
3.16	<i>Penicillium corylophilum</i>	1,27	0.79, 1.12, 1.37, 1.49
21.5	<i>Penicillium corylophilum</i>	1.23, 1.44, 1.74	1,51
21.20	<i>Penicillium corylophilum</i>	-	-
21.29	<i>Penicillium corylophilum</i>	0.44, 0.76, 1.16, 1.31, 1.45, 1.71	1.22, 1.33
22.21	<i>Penicillium corylophilum</i>	1,52	1.33, 1.77
7.1	<i>Penicillium decumbens</i>	0.91, 1.26, 1.39, 1.55	0.40, 1.26
7.3	<i>Penicillium decumbens</i>	-	1.39, 1.57

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
7.4	<i>Penicillium decumbens</i>	0.95, 1.12, 1.31, 1.49, 1.77	0.91, 1.09, 1.30
7.10	<i>Penicillium decumbens</i>	1.22, 1.43, 1.72	1,26
8.10	<i>Penicillium decumbens</i>	0.93, 1.09, 1.34, 1.47, 1.67	1.06, 1.20, 1.74
9.6	<i>Penicillium decumbens</i>	1.24, 1.74	1.05, 1.10, 1.30
13.11	<i>Penicillium decumbens</i>	0.90, 1.02, 1.18	0.61, 1.85
17.24	<i>Penicillium decumbens</i>	0.62, 0.90, 1.18, 1.76	0.55
17.32	<i>Penicillium decumbens</i>	0.54, 0.92, 1.04, 1.27	1,27
21.23	<i>Penicillium decumbens</i>	0.44, 0.75, 1.04	-
26.20	<i>Penicillium funiculosum</i>	0.04, 1.66, 1.81, 1.94	1.35, 1.60, 1.76, 1.80
1.13	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1.71, 1.48, 1.18, 0.96, 0.50	1.70, 1.50, 1.18, 0.95, 0.46
1.14	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1.74, 1.40, 0.93, 0.49	1.70, 1.47, 0.93, 0.51
1.15	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1.76, 1.54, 0.98, 0.52	1.72, 1.58, 1.06, 0.48
2.4	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.39, 0.80, 1.14, 1.34, 1.56	0.37, 0.80, 1.34, 1.60
2.7	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.39, 0.80, 1.08, 1.34, 1.58	0.39, 0.78, 1.33, 1.59
2.11	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.42, 0.78, 1.05, 1.35, 1.58	0.43, 0.77, 1.12, 1.33, 1.57
2.15	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.44, 0.80, 1.37, 1.67	0.74, 1.14, 1.36, 1.58
2.23	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.89, 1.20, 1.45, 1.68	0.53, 0.81, 1.18, 1.44, 1.70
3.27	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1.10, 1.44	1.28, 1.45, 1.63
8.8	<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	-
8.9	<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	1,78
10.15	<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	1.11, 1.50
12.14	<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	-
12.24	<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	1,80
13.2	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.30, 1.08, 1.39, 1.68	-
13.3	<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	1.24, 1.40, 1.59
13.24	<i>Pencillium griseofulvum</i>	0.35, 1.22, 1.50	1.04, 1.42, 1.69
14.5	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1.14, 1.40	0.72, 1.09, 1.42, 1.68
14.6	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.25, 0.91, 1.08, 1.35, 1.68	0.89, 1.11, 1.40, 1.61
14.13	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.30, 1.14, 1.44	0.89, 1.44, 1.78
14.17	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.30, 1.14, 1.47	1.15, 1.42, 1.69
14.30	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.28, 1.08, 1.44	0.87, 1.47
17.25	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.30, 1.21, 1.44, 1.78	0.85, 1.39, 1.72
21.12	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.30, 1.11, 1.38	1.01, 1.32
22.4	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.30, 1.11, 1.32, 1.66	0.94, 1.36, 1.67
22.6	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.03, 1.42	0.03, 1.33, 1.41, 1.60

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
22.19	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.32, 1.04, 1.41, 1.74	1.04, 1.36
24.2	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.03, 0.39, 1.64, 1.89	1,56
24.4	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.25, 0.91, 1.05, 1.30, 1.64	1.13, 1.35
24.15	<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.98, 1.15, 1.33, 1.60, 1.71	0.92, 1.30, 1.50, 1.62, 1.74
24.17	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1.28, 1.43	1.24, 1.46
24.21	<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	1,57
7.7	<i>Penicillium implicatum</i>	-	0.05
7.9	<i>Penicillium implicatum</i>	-	-
9.21	<i>Penicillium implicatum</i>	0.74, 0.98, 1.69	0.75, 1.29, 1.67
9.22	<i>Penicillium implicatum</i>	0.63, 1.68	0.90, 1.30, 1.66
18.8	<i>Penicillium implicatum</i>	1.29, 1.35, 1.56	1.22, 1.35, 1.63
18.18	<i>Penicillium implicatum</i>	1.20, 1.55, 1.89	0.86, 1.57
18.28	<i>Penicillium implicatum</i>	1.33, 1.56	1.31, 1.58
19.18	<i>Penicillium implicatum</i>	1.21, 1.49	
22.20	<i>Penicillium implicatum</i>	1,60	1,62
25.2	<i>Penicillium implicatum</i>	1.56, 1.67	1.55, 1.66
25.4	<i>Penicillium implicatum</i>	1.09, 1.22, 1.47, 1.68, 1.86, 1.98	1.05, 1.33, 1.69, 1.85, 1.96
25.7	<i>Penicillium implicatum</i>	0.91, 1.19, 1.33, 1.65	0.80, 1.24, 1.60
25.12	<i>Penicillium implicatum</i>	0.65, 1.81	1.13, 1.17, 1.82
25.15	<i>Penicillium implicatum</i>	0.84, 1.16, 1.48, 1.67, 1.80	0.57, 1.62, 1.82
25.19	<i>Penicillium implicatum</i>	1.55, 1.80	1,78
26.16	<i>Penicillium implicatum</i>	1.01, 1.36, 1.45, 1.54	0.99, 1.24, 1.44, 1.51, 1.72, 1.83
26.24	<i>Penicillium implicatum</i>	1,61	1,61
26.27	<i>Penicillium implicatum</i>	1,76	0.85, 1.02, 1.26, 1.33, 1.48, 1.64, 1.82
10.1	<i>Penicillium islandicum</i>	1,68	1.29, 1.62
17.22	<i>Penicillium islandicum</i>	0.86, 1.48, 1.66, 1.80	0.43, 1.53, 1.65, 1.84
25.9	<i>Penicillium islandicum</i>	1.28, 1.51	0.39, 1.26, 1.52, 1.69, 1.82
25.13	<i>Penicillium islandicum</i>	1.25, 1.37, 1.53, 1.69, 1.81	1.20, 1.27, 1.55, 1.68, 1.81
2.5	<i>Penicillium miczynskii</i>	1.01, 1.13, 1.63, 1.79	1.00, 1.16, 1.59
2.14	<i>Penicillium miczynskii</i>	1.32, 1.69	1.20, 1.68
13.28	<i>Penicillium miczynskii</i>	0.87, 1.14, 1.42, 1.49, 1.72	-
18.21	<i>Penicillium oxalicum</i>	1.23, 1.68	0.55, 1.70
19.8	<i>Penicillium oxalicum</i>	1.09, 1.28, 1.72	0.47, 1.29, 1.68
26.26	<i>Penicillium oxalicum</i>	1.15, 1.35, 1.76	0.59, 1.32, 1.72

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF _{MEA}	RF _{CYA}
22.7	<i>Penicillium paxilli</i>	0.24, 1.29, 1.50	1,52
22.11	<i>Penicillium paxilli</i>	1.48, 1.87	0.18, 1.21, 1.30
18.26	<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.59, 0.78, 1.11, 1.41, 1.53, 1.74	1.43, 1.56, 1.71
19.5	<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.70, 1.12, 1.20, 1.39, 1.57, 1.77	0.56, 1.27, 1.44, 1.55, 1.73
19.6	<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.62, 0.86, 1.21, 1.47, 1.58, 1.78	0.23, 1.46, 1.57, 1.77
26.15	<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.56, 0.86, 1.05, 1.18, 1.43, 1.53, 1.75	0.48, 0.83, 1.07, 1.23, 1.36, 1.56, 1.75
26.28	<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.38, 0.52, 0.96, 1.12, 1.24, 1.31, 1.46, 1.72, 1.87	0.33, 0.51, 0.96, 1.13, 1.23, 1.62, 1.76, 1.87
15.3	<i>Penicillium restrictum</i>	1,58	-
15.8	<i>Penicillium restrictum</i>	1,33	1,38
15.18	<i>Penicillium restrictum</i>	1.24, 1.45, 1.69	1.29, 1.68, 1.80
2.9	<i>Penicillium rugulosum</i>	1.20, 1.50, 1.74	1.22, 1.46, 1.70
25.4	<i>Penicillium rugulosum</i>	0.43, 1.24, 1.37, 1.75	0.39, 1.26, 1.36, 1.47, 1.67, 1.74
25.5	<i>Penicillium rugulosum</i>	0.84, 1.21, 1.31, 1.50, 1.65	0.90, 1.12, 1.50, 1.67
25.6	<i>Penicillium rugulosum</i>	1,63	1,63
25.16	<i>Penicillium rugulosum</i>	1.63, 1.72	1.24, 1.64
25.17	<i>Penicillium rugulosum</i>	0.80, 1.30, 1.50, 1.65	0.87, 1.13, 1.39, 1.54, 1.66
25.22	<i>Penicillium rugulosum</i>	0.90, 1.23, 1.43, 1.57, 1.72	0.84, 1.23, 1.49, 1.64, 1.74
1.5	<i>Penicillium solitum</i>	1.74, 1.58, 1.24, 0.97, 0.20	1.82, 1.52, 1.18
1.7	<i>Penicillium solitum</i>	1.72, 1.56, 1.21, 0.88, 0.20	1.73, 1.22, 0.84, 0.20
1.16	<i>Penicillium solitum</i>	1.73, 1.54, 1.10, 0.19	1.72, 1.53, 1.17, 0.24
1.17	<i>Penicillium solitum</i>	1.69, 1.49, 1.02, 0.27	1.70, 1.50, 1.16, 1.02, 0.21
1.18	<i>Penicillium solitum</i>	1,94	1.96, 1.86, 1.60, 1.48, 1.40, 1.21, 0.15
1.19	<i>Penicillium solitum</i>	1.73, 1.52, 1.13, 0.96, 0.18	1.74, 1.50, 1.15, 0.21
1.20	<i>Penicillium solitum</i>	1.73, 1.54, 1.14, 0.93, 0.22	1.73, 1.17, 0.18
2.12	<i>Penicillium solitum</i>	0.98, 1.17, 1.36, 1.55	0.68, 1.31, 1.58, 1.80
4.3	<i>Penicillium solitum</i>	1.25, 1,46	1,42
17.18	<i>Penicillium solitum</i>	-	1.42, 1.63
15.15	<i>Penicillium sp.</i>	1.02, 1.26, 1.42, 1.60, 1.84	0.94, 1.26, 1.42, 1.73, 1.83
3.17	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.05, 1.50, 1.75	0.06, 0.94, 1.16, 1.46, 1.75, 2.13
4.21	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.14, 1.02, 1.22, 1.51, 1.77, 1.94	1.23, 1.42, 1.80, 1.93, 2.13
12.16	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.07, 2.00	0.10, 0.16, 1.98
12.29	<i>Penicillium verrucosum</i>	1.25, 1.79	1.28, 1.80

EK-1- (Devam) Un örneklerinden elde edilen izolatların metabolit profilleri

İzolat No	Tür	RF_{MEA}	RF_{CYA}
13.9	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.04, 1.46, 1.60, 1.75	0.05, 0.54, 0.61, 0.69, 1.57, 1.63
13.12	<i>Penicillium verrucosum</i>	1.21, 1.52, 1.72	1.26, 1.58, 1.74
13.16	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.04, 0.10, 1.40, 1.57	1.31, 1.46, 1.59, 1.70, 1.184
13.20	<i>Penicillium verrucosum</i>	1,77	1,84
13.25	<i>Penicillium verrucosum</i>	-	0.03, 0.19, 1.94, 2.07
13.27	<i>Penicillium verrucosum</i>	1.18, 1.76	0.30, 1.08, 1.24, 1.47, 1.80
13.29	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.10, 1,95	1,89
13.30	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.08, 1,91	1,95
15.4	<i>Penicillium verrucosum</i>	1.29, 1.43, 1.56, 1.69	0.07, 1.47, 1.57, 1.71
17.20	<i>Penicillium verrucosum</i>	1.28, 1.55	0.06, 1.67, 1.95
21.11	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.13, 1.06, 1.27, 1.39, 1.58, 1.71	-
24.3	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.04, 1.02, 1.23, 1.38, 1.54, 1.66	0.04, 1.10, 1.29, 1.41, 1.56, 1.67
24.19	<i>Penicillium verrucosum</i>	1.33, 1.57, 1.70	0.03, 1.26, 1.42, 1.50, 1.58, 1.68
24.24	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.97, 1.21, 1.58	0.96, 1.16, 1.32, 1.60
24.25	<i>Penicillium verrucosum</i>	1,58	0.03, 1.38, 1.56
24.26	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.03, 1.29, 1.56, 1.74	1,60
24.27	<i>Penicillium verrucosum</i>	-	-
26.7	<i>Penicillium verrucosum</i>	0.06, 1.19, 1.38, 1.56, 1.68, 1.84	0.03, 1.28, 1.40, 1.51
26.19	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.15, 1.30, 1.50, 1.68, 1.83	1.25, 1.55, 1.70, 1.83
14.15	<i>Penicillium viridicatum</i>	1,75	1,74
2.8	<i>Penicillium waksmanii</i>	1.05, 1.22, 1.32, 1.55	1.00, 1.29, 1.57
2.13	<i>Penicillium waksmanii</i>	1.34, 1.56, 1.71	0.96, 1.62, 1.74
13.15	<i>Penicillium citrinum</i>	1.10, 1.55	1.29, 1.57
24.16	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1.29, 1.40, 1.59	
25.20	<i>Steril misel (Kahverengi)</i>	-	1.02, 1.84
8.12	<i>Trichoderma reesei</i>	1.28, 1.49	1.02, 1.15, 1.41
18.1	<i>Trichoderma reesei</i>	0.86, 1.32, 1.50, 1.74	
18.33	<i>Trichoderma viride</i>	1.07, 1.34, 1.50, 1.70	
22.14	<i>Trichoderma viride</i>	1.11, 1.35, 1.51, 1.72	
26.1	<i>Trichoderma viride</i>	1.13, 1.39, 1.51, 1.71	
5.5	<i>Ulacladium artrum</i>	-	1.19, 1.52