

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ASPERGİLLUS* İZOLATLARININ TANISI, MİKOTOKSİJENİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, SICAKLIK VE SÜRENİN İNCİRDE
AFLATOKSİN VE SİKLOPIAZONİK ASİT OLUŞUMUNA ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ
Hatice İmge OKTAY**

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği

Programı : Gıda Mühendisliği

EKİM 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ASPERGİLLUS* İZOLATLARININ TANISI, BAZI MİKOTOKSİJENİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, SICAKLIK VE SÜRENİN İNCİRDE
AFLATOKSİN VE SİKLOPIAZONİK ASİT OLUŞUMUNA ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Hatice İmge OKTAY
(506052502)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06 Eylül 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 14 Ekim 2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dilek HEPERKAN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Onur DEVRES (İTÜ)
Prof. Dr. Derin ORHON (İTÜ)
Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG (MÜ)
Prof. Dr. Gürhan ÇİFTÇİOĞLU (İÜ)

EKİM 2010

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca araştırmamın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler identifikasyon çalışmalarını gerçekleştirmemde laboratuvar kapılarını bana açan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Nevin Gül KARAGÜLER ve yardımlarından dolayı Emrah YELBOĞA'ya, toksin analizlerini yapabilmeme olanak sağlayan Çevre Mühendisliği Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Tuğba ÖLMEZ'e de teşekkür ederim.

Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Funda Karbancıoğlu GÜLER'e, ayrıca Levent DİNÇER ve analizlerimin bir kısmını TUBİTAK MAM Gıda Enstitüsü mikotoksin-HPLC laboratuvarında gerçekleştirmeme olanak sağlayan Doç. Dr. Güner ÖZAY'a da teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora yolculuğumda beni her zaman destekleyen başta ailem Merih-Nurettin OKTAY olmak üzere, Turgut BAŞEĞMEZ, Oğuz ŞENOĞUZ, İlke ŞANLIER YÜKSEL ve Uzay DURAL' a da teşekkür ederim.

Eylül 2010

Hatice İmge OKTAY
(Veteriner Hekim)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ixx
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xixiii
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. İNCİRİN ÖNEMİ, ÖZELLİKLERİ VE İNCİRDE BULUNAN MİKOTOKSİNLER.....	5
2.1 İncirin Orijini, Üretimi Ve Genel Özellikleri	5
2.2 İncir'in Değerlendirilmesi Ve Kuru İncir Üretimi	7
2.3 Kuru İncirde Küf Florası	11
2.4 Kuru İncirde Mikotoksin Varlığı.....	13
3. AFLATOKSİNLER VE ÖZELLİKLERİ	19
3.1 Aflatoksin Üreticisi Küfler Ve Aflatoksin Biyosentezi	19
3.2 Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	24
3.3 Gıdalarda Aflatoksin Varlığı.....	25
3.4 Aflatoksinin Sağlık Üzerine Etkileri Ve Metabolizması.....	27
3.5 Aflatoksin İle İlgili Yasal Düzenleme Ve Limitler	31
3.6 Aflatoksin Tayininde Kullanılan Analitik Metodlar	33
4. SİKLOPIAZONİK ASİT VE ÖZELLİKLERİ.....	37
4.1 Siklopiazonik Asit Üreticisi Küfler Ve Siklopiazonik Asit Biyosentezi	37
4.2 Siklopiazonik Asitin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	39
4.3 Gıdalarda Siklopiazonik Asit Varlığı.....	40
4.4 Siklopiazonik Asitin Sağlık Üzerine Etkileri	42
4.5 Siklopiazonik Asit İle İlgili Yasal Düzenleme Ve Limitler	44
4.6 Siklopiazonik Asit Tayininde Kullanılan Analitik Metodlar	45
5. β -NİTROPROPİONİK ASİT VE ÖZELLİKLERİ.....	49
5.1 β -Nitropropionik Asit Üreticisi Küfler Ve β -Nitropropionik Asit Biyosentezi.....	49
5.2 β -Nitropropionik Asit'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	51
5.3 Gıdalarda β -Nitropropionik Asit Varlığı.....	52
5.4 β -Nitropropionik Asitin Sağlık Üzerine Etkileri	53
5.5 β -Nitropropionik Asit İle İlgili Yasal Düzenleme Ve Limitler.....	54
5.6 β -Nitropropionik Asit Tayininde Kullanılan Analitik Metodlar	55
6. <i>ASPERGILLUS SECTION FLAVI</i> İZOLATLARININ İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ	57
6.1 <i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i> İzolatlarının Geleneksel Yöntem İle İdentifikasyonu	57

6.2 <i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i> İzolatlarının Moleküler Yöntem İle İdentifikasyonu	60
7. MATERYAL VE METOT	63
7.1 Küf İzolatları	63
7.2 Küf İzolatlarının Moleküler Yöntemle İdentifikasyonu	63
7.2.1 DNA izolasyonu ve PZR amplifikasyon protokolü	63
7.2.2 Agaroz jel elektroforezi.....	64
7.2.3 Sekans analizi.....	64
7.3 Küf İzolatlarının Besiyerinde Mikotoksin Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi	65
7.3.1 Spor süspansiyonlarının hazırlanması.....	65
7.3.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile aflatoksin tayini	65
7.3.2.1 Aflatoksin standartlarının hazırlanması	65
7.3.2.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi	66
7.3.2.3 Aflatoksin ekstraksiyonu	66
7.3.2.4 Aflatoksin analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) koşulları	67
7.3.3 HPLC ile siklopiazonik asit tayini	67
7.3.3.1 Siklopiazonik asit standartlarının hazırlanması	68
7.3.3.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi	69
7.3.3.3 Siklopiazonik asit ekstraksiyonu	69
7.3.3.4 Siklopiazonik asit analizi HPLC koşulları	70
7.3.4 İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile β -nitropropionik asit tayini.....	70
7.4 <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> Üyelerinin Kuru İncirde Toksin Oluşturma Özelliklerine Sıcaklık Ve Zamanın Etkisinin Belirlenmesi.....	71
7.4.1 Örneklerin hazırlanması ve aşılama çalışmaları.....	72
7.4.2 Kuru incir örneklerinde aflatoksin analizleri	72
7.4.3 Kuru incir örneklerinde siklopiazonik asit tayini	72
7.5 İstatistiksel Analiz	73
8. BULGULAR VE TARTIŞMA	75
8.1 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i> Üyelerinin Moleküler İdentifikasyonu.....	75
8.2 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i> Üyelerinin Aflatoksin Oluşturma Özellikleri.....	86
8.3 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i> Üyelerinin Siklopiazonik Asit Oluşturma Özellikleri.....	92
8.4 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i> Üyelerinin β -Nitropropionik Asit Oluşturma Özellikleri.....	95
8.5 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Section <i>Flavi</i> Üyelerinin Aflatoksin, Siklopiazonik Asit ve β -Nitropropionik Asiti Birlikte Oluşturma Özellikleri	97
8.6 İzolatların İncirde Aflatoksin ve Siklopiazonik Asit Oluşturma Özelliklerine Sıcaklık Ve Sürenin Etkisi.....	101
8.6.1 İncirde aflatoksin üretimine sıcaklık ve sürenin etkisi.....	102
8.6.2 İncirde siklopiazonik asit üretimine sıcaklık ve zamanın etkisi.....	111
9. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	119
KAYNAKLAR.....	123
EKLER.....	145
ÖZGEÇMİŞ.....	153

KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADI	: Günlük alınabilecek en yüksek miktar
AF	: Aflatoksin
AFB₁	: Aflatoksin B ₁
AFB₂	: Aflatoksin B ₂
AFG₁	: Aflatoksin G ₁
AFG₂	: Aflatoksin G ₂
AFLP	: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
AFM₁	: Aflatoksin M ₁
AFM₂	: Aflatoksin M ₂
AFPA	: <i>Aspergillus flavus parasiticus</i> agar
ATP	: Adenozin trifosfat
ATR/FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopi
aw	: Su aktivitesi
BGYF	: Parlak yeşilimsi sarı fluoressans
BNP	: β-Nitropropionik asit
CA	: Coconut agar
CPA	: Siklopiazonik asit
CYA	: Czapek yeast agar
CZA	: Czapek agar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC	: Avrupa komisyonu
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim bağılı immün assay
ETS	: Eksternal transcribed region
EU	: Avrupa Birliği
FAO	: Gıda Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR-PAS	: Fourier Transform Infrared–Fotoakustik Spektroskopi
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
HA	: Hacimce
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IAK	: Immunoafinite kolon
IARC	: Uluslar arası kanser araştırmaları ajansı
IGS	: Intergenic spacer region
ITS	: Internal Transcribed Region
kGy	: Kilogrey
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Ölçüm limiti
MEA	: Malt ekstrakt agar
MeOH	: Metanol

NOEL	: Etkinin gözlenmediği en yüksek düzey
OTA	: Okratoksin A
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PDA	: Potato dekstroz agar
PDB	: Potato dekstroz broth
Ppb	: Parts per billion
Ppm	: Parts per million
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RASFF	: Gıda ve yem için hızlı alarm sistemi
rDNA	: Ribozomal deoksiribonükleik asit
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RIA	: Radio immuno assay
TBE	: Tris borik asit-EDTA
TDI	: Tolere edilebilir günlük alım miktarı
TFA	: Trifluoroasetik asit
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
USDA	: Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı
UV	: Ultraviyole
YES	: Yeast ekstrakt sukroz agar

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Taze ve kuru incirin besin içerikleri (100 g) (Tous ve Ferguson, 1996; USDA , 2009; Desai ve Kotecha, 1995; Janick ve Paull, 2008).	6
Çizelge 2.2 : Türkiye’de incir üretimi (TUIK, 2010).	8
Çizelge 2.3 : Dünyada kuru incir üretimi (Özden, 2008; Anon, 2010a).	9
Çizelge 2.4 : Dünyada kuru incir ihracatı (Anon, 2010b).	10
Çizelge 2.5 : Dünya kuru incir ithalatı (Anon, 2010b).	10
Çizelge 2.6 : BGYF veren (%) ve imha edilen ortalama kuru incir miktarları (Anon, 2010b).	15
Çizelge 2.7 : Türkiye’den ihraç edilen kuru incirlerde aflatoksin kontaminasyonu için toplam ve AB limitleri üzerindeki hızlı alarm bildirim sayısı (Anon, 2010c).	17
Çizelge 3.1 : Bazı <i>Aspergillus</i> türleri ve ürettikleri mikotoksinler.	20
Çizelge 3.2 : Bazı ülkelerde gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum aflatoksin limitleri (EC, 2006; FAO, 2007; TGK, 2008; FDA, 2009; TGK, 2009).	32
Çizelge 4.1 : Siklopiazonik asit üreticisi küfler.	38
Çizelge 4.2 : Gıdalarda siklopiazonik asit varlığı.	41
Çizelge 4.3 : Siklopiazonik asit analizlerinde kullanılan yöntemler.	47
Çizelge 5.1 : Bazı küf suşlarının besiyerinde BNP üretimleri.	50
Çizelge 6.1 : Mikotoksijenik <i>Aspergillus</i> türlerinin tayininde kullanılan klasik yöntemler.	59
Çizelge 6.2 : Mikotoksijenik <i>Aspergillus</i> türlerinin tayininde kullanılan moleküler yöntemler.	60
Çizelge 7.1 : Aflatoksin kalibrasyon çözeltileri ve içerdikleri toksin miktarları.	66
Çizelge 7.2 : CPA kalibrasyon çözeltileri ve içerdikleri toksin miktarları.	69
Çizelge 8.1 : Referans kültür olarak kullanılan <i>Aspergillus</i> türleri.	77
Çizelge 8.2 : <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> izolatlarının moleküler identifikasyonu.	78
Çizelge 8.3 : HPLC yöntemi ile aflatoksin analizlerinde tespit limiti ve geri kazanım oranları.	86
Çizelge 8.4 : Küf izolatlarının besiyerinde aflatoksin oluşturma özellikleri.	86
Çizelge 8.5 : <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> izolatlarının aflatoksin oluşturma miktarları.	90
Çizelge 8.6 : Küf izolatlarının besiyerinde CPA oluşturma özellikleri.	92
Çizelge 8.7 : Küf izolatlarının besiyerinde BNP üretme özellikleri.	95
Çizelge 8.8 : <i>A. flavus</i> suşlarının toksin profilleri.	97
Çizelge 8.9 : <i>A. parasiticus</i> suşlarının toksin profilleri.	100
Çizelge 8.10 : Kuru incirde aşılama çalışmalarında kullanılan izolatlar ve besiyerinde toksin oluşturma özellikleri.	102
Çizelge 8.11 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde aflatoksin B ₁ üretimi.	103
Çizelge 8.12 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde aflatoksin B ₂ , G ₁ ve G ₂ üretimi.	104
Çizelge 8.13 : İzolatların aflatoksin üretimi varyans analiz tablosu.	105

Çizelge 8.14 : Aflatoksin üretimi için izolatların arasındaki fark tablosu.	105
Çizelge 8.15 : İzolatların toplam aflatoksin üretimi için sıcaklık ve süre etkisinin ANOVA tablosu.	107
Çizelge 8.16 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde CPA üretimi.	112
Çizelge 8.17 : İzolatların siklopiazonik asit üretimi varyans analiz tablosu.	113
Çizelge 8.18 : İzolatların siklopiazonik asit üretimi için fark tablosu.	113
Çizelge 8.19 : İzolatların siklopiazonik asit üretimi için sıcaklık ve süre etkisinin ANOVA tablosu.	114
Çizelge A.1 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde toplam aflatoksin üretimi.	145

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1 : Aflatoksin biyosentez şeması (Sweeney ve Dobson, 1998).	23
Şekil 3.2 : Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Desphande ve diğ., 2002).	25
Şekil 4.1 : Siklopiazonik asitin kimyasal yapısı (Burdock ve Flamm, 2000).	40
Şekil 5.1 : β -nitropropionik asitin kimyasal yapısı (Burdock ve diğ., 2001).....	51
Şekil 6.1 : (a) <i>A. flavus</i> 'un AFPA besiyerinde 25°C'de 7 gün inkübasyon sonrası görüntüsü (b) CA besiyerinde 7 gün inkübasyon sonrası gelişen aflatoksijenik <i>A. flavus</i> 'un verdiği fluoresans görüntüsü (küçük petri kutuları) (Rodrigues ve diğ., 2007).	58
Şekil 6.2 : rDNA gen organizasyon şeması (A) ve daire içine alınan kısmın büyütülmüş şekli (B) (Güzeldağ, 2007).	62
Şekil 8.1 : Çalışmada kullanılan ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile hedef alınan fungal ribozomal DNA'nın şematik görüntüsü (Edwards ve diğ., 2002).	75
Şekil 8.2 : İzole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sıra M, marker DNA (Lambda/HindIII); Sıra: 1-7; 9-24; 26-28; 30; 32-35; 37-41 ve 43-57 <i>A. flavus</i> , Sıra: 8; 25; 31; 36; 42 <i>A. parasiticus</i> , Sıra 29 <i>A. tamarii</i>).	76
Şekil 8.3 : ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak çoğaltılan ITS ve 5.8S bölgelerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sıra M, marker DNA (PhiX174 DNA/BsuRI HAEIII); Sıra: 1-7; 9-24; 26-28; 30; 32-35; 37-41 ve 43-57 <i>A. flavus</i> , Sıra: 8; 25; 31; 36; 42 <i>A. parasiticus</i> , Sıra 29 <i>A. tamarii</i>).	76
Şekil 8.4 : Dizi analizi sonrası MEGA sekans analizi programı yardımıyla elde edilen elektroferogram grafiği.	77
Şekil 8.5 : İzole edilen <i>Aspergillus section Flavi</i> üyelerinin dağılımı (%).	83
Şekil 8.6 : AF1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	106
Şekil 8.7 : AF2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	107
Şekil 8.8 : AP1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	110
Şekil 8.9 : AP2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	110
Şekil 8.10 : AF1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde CPA değişim grafiği.	115
Şekil 8.11 : AF2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde CPA değişim grafiği.	115
Şekil 8.12 : AT'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde CPA değişim grafiği.	116
Şekil B.1 : AF1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	147
Şekil B.2 : AF2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	147
Şekil B.3 : AP1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	148

Şekil B.4 : AP2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.	148
Şekil C.1 : AF1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde siklopiazonik asit değişim grafiği.	149
Şekil C.2 : AF2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde siklopiazonik asit değişim grafiği.	149
Şekil C.3 : AT'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde siklopiazonik asit değişim grafiği.	150

ASPERGİLLUS İZOLATLARININ TANISI, MİKOTOKSİJENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, SICAKLIK VE SÜRENİN İNCİRDE AFLATOKSİN VE SİKLOPIAZONİK ASİT OLUŞUMUNA ETKİSİ

ÖZET

İncir meyvesi ve özellikle kuru incir ülkemiz için çok yüksek ekonomik değere sahip bir ihracat ürünüdür. Türkiye’deki incir üretiminin yaklaşık % 70’i kuru incir olarak tüketilmekte ve dünya’da kuru incir ihracatının yaklaşık % 55’i ülkemiz tarafından karşılanmaktadır. Ülkemizde incir hasatı geleneksel olarak ağaç üzerinde kuruyarak yere düşen buruk incirlerin toplanarak nem içeriğinin güneşte % 18-20’ye kadar düşürülmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Üretim yöntemi nedeniyle kuru incirler yoğun olarak küf kontaminasyonuna ve gelişimine maruz kalmaktadır. Kuru incir ayrıca yüksek karbonhidrat içeriği nedeniyle de küf gelişimi ve toksin oluşumunu destekleyen bir meyvedir. Ülkemizde incirlerin mikroflorası baskın olarak *Aspergillus* cinsi küf türlerinden *Aspergillus niger* sonrasında ise *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*’tan meydana gelmektedir.

Aspergillus section *Flavi* alt grubunda bulunan *A. flavus* ve *A. parasiticus* dünyada sıklıkla rastlanan ve en iyi bilinen küf türleridir. Özellikle bu küfler doğada ve gıdalarda yaygın olarak bulunarak başlıca aflatoksin olmak üzere mikotoksin olarak adlandırılan ikincil metabolitleri oluşturmaları nedeniyle önem taşımaktadır.

Aflatoksinler içerisinde en toksik özellikte olan aflatoksin B₁ (AFB₁) insan dahil olmak üzere tüm omurgalı canlılar üzerinde karsinojen, mutajen, teratojen, hepatotoksik ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkiye sahiptir ve kanserojen madde (grup 1) olarak sınıflandırılmaktadır. Bilinen 15-20 birbiriyle yakın ilişkili aflatoksin türevinden *Aspergillus flavus* AFB₁ ve AFB₂’yi üretirken, *Aspergillus parasiticus* ise AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂’yi üretmektedir. Aflatoksinler mısır, yer fıstığı, pamuk tohumu, kabuklu yemişler, tahıllar, baharatlar, incir ve kuru meyveler gibi çok çeşitli üründe doğal olarak bulunmak suretiyle sorun oluşturabilmektedir.

Aflatoksin’e ilave olarak *A. section Flavi* üyelerinden *A. flavus*, *A. tamarii* ve *A. pseudotamarii* tarafından üretilen diğer bir toksin siklopiazonik asittir (CPA). Bu toksinin çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* küf türleri tarafından da üretildiği belirlenmiştir. Yağlı tohumlar, kabuklu yemişler, mısır, fıstık, kuru meyveler ve kuru incirde doğal olarak CPA varlığı tespit edilmiştir.

β -Nitropropionik asit (BNP) ise *A. flavus* tarafından üretilen bir başka toksindir. *A. wentii*, *A. oryzae*, *Penicillium atrovirens*, *Arthrinium seccharicola* ve *A. phaeospermum* tarafından da üretilmektedir. Toksik özellikte olmayıp enzim ve bazı geleneksel fermente ürünlerin üretiminde kullanılan *A. section Flavi* üyelerinden *A. oryzae* ve *A. sojae* türlerinin miso, shoyu ve katsuobushi gibi ürünlerde BNP ürettikleri tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında kurutma döneminde toplanan kuru incir örneklerinden izole edilmiş *A. section flavi* üyelerinin PZR kullanılarak moleküler yöntemle

identifikasyonu yapılmış ve izolatların in vitro koşullarda AF, CPA ve BNP oluşturma özellikleri belirlenmiştir. İkinci aşamada ise besiyerinde toksin üretme özelliklerine göre seçilen izolatlar incire aşılansarak AF ve CPA üretimlerine sıcaklık ve sürenin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Kuru incirden izole edilmiş 57 adet küf izolatının moleküler yöntemle tanımlanması ITS 1-5.8S-ITS 2 bölgesine spesifik primerler dizayn edilerek Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yapılmıştır. Türlerin identifikasyonu 18S rDNA bölgesine ait sekans sonuçlarının BLAST'da bilinen ribozomal sekanslar ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Küf izolatlarının 51'i *Aspergillus flavus*, 5'i *Aspergillus parasiticus* ve 1'i ise *Aspergillus tamarii* olarak tanımlanmıştır. İdentifikasyonda kullanılan ITS bölgesinin hedef alındığı moleküler yöntem 3 türü birbirinden ayırmada başarılı olmuştur fakat genetik düzeyde birbirine çok yakın akraba olan *A. flavus* ve *A. oryzae* gibi türlerin ayırımında sorun yaşanmaktadır. Ayrıca bu yöntem ile izolatların toksijenik ve atoksijenik suşlarının birbirinden ayırımı yapılamamaktadır.

57 adet izolatın AF, CPA ve BNP oluşturma özellikleri in vitro olarak sırasıyla YES, CYA ve PDA besiyerinde incelenmiştir. İzolatların büyük oranda ve yüksek toksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir. *A. flavus* izolatlarının % 98'i, *A. parasiticus* izolatlarının ise % 100'ü sırasıyla 0,30 ile 1619 ppb ve 106 ile 1255 ppb aralığında aflatoxin üreticisi olduğu belirlenmiştir. *A. flavus* izolatlarının % 98'i CPA'yı 0,072-398,16 ppm aralığında, *A. parasiticus* izolatlarının % 40'ı ise 0,059-0,052 ppm aralığında üretmiştir. *A. tamarii* izolatı aflatoxin üretmemiş, CPA'yı ise 2,69 ppm düzeyinde üretmiştir. Son olarak BNP, yalnızca *A. flavus* izolatlarının % 23,5'i tarafından 7,90-1571,20 ppb aralığında oluşturulmuştur.

İzolatların besiyerinde toksin üretimlerinin incelenmesi ile farklı toksin profilleri olduğu gözlenmiştir. Mikotoksin oluşturma özelliklerine göre, *A. flavus* izolatlarının 5 farklı profil, *A. parasiticus* izolatlarının ise 3 farklı profil gösterdiği tespit edilmiştir.

İncir aşılama çalışmalarında kullanılmak üzere in vitro AF ve CPA oluşturma özelliklerine göre 2 adet *A. flavus* (AF1 ve AF2), 2 adet *A. parasiticus* (AP1 ve AP2) ve 1 adet *A. tamarii* (AT) izolatı seçilmiştir. Seçilen izolatlardan AF1, B grubu aflatoxinler, CPA ve BNP'yi; AF2, B grubu aflatoxinler ve CPA'yı, AP1, B ve G grubu aflatoxinleri, AP2 ise B ve G grubu aflatoxinlere ilave olarak CPA'yı ve AT izolatı ise yalnızca CPA'yı üretmektedir.

İncire aşılansan izolatların aflatoxin üretimleri yönünden aralarında istatistiki olarak ($\alpha=0,01$) önemli farklılık olduğu ve *A. parasiticus* suşlarının kuru incirde *A. flavus* suşlarından önemli düzeyde farklılık göstererek çok daha yüksek miktarda aflatoxin üreticisi olduğu belirlenmiştir. İzolatların incirde aflatoxin oluşturmalarına sıcaklık ve süre etkisinin ve ayrıca aralarındaki ilişkinin de istatistiki ($\alpha=0,01$) olarak çok önemli olduğu belirlenmiştir. *A. flavus* türleri tarafından aflatoxin üretimleri en iyi AF1 için 27,5°C'de 7. günde ve AF2 için 30°C'de 14. günde gerçekleşmiştir. 20°C ve 35°C'de toksin üretimi oldukça düşük gerçekleşmiş ve 40°C'de ise aflatoxin üretimi gözlenmemiştir. AF1 kuru incirde yalnızca AFB₁'i düşük olarak üretmek suretiyle zayıf toksijenik özellik göstermiş, AF2 ise 954 ppb düzeyinde aflatoxin üreticisi olarak belirlenmiştir. AF1 yalnızca 25°C sıcaklıkta 3. gün çok düşük AFG₁'de üretmekte, AF2 numaralı izolat AFB₁'e ilave olarak AFB₂ de üretmektedir.

A. parasiticus izolatlarının (AP1 ve AP2) incirde aflatoxin üretimlerinin 25°C'de 7. günde 1231 ppb gibi çok daha yüksek düzeyde gerçekleştiği görülmektedir. 30°C

sıcaklıkta da yüksek konsantrasyonda aflatoksin üretimi gözlenmiş, 20°C ve 40°C’de aflatoksin üretimi çok daha düşük olmak kaydıyla devam etmiştir. AP1 olarak numaralandırılmış *A. parasiticus* izolatu B ve G grubu aflatoksinlerin tamamını 25, 27,5 ve 30°C’de üretmiş, AP2 ise aflatoksin G₂ dışında diğer aflatoksinleri üretmiştir.

Kuru incirde CPA üretimi yönünden seçilen izolatlar arasındaki fark analizinde AF1 izolatının daha yüksek miktarda CPA üreterek diğer izolatlardan istatistiki ($\alpha=0,01$) olarak da farklılık gösterdiği belirlenmiştir. CPA üretimi tüm suşlarda 1. günde belirlenmemiş, 3. günden itibaren gözlenmiş ve 14. güne doğru genellikle artış göstermiştir. *A. flavus* izolatlarından AF1’in CPA üretimi genel olarak AF2’den daha yüksektir. En yüksek CPA üretimi her iki *A. flavus* izolatında da 25°C 14 günde görülmüş, 40°C’de de diğer sıcaklıklardan daha düşük olmak kaydıyla devam ettiği belirlenmiştir. *A. tamarii* izolatu ise *A. flavus* türlerinden daha zayıf toksijenik özellik göstermiş, en yüksek CPA üretimi 30°C’de 14. günde gerçekleşmiştir. *A. parasiticus* izolatının kuru incirde CPA üretmediği görülmüştür.

IDENTIFICATION OF *ASPERGILLUS* ISOLATES, DETERMINATION OF MYCOTOXIGENIC PROPERTIES, EFFECTS OF TEMPERATURE AND TIME ON AFLATOXIN AND CYCLOPIAZONIC ACID FORMATION IN FIGS

SUMMARY

Fig fruit and especially dried fig is a very important economical export product for our country. Almost 70 % of the production in Turkey is consumed as dried fig and 55 % of the world's dried fig export is provide from Turkey. Traditional harvesting technique includes collecting of the fully ripen fruit from the soil and sun drying until moisture reaches % 18-20. Because of the traditional harvesting and drying techniques fig is suitable for contamination and growth of fungi. Also high carbohydrate content of the fig fruit enhance fungi growth and toxin formation. In our country microflora studies on figs showed that *Aspergillus* species are dominant mainly *A. niger*, *A. flavus* and *A. parasiticus*.

Aspergillus section *Flavi* includes common and world-wide species namely *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii*. Unfortunately many strains in these species can be found in food naturally and they are capable of producing highly toxic secondary metabolites called mycotoxins such as aflatoxins.

Aflatoxins are considered the most toxigenic metabolites being hepatotoxic, mutagenic, carcinogenic and immunosuppressive from mycotoxin classes and became a potential risk to human and animal health. The main members of *A. section Flavi* able to produce aflatoxins are *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxins consist of a group of approximately 15-20 related secondary metabolites although AFB₁ and AFB₂ are produced by *Aspergillus flavus*, AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ are produced by *Aspergillus parasiticus* strains. AFB₁ is known to be a hepatocarcinogen for humans. Therefore it is classified as a group I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins can occur in a wide range of important raw food commodities including cereals, nuts, spices, figs and dried fruits.

Besides aflatoxins some *A. flavus* strains together with strains belonging to the species *Aspergillus tamarii* are reported to produce cyclopiazonic acid (CPA). Also other species from the genera *Aspergillus* and *Penicillium* produce CPA. This mycotoxin is a inhibitor of calcium dependent ATPase, which is toxic to animals and humans. Natural CPA contamination has been reported from variety of foods such as seeds, nuts, maize, peanut, dried fruits and dried figs.

β -Nitropropionic acid (BNP) is an another mycotoxin produced by *A. flavus* strains. BNP may also be produced by other *A. section Flavi* members such as *A. oryzae*, *A. sojae* which are used as starter cultures for fermentation of soybean paste for miso and other products traditionally. It shows a neurotoxic effects.

The purpose of this study was identification of *A. section Flavi* members by using PCR isolated from dried figs and determination of in vitro AF, CPA and BNP production capacity of the isolates. Regarding mycotoxigenic properties different isolates were selected for studying effects of temperature and time on the AF and CPA formation in fig.

Molecular identification of 57 isolates from dried figs was conducted with designing specific primers for the ITS 1-5.8S-ITS 2 rDNA region using PCR. Identification of species was determined by comparing the result of sequences which belongs to partial 18S rDNA of the sequences with known ribosomal sequences using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Out of a total 57 fungal isolates 5 of them identified as *A. parasiticus*, 1 of them identified as *A. tamarii* and 51 of them identified as *A. flavus*. ITS 1-ITS 2 target region for molecular identification is suitable for discrimination of three species. Unfortunately it was became inefficient for discriminate closely related species like *A. flavus* and *A. oryzae*. And also this method was not able to differentiate toxigenic and atoxigenic strains.

In vitro AF, CPA and BNP production properties of 57 isolates were studied on YES, CYA and PDA media respectively. High percentages of the isolates were determined highly toxigenic. Out of the 98 % of the *A. flavus* and 100 % of the *A. parasiticus* isolates were able to produce aflatoxin in the range of 0,30-1619 ppb and 106-1255 ppb respectively. 98 % of the *A. flavus* isolates were able produce CPA from 0,072 to 398,16 ppm, 40 % of the *A. parasiticus* isolates were able to produce CPA from 0,052 to 0,059 ppm. One *A. tamarii* isolate were able to produce CPA 2,69 ppm concentration. Finally BNP only produced by 23,5 % *A. flavus* isolates in the range of 7,90-1571,20 ppb.

Based on the mycotoxigenic profile regarding aflatoxins B, G, CPA and BNP, 57 fungal strains classified into 5 chemotypes for *A. flavus*, 3 chemotypes for *A. parasiticus*.

For the fig inoculation studies 2 *A. flavus* (AF1 ve AF2), 2 *A. parasiticus* (AP1 ve AP2) and 1 *A. tamarii* (AT) isolates were selected according to in vitro AF and CPA production properties. Within the selected *A. flavus* isolates AF1 were able to produce group B aflatoxins, CPA and BNP, AF2 were able to produce group B aflatoxins and CPA, within the *A. parasiticus* isolates AP1 were able to produce B and G group of aflatoxins, AP2 were able to produce CPA in addition to B and G group of aflatoxins. AT were able to produce only CPA.

A. parasiticus isolates were able to produce higher concentration of aflatoxin and *A. flavus* and *A. parasiticus* difference were statistically ($\alpha=0,01$) significant. Also effects of temperature and time on formation of aflatoxin and relation between these two factors were significantly ($\alpha=0,01$) important statistically. Maximum aflatoxin formation of *A. flavus* isolates were observed for AF1 27,5°C and 7 days, for AF2 30°C 14 days. Very low level of aflatoxin production was observed at 20°C and 35°C and no aflatoxin production was observed at 40°C. Isolate AF1 was weak aflatoxigenic with producing only low level of AFB₁ in figs however AF2 was able to produce 954 ppb concentration of aflatoxin. Only at 25°C 3. days AF1 was able to produce very low level of AFG₁. Isolate AF2 was able to produce AFB₂ in addition to AFB₁.

Isolates of *A. parasiticus* (AP1 and AP2) were able to produce high concentration of aflatoxin with 1231 ppb at 25°C 7 days. And also 30°C was favourable for aflatoxin formation. At 20°C and 40°C very low level aflatoxin fromtaion was observed.

Isolate AP1 was able to produce both B and G group of aflatoxins. But isolate AP2 was not able to produce AFG₂.

Regarding CPA formation in figs there was a significant difference ($\alpha=0,01$) between isolates. AF1 was able to produce higher concentration of CPA. CPA formation started from 3. day and increase until 14 days incubation generally. AF1 isolate was higher CPA producer than AF2 usually. Optimum conditions for CPA production were 25°C and 14 days for both *A. flavus* strains. Being lower concentrations than other temperatures CPA production of *A. flavus* continued at 40°C. AT isolate showed weak CPA production than *A. flavus* and maximum CPA concentration were observed 14 days at 30°C. None of the *A. parasiticus* isolates was able to produce CPA in figs.

1. GİRİŞ

Yüksek kalorisi, içerdiği mineral ve vitaminlerin zenginliği ile besleyici özelliği olan subtropik incir meyvesinin dünyadaki en önemli üreticisi ülkemizdir ve üretimin % 80'den fazlası incir yetiştiriciliği açısından en uygun ekolojik koşulların bulunduğu Ege Bölgesi'nde gerçekleşmektedir (Günay, 2008). Türkiye incir üretimindeki liderliğinin yanısıra dünya kuru incir üretiminin de yarısından fazlasını karşılamaktadır (Aksoy ve diğ., 2001).

İncir hem taze hem de kuru olarak tüketilmektedir. Geleneksel kurutma yöntemi, dalında kuruyan incir meyvesinin yere düşerek toplanması ve 3-4 gün kadar güneşte kurutulması şeklinde yapılmaktadır. Bu yöntemde hasadın her gün düzenli olarak yapılması küf kontaminasyonunun önlenmesi açısından önem taşımaktadır (Öztekin ve diğ., 2006). Ülkemizde yapıldığı gibi güneşte kurutmanın başlıca problemi meyvenin toprakla teması ve uzun süre açık havada kalması nedeniyle böcekler ve patojenler tarafından enfeksiyon riskidir (Flaishman ve diğ., 2008). Kurutmadaki nem içeriği ile küf yükü de doğrudan bağlantılıdır. (Piga ve diğ., 2004).

Kurutulmuş incirlerin mikroflorası hammaddenin mikroflorası ve uygulanan kurutma yöntemine bağlı olmakla beraber, kuru incirin mikroflorasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda hakim floranın *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Fusarium* küflerinden oluştuğu belirlenmiştir (Heperkan, 2005). Kuru incirde küf florasının belirleme çalışmaları genellikle direkt ekim gibi geleneksel identifikasyon yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır. Fakat bu yöntemler ucuz olmakla beraber işgücü kaybına sebep olmasının yanısıra deneyimli, kalifiye eleman ihtiyacını doğurmaktadır. Bu nedenlerden dolayı daha yeni ve hızlı tekniklerin geliştirilme çalışmaları sürdürülmektedir.

Bu alanda en yeni teknik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile küflerin genetik materyalinin hedef alınarak identifikasyonlarının yapılmasıdır. Küf tanımlamalarında moleküler yöntemlerin en çok tercih edileni olan PZR yöntemi hızlı oluşu ve kalifiye teknik elemana olan ihtiyacın önüne geçmesine rağmen başlıca dezavantajı pahalı olması ve hatalı sonuç verebilmesidir.

Kuru incir mikroflorasını oluşturan küflerden özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* en toksijenik mikotoksin olma özelliğine sahip aflatoksinleri oluşturdıklarından önem taşımaktadırlar. İncir meyvesi ham halde *A. flavus* enfeksiyonuna dirençliyen olgunlaştıkça yumuşamakta ve direncini kaybetmektedir. Meyvenin herhangi bir hasarı yokken bile *A. flavus* sporları incir'in içine penetre olabilmektedir (Buchanan ve diğ., 1975).

Mikotoksinler küfler tarafından oluşturulan ikincil metabolitlere verilen genel isimdir. Bu maddeler insan ve hayvanlar tarafından alındığında mikotoksinin tipine bağlı olmakla beraber karsinogenik, mutajenik ve teratojenik etkileri ortaya çıkmaktadır (Kuiper-Goodman, 2004; Gümüş ve Yılmaz, 2006).

Aflatoksinler mikotoksinler içerisinde en toksik olanlarıdır. Bilinen 15-20 birbiriyle yakın ilişkili aflatoksin türevinden aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ gıdalarda doğal olarak bulunmakta, aflatoksin B₁ ve B₂'nin hayvanların metabolizmaları tarafından hidroksile metaboliti haline dönüştürülen M₁ ise süt, kan ve idrarda bulunmaktadır (Richard, 2007). İnsan dahil olmak üzere tüm omurgalı canlılar üzerinde karsinogen, mutajen, teratojen, hepatotoksik ve immun sistemi baskılayıcı etkiye sahip aflatoksinler içerisinde en toksik olanı aflatoksin B₁'dir ve Uluslararası kanser araştırmaları ajansı tarafından grup 1 karsinogen olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1993).

Aflatoksin'e ilave olarak *A. flavus* küfleri tarafından üretilen diğer bir mikotoksin siklopiazonik asittir (CPA) (Horn ve Dorner, 1999; Frisvad ve diğ., 2007; Horn, 2007). Bu iki mikotoksin kuru incirde bir arada bulunabilmektedir (Meçik, 2007; Somuncuoğlu, 2007). Siklopiazonik asit akut etkiye sahip bir toksin olmayıp etkisi kroniktir. İnsanlar üzerinde kronik etkileri olabileceği, üreme sistemini olumsuz etkileyerek doğum kusurlarına yola açabileceği düşünülmektedir. Hayvanlar üzerindeki deneysel çalışmalar neticesi siklopiazonik asit'in insanlarda teratojenik etkiye sahip olabileceği ve böbrek, dalak, kalp damar sistemi, merkezi sinir sistemi üzerinde hasar oluşturabileceği düşünülmektedir (Burdock ve Flamm, 2000). CPA tek başına toksisitesi yanı sıra *A. flavus* türleri tarafından aflatoksinle birlikte üretilmekte ve aflatoksinin toksisitesini arttırmaktadır.

β -Nitropropionik asit (BNP) ise *A. flavus* küf türleri tarafından üretilen diğer bir toksindir (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Burdock ve diğ., 2001; Scott, 2004; Frisvad ve

diğ., 2006). Çin’de doğru şekilde depolanmamış şeker kamışı kaynaklı olarak özellikle çocuk ve yaşlıların etkilendiği toplu zehirlenme vakaları gözlenmiştir. Bu mikotoksinin alımı apne, konvülziyonlar, ciğerlerde tıkanma ve karaciğerde hasara neden olmaktadır (Bhatnagar ve Garcia, 2001). β -Nitropropionik asit karsinojen veya mutajen olmadığı, en önemli etkisinin beyin üzerine olan nörotoksin özelliği olduğu düşünülmektedir. *A. flavus*’ un gıdalarda en önemli aflatoksin üreticisi olduğu bilinmektedir fakat gıdalarda aflatoksin B₁ ve siklopiazonik asit ile birlikte β -nitropropionik asit üretimlerine dair analitik çalışmalar mevcut değildir. Ayrıca bu mikotoksinlerin memeliler üzerindeki ortak etkisi halen daha bir soru işaretidir (Frisvad ve diğ., 2006).

Bu çalışmada Ege Bölgesi’nden kurutma aşamasında toplanan incirlerden izole edilen *Aspergillus* section *Flavi* üyelerinin moleküler yöntem kullanımı ile identifikasyonlarının yapılarak in vitro koşullarda aflatoksin, siklopiazonik asit ve β -nitropropionik asit oluşturma özelliklerinin ve kuru incirde aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturmalarına sıcaklık ve sürenin etkisinin belirlenmesi ve böylece incirde bulunması muhtemel mikotoksinlerin oluşumuna etkili faktörlerin aydınlatılması konularında katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2. İNCİRİN ÖNEMİ, ÖZELLİKLERİ VE İNCİRDE BULUNAN MİKOTOKSİNLER

2.1 İncirin Orijini, Üretimi Ve Genel Özellikleri

Tarihi insanlık tarihi kadar eskiye dayanan incirin kültür meyvesi olarak yetiştiriciliğinin yapıldığını gösteren kayıtlara milattan önce (M.Ö.) 2900 yılında Sümerlere ait kaynaklarda rastlanmaktadır (Janick ve Paull, 2008). Anavatanı olarak kabul edilen Anadolu yarımadasında yabani olarak yetiştirilen incir, Akdeniz çevresine Fenikeliler, Yunanlılar ve Romalılar tarafından kültür bitkisi olarak yayılmıştır. İncirin Yunanlılar tarafından Anadolu'nun güneybatısında bugünkü Aydın ve Muğla illerinin büyük kısmını içine alan Karia Bölgesi'nden alındığı belirtilmektedir. M.Ö. 4. yüzyılda bu bölgede üretilen incirin gemilerle Akdeniz ülkelerine gönderildiği ve incirin latince adı *Ficus carica*'nın da buradan kaynaklandığı bilinmektedir (Günel, 2008). Botanik olarak yenebilir incir meyvesi, *Urticales* (ısırganlar) takımı *Moraceae* (dutgiller) ailesi *Ficus* cinsinin üyesi olup en geniş türü *Ficus carica* L.'dir. Bu türün 700'den fazla çeşidi vardır ve meyvenin olgunlaşması için tozlaşma (döllenme) gereksinimi olup olmamasına ve hasat şekline göre birbirlerinden ayrılmaktadır (Flaishman ve diğ., 2008). Erkek incire *figus carica caprificus*, dişi incire ise *figus carica domestica* denilmektedir. Tozlaşma rüzgarla değil, erkek incirle simbiyotik yaşam süren ilek arıcığı (*Blastophaga psenes* L.) ile dişi incir çiçeklerinin döllenmesiyle meydana gelmektedir (Aksoy ve diğ., 2001). Meyve oluşumu için tozlaşmaya gereksinimi olup olgunlaşan incir çeşidine örnek "Smyrna", tozlaşmaya gereksinim duymadan olgunlaşan incir çeşidine örnek olarak ise "kahverengi Türk inciri" verilebilir (Desai ve Kotecha, 1995). Sofralık olarak tüketilen incir ticari olarak önem taşıyan dişi incirlerin yaş ve kuru meyveleridir. Subtropik bir meyve olan incir ekolojik uyum yeteneği ile yurdumuzun tüm sahil kuşağında özellikle Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde ticari olarak yetiştirilmektedir. Kuru ve taze incir üretimi Ege Bölgesi'nde Gediz, Büyük ve Küçük Menderes havzalarında yoğunlaşmaktadır. Türkiye incir üretiminin % 80'den fazlası bu Bölgeden sağlanmaktadır (Günel, 2008). İncir hasatı iklim şartlarına bağlı olarak Ağustos sonunda başlamakta, Eylül ve Ekim aylarında tamamlanmaktadır.

Ülkemizde üretilen çeşitlerin % 88’lik bölümünü sarılop oluşturmakta geri kalan % 12’lik kısmı ise Bursa siyahı, göklop, yeşilgüz, bardacık gibi çeşitlerden meydana gelmektedir (Tuğ, 2002).

Hem taze hem de kuru incir meyvesi potasyum, kalsiyum, askorbik asit, A vitamini, karbonhidrat, serin, prolin, alanin aminoasitleri ve çok çeşitli polifenolik antioksidanlar açısından oldukça zengindir ve yüksek lif içeriği, kolesterol ve neredeyse hiç yağ içermemesi ile besinsel olarak çok yararlı bir üründür. Kuru incirin 1 gramındaki kalsiyum içeriği sütün kalsiyum içeriğinden fazladır. Çizelge 2.1’de taze ve kuru incirin besin içerikleri verilmiştir. İncir meyvesi’nin polifenolik antioksidan içeriğini flavonlar, kateşinler, flavanonlar, klorojenik asit, gallik asit, syrinjik asit oluşturmaktadır (Duenas ve diğ., 2008; Veberic ve diğ., 2008). Özellikle mor renkli incir türleri antosiyaninler yönünden oldukça zengindir (Mazza ve Miniati, 1993). Antioksidan özelliğindeki polifenollerin kalp-damar sağlığı ve kanser oluşumu üzerine etkileri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır ve bu konuda incir ile ilgili çalışmalar da yürütülmektedir (Lansky ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2008).

Çizelge 2.1 : Taze ve kuru incirin besin içerikleri (100 g)*.

Bileşen	Taze İncir ¹	Kuru İncir ²	Kuru İncir ³ (Calimyrna)	Kuru İncir ³ (Mission)	Kuru İncir ⁴ (Kaliforniya)
Kalori (kcal)	80	249	253	212	281,9
Protein (g)	1,3	3,30	3,0	2,82	3,14
Karbonhidrat (g)	20,3	63,87	58,20	50,10	66,16
Lif (g)	2,0	9,8	- ⁵	-	12,21
Toplam yağ (g)	0,3	0,93	1,90	0,90	0,52
Doymuş yağ (g)	-	0,144	-	-	0
Kolesterol (mg)	-	0	-	-	0
Kalsiyum (mg)	50,0	162,0	174,0	130,0	133,0
Demir (mg)	0,6	2,03	2,50	2,40	3,07
Magnezyum (mg)	-	68,0	60,0	59,0	-
Fosfor (mg)	22,0	67,0	70,0	57,0	-
Potasyum (mg)	194,0	680,0	682,0	575,0	609,0
Sodyum (mg)	2,0	10,0	10,0	10,0	12,26
Selenyum (mcg)	-	0,6	-	-	-
A Vitamini (IU)	80,0	10,0	-	-	9,76
C Vitamini (mg)	2,00	1,20	3,60	3,60	0,68
B ₁ Vitamini (mg)	0,06	0,085	0,079	0,061	-
B ₂ Vitamini (mg)	0,05	0,082	0,083	0,078	-
Niasin (mg)	0,40	0,619	0,71	0,59	-

*¹: Tous ve Ferguson, 1996; *²: USDA, 2009; *³: Desai ve Kotecha, 1995; *⁴: Janick ve Paull, 2008;

*⁵: Veri mevcut değildir.

2.2 İncir'in Değerlendirilmesi Ve Kuru İncir Üretimi

İncir taze olarak tüketildiği gibi işlenmiş olarak da tüketilmektedir. Buzdolabı koşullarında bile çok kolay bozulabilir olması nedeniyle en yaygın işleme ve saklama şekli kurutmadır (Piga ve diğ., 2004). Özellikle Amerika'da incir ezmesi reçel, şekerleme ve kurabiye yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunu dışında çok sayıda küçük çaplı amaçla da kullanılmaktadır. Örneğin, likör yapımında, tütün aromalandırma işleminde kullanılan şurubun yapımında, meyve ve yaprağından elde edilen fisin enzimi etin olgunlaştırılmasında ve özellikle Hindistan'da meyveler toplandıktan sonra yaprakları hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Hurda, özürlü, işleme artığı incirler ise pekmez ve etil alkol üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır (Desai ve Kotecha, 1995; Günay, 2008).

İncir meyvesinin hasatı incirin tüketim şekline bağlı olarak değişmektedir. Olgun incir meyveleri taze olarak hasat edilip çoğunlukla sofralık az miktarda reçel, marmelat ve derin dondurularak kullanılmaktadır. Taze olarak tüketilecek olgun meyve elle toplanmaktadır ki olgunlaşmanın başlıca belirleyici faktörü renktir. Bu da incirin türüne göre değişmektedir (Flaishman ve diğ., 2008). Kuru incir üretimi ise genellikle ağustos, eylül aylarında tamamen olgunlaşan meyvenin diğer meyvelerden farklı olarak hemen toplanmayıp ağaçta bırakılarak bitki üzerinde kurumaya terk edilmesi ve 5-6 gün içinde kısmen dalında kuruyarak kendiliğinden yere düşen yarı kuru meyvelerin elle toplanarak doğal veya yapay yöntemlerle tamamen kurutulmasıyla gerçekleştirilmektedir (Janick ve Paull, 2008). Kurutmalık olarak değerlendirilecek incir meyvelerinin olgunlaştıktan sonra ağaç üzerinde kurumaya bırakılan halleri buruk incir olarak isimlendirilmektedir (Piga ve diğ., 2004). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) hasat mekanik olarak gerçekleştirilmekte fakat ülkemiz dahil diğer birçok ülkede elle yapılmaktadır. Yere düşen incirler mekanik olarak toplanacak ise bir süre daha düştükleri yerde bırakılarak daha fazla kuruması sağlanarak ardından mekanik olarak toplanmaktadır. Toplanan incirler bütün olarak yerde güneş altında kerevetler üzerinde 3-4 gün süreyle kurumaya bırakılmaktadır (Desai ve Kotecha, 1995). Diğer bir yöntem ise toplanan incirlerin yarım dakika kadar kaynayan tuzlu suya daldırılması ve ardından birkaç saat güneş altında kurutulduktan sonra 8 gün gölgede kurutulması şeklindedir (Flaishman ve diğ., 2008). Kurutma işlemi hava sıcaklığı ve yağmur gibi çevresel faktörlere bağlı olarak 8-10 gün kadar devam etmekte ve işlem sonunda incir meyvesinin ağırlığı

üçte birine düşmektedir. İncirde klasik kurutma dışında son yıllarda kalitenin artırılması amacıyla endüstriyel mekanik kurutucularla kurutma yöntemleri de araştırılmış ve sıcak havayla kurutmanın en uygun yöntem olduğu belirlenmiştir (Piga ve diğ., 2004). Kurutulmuş incirler sandıklar içinde depolanır ve incir işleme tesislerinde eleme, sınıflandırma, yıkama gibi işlemlerden geçirilerek ambalajlanıp piyasaya sunulur. Ayrıca ambalajlanmadan önce incirler, yumuşatılarak istenilen şekli vermek üzere sıcak basınçlı buhar (125-130°C) altında yaklaşık 3 dakika tutulmaktadır. Ülkemizde bu işlem ısıtılmış deniz suyunda yapılmaktadır. Böylece yumuşamış incirler değişik şekiller verilerek ambalajlanmakta ve bu şekilde piyasaya verilmektedir. İncirler çeşitli zararlılardan korunmak amacıyla düzenli aralıklarla fumigasyona tabi tutulmaktadır. Fakat ülkemizde kurutulan incirlere kükürtleme işlemi uygulanmamaktadır. İncirler 0°C, 4°C’de % 50-60 bağıl nemde 1 yıl süre ile depolanabilmektedirler (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Ülkemizde sofralık taze incir üretimi Ege, Akdeniz, Marmara Bölgeleri’nde ve Karadeniz sahillerinde, kurutmalık incirler ise daha çok Ege Bölgesi’nde özellikle Aydın yöresinde yetiştirilmektedir. En önemli iki çeşit yöresel isimleriyle göklop ve sarılop’tur (Tuğ, 2002).

Dünya’da incir üretiminin tamamı Akdeniz ülkelerinde ve Akdeniz iklimine sahip ülkeler tarafından sağlanmakta ve toplam sofralık incir üretimi (*Ficus carica*) 1 milyon tonun üzerinde gerçekleşmektedir. Üretimin yaklaşık % 40’ı kuru incir şeklindedir ve yıllara göre değişmekle beraber bunun % 55’ten fazlası ülkemiz tarafından karşılanmaktadır (Aksoy ve diğ., 2001). Türkiye dünyanın en büyük ve en kaliteli incir üreticisidir. Ülkemizi, Mısır, Yunanistan, İran, Fas, İspanya, ABD, Cezayir ve Suriye takip etmektedir. Türkiye’de son 10 yıldır yıllık üretim 200.000 ile 300.000 ton arasında değişmektedir ve 2008 yılı sonunda incir üretimi 205.067 ton olarak verilmiştir (TUİK, 2010). Çizelge 2.2’de 2005 yılından itibaren Türkiye’de meyve veren incir ağaç sayısı ve incir üretim miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 : Türkiye’de incir üretimi (TUİK, 2010).

Yıllar	Meyve veren ağaç sayısı (Bin)	Üretim miktarı (Ton)
2005	9450	285.000
2006	9958	290.151
2007	9855	210.152
2008	9271	205.067

Ülkemizde kuru incir üretimi özellikle Ege Bölgesi'nde bulunan Büyük ve Küçük Menderes havzalarında yoğunlaşmaktadır. Taze incir çeşitleri ise özellikle Bursa yöresinde yetiştirilmekte olan Bursa siyah incir çeşidi, Antalya'nın Mut ilçesinde yetiştirilmekte olan incir ve sarılop incir çeşitleridir. İncir geleneksel ihraç ürünlerimizden birisidir ve Manisa ve Karadeniz Bölgesi'nin bazı yöreleri de sofralık taze incir üretiminde önem kazanmaya başlamıştır. Kuru incir üretiminde büyük paya sahip diğer ülkeler ise Yunanistan, ABD, İspanya, İtalya ve Portekiz'dir. Ülkemizde hem sofralık hem de kurutmalık incir üretimi yapılmakta ve üretilen incirlerin % 30'u genellikle taze olarak ve iç pazarda, % 70'i ise kuru incir olarak iç ve dış pazarlarda tüketilmektedir (Tuğ, 2002). Yıllar itibariyle dünyada kuru incir üretimi Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3 : Dünyada kuru incir üretimi (Özden, 2008; Anon, 2010a).

Ülkeler	Yıllar (ton)			
	2006	2007	2008	2009*
Türkiye	60.393	43.500	42.500	56.590
İran	43.000	25.000	22.000	23.000
ABD	12.000	13.100	11.000	12.000
Yunanistan	12.000	10.000	8000	9000
İspanya	3500	5000	4500	5000
İtalya	5000	4000	4000	4000
Toplam	135.893	100.600	92.000	109.590

(*) Tahmini değerler

Türkiye incir üretimindeki liderliğinin yanı sıra dünya kuru incir ihracatında da lider konumdadır. Türkiye'de kuru incir kuru meyve ihracatımız içinde miktar olarak kuru üzümünden sonra 2., değer olarak da kuru üzüm ve kuru kayısıdan sonra 3. sırada gelmektedir. Son 10 yıldır yıllık kuru incir ihracatı 42.000 ton ile 69.000 ton arasında değişmektedir. Dünya kuru incir ihracatında lider konumda olan ülkemizde ihracatın yaklaşık % 75'i Avrupa Birliği ülkelere gerçekleştirilmektedir. Dünyada kuru incir ihracatının yıllara ve ülkelere göre dağılımı Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4 : Dünyada kuru incir ihracatı (Anon, 2010b).

Ülkeler	Yıllar					
	2006		2007		2008	
	Ton	USD (1000)	Ton	USD (1000)	Ton	USD (1000)
Türkiye	56.268	125.008	47.590	168.442	42.695	187.202
İran	7776	17.424	-*	-	-	-
İspanya	6134	9442	4765	8461	-	-
A.B.D.	5004	14.442	3047	11.819	3721	15.479
Suriye	4922	3.886	2894	2799	-	-
Hollanda	3788	10.723	2881	14.504	2732	15.081
Çin	1176	1384	226	724	173	799
Yunanistan	3214	8081	1699	6107	1349	6217
Almanya	3233	9569	047	10.061	2031	11.721
Fransa	2217	9462	2107	10.891	1878	11.528
İtalya	1785	4092	1497	4172	2571	7193
Diğerleri	9729	23.350	9650	29.204	9806	37.421
Toplam	105.246	236.863	78.403	267.184	66.957	292.640

*: Veri mevcut değildir

Kuru incir ihracatımızın en fazla olduğu ülkeler Fransa, Almanya, İtalya, İspanya, İsviçre, Hollanda, Rusya ve İsrail'dir. 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait kuru incir ithalatında lider ülkeler ve ithalat miktarları Çizelge 2.5'te görülmektedir.

Çizelge 2.5 : Dünya kuru incir ithalatı (Anon, 2010b).

Ülkeler	Yıllar					
	2006		2007		2008	
	Ton	USD (1000)	Ton	USD (1000)	Ton	USD (1000)
Fransa	15.895	37.247	12.619	48.085	13.694	58.026
Almanya	14.307	37.156	13.316	42.102	10.742	49.758
Hindistan	3706	23.203	4691	31.087	4973	32.950
İtalya	6791	17.082	4054	18.242	3916	21.042
UK	6401	16.636	5486	19.580	4312	18.809
İsviçre	3433	10.602	1459	6695	3097	16.878
Kanada	3652	10.858	3212	11.369	3418	13.346
Belçika	2579	6725	2385	7868	2685	12.766
Hollanda	3693	10.664	2968	12.155	2709	10.481
Avusturya	2751	7227	2530	9154	1960	9897
A.B.D.	6000	10.041	5800	10.672	2367	9357
Diğerleri	36.640	73.378	35.601	91.642	67.729	99.402
Toplam	105.848	260.819	94.123	308.653	121.601	352.712

Çizelge 2.3 ve 2.4’te görüldüğü gibi incir ülkemiz ekonomisi açısından çok değerli bir üründür. İncir ihracatında karşılaşılan en önemli zorlukların başında incirde aflatoksin mevcudiyeti gelmektedir.

2.3 Kuru İncirde Küf Florası

Kuru incir sahip olduğu yüksek şeker içeriği, hasat ve hasat sonrası maruz kaldığı koşullar neticesinde küf bulaşması ve gelişimine uygun bir üründür (Trucksess ve Scott, 2007). Hasattan önce çok sayıda patojen mikroorganizma incir meyvesine saldırıp ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. İncir’in küflerle kontaminasyonu ağaç üzerindeyken başlar. Dişi incir meyvesinin döllemesinde görevli ilek arıcığı bazı hastalık etmenlerinin incire taşınmasında rol oynamaktadır (Kıraç, 2006). İlek arıcığı *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*’in incire taşınmasında rol oynamaktadır (Yorgancı, 2003). Meyveler dölleme sırasında ilek arıları aracılığıyla enfekte olur ve olgunlaştıkça dirençleri düşerek küfler tarafından mikotoksin oluşumu da şekillenir (Tunail, 2000). *Fusarium moniliforme*’nin sebep olduğu incir iç çürüklüğü (endosepsis) hastalığında meyve yumuşayıp renk kaybı meydana gelmektedir. Sürme (puf, siyah küf) hastalığı ise incir meyvesinde hasattan önce meydana gelmekte ve siyah *Aspergilli* türleri ve özellikle *A. niger* küf türleri tarafından incirin iç kısmının siyah renk alması ile sonuçlanmaktadır. Kuru incir üretiminde hasat yere düşen buruk incirlerin toplanması şeklinde olduğundan hasatın her gün düzenli olarak yapılması küf kontaminasyonunun önlenmesi açısından önem taşımaktadır (Öztekin ve diğ., 2006). Ülkemizde yapıldığı gibi güneşte kurutmanın başlıca problemi meyvenin toprakla teması ve uzun süre açık havada kalması nedeniyle böcekler ve patojenler tarafından enfeksiyon riskidir (Flaishman ve diğ., 2008). Kurutmada meyvenin nem içeriğinin doğal veya yapay yöntemlerle % 20-22’ye indirilmesi hedeflenmektedir. Kurutmadaki nem içeriği ile küf konsantrasyonu doğrudan bağlantılıdır (Piga ve diğ., 2004). İncir meyvesi ham haldeyken *A. flavus* enfeksiyonuna dirençliyken olgunlaştıkça yumuşamakta ve direncini kaybetmektedir. Meyvenin herhangi bir hasarı yokken bile *A. flavus* sporları incirin içine penetre olabilmektedir. Bununla beraber penetrasyonda meyvede gözle görülemeyen çok küçük hasarlar yaratabilecek böcekler gibi dış etkenler de söz konusudur (Buchanan ve diğ., 1975).

Kuru incir üretim aşamalarını takiben küf oluşumu ve gelişiminde çok önemli olan depolama aşamasına gelinmektedir. Depolama sürecinde optimum sıcaklık ve bağıl nemin uygulanmaması üründe küf ve maya oluşumu ile sonuçlanabilmektedir (Trucksess ve Scott, 2007).

Kuru incir örneklerinin mikoflorasının morfolojik teknikler kullanılarak belirlenmesine yönelik çalışmalarda hakim flora incirin temin edildiği döneme göre değişebilmekteyken çoğunluğun *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *Fusarium* türlerinden oluştuğu belirlenmiştir (Heperkan, 2006). Pitt ve Hocking (1997)'de kuru incirde *A. flavus* ve *A. niger*'in en yaygın türler olduğunu ve yüksek şeker içeriği nedeniyle kuru kayısı ve üzümünden daha fazla *A. flavus* ve dolayısıyla aflatoksin kontaminasyonuna uygun olduğunu belirtmişlerdir. Heperkan ve Karbancıoğlu-Güler (2009) kuru incir örneklerinin mikoflorası üzerine yaptıkları çalışmada *A. section Flavi* üyesi izolatların % 37,5'unun *A. flavus*, % 3,5'unun ise *A. parasiticus* türleri tarafından oluştuğunu belirlemiştir. Yemen'de 2004 yılında kuru incir dahil olmak üzere kuru meyvelerin mikoflorası üzerine yapılan çalışmada *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* ve *Penicillium chrysogenum* en yaygın bulunan türler olmuştur (Alghalibi ve Shater, 2004). Karapınar ve Gönül (1989) tarafından Ege Bölgesi'nde kurutma aşamasından alınan incir örneklerinde mikoflora belirlenmiştir. Kuru incir örneklerinin florasının dominant olarak *A. niger*'den oluştuğu, daha az olarak da sırasıyla *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria tenuis*, *Penicillium glabrum*'dan oluştuğu ve *A. parasiticus*'a rastlanmadığı belirtilmiştir. 1977 yılında Ege Bölgesi'nde bahçe ve işletmeler ile Tarihî depolarından alınan kuru incir ve ezme örneklerinden toplam 138 küf türü izole edilmiştir. Mikofloranın çoğunluğunun *Aspergillus* ve *Penicillium* cinlerine ait türler tarafından oluşturulduğu olduğu bunların yansısı *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Mucor* ve *Geotrichum* cinslerine ait türlerin de mevcut olduğu belirlenmiştir (Aşkın ve diğ., 1977).

Bir başka çalışmada 40 adet ambalajlı ve ambalajsız incir örneği Adana, Eskişehir, Gaziantep ve Malatya illerinden piyasadan toplamış ve *Mucor*, *Trichoderma* ve *Penicillium* küf türleri izole edilmiştir (Var ve diğ., 2001).

Kurutulmuş incirlerin mikroflorası hammadde olarak kullanılan incir meyvesinin mikroflorası ve uygulanan hasat, kurutma ve depolama yöntemine bağlıdır. Kuru incirin mikroflorasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda hakim floranın *A. niger*,

A. flavus, *A. parasiticus* ve *Fusarium* küflerinden oluştuğu belirlenmiştir (Heperkan, 2006). Iamanaka ve diğ. (2007), Brezilya’da piyasadan temin ettikleri 19 kuru incir örneğinde *A. flavus*, *A. parasiticus* ve aflatoksin varlığını incelemişler, yalnızca 1 adet örnekten *A. flavus* izole etmişler ve bu izolatin aflatoksin B₁ ve B₂ üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir.

İşman tarafından (2004) yapılan çalışmada Aydın, Nazilli ve İncirliova pazarlarından temin edilen 50 adet kuru incir örneğinden izole edilen 127 küf türünün *Aspergillus* (% 58), *Trichoderma* (% 19), *Fusarium* (% 13) ve *Acremonium* (% 10) cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. *Aspergillus* cinsine ait türlerin büyük çoğunluğunu *A. flavus* oluşturmaktayken yalnızca 1 adet *A. parasiticus* mevcudiyetine rastlanmıştır.

Kıraç tarafından (2006) İzmir ve Aydın illerinden TARİŞ tarafından toplanan 13 adet hurda ve 73 adet A ve B kalite kuru incir örneğinin küf florası incelenmiştir. Çalışma sonucunda *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin en yaygın olarak bulunduğu *Aspergillus* türleri içinde *A. niger*’in kuru incir örneklerinde baskın olduğu belirlenmiştir. Kuru incir örneklerinde *A. niger*’in yanısıra *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin de yaygın olduğu belirlenmiştir. İlave olarak *Rhizopus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium* varlığı da cins düzeyinde tanımlanmıştır.

Aydın ilinde kuru incir ihracatı yapan 23 firmadan alınan örneklerde mikofloranın araştırıldığı bir diğer çalışmada *A. niger* kontaminasyonunun % 0-29,9; *A. flavus/A. parasiticus*’un % 0-4,5; *Fusarium* spp.’nin % 0-10; *Penicillium* spp.’nin % 0-12, *Cladosporium*’un % 0-6,1 ve *Alternaria* spp.’nin ise % 0-4 aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Benlioğlu ve diğ., 2008).

2.4 Kuru İncirde Mikotoksin Varlığı

Kuru incirde yapılan mikroflore çalışmaları neticesinde mikotoksin oluşturma özelliğine sahip küflerin bulunduğu saptanmıştır. Kuru incir, yüksek karbonhidrat içeriği nedeniyle küf gelişimi ve toksin üretimi için elverişli bir substrattır. Bazı kurutulmuş incirler duysal olarak tüketilebilir olma özelliklerini korumalarına karşın küfler tarafından üretilen aflatoksin, okratoksin, patulin, sitrinin gibi çeşitli mikotoksinleri içerebilirler (Trucksess ve Scott, 2007; Murphy ve diğ., 2006). Mikotoksinler küfler tarafından oluşturulan ikincil metabolitlere verilen genel isimdir. Bu maddelerin insan ve hayvanlarda vücuda alındığında mikotoksinin tipine

bağlı olmakla beraber karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkileri ortaya çıkmaktadır (Gümüş ve Yılmaz, 2006).

Kuru incir ihracatında ilk sırada yer alan ülkemiz aflatoksin varlığı nedeniyle ekonomik kayıplara uğramaktadır. Kuru incir mikroflorasını oluşturan küflerden özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* en toksijenik metabolit olma özelliğine sahip aflatoksineri oluşturdıklarından önem taşımaktadır. *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un genellikle hasat öncesinde bulaştığı ve depolanan ürünlerde toksin oluşturdıkları belirtilmektedir. Aflatoksin oluşumu küfün ürüne tarlada bulaşması ve kolonizasyonu ile başlamakta ve hasat, kurutma, depolama ve işleme süresince devam etmektedir (Manonmani ve diğ., 2005). Ülkemizde kuru incirde aflatoksin varlığına ait sorun ilk olarak 1972 yılında Danimarka'ya ihraç edilen ürünümüzde 938 ppb gibi yüksek miktarlarda aflatoksin belirlenmesiyle ortaya çıkmıştır. 1973-74 yıllarında ABD'ne ihraç edilen 38 partiden üçünde aflatoksin tespit edilmiş ve bu ürünler Türkiye'ye geri gönderilmiştir (Çamlıbel, 1995). Bundan sonra kuru incirlerimizde aflatoksin mevcudiyeti üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Fas'ta 2006 yılında yapılan bir tarama çalışmasında farklı kuru meyvelerin (ceviz, kuru üzüm, yer fıstığı ve Antep fıstığı) yanısıra 20 adet kuru incir örneğinde aflatoksin düzeyleri araştırılmıştır. Örneklerin % 20'sinde hem total aflatoksin hem de aflatoksin B₁'e rastlanmış ve örneklerin % 15'inde toplam aflatoksin seviyesi Avrupa Birliği tarafından izin verilen maksimum limit olan 4 µg/kg'ın üzerinde bulunmuştur (Juan ve diğ., 2007). Erdoğan ve diğ. (2003), 17 kuru incir örneğinin 5 adedinin 4,1-33,9 ppb aralığında aflatoksinle kontamine olduğunu belirlemiştir.

Kuru incirde aflatoksinli ürünlerin tespiti için 1987 yılından itibaren işletmelerde UV lambalı kabinler kullanılmaktadır. 365 nm UV ışığı altında parlak yeşilimsi sarı floresans (BGYF) veren incirler ayrılmaktadır (Çamlıbel, 1995). Çizelge 2.6'da son üç yılda incir üretim işletmelerinde imha edilen incir miktarları görülmektedir. Uzun dalga boylu UV ışığı altında floresans verme özelliği aflatoksin üreticisi olan *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından üretilen kojik asitten kaynaklanmaktadır. BGYF pozitif olan incirlerde kojik asit ile birlikte aflatoksin oluşma riski yüksek olarak bulunmuştur (Aksoy, 2001). Türk kuru incirleri ile yapılan çalışmalar UV ışığı altında belirlenen floresans ile üründe aflatoksin kontaminasyonu arasında sıkı bir bağlantı olduğunu ve bu yöntemin % 90 düzeyinde etkin olduğunu göstermektedir (Steiner ve diğ., 1988). Kaliforniya incirleri ile yapılan çalışmada ise bu yöntemin

etkin olmadığı belirlenmiştir. Bunun başlıca sebepleri aflatoksin kontaminasyonunun Türk kuru incirlerinin aksine meyvenin içinde olması ve mikoflorasının *A. flavus*'dan ziyade *A. tamarii* ağırlıklı olmasına dayandırılmaktadır (Doster ve Michailides, 1998).

Çizelge 2.6 : BGYF veren (%) ve imha edilen ortalama kuru incir miktarları (Anon, 2010b).

Yıllar	BGYF veren incir oranı (%)	İmha edilen incir miktarı (ton)
2006	1,2	730.000
2007	1,25	494.000
2008	1	418.000
2009	0,8	280.000

Kuru incirde aflatoksinin yanı sıra okratoksin A (Şanlı ve diğ., 1990; Özay ve Alperden, 1991; Aksoy ve diğ., 2003; Iamanaka ve diğ., 2005; Şenyuva ve diğ., 2005; Zinedine ve diğ., 2007; Güler ve Heperkan, 2008; Bircan, 2009), patulin, ergosterol (Karaca ve Nas, 2006), fumonisin (Karbancıoğlu-Güler ve Heperkan, 2009) ve siklopiazonik asit (Somuncuoğlu, 2007) mikotoksinlerinin de doğal olarak bulunduğu belirlenmiştir.

Özay ve Alperden (1991), 1988 yılı incir hasadında Aydın ve İzmir'de bulunan bahçe ve işletmelerden alınan 103 örnekte aflatoksin ve okratoksin A taraması gerçekleştirmiştir. Örneklerin % 29'u en yüksek 63 ppb düzeyinde aflatoksinlerle, % 3'ü ise en yüksek 8,3 ppb düzeyinde OTA kontaminasyonu belirlenmiştir. Ankara piyasası ve Aydın yöresinden alınan 54 adet kuru incir örneğinde aflatoksin ve OTA varlığının birlikte incelendiği bir başka çalışmada örneklerin % 11,1'i AFB₁ ve % 20,3'ü OTA ile sırasıyla 53-300 ppb ve 19-390 ppb aralığında kontaminasyon tespit edilmiştir (Şanlı ve diğ., 1990). Aksoy ve diğ. (2003), toplam 238 kuru incir örneğinin 69'unda farklı düzeylerde okratoksin A (OTA) tespit etmişlerdir. OTA ile bulaşık 6 örnekte miktar 50 ppb'nin üzerinde, 3 örnekte 1000 ppb'nin üzerinde geri kalanlarda ise 2-50 ppb arasında bulunmuştur. Iamanaka ve diğ. (2005), 19 adet incir örneğinde yaptıkları tarama çalışmasında 13 örnekte 0,13-5 ppb; 4 örnekte 5,1-20 ppb ve 1 örnekte de 20-30 ppb aralığında OTA tespit etmişlerdir. Güler ve Heperkan tarafından 2003-2004 yıllarında Ege Bölgesi'nden kurutma aşamasında toplanan 115 kuru incir örneğinin 55'inde (% 47,2) 0,12–15,31 ppb aralığında OTA kontaminasyonu (Güler ve Heperkan, 2008) 86'sında (% 74,8) ise 0,046–3,649 ppb aralığında Fumonisin B₁ kontaminasyonu (Karbancıoğlu-Güler ve Heperkan, 2009)

bildirilmiştir. Somuncuoğlu tarafından 2007 yılında yapılan çalışmada ise Ege Bölgesi'nde kurutma aşamasında toplanan 48 kuru incir örneğinin % 58'i 23,38–187 ppb aralığında CPA varlığı belirlenmiştir.

Kuru incirlerde aflatoksin ve okratoksin A'nın beraber oluşumu üzerine yapılan bir başka çalışmada Avrupa Birliği ülkelerine ihraç edilen 2003 ve 2004 üretimi kuru incirler incelenmiştir. 2003 yılına ait 58 örnekten 7'si AFB₁, 2'si OTA ve 2'si de her iki toksini birlikte içermektedir. En yüksek aflatoksin konsantrasyonu 35,1 ng/g, OTA konsantrasyonu ise 13 ng/g şeklindedir. 2004 yılına ait 41 örneğin 16'sında AFB₁, 4'ünde OTA ve 2'sinde de her iki toksinin birlikte bulunduğu belirlenmiştir. Bu yıla ait en yüksek aflatoksin konsantrasyonu 20,6 ng/g, OTA konsantrasyonu ise 26,3 ng/g olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada piyasadan alınan 20 örnekten birinde OTA (2 ng/g) belirlenirken aflatoksine rastlanmamıştır (Şenyuva ve diğ., 2005). Türkiye'den Avrupa Birliği ülkelerine ihraç edilen 98 incir örneğinde aflatoksin ve OTA'nın birlikte bulunuşu üzerine yapılan bir başka çalışmada yalnızca 2 örnekte en yüksek 24,37 ppb OTA ve 1,02 ppb AFB₁ tespit edilmiştir (Bircan, 2009).

Karaca ve Nas (2006) tarafından yapılan çalışmada 3 farklı kategorideki kuru incir örnekleri aflatoksin, patulin ve ergosterol kontaminasyonları açısından incelenmiştir. Birinci kategoride yer alan yüksek kalitedeki incir örneklerinin az sayıda ve iz miktarda toksinlerle bulaşık olduğu belirlenmiştir. UV lambası altında floresans veren incir örneklerinin yüksek aflatoksin kontaminasyonu (117,9–471,9 ppb) içerdikleri fakat patulin kontaminasyonlarının 50 ppb'nin altında olduğu, üçüncü kategorideki fiziksel zarara uğramış, işlenmek üzere ayrılan incirlerin aflatoksin kontaminasyonu 8,3 ppb düzeyinde iken patulin (39,3–151,6 ppb) ve ergosterol (4,5–18 ppm) ile yüksek seviyede kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Mikoflora ve mikotoksin varlığına yönelik incirde yapılan çalışmalar, incirin *A. flavus* enfeksiyonu ve mikotoksin oluşumu için oldukça hassas ve iyi bir substrat olduğunu göstermektedir. Normalde bu küf türü meyvenin yüzeyinde bulunmaktadır. Meyve olgunlaştıkça yumuşamakta ve incirin *A. flavus* enfeksiyonuna olan dayanıklılığı azalmaktadır (Barkai-Golan, 2008). Bourda ve diğ. (1994), yaptıkları çalışma ile *A. flavus*'un incirde en iyi gelişmeyi olgunlaştıktan sonra fakat tamamen kurumadan gösterdiğini belirlemişlerdir.

Kuru incirin ülkemiz açısından öneminden ve mikotoksin varlığından bahsederken Avrupa Birliği hızlı alarm (Rapid alert system for food and feed-RASFF) sayılarından bahsetmek, sorunu daha net gözler önüne sermektedir. Çizelge 2.7’de son üç sezona bakıldığında Avrupa Birliği’ne ihraç ettiğimiz kuru incirlerimizde aflatoksin kontaminasyonuna ait toplam 216 alarm bildirimi aldığımız görülmektedir.

Çizelge 2.7 : Türkiye’den ihraç edilen kuru incirlerde aflatoksin kontaminasyonu için toplam ve AB limitleri üzerindeki hızlı alarm bildirim sayısı (Anon; 2010c).

Yıl	Toplam hızlı alarm sayısı	Hızlı alarm sayısı (>4-10 µg/kg)
2007	57	24
2008	96	55
2009	63	34

Çizelge 2.7’den görüldüğü gibi 2008 yılında Türkiye orijinli kuru incirlerde aflatoksin nedeniyle AB ülkelerinden alınan hızlı alarm sayısında ciddi artış şekillenmiştir. Bunun sebebinin 2007 yılında yaşanan kuraklık ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Bircan ve diğ., 2008). Yıllara göre tablo incelendiğinde alarm sayılarının yaklaşık % 50’si AB limitlerinin üzerinde olan kuru incirlere işaret etmektedir. Bu kuru incirler ya ülkemize geri gönderilmekte ya da imha edilmektedir. Her iki halde de ülkemizin uğradığı ekonomik kayıplar yüksek olmaktadır.

3. AFLATOKSİNLER VE ÖZELLİKLERİ

3.1 Aflatoksin Üreticisi Küfler Ve Aflatoksin Biyosentezi

Aflatoksinler dünyada ilk olarak 1960 yılında İngiltere’de 100.000’den fazla hindi ve ördek yavrusunun ölümü ile ortaya çıkmıştır. ‘Turkey X Disease’ olarak adlandırılan bu salgının kaynağının, Güney Amerika ve Afrika’dan ithal edilerek rasyon hazırlamada kullanılan aflatoksinle kontamine yerfıstığı küspesi olduğu tespit edilmiştir (Richard, 2008). Yaklaşık 50 yıldır söz konusu toksinin üretimini etkileyen faktörler, biyosentezi ve biyolojik etkisi üzerine çok yoğun çalışmalar yürütülmüş ve yürütülmeye devam etmektedir.

Aflatoksinler gıdalarda doğal olarak bulunan *Aspergillus* section *Flavi* üyesi küf türlerinden özellikle *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve nadiren *Aspergillus nomius* türlerine ait suşlar tarafından üretilmektedir (Turner ve diğ., 2009). Aflatoksin adı başlıca üreticisi olan ‘*Aspergillus flavus* **toksin**’inden gelmektedir (Samson ve diğ., 2002). *A. flavus* yalnızca B grubu aflatoksinleri üretirken morfolojik olarak çok benzer olan *A. parasiticus* ve *A. nomius* B ve G grubu aflatoksinleri birlikte üretmektedir. *A. flavus* ve *A. parasiticus*’un aksine *A. nomius*’un doğada yaygın olarak bulunmaması nedeniyle, bu küf üzerine az sayıda çalışma yapılmış ve izolatlarının toksijenitesi tam olarak belirlenememiştir (Doyle ve diğ., 1997). Henüz gıdalarda varlığı tespit edilmemiş fakat deneysel çalışmalarla aflatoksin üreticisi olduğu belirlenen türler de mevcuttur. B grubu aflatoksinlerin çok iyi üreticisi olan *A. ochraceoroseus*’un (Klich ve diğ., 2000; Frisvad ve diğ., 2005) yanı sıra *A. rambellii* (Frisvad ve diğ., 2005); *A. bombycis* (Turner ve diğ., 2009); *A. toxicarius* (Frisvad ve diğ., 2005); *Emerciella astellata* (Frisvad ve diğ., 2004) ve *E. venezuellensis* (Frisvad ve Samson, 2004) bu türlerin başlıcalarıdır. Bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri (Tarin ve diğ., 2004) ve *A. pseudotamarii* (Ito ve diğ., 2001) ile buna çok yakın bir tür olan *A. tamarii*’nin de aflatoksin üreticisi olduğu bazı çalışmalarla ortaya konmuştur (Goto ve diğ., 1996; Klich ve diğ., 2000). Arjantin’de 2008 yılında yapılan bir çalışmada yer fıstığından izole edilen iki yeni *A. section Flavi* üyesi *A. arachidicola* ve *A. minisclerotigenes*’in de aflatoksin üreticisi olduğu

belirlenmiştir (Pildain ve diğ., 2008). Çizelge 3.1’de bazı *Aspergillus* türleri ve ürettikleri ikincil metabolitler gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 : Bazı *Aspergillus* türleri ve ürettikleri mikotoksinler.

<i>Aspergillus</i> Türü	Mikotoksinler	Kaynaklar
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksinler (B ₁ , B ₂)	Hesseltine ve diğ., 1966; Buchanan ve diğ., 1975; Doster ve diğ., 1996; Klich, 2002; Samson ve diğ., 2002; Frisvad ve diğ., 2006; Hedayati ve diğ., 2007
	Aflatrem	Giridhar ve Reddy, 2001; Roussos ve diğ., 2006; Hedayati ve diğ., 2007
	Aspergillik asit	Wilson, 1966; Hedayati ve diğ., 2007
	Sterigmatisisin	Moss, 1977; Wicklow ve Cole, 1982; Samson ve diğ., 2002; Hedayati ve diğ., 2007
	Siklopiazonik asit	Cole ve Cox, 1981; Klich, 2002; Samson ve diğ., 2002; Frisvad ve diğ., 2006; Hedayati ve diğ., 2007
	Versikolorinler	Davis, 1981; Hedayati ve diğ., 2007
	Kojik asit	Wilson, 1966; Gallagher ve diğ., 1978; Doster ve diğ., 1996; Betina, 1989; Moss, 1977; Samson ve diğ., 2002; Hedayati ve diğ., 2007
	β-Nitropropionik asit	Wilson, 1966; Klich, 2002; Samson ve diğ., 2002; Hedayati ve diğ., 2007
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoksinler (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	Doster ve diğ., 1996; Pitt ve Hocking, 1997; Klich, 2002; Samson ve diğ., 2002; Frisvad ve diğ., 2006
	Versikolorinler	Lee ve diğ., 1975
	Aspergillik asit	Samson ve diğ., 2002
	Kojik asit	Samson ve diğ., 2002
<i>Aspergillus tamarii</i>	Siklopiazonik asit	Dorner ve diğ., 1984; Doster ve diğ., 1996; Goto ve diğ., 1997; Klich, 2002; Samson ve diğ., 2002
	Aflatoksin (B ₁ , B ₂)	Goto ve diğ., 1997
	Kojik asit	Pitt ve Hocking, 1997

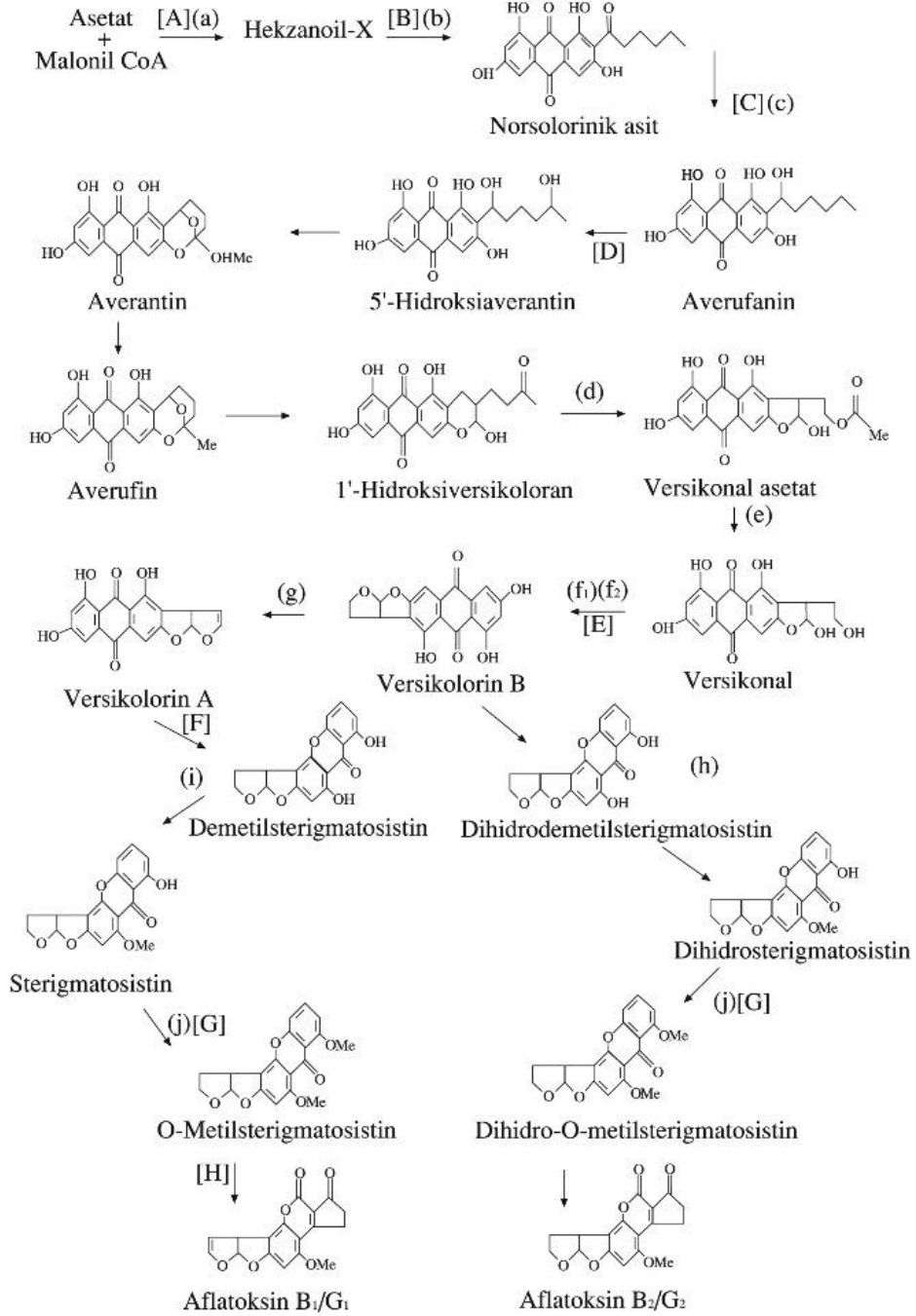
A. flavus dünyada tropik ve sıcak iklim kuşağında bulunan ülkelerde gıda ürünlerinde çok yaygın olarak bulunmakta, *A. parasiticus* ise daha sınırlı bir dağılım göstermektedir (Pitt, 2004). Başlıca aflatoksin üreticisi küf türlerinden *A. flavus* ve *A. parasiticus* benzer gelişme özelliklerine sahiptir. Her ikisi de 10-12°C ile 42-43°C sıcaklık aralığında ve optimum 32-33°C sıcaklıkta gelişebilmektedir. Aflatoksin üretimi ise 12-40°C aralığında gerçekleşebilmektedir. *A. flavus* gelişimi için minimum su aktivitesi (aw) 0,80 iken toksin üretimi için 0,82, *A. parasiticus* gelişimi için ise minimum 0,84 ve toksin üretimi için ise 0,87 şeklindedir. Her iki küf türü

içinde aflatoksin üretiminde optimal sıcaklık ve aw değerleri sırasıyla 33°C ve 0,99 şeklindedir. (Sweeney ve Dobson, 1998; Murphy ve diğ., 2006). *A. flavus* aflatoksinleri 0,82 aw'nin üzerinde 13-37°C aralığında üretebilmektedir. Optimum ise 16-31°C ve 0,95-0,99 aw şeklindedir. *A. parasiticus* ise 12-42°C aralığında optimum 32°C'de gelişebilmektedir. *A. tamarii* de *A. flavus*'a benzer şekilde en düşük 0,78 su aktivite değerinde ve optimum 33°C'de gelişme göstermektedir (Pitt ve Hocking, 1997). *A. flavus* ve *A. parasiticus* optimum 3,5-8 olmak üzere 2,1-11,2 pH aralığında gelişebilme özelliğine sahiptir. Aflatoksin üretimi ise 3,5-8 pH aralığında optimum 6'da şekillenmektedir. *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarımsal ürünlerin özellikle hasat öncesi ve depoda aflatoksinlerle kontaminasyonundan sorumludur (Murphy ve diğ., 2006).

Doğal olarak bulunan *A. flavus* suşlarının yaklaşık % 50'si aflatoksijenik özellikteyken neredeyse bilinen tüm *A. parasiticus* suşları aflatoksijenik özelliktedir (Pitt, 2004). Bugüne kadar yapılan birçok çalışma ile aflatoksijenik *A. flavus* suşları fıstık (Vaamonde ve diğ., 2003; Mphande ve diğ., 2004; Pildain ve diğ., 2004; Gonçalez ve diğ., 2008), mısır (Lee ve Hagler, 1991; Giorni ve diğ., 2007; Atehnkeng ve diğ., 2008), kuru incir ve kuru üzüm (Iamanaka ve diğ., 2006), kahve çekirdeği (Sanchez-Hervas, 2008), misket limonu (Bamba ve Sumbali, 2005), hayvan yemi (Martins ve Martins, 1999), silaj (El-Shanawany ve diğ., 2005), brezilya fıındığı (Arrus ve diğ., 2005), buğday, soya fasulyesi (Vaamonde ve diğ., 2003), badem (Rodrigues ve diğ., 2009), un, irmik, kepek (Riba ve diğ., 2010) ve pamuk (Cotty, 1997) gibi farklı gıda maddeleri ve tarımsal ürünlerden izole edilmiştir. Daha sınırlı dağılıma sahip aflatoksijenik *A. parasiticus* suşlarına ise özellikle yer fıstığı (Vaamonde ve diğ., 2003) ve yer fıstığı yetiştirilen bölgeler ile şeker kamışı (Kumeda ve diğ., 2003) üretilen bölgelerde yaygın bir şekilde rastlanmaktadır. Dünyadaki başlıca fıstık yetiştirilen bölgelerden biri olan Güneydoğu Asya ülkelerinde *A. parasiticus* varlığına rastlanmaması ise ilginç bir bulgu olarak nitelendirilmektedir (Pitt, 2004).

Aflatoksinler diğer birçok toksik ikincil metabolit gibi Şekil 3.1'de gösterilen poliketit yolu ile sentezlenmektedirler. Biyosentez, bir asetil ünitesi (AsetilCoA) ve karbon kaynağı olarak görev yapan bir malonil (Malonil CoA) ünitesi tarafından başlatılmaktadır. Malonil CoA karbondioksit kaybederek yağ asidi sentezi yolu ile hekzonat'a dönüşmektedir. Hekzonatın birbirini izleyen 7 malonat ünitesi ile

tepkimeye girmesi ile poliketit sentezi sonucu norsolorinik asit oluşmaktadır (Maggon ve diğ., 1977; Pitt and Hocking, 1997; Sweeney ve Dobson, 1998; Cary ve diğ., 2000; Deshpande, 2002). Norsolorinik asit yaklaşık 12-17 kadar enzimatik değişimden geçerek versikolorin B oluşmaktadır. Bu enzimatik değişimler sırasıyla norsolorinik asitin, averantin üzerinden averufin ara ürününe dönüşmesi, sonraki basamakta averufinin halka yapısının açılmasıyla dehidrasyon, epoksidasyona uğraması ve versikonal hemiasetal asetat üzerinden epoksidlerin yeniden düzenlenmesi ile versikolorin B oluşumu şeklindedir. Versikolorin B oluşumunu takiben biyosentez ikiye ayrılmaktadır. Birinci yolda versikolorin B'den versikolorin A oluşumunu takiben dimetil sterigmatosistinden AFB₁ ve AFG₁ sentezlenmektedir. Diğer yolda ise versikolorin B'den dihidrodimetil sterigmatosistin ve sonuçta AFB₂ ve AFG₂ sentezlenmektedir (Maggon ve diğ., 1977; Minto ve Townsend, 1997; Sweeney ve Dobson, 1998; Cary ve diğ., 2000; Brase ve diğ., 2009). Birbiri ardına sıralanmış olan AflR ve AflS genleri aflatoksin biyosentezinde düzenleyici genlerdir. Bu genler aflatoksin biyosentezini başlatmakta ve aflatoksin üretimini arttırmaktadır (Georgianna ve Payne, 2009).



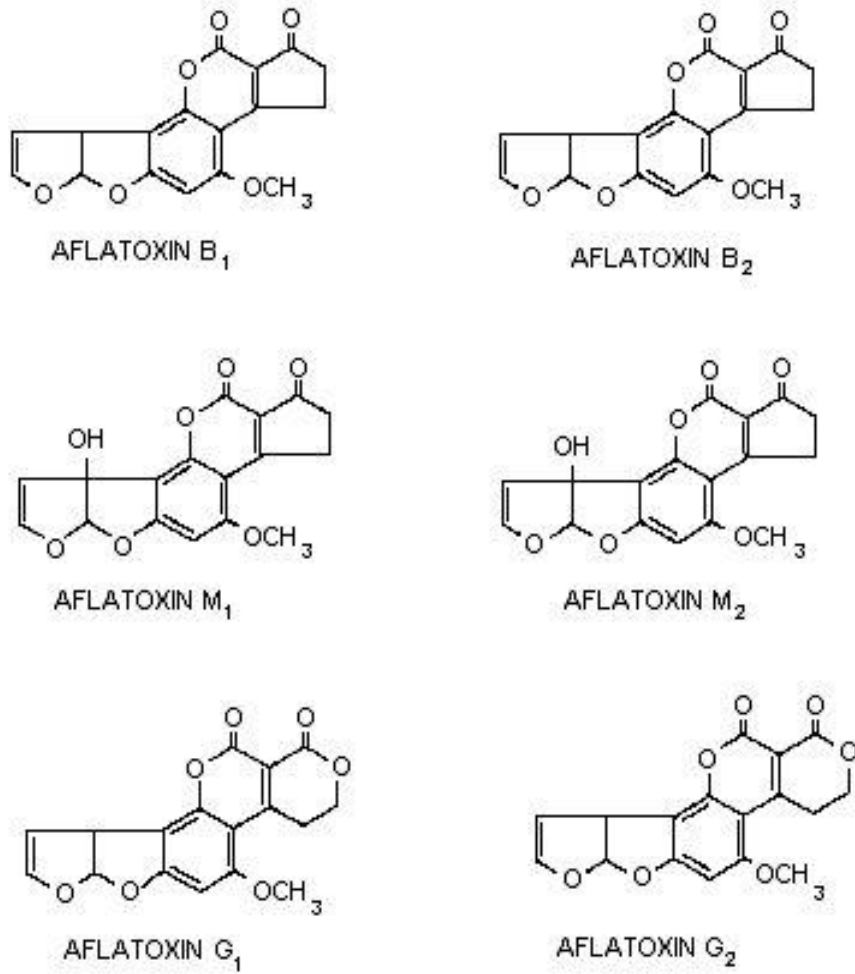
Şekil 3.1 : Aflatoksin biyosentez şeması (Sweeney ve Dobson, 1998).

Görev alan enzimler : (a) yağ asiti sentetaz, (b) poliketid sentetaz, (c) norsolorinik asit redüktaz, (d) versikonal hemiasetal asetat redüktaz, (e) esteraz, (f₁) versikolorin B sentetaz, (f₂) versikonil siklaz, (g) desatüraz, (h) O-metiltransferaz (MT-II), (i) O-metiltransferaz, (j) O-metiltransferaz (MT-I). Görevli genler : [A] *fas-1A* ve *fas-2A*, [B] *pksA*, [C] *nor-1*, *norA*, [D] *avnA*, [E] *vbs*, [F] *ver-1*, [G] *omtA* ve [H] *ord-1*.

3.2 Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Aflatoksinler kimyasal yapıları birbirine benzeyen heterosiklik bileşikler olup, difuranokumarin türevleridir. Bugüne kadar tanımlanmış birbiriyle kimyasal olarak yakın ilişkili 20 kadar aflatoksin türevi olmasına rağmen yalnızca B₁, B₂, G₁, G₂ ve M₁ gıdalarda ve yemlerde doğal olarak bulunmalarıyla önem taşımaktadır (Deshpande, 2002; Hedayati ve diğ., 2007; Richard 2007). Aflatoksinin ana yapısı yoğunlaştırılmış bifuran/kumarin halka'dan oluşmaktadır. Kimyasal yapılarına göre dihidrofuran (B₁ ve G₁) ya da tetrahidrofuran (B₂ ve G₂) ve merkezi bir lakton (G₁ ve G₂) ya da siklopententanon (B₁ve B₂) bağı içermektedir (Sweeney ve Dobson, 1998; Brase ve diğ., 2009). Aflatoksin B₂ ve G₂, B₁ ve G₁'in dehidro türevleridir. Uzun dalga boylu ultraviyole ışık (360 nm) altında B₁ ve B₂ mavi (Blue) floresans verirken G₁ ve G₂ yeşil (Green) floresans vermekte ve bu özelliklerine göre adlandırılmaktadırlar (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Frisvad ve diğ., 2006). Memelilerde yemlerle alınan aflatoksin B₁ ve B₂ vücutta metabolize olarak M₁ ve M₂ (milk toxins)'ye dönüşmekte ve süt ile atılmaktadır. Hidroksil grubu içeren AFM₁ ve AFM₂, B₁ ve B₂'nin hidroksil formlarıdır (Tunail, 2000). Şekil 3.2'de aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂'nin kimyasal yapıları görülmektedir.

Aflatoksinler kristal yapıda, kloroform ve metanol gibi polar çözücülerde kolaylıkla çözünebilen bileşiklerdir. Saf halde UV radyasyon altında parçalanmakta, <3 ve >10 pH'da ve oksitleyici maddelerin varlığında stabil değildirler (Miraglia ve diğ., 2004). Kristal halde iken ışık ve UV radyasyon yokluğunda 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile oldukça dayanıklıdır. Bu nedenle pastörizasyon gibi ısıl işlemlerden ciddi zarar görmezler (Park, 2002). Yapılarında bulunan lakton halkası aflatoksinlerin amonyak, hipoklorit gibi alkalilere karşı hassas olmasını sağlamaktadır. Bu tip alkalilerin kullanımıyla aflatoksinleri gıdalardan uzaklaştırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Fakat aflatoksinlerin parçalanma ürünlerinin insan ve hayvanlar üzerindeki etkileri soru işareti olarak kalmaya devam etmektedir (Deshpande, 2002).



Şekil 3.2 : Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Desphande ve diğ., 2002).

3.3 Gıdalarda Aflatoksin Varlığı

Başlıca aflatoksin üreticisi olan *A. flavus* ve *A. parasiticus* küf türleri dünyada özellikle sıcak olan tropik ve yarı tropik bölgelerde toprakta ve havada yaygın bir şekilde bulunarak hem tarla hem de depo küfü özelliği göstermektedir. Bu küf türleri toprakta, depolanmış üründe saprofit olarak veya gıda maddelerinde bozulma etkeni olarak bulunabilmektedir (Hedayati ve diğ., 2007). *A. flavus* yaşam döngüsünün çoğunu toprakta saprofit olarak geçirmek suretiyle bitkilere ve hayvanlara geçmekte, böylece gıda döngüsüne karışmaları çok kolay olmaktadır (Horn, 2007). Özellikle Arjantin, Türkiye, Avustralya, Mısır, İran gibi sıcak iklime sahip coğrafik bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Riba ve diğ., 2010). Bazı suşları bitki patojeni özelliğinde olduğundan bitkileri tarlada enfekte ederek hasatta veya depoda üründe

kolonize olarak toksin oluşturabilmektedir. Bu nedenle de aflatoksinlerin hem gıdalarda bulunuşu hem de bulunduğu gıda çeşitleri çok yaygın ve çeşitli olmaktadır.

Aflatoksinlerin muhtemel karsinojen olduğunun belirlenmesini takiben gıdalarda doğal olarak mevcudiyetine yönelik tarama çalışmaları yapılmış, hayvansal ve bitkisel kaynaklı çok sayıda gıdada varlığı belirlenmiştir. Mısır, yer fıstığı, pamuk tohumu, arpa, buğday, un, ırmik, kepek, baharatlar, antep fıstığı, fındık, kuru incir, kasava, pirinç, kakao, ekmek, makarna, yağlı tohumlar, kepek, kahve çekirdeği, bezelye, soya, susam, süt, peynir, sosis ve pişmiş et bunlardan bazılarıdır. Bu ürünlerin içinde hasat öncesi sıklıkla kontaminasyon varlığı belirlenen mısır, pamuk, yer fıstığı ve fındık yüksek düzeyde kontaminasyon ile önem arz etmektedir (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Park ve diğ., 2001; Deshpande, 2002; Riba ve diğ., 2010). Çiftlik hayvanları aflatoksin içeren yemlerle beslenirse et ve et ürünleri de kontamine olabilmektedir (Deshpande, 2002). Bir çalışmada 100, 200 ve 400 ppb düzeylerinde aflatoksinle kontamine yemle beslenen tavukların yumurtalarına sırasıyla 0,23, 0,78 ve 1,40 ppb aflatoksin geçtiği tespit edilmiştir (Devegowda ve Murthy, 2005).

Aspergillus cinsi küf türleri bu gıda gruplarını tarlada veya depoda enfekte etmektedirler. Bu küf türlerinin gelişmesini arttıran faktörlerin başında tarlada yüksek su aktivitesi, yüksek sıcaklık, kuraklık, hasat esansında mekanik hasarlar, böcek enfeksiyonları, hasat sırasında yağmur, depoda nem birikimi gelmektedir. Aflatoksinlerin gıdalarda şekillenmesi ve kontaminasyon düzeyleri de küflerin gelişimi gibi ürünün tarlada ve depolanma sırasındaki sıcaklık ve nemi ile çok yakından ilişkilidir (Deshpande, 2002; Murphy ve diğ., 2007).

Aflatoksinler kontamine yemle beslenen hayvanlarda yemle alınan aflatoksin B₁'in % 0,3-6'sı M₁'e dönüşerek sütle atılmaktadır. AFM₁ çiğ süt ve süt ürünlerinde pastörizasyon ile peynir, krema, tereyağına işleme aşamalarında etkilenmeyerek oldukça stabil bir yapı göstermektedir ve AFM₁ ile kontamine süttten üretilen süt ürünleri de toksini içermektedir. AFM₁ kazeine bağlanma özelliği nedeni ile peynirde peyniraltı suyundan daha fazla bulunmaktadır. Bebek mamaları AFM₁'in vücuda alımının bir diğer yoludur. Bebek mamaları üzerine yapılan tarama çalışmalarında AFM₁ varlığı tespit edilmiş olmasına rağmen toksin miktarı genellikle limitler içindedir. Bu durum bebek mamaları ile ilgili yasal düzenleme ve kontrollerin sıklığı ile ilişkilendirilmektedir (Galvano ve diğ., 2005).

Mısır'da yapılan bir çalışmada 2004-2005 yıllarında toplanan mısır örneklerinde aflatoksin ve siklopiazonik asit varlığı incelenmiştir. Aflatoksin ve siklopiazonik asit için ortalama kontaminasyon oranları % 33 ve % 25 olarak tespit edilmiştir. Örneklerin içerdiği toksin miktarları ise AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve CPA için sırasıyla 0,93–45,5, 0,10–19,0, 0,20–23,0, 0,22–18,0 ve 1,2–56,0 µg/kg olarak belirlenmiştir (Amra, 2009). Iamanaka ve diğ. (2007), Brezilya'da 2002-2003 yıllarında marketlerden topladıkları 24 siyah sultani, 19 beyaz sultani ve 19 kuru incir örneğinde aflatoksin analizleri gerçekleştirmişlerdir. Beyaz sultanilerin 3'ü 2 ppb'nin altında olmak üzere ve kuru incirlerin 11'i yalnızca bir tanesinin 1500 ppb gibi çok yüksek düzeyde fakat diğerleri 2 ppb'nin altında olarak aflatoksin B₁ ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Aflatoksinlerin detoksifikasyonu ve üründen uzaklaştırılması amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Aflatoksin açısından çok riskli bir ürün olan mısırdaki ıslak öğütme sırasında aflatoksinin % 39-42'si ıslatma suyuna geçmekte ve % 30-38'i de lifte kalmaktadır. Mısırın kuru öğütülmesi sırasında ise en yüksek miktarda toksin germ ve dış kabukta kalmaktadır. Pirinç ve buğday ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır (Scudamore, 2004). Yer fıstığı küspesine uygulanan gama radyasyon (2,5 Mrad) uygulamasının önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Yer fıstıklarında kavurma işleminin aflatoksin üzerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada % 40-50 oranında azalma gözlenmiştir (Park, 2002). Yağlı tohumlardan yağ eldesi sırasında aflatoksin B₁ yağa geçebilmektedir. Yağda rafinasyon işlemi yoksa toksin içermesi bakımından risk arz etmektedir. Aflatoksin içeren makarnanın 10 dakika kaynatma sonrası % 29'unun kaynatma suyuna geçtiği belirlenmiştir (Scudamore, 2004). Kimyasal inaktivasyon amacıyla aflatoksinle kontamine olan ürünlerin toksin konsantrasyonu % 99 oranında amonyak uygulaması ile azaltılmıştır (Park, 2002).

3.4 Aflatoksinin Sağlık Üzerine Etkileri Ve Metabolizması

Aflatoksinler mikotoksinler içerisinde en toksik bileşiklerdir. İnsan dahil olmak üzere tüm omurgalı canlılar üzerinde karsinojen, mutajen, teratojen, hepatotoksik ve immun sistemi baskılayıcı etkiye sahip aflatoksinler içerisinde ise toksisite sıralaması AFB₁>AFG₁>AFB₂>AFG₂ şeklindedir (Deshpande, 2002; Brase ve diğ., 2009). Aflatoksin B₁ uluslararası kanser araştırma ajansı (International Agency of Research

on Cancer-IARC) tarafından karsinojen madde (grup 1) (IARC, 1993), aflatoksin B₂ ve M₁ ise muhtemel karsinojen madde (grup 2B) olarak sınıflandırılmıştır. Aflatoksinlerin hedef organı karaciğerdir. (Peraica ve diğ., 1999; Murphy ve diğ., 2006).

Mikotoksinler tarafından canlılarda meydana gelen toksisite sendromu mikotoksikozis, aflatoksinler tarafından oluşturulan mikotoksikozis ise aflatoksikozis olarak adlandırılmaktadır (Bhatnagar ve Garcia, 2001). Primer ve sekonder aflatoksikozis olarak iki formu vardır ve primer aflatoksikozis de akut ve kronik olarak iki farklı şekilde ortaya çıkmaktadır. Akut primer aflatoksikozis yüksek veya orta düzeydeki aflatoksin alımı neticesinde canlının ölümüne neden olmaktadır. Başlıca klinik semptomları karaciğerde yağlanma, solgunluk, renk bozulmaları, hemoraji, serum proteinlerinde azalma, karaciğer enzimlerinde artış, mide-bağırsak sisteminde kanamalar ve nefritis şeklindedir. En şiddetli akut aflatoksikozis vakaları dünya’da tropikal ülkelerde özellikle de başlıca gıdaları mısır ve pirinç olan gelir düzeyi düşük ülkelerde ortaya çıkmıştır. 1967 yılında Tayvan’da 19’u çocuk olmak üzere 26 Tayvanlı köylü yaklaşık 200 ppb aflatoksin B₁ içeren pirinç nedeniyle zehirlenmiş ve 3 çocuk ölmüştür (Pitt ve Hocking, 1997). 1974 yılında kuzeybatı Hindistan’da 6,25–15,60 ppm düzeyinde aflatoksin içeren mısır tüketiminden kaynaklanan akut aflatoksikozis vakasında 397 kişi etkilenmiş ve zehirlenenlerin 106’sı ölmüştür (Cullen ve Newberne, 1994; Deshpande, 2002). 2002 yılında ise Kenya’da aflatoksikozis salgını bildirilmiştir. Bu salgın sonucu % 39’luk ölüm oranı ile 317 vakanın 125’inde akut hepatoksisite nedeniyle ölüm şekillenmiştir. Bölgeye göre değişmekle birlikte analizlenen mısır örneklerinin yarısında >20 ppb, % 3 ile % 12’sinde >1000 ppb ve bazı örneklerde ise 8000 ppb gibi çok yüksek konsantrasyonda aflatoksin varlığı belirlenmiştir (Murphy ve diğ., 2006). 2004 ve 2005 yıllarında yine Kenya’da akut aflatoksikozis vakaları nedeniyle 123’ün üzerinde ölüm bildirilmiştir (Zinedine ve Manes, 2009).

Kronik aflatoksikozis orta ile düşük miktarda aflatoksine uzun süre maruz kalan canlılarda şekillenmektedir. Başlıca semptomları karaciğerde ve nekrotik bölgelerde kanama ve tıkanıklık, karaciğer hücrelerinde ve safra kesesi epitelyum hücrelerinde proliferasyon, fertilitede azalma, akut gastrointestinal etki ve böbrek kanamaları şeklindedir (Peraica ve diğ., 1999).

Sekonder aflatoksikozis de ise canlıda düşük düzeyde aflatoksin alımı sonucunda bağışıklık hücrelerinin azalması ve bağışıklığın baskılanması şekillenmekte ve sonuçta bakteri, virüs ve küfler tarafından sekonder infeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Desphande ve diğ., 2002).

Aflatoksin genel olarak tropik ve subtropik iklim koşullarında ve özellikle ekonomik düzeyi düşük Afrika ve Asya ülkelerinde görülmektedir. Bu ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar gıdalar ile alınan aflatoksinin insanlarda dünyada ölüm oranı 4. sırada yer alan karaciğer kanserini oluşturabileceğini göstermektedir. (Wiedenbörner, 2001). Doğrudan ilişkisi kanıtlanmamış olsa da hepatit B enfeksiyonunun aflatoksinlerin karaciğer kanserini oluşturmada sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Coğrafi olarak karaciğer kanseri nedeniyle ölümlerin sıklığı bölgeler Asya, Güney Çin ve Sahraaltı Afrika şeklindedir. Bu bölgelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar diyetle alınan AFB₁ ile yüksek karaciğer kanseri arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu duruma özellikle hepatit B virüs enfeksiyonu eşlik ettiğinde sinerjistik etki meydana getirdiği toksikolojik çalışmalarla ortaya konmuştur (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Galvano ve diğ., 2005). Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise 2006-2007 yıllarında 203 viral hepatit teşhisi konulan hastada plazma aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiş ve hastaların sırasıyla % 24,6, % 17,2, % 22,7, % 18,2’sinde AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ saptanmıştır. Hastalığın derecesinden bağımsız olarak kontrol grubu ile AFB₁ pozitif hastaların yüzdesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Fakat aflatoksin pozitif hasta yüzdesi açısından kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler kanserli hasta grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Mızrak ve diğ., 2009).

İnsanlarda aflatoksinlerin tolere edilebilir günlük alım miktarı (Tolerable Daily Intake-TDI) 0.11-0.19 ng AFB₁/kg vücut ağırlığı şeklinde belirlenmiştir. TDI değerinin belirlenmesinde Hepatit B virüsünün en önemli kanser faktörü olduğu Güneydoğu Asya ve Afrika’nın belli kesimlerinde yapılan çalışmalar temel alınmıştır (Galvano ve diğ., 2005).

Aflatoksinlerin toksisitesi hayvanın türü, yaş ve cinsiyete göre değişmektedir. En hassas hayvan ördek yavrusudur (Shibamoto ve Bjeldanes, 1993). Tavuk, hindi, ördek gibi kanatlı hayvanlar koyun ve keçiden daha hassastır. Hamsterlar ise AFB₁’e tavşanlardan 35 kat daha dirençlidir. LD₅₀ değeri bir günlük ördek yavrularında 0,34 mg/kg vücut ağırlığı (v.a) ve yetişkin köpeklerde 0,5 mg/kg v.a kadar düşük iken

hamsterlarda 10,2 mg/kg v.a gibi oldukça yüksektir. Yapılan çalışmalarla insanlarda akut aflatoksikoze neden olan LD₅₀ değeri 5 mg/kg v.a olarak belirlenmiştir. Dişi fareler ise erkeklerden 3 kat daha fazla dirençlidir. Aflatoksinin toksisitesindeki bu farklılık AFB₁'in biyotransformasyonu ile sıkı ilişkili olduğu için bireylerdeki metabolizma, aktivasyon ve detoksifikasyon farklılıkları ile ilişkilendirilmektedir (Moss, 1998).

Aflatoksinin metabolizması hem hayvan hem de insanlarda yoğun olarak araştırılmıştır. Sindirim sistemi yoluyla alınan AFB₁ karaciğerde sitokrom p450 enzim sistemi eşliğinde metabolize olarak, idrar ve safra yoluyla atılmaktadır. Aflatoksinlerin metabolizmasında oksidatif hidroksilasyon, O-dimetilasyon ve epoksidasyon basamakları sonucu sırasıyla M₁, Q₁, P₁, AFB₁-8,9 exo epoxide ve AFB₁-8,9 endo epoxide gibi çok sayıda oldukça aktif, daha az toksik ve kolaylıkla vücuttan atılabilen ara ürünler meydana gelmektedir (Cary ve diğ., 2000; Bhatnagar ve Garcia, 2001; Murphy ve diğ., 2006). Bu ara ürünler karaciğer makromolekülleri ile reaksiyona girerek karaciğer toksisitesine neden olup, karaciğerde yağlanma, renk bozukluğu, nekroz ve kanamalara yol açmaktadır. Özellikle epoksid ara ürünleri deoksiribonükleik asite (DNA) bağlanarak 8,9-dihidro-8 (N7 guanil)-9-hidroksi AFB₁'i oluşturmaktadır. Ara ürünlerin DNA'ya bağlanması sonucu transkripsiyon engellenmekte ve bu durum mutagenез ile sonuçlanmaktadır. Mutagenез özellikle p53 tümör baskılayıcı gende olduğunda anormal hücre proliferasyonu şekillenmekte ve tümör oluşumu gerçekleşmektedir. DNA'ya bağlanma sonucu AFB₁ karsinojenik, mutajenik ve teratojenik özellik kazanmaktadır (Shibamoto ve Bjeldanes, 1993; Eaton ve diğ., 1994; Cary ve diğ., 2000; Bhatnagar ve Garcia, 2001; Galvano ve diğ., 2005). AFB₁'den oluşan aflatoksin Q₁, P₁, aflatoxicol ve M₁ gibi diğer metabolitler ve doğal olarak şekillenen aflatoksinler (B₂, G₁ ve G₂) epoksidasyon için AFB₁'den daha zayıf substrat özelliği gösterdiklerinden daha az mutajenik, karsinojenik ve toksiktir. AFB₁ aynı zamanda bazı hayvanlarda doğum öncesi evredeki etkileri nedeniyle teratojeniktir (Cary ve diğ., 2000; Deshpande, 2002; Murphy ve diğ., 2006). AFB₁'in sıçan, fare, ördek, maymun ve alabalık gibi çeşitli hayvanlar için karsinojen olduğu deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur (Moss, 1998; Peraica ve diğ., 1999).

Aflatoksinlerin insanlarda Reye sendromu, Kwashiorkor ve hepatit gibi hastalıkların şekillenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Peraica ve diğ., 1999; Deshpande,

2002). Tayvan’da bir vakada kusma, hipoglisemi, konvülziyonlar, hiperamonemi, koma ve diğer akut klinik semptomlarla karakterize bir hastalık olan Reye sendromu görülmüş ve bunun aflatoksin maruziyeti ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Yeni Zelanda’da görülen Reye sendromlu iki vakada dokularda aflatoksin tespit edilmiştir. Akut aflatoksikoziste de aynı klinik semptomların görülmesi bu görüşü desteklemektedir (Cullen ve Newberne, 1994; Peraica ve diğ., 1999). Protein enerji malnutrisyonu olarak da bilinen Kwashiorkor hastalığı ise özellikle gelişmekte olan ülkelerde 5 yaşın altındaki çocuklarda ölümle sonuçlanan bir hastalık olup proteince fakir gıdalarla beslenmeyle birlikte aflatoksin alımı ile de ilişkilendirilmektedir (Pitt ve Hocking, 1997).

3.5 Aflatoksin İle İlgili Yasal Düzenleme Ve Limitler

Aflatoksinler doğal olarak gıdalarda meydana geldiği bilinen en toksik bileşiklerdir. Dolayısıyla bu bileşikler için birçok ülkede yasal düzenleme ve limitler mevcuttur. Günümüzde 100’den fazla ülkede mikotoksinler için yasal limitleri mevcuttur. Bu limitler arasında toksin-matris kombinasyonu açısından 221 yasal düzenlemeyle fındıkta aflatoksin başı çekmektedir (Van Egmond ve Jonker, 2008).

Ülkemizde ise 17 Mayıs 2008 tarih ve 26879 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan 2008/26 numaralı “Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri” hakkında tebliğe göre aflatoksin limitleri belirlenmiştir (TGK, 2008). 16 Şubat 2009 yılında bu tebliğde değişiklik yapılmasına yönelik tebliğ Resmi gazetede yayınlanarak yürürlüğe girmiş ve fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar için AFB₁ limiti kaldırılmıştır (TGK, 2009). Çizelge 3.3’de bazı ülkelerde gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri görülmektedir.

Doğrudan insan tüketimine sunulacak olan kurutulmuş meyveler için Avrupa Birliği’nin koyduğu maksimum limit toplam aflatoksin için 4 µg/kg şeklindedir (EC, 2008). Bu limitin yükseltilmesi için 171 ülkenin üyesi olduğu Uluslararası FAO/WHO organizasyonu Kodeks Alimentarius Komitesinde ülkemiz tarafından 2007 yılında başlatılan tartışmalar sürdürülmektedir (Anon, 2010b).

Çizelge 3.2 : Bazı ülkelerde gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum aflatoksin limitleri*.

Ülkeler	Gıda Maddeleri	Maksimum Limit (µg/kg)		
		B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
Türkiye ¹	Fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	-	10	-
	Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8	15	-
	Tahıllar (karabuğday (<i>Fagopyrum</i> sp.) dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2	4	-
	Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5	10	-
	Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,05
	Kırmızı biber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızı biber ve acı kırmızı biberin bütün ve toz hali dahil)	5	10	-
	Karabiber (<i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil)			
	Hint cevizi/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>)			
	Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>)			
	Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)			
	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 diyet gıdalar	0,10	-	0,025
	Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5	10	0,50
	Süt	-	-	0,050
Avrupa Birliği ²	Yer fıstığı, fındık, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan ve bunların işlenmiş ürünleri)	2	4	-
	Yerfıstığı (sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8	15	-
	Fındık ve kuru meyveler (sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5	10	-
	Tahıllar ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketime sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2	4	-
	Mısır (Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5	10	-
	Baharatlar (<i>Capsicum</i> spp., <i>Piper</i> spp., <i>Myristica fragrans</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Curcuma longa</i>)	5	10	-

Çizelge 3.2 (devam) : Bazı ülkelerde gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum aflatoksin limitleri*.

Ülkeler	Gıda Maddeleri	Maksimum Limit (µg/kg)		
		B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
Avrupa Birliği ²	Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050
	Tahıl bazlı işlenmiş gıdalar, bebek ve küçük çocuk gıdaları	0,10	-	-
	Bebekler formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,025
	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	-	0,025
A.B.D. ³	Tüm gıdalar (süt hariç insan tüketimine sunulan)	-	20	-
	Süt	-	20	0,50
Kodeks Alimentarius ⁴	Yer fıstığı (çiğ)	-	15	-
	Fındık	-	10	-

*¹ TKG, 2008

*³ FDA, 2009

*⁵ TKG, 2009

*² EC, 2006

*⁴ FAO, 2007

3.6 Aflatoksin Tayininde Kullanılan Analitik Metodlar

Mikotoksin analizlerinde kullanılacak analitik metodlar birçok faktöre bağlıdır. Tek bir metod ya da teknik tüm mikotoksin analizleri için uygun değildir. Öncelikle araştırmaya konu olan mikotoksinin kimyasal yapısı, molekül ağırlığı ve fonksiyonel grubu göz önüne alınmaktadır. Çünkü bu faktörler toksinin uçuculuğunu, çözünürlüğünü belirlemekte ve bu da analiz metodunu etkilemektedir. Bunun yanı sıra örnek matrisi de ekstraksiyon yönteminin belirlenmesinde etkili olmaktadır.

Mikotoksin analizlerinde yönteme göre değişmeyen başlıca basamaklar örnekleme, örnek hazırlama, ekstraksiyon, saflaştırma, ayırma, miktar tespiti ve doğrulama şeklindedir. Aflatoksinlerin ekstraksiyonu genellikle organik bir çözücü ve su karışımı kullanılarak yapılmaktadır. En yaygın kullanılan ekstraksiyon çözücü klorohidrokarbon (kloroform vb) ve su iken günümüzde yerini metanol-su, asetonitril-su'ya bırakmıştır (Deshpande, 2002). Organik bir çözücüyle ekstraksiyonun ardından gelen saflaştırma aşamasında yağlar ve diğer bileşenleri uzaklaştırmak için kromatografi kolonları ve katı faz ekstraksiyon kartuşları (C₁₈) kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan en yeni teknik monoklonal antikorlar içeren ve büyük kolaylık sağlayan immunoaffinite kolonlarıdır.

Aflatoksinlerin tayininde kullanılan çeşitli fizikokimyasal ve biyolojik yöntemler mevcuttur. Aflatoksin analizlerinde kullanılan kimyasal yöntemlerin başında ayırma yöntemlerinden kromatografik teknikler gelmektedir. Klasik analitik metodlar ince

tabaka kromatografisi (TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresidir (GC-MS). Son yıllarda tüm bu metodlar immunoafinite teknikleri ile ekstraksiyon basamağının basitleştirilmesi ile geliştirilmektedir. Bunların yanısıra Florimetri ve imunokimyasal yöntemlerden ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ve RIA (Radio Immuno Assay)'de kullanılmaktadır (Scudamore, 2005).

Aflatoksin analizlerinde TLC kullanımı 1960-70'lerde başlamış ve günümüzde de devam etmektedir. Aflatoksinlerin UV ışığı altında yoğun floresans ışıma gösterme özellikleri nedeniyle TLC kullanılarak yapılan analizlerde floresansın gözle veya densitometer ile standart ile karşılaştırılarak ölçümü yapılmaktadır. Mısır, yer fıstığı, yer fıstığı ezmesi, pamuk tohumu, süt, et ve yumurtada aflatoksin analizlerinde TLC kullanımına dair standart metodlar (AOAC) mevcuttur (Cary ve diğ., 2000). Genel olarak TLC kullanımı Avrupa ülkelerinde ABD'den daha yaygındır. Rutin analizlerde kullanılmasına rağmen yeni bir üründe denenmediği sürece yayınlarda yer almamaktadır (Trucksess ve Wood, 1994).

1980'lerden sonra TLC'nin yerini HPLC almaya başlamıştır. Floresans dedektör ile aflatoksin analizleri HPLC ile başlıca metot olarak kullanılmıştır. Tüm B₁, B₂, G₁ ve G₂ aflatoksinleri HPLC ile ayrılabilen ve miktar tayini yapılabilir. Aflatoksinler 365 nm'de floresans ışığını eksitasyon ve 400 nm'nin üzerinde emisyon yaparlar. 365 nm'de UV ile miktar tayini mümkün olmasına rağmen tercih edilmemektedir (Wilson ve diğ., 1998). Sıvı kromatografi metodu normal veya ters faz olarak uygulanabilmektedir. HPLC cihazında kolon sonrası veya öncesi türevlendirme düşük konsantrasyonlarının tayini için floresan ışığının emisyonunu arttırmak üzere kullanılmaktadır. Türevlendirmede B ve G aflatoksinler için brom, iyot (Br₂, I₂), M₁ ve M₂ için ise trifluoroasetik asit (TFA) kullanılmaktadır. İncir ezmesi, antep fıstığı ezmesi, yerfıstığı yağı ve kırmızıbiber'de aflatoksin analizleri için standart referans HPLC metodu geliştirilmiştir (AOAC, 2000). HPLC metodunda aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ pikleri sırasıyla çıkabilmekteyken süt ve süt ürünlerinde M₁ ve M₂ analizleri için farklı metot gerekmektedir. GLC ise uçucu bileşiklerin analizinde kullanılabildiği için mikotoksin analizlerinde sınırlı kullanım alanı bulmuştur (Krska ve Welzig, 2006).

Kromatografik tekniklerin yanısıra immunoassay teknikler de kullanılmaktadır. ELISA, antikor moleküllerini bağlamak için test çözeltisindeki işaretlenmemiş

aflatoksin ile tayin için kullanılan işaretlenmiş aflatoksinler arasındaki yarışa dayanır. ELISA yöntemi, diğer yöntemlere göre daha basit, hızlı ve kolaydır. RIA da, ELISA benzeri bir metottur. Fakat işaretleme işleminde radyoaktif bir izotop kullanılmaktadır. Genellikle kullanılan izotop ^{125}I 'dir. RIA yönteminde işlem sonunda açığa çıkan atıkların radyoaktif özellikte olması nedeniyle kullanımı sınırlanmaktadır. Özellikle ELISA kullanım kolaylığı ve bir günde çok sayıda örneğin analizlenmesine olanak sağlaması ile tarama ve yarı kantitatif çalışmalar açısından önem arz etmektedir. Çapraz kontaminasyon riski nedeniyle seçiciliğine dikkat etmek gerekmektedir (Deshpande, 2002).

Hızlı teknikler içinde sayılabilecek kuru incirde aflatoksinli tanelerin tespiti ve ayrılması için 1987 yılından beri Türkiye'de işletmelerde UV lambalı kabinler kullanılmaktadır. Yöntemde 365 nm uzun dalga boylu UV ışığı altında floresans verme özelliklerine bakılmaktadır. İncirlerde aflatoksin kontaminasyonu ve parlak yeşilimsi sarı floresans (BGYF) gösterme özelliği arasındaki ilişki araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Steiner ve diğ., 1988; Aksoy, 2001). BGYF verme özelliğinin mısır üzerine olan uygulama çalışmalarında, mısırın dışında BGYF vermiyorken, içinde verebildiği ve mısırı kırmak gerektiği belirlenmiş, bu nedenle yöntemin izleme çalışmalarında uygun olmadığı belirtilmiştir (Shotwell ve Hesseltine, 1981).

4. SİKLOPIAZONİK ASİT VE ÖZELLİKLERİ

4.1 Siklopiazonik Asit Üreticisi Küfler Ve Siklopiazonik Asit Biyosentezi

Siklopiazonik Asit (CPA) 1968 yılında Holzapfel tarafından *Penicillium cyclopium* (= *P. aurantiogriseum*=*P. puberulum*) küfünün metaboliti olarak izole edilmiştir (Holzapfel, 1968). CPA üreticisi olan diğer *Penicillium* cinsi küfler *Penicillium commune*, *P. griseofulvum*, *P. camemberti* ve *Aspergillus* cinsi küflerin başında da *A. flavus*'un geldiği *A. versicolor*, *A. oryzae* ve *A. tamarii* küflerinin de üretici olduğu bildirilmiştir (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Scott, 2004; Barkai-Golan, 2008). Siklopiazonik asit üreten küf türleri Çizelge 4.1'de görülmektedir.

Aflatoksinlerin başlıca üreticisi olan *A. flavus*'un doğada yaygın olarak bulunma ve CPA üretebilme özelliğinden dolayı bu iki mikotoksin gıdalarda bir arada bulunabilmektedir. Hatta 1960 yılında ortaya çıkan ve 100.000 kümes hayvanının ölümüyle sonuçlanan 'Turkey X' hastalığından aflatoksinle birlikte sorumlu olduğu düşünülmektedir (Frisvad ve diğ., 2006).

Küf suşlarının besiyerinde CPA üretme potansiyelleri üzerine yapılan çalışmalardan *Penicillium* spp. türlerinin araştırıldığı bir çalışmada *P. griseofulvum* ve *P. camembertii* izolatlarının 1000 ppm kadar yüksek düzeylerde toksin üretimi tespit edilmiştir (Hermansen ve diğ., 1984). Kamember peyniri'nden izole edilmiş 63 adet *P. camembertii* suşunun hepsinin CPA ürettiği belirlenmiştir (Scott, 1981).

13 tür ve 138 *Aspergillus* spp. suşu ile yapılan bir çalışmada siklopiazonik asitin özellikle *A. section Flavi* üyelerinden *A. flavus* izolatlarının % 61'inin, *A. oryzae* izolatlarının % 83'ünün ve *A. tamarii* izolatlarının hepsinin CPA üreticisi olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada yeni bir bulgu olarak *A. fumigatus* ve *A. phoenicis*'in de CPA ürettiği belirlenmiştir (Vinokurova ve diğ., 2007). Amerika'nın farklı bölgelerinden alınan toprak örneklerinden izole edilen *A. flavus* suşlarının % 8'inin CPA üreticisi olduğu belirlenmiştir (Horn ve Dorner, 1999).

Çizelge 4.1 : Siklopiazonik asit üreticisi küfler.

Küf türü	Kaynak
<i>A. flavus</i>	Luk ve diğ., 1977; Cole ve Cox, 1981; Hermansen ve diğ., 1984; Cvetnic ve Pepelnjak, 1998; Munimbazi ve diğ., 1997; Horn ve diğ., 1996; Gqaleni ve diğ., 1996; Vinokurova ve diğ., 2007
<i>A. oryzae</i>	Orth, 1977; Luk ve diğ., 1977; Hermansen ve diğ., 1984; Munimbazi ve Bullerman, 1996; Vinokurova ve diğ., 2007
<i>A. tamarii</i> Kita.	Dorner, 1983
<i>A. tamarii</i>	Goto ve diğ., 1996; Horn ve diğ., 1996; Munimbazi ve Bullerman, 1996; Dorner, 2002
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirahoschi	Luk ve diğ., 1977; Cole ve Cox, 1981; Dorner, 2002
<i>A. fumigatus</i>	Vinokurova ve diğ., 2007
<i>A. phoenicis</i>	Vinokurova ve diğ., 2007
<i>P. commune</i>	Hermansen ve diğ., 1984; El-Banna ve diğ., 1987; Lund ve diğ., 1995; Pitt ve diğ., 1986; Larsen ve diğ., 2002
<i>P. crustosum</i>	Hermansen ve diğ., 1984; El-Banna ve diğ., 1987
<i>P. cyclopium</i> Westling	Cole ve Cox, 1981
<i>P. griseofulvum</i>	Hermansen ve diğ., 1984; El-Banna ve diğ., 1987
<i>P. hirsutum</i>	El-Banna ve diğ., 1987
<i>P. nalgiovense</i>	El-Banna ve diğ., 1987
<i>P. viridicatum</i>	El-Banna ve diğ., 1987
<i>P. patulum</i>	Hermansen ve diğ., 1984
<i>P. camembertii</i>	Hermansen ve diğ., 1984; Pitt ve diğ., 1986; El-Banna ve diğ., 1987
<i>P. chrysogenum</i>	El-Banna ve diğ., 1987
<i>P. palitans</i>	Samson ve diğ., 2004
<i>P. urticae</i>	Trucksess ve diğ., 1987

Hindistan’da yer fıstığı örneklerinden izole edilen 150 *A. flavus* izolatından, 52 tanesinin aflatoksin ve CPA’yı birlikte ürettiği, 32’sinin yalnızca CPA, 33’ünün yalnızca aflatoksin ve 33’ünün ise hiçbir toksini üretmediği belirlenmiştir (Pushvinder ve Desai, 2006). Arjantin’de farklı tarımsal ürünlerden izole edilen *Aspergillus* cinsi küflerin aflatoksin ve CPA üretiminin incelendiği bir çalışmada yer fıstığından izole edilen *A. flavus* izolatlarının % 94’ü, buğdaydan izole edilenlerin % 93’ü ve soya fasulyesinden izole edilenlerin ise % 73’ünün CPA üreticisi olduğu belirlenmiştir (Vaamonde ve diğ., 2003). Kuru fasulyeden izole edilen *A. flavus* suşlarının besiyerinde 25-36 ppm düzeyinde CPA oluşturdukları belirlenmiştir (Cvetnic, 1994). İncir tarlalarından izole edilen *A. flavus* suşlarının aflatoksin ile

birlikte CPA oluşturdıkları ve izole edilen *A. tamarii* suşlarının ise yalnızca CPA ürettikleri belirlenmiştir (Doster ve diğ., 1996). Şaraplık üzümlerle yapılan bir çalışmada izole edilen *A. flavus* suşlarının aflatoksin üretmediği fakat CPA ürettiği belirlenmiştir (Barkai-Golan, 2008). Monaci ve diğ. (2002), yaptıkları çalışmada İtalya’da süt ürünlerinden izole ettikleri 6 adet *A. versicolor* suşunun tamamının 26-140 ppm aralığında CPA üreticisi olduğunu belirlemişlerdir.

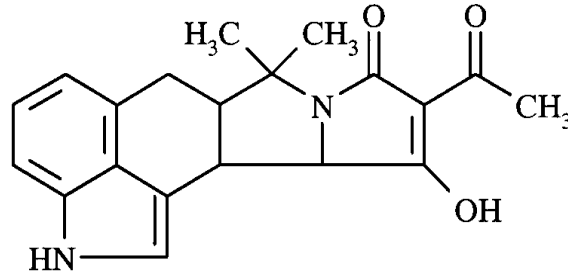
Holzapfel ve diğ. (1970), *Penicillium cyclopium* tarafından en iyi CPA üretiminin Czapek besiyerinde 25°C’de 7 gün çalkalamalı etüv kullanılarak yapılan inkübasyonda gerçekleştiğini belirlemişlerdir. *A. flavus* ile yapılan bir çalışmada ise toksin üretiminin en yüksek CYA besiyerinde 25°C sıcaklıkta inkübasyon sonucu meydana geldiği tespit edilmiştir (Gqaleni ve diğ., 1997).

CPA kimyasal olarak indol türevi ergot alkaloidleri ailesine dahildir. Ergot alkaloidlerinin biyosentezi triptofan aminoasitinin dimetilalil pirofosfat ile alkillenmesi ile başlamaktadır. Bu reaksiyonu katalizleyen dimetilalil triptofan sentetaz enzimi triptofan molekülündeki indol halkasını elektron alıcısı olarak kullanmaktadır (Chang ve diğ., 2009).

CPA biyosentezinin düzenlenmesi hakkında fazla bilgi olmamasına rağmen *A. flavus* küf türünde *veA* geninin mutasyonu sonucu CPA toksininin üretiminde azalma olduğu dolayısıyla CPA’nın üretiminden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Duran ve diğ., 2007). Küfler tarafından ergot alkaloidlerinin sentezinde görevli genler genellikle kümelenmiş haldedir. Yapılan bir çalışmada *A. flavus* küf türünde CPA biyosentezinde görevli bazı genlerin mini-gen kümesi halinde aflatoksin gen kümesine bitişik olarak yerleştiği tespit edilmiştir (Chang ve diğ., 2009).

4.2 Siklopiazonik Asitin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Siklopiazonik asit çok sayıda *Aspergillus* ve *Penicillium* türü tarafından üretilen monobazik asit gibi davranış gösteren toksik bir indol tetramik asittir. CPA’nın kimyasal yapısı Şekil 4.1’de görülmektedir. Siklopiazonik asitin biyokimyadaki adı α -siklopiazonik asit olarak geçmektedir.



Şekil 4.1 : Siklopiazonik asitin kimyasal yapısı (Burdock ve Flamm, 2000).

Siklopiazonik asit bir molekül triptofan aminoasiti, bir molekül mevalonik asit ve iki molekül asetik asitten meydana gelmektedir (Burdock ve Flamm, 2000). CPA renksiz, kristal yapıda bir bileşiktir. Kloroform, metanol, asetonitril ve sodyum bikarbonatta kolaylıkla çözünebilen CPA floresans verme özelliğine sahip değildir ve 284 nm'deki maksimum UV absorpsiyonu spesifik değildir (Yu ve Chu, 1998). Kuru halde +4°C'de uzun süre depolanabilmektedir.

CPA'nın *Penicillium cyclopium* küfı tarafından üretimi üzerine yapılan çalışmalarda siklopiazonik asit ile birlikte β -siklopiazonik asit ve siklopiazonik asit imine olmak üzere iki bileşenin daha üretildiği tespit edilmiştir. Gelişmenin başlangıcında β -siklopiazonik asit yüksek konsantrasyonda üretilirken 5-7 gün sonra gelişme hızının düşmesiyle birlikte α -siklopiazonik asit miktarı hızlı bir şekilde yükselmekte eşzamanlı olarak β -siklopiazonik asit miktarı azalmaktadır. Siklopiazonik asit imine ise fermentasyonun daha ileri basamaklarında şekillenmektedir. Bu bulgular β -siklopiazonik asit'in α -siklopiazonik asit üretiminde ön madde olduğunu ortaya koymuştur (Holzapfel, 1968; Burdock ve Flamm, 2000).

4.3 Gıdalarda Siklopiazonik Asit Varlığı

Siklopiazonik asit özellikle yağlı tohumlar, kabuklu yemişler, mısır, yer fıstığı ve kuru meyvelerde *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait küfler tarafından üretilerek sorun oluşturmaktadır (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Frisvad ve diğ., 2006). Özellikle enzim üretimi ve içeceklerin üretiminde kullanılan küf türleri tarafından üretilmektedir (Vinokurova ve diğ., 2007). Doğada ve gıdalarda yaygın olarak bulunan *A. flavus* izolatları tarafından da üretilmesinin keşfinden sonra özellikle aflatoksinle birlikte bulunabilme ihtimali ile birlikte bu toksin önem kazanmıştır.

CPA'nın ilk olarak 1978 yılında mısırdaki doğal olarak bulunduğu belirlenmiştir (Bryden ve diğ., 2004). Siklopiazonik asitin doğal olarak varlığının rapor edildiği

ürünlerin arasında başlıca mısır (Urano ve diğ., 1992; Hayashi ve Yoshizawa, 2005), yer fıstığı (Lansden ve Davidson, 1983; Urano ve diğ., 1992; Fernandez-Pinto ve diğ., 2001), peynir (Le Bars, 1979; Zambonin ve diğ., 2001), darı (Rao ve Husain, 1985), mısır gevreği (Aresta ve diğ., 2003), domates ezmesi ve püresi (Da Motta ve Valente Soares, 2001) ve ayçiçeği tohumu (Ross ve diğ., 1991) yer almaktadır. Yer fıstığı ve mısırdaki aflatoksinlerle birlikte bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Urano ve diğ., 1992). Deneysel çalışmalarla CPA ile kontamine yemlerle beslenen süt veren hayvanların sütlerinde birkaç gün sonra bile CPA mevcudiyeti saptanmıştır. Ayrıca fermente ürünlerde de oldukça dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Weidenbömer, 2001). Brezilya’da marketlerden toplanan 48 süt örneğinin 2’sinde 6,4 ve 9,7 ppb düzeyinde siklopiazonik asit tespit edilmiştir (Oliveira ve diğ., 2006). Çizelge 4.2’de siklopiazonik asitin gıdalarda doğal olarak varlığının araştırıldığı çalışmalar listelenmiştir.

Çizelge 4.2 : Gıdalarda siklopiazonik asit varlığı.

Ürün	Ülke	Pozitif Örnek Sayısı/Toplam Örnek Sayısı	Miktar (ppb)	Kaynak
Süt	İtalya	3/20	-*	Losito ve diğ., 2002
Süt	Brezilya	2/48	6,4/9,7	Oliveira ve diğ., 2006
Süt	Brezilya	3/50	6,4-9,1	Oliveira ve diğ., 2008
Yer fıstığı	ABD	21/27	32-6525	Lansden ve Davidson, 1983
Yer fıstığı	ABD	45/50	50-2900	Urano ve diğ., 1992
Yer fıstığı	Arjantin	2/50	493/4300	Fernandez-Pinto ve diğ., 2001
Yer fıstığı	Botsvana	17/83	1-10	Mphande ve diğ., 2004
Yer fıstığı	Brezilya	8/30	260-600	Gonçalez ve diğ., 2008
Mısır gevreği	İtalya	-	72	Aresta ve diğ., 2003
Mısır	Filipinler	1/6	76	Hayashi ve Yoshizawa, 2005
Hayvan yemi	Portekiz	5/80	160	Martins ve Martins, 1999
Hayvan yemi	Brezilya	6/50	12,5-153,3	Oliveira ve diğ., 2008
Kamember peyniri	Fransa	11/20	50-1500	Le Bars, 1979
Peynir	İtalya	6/6	20-80	Zambonin ve diğ., 2001
Domates ürünleri	Brezilya	8/44	36-178	Da Motta ve Valente Soares, 2001

Ayrıca kontamine yemle beslenen tavukların etlerinde (Bhatnagar ve Garcia, 2001) ve yumurtada da CPA kalıntısına rastlanmıştır (Dorner ve diğ., 1994). Endonezya’da tavuk yemlerinde CPA varlığının araştırıldığı bir çalışmada örneklerin yaklaşık % 81’inin 9 ppm düzeyine kadar kontamine olduğunu tespit edilmiştir (Devegowda ve Murthy, 2005).

Mısır gevreklerinde siklopiazonik asit, okratoksin A ve tenuazonik asit'in varlığının araştırıldığı bir çalışmada örneklerin doğal olarak 72 ppb ve 25 ppb konsantrasyonlarında siklopiazonik asit ve tenuazonik asit ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Aresta ve diğ., 2003).

Brezilya'da farklı olgunlaşma aşamalarındaki yer fıstıkları ile yapılan bir çalışmada örneklerin tamamında mikofloranın çoğunlukla *Fusarium* spp. (% 26) ve *A. flavus* (% 17) tarafından oluştuğu ve örneklerin % 32'sinin aflatoksin ve CPA'yı birlikte içerdiği belirlenmiştir. Aflatoksin konsantrasyonları 4,20-198,84 ppb aralığında, CPA konsantrasyonları ise 260-600 ppb aralığında olarak kayıt edilmiştir (Gonçalez ve diğ., 2008).

CPA *Penicillium* cinsi küflerden *P. camemberti* tarafından da üretilmekte ve bu küf türünün peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılması nedeni ile kamember peynirlerinde 5 mg/kg kadar yüksek konsantrasyonlarda varlığı tespit edilmiştir (Duran ve diğ., 2007).

CPA'nın gıda işleme süresince stabilitesi üzerine yapılan çalışmalar da mevcuttur. CPA ile 1 ppm düzeyinde kontamine sütün dondurma üretimi ve 9 hafta -20°C depolama süresince CPA miktarındaki azalmanın incelendiği bir çalışmada dondurma üretim basamakları sonunda % 12-14 arasında bir azalma olduğu ve depolamanın 4. haftasında % 5 ve 9. haftasında ise % 12 oranında azalma olduğu kaydedilmiştir (Prasongsidh ve diğ., 1999a). Benzer şekilde 1 ppm düzeyinde CPA ile kontamine sütün yağ ve krema üretimi sırasında CPA miktarındaki azalmanın incelendiği bir çalışmada, yağ üretiminde CPA'nın yalnızca % 5'i yağa geçerken kremada bu oranın % 50-59 arasında olduğu belirlenmiştir (Prasongsidh ve diğ., 1999b).

4.4 Siklopiazonik Asitin Sağlık Üzerine Etkileri

Siklopiazonik asit'in 1960 yılında ortaya çıkan ve 100.000 kümes hayvanının ölümüyle sonuçlanan "Turkey X Disease" hastalığından aflatoksinle birlikte sorumlu olduğu düşünülmektedir. Salgından sonra yemlerde *A. flavus* ve aflatoksin varlığı belirlenmiştir. Fakat salgının başlangıcında hayvanlarda şekillenen nörolojik semptomlar aflatoksinler tarafından meydana gelen klinik semptomlarla açıklanamamakta, *A. flavus* küfü her iki toksini de üretme özelliğine sahip olduğu

için, iki toksinin birlikte rol oynadığı ileri sürülmektedir (Duran ve diğ., 2007). Ayrıca salgından sorumlu yer fıstığı küspesi örneklerinde 31 ppb düzeyinde CPA varlığı tespit edilmiştir. (Bradburn ve diğ., 1994).

CPA yapısındaki tetramik asit nedeniyle katyon metallerini şelatlama özelliğine sahiptir. Kalsiyum, magnezyum ve demir'i şelatlama özelliğinin toksisite mekanizmasının esasını oluşturduğu düşünülmektedir (Devegowda ve Murthy, 2005). CPA intoksikasyonunun klinik semptomları özellikle kas dokusunda şekillenen titremeler, kasılmalarla ilişkilidir. Çünkü CPA hücre içinde Ca^{+2} alımının inhibitörü olarak görev yapmakta ve dolayısıyla sarkoplazmik ve endoplazmik retikulum'da kalsiyum'a ihtiyaç duyan ATPaz enzimini de inhibe ederek kalsiyum seviyesinin azalmasına ve kasılmaların artmasına neden olmaktadır (Duran ve diğ., 2007). Bu özelliği nedeniyle de sindirim yoluyla alınan toksinin özellikle kaslar olmak üzere yenabilir dokularda birikimi deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur (Norred ve diğ., 1988).

Bir nörotoksin olan CPA'nın hedef organları başlıca karaciğer, böbrekler ve sindirim sistemidir. CPA alımı nedeniyle lezyonlar sindirim sistemi, karaciğer, böbrekler, dalak, pankreas, tükürük bezleri, kalp ve iskelet kaslarında şekillenmektedir (Devegowda ve Murthy, 2005). CPA akut etkiye sahip bir toksin olmayıp etkisi kroniktir. İnsanlar üzerinde kronik etkileri olabileceği, üreme sistemini olumsuz etkileyerek doğum kusurlarına yol açabileceği düşünülmektedir. Hayvanlar üzerindeki deneysel çalışmalar neticesinde CPA'nın insanlarda teratojenik etkiye sahip olabileceği ve böbrek, dalak, kalp damar sistemi, merkezi sinir sistemi üzerinde hasar oluşturabileceği düşünülmektedir (Burdock ve Flamm, 2000).

Farelerde yapılan deneysel çalışmalar karaciğer, böbrek, pankreas, dalak ve kalpte lezyonların şekillendiğini göstermiştir (Purchase, 1971). 100 ppm konsantrasyonda kontamine yemle beslenen tavuklarda hepatit, kalp kasında inflamasyon şekillenmiş, ölüm oranında artış meydana gelmiş ve yenabilir dokularda toksin birikimi gözlenmiştir. Etin yansıra sütte ve yumurtada da CPA'nın mevcut olduğu tespit edilmiştir (Duran ve diğ., 2007). Kontamine yemle beslenen tavukların etlerinde birikimin meydana geldiği ve doz arttıkça eliminasyon süresinin arttığı 1987 yılında yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur (Norred ve diğ., 1988). Kontamine yemle beslenen tavukların yumurta kabuklarının yeterince gelişmemesi nedeniyle ince veya çatlak kabuklu yumurtalar üretilmektedir (Devegowda ve Murthy, 2005).

CPA üzerine ilk deneysel çalışma 1971 yılında farelerde oral ve intraperitoneal LD₅₀ dozlarının belirlenmesi ile başlamış (Purchase, 1971) ve daha sonraki çalışmalar ile fare, domuz, tavuk, tavşan, köpek ve maymun gibi birçok memeli hayvan üzerinde toksik etkileri olduğu belirlenmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan toksikolojik çalışmalarda domuzların çok hassas olduğu belirlenmiştir. Başlıca semptomları kilo kaybı, ishal, kusma, dehidrasyon, depresyon, konvülsiyonlar, opistotonus ve sonunda ölüm şeklindedir (Bhatnagar ve Garcia, 2001). CPA'nın akut oral LD₅₀ dozu erkek sıçanlar için 36 mg/kg, dişi sıçanlar için ise 63 mg/kg v.a olarak belirlenmiştir. İntraperitoneal LD₅₀ dozu erkek sıçanlar için 2,3 mg/kg v.a'dır. CPA'nın toksik etkileri cinsiyet, tür ve doza bağlıdır. Tavuklar için oral LD₅₀ dozu 12 mg/kg v.a olarak belirlenmiştir (Desphande, 2002).

CPA kaynaklı mikotoksikozis vakasının bir kere şekillendiği bildirilmiştir. Yemlerde bulunan 6 ppm düzeyindeki CPA'nın meydana gelen bıldırcın ölümlerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yemlerde CPA ile birlikte aflatoksin (0,45 ppm) ve okratoksin A (0,50 ppm) varlığı da tespit edilmiş olmasına rağmen hayvanlarda görülen klinik semptomlar CPA'yı işaret etmektedir (Bryden ve diğ., 2004). Fakat esas olarak Kodua zehirlenmesi olarak bilinen ve özellikle Kuzey Hindistan'da temel gıda maddelerinden birisi olan darı (kodo millet) tüketimi sonucunda şekillenen bulantı, kusma, çılgınlık, depresyon ve bilinç kaybı semptomlarıyla ortaya çıkan hastalıktan CPA sorumlu tutulmaktadır (Weidenbörner, 2001). Kuzey Hindistan'da yapılmış çalışmalarda darı örneklerinin çok yüksek miktarlarda CPA üreticisi olan *A. tamarii* Kita türleri ile yüksek oranda kontamine olduğu tespit edilmiştir (Antony ve diğ., 2003).

CPA tarafından şekillenen karaciğer hasarı aflatoksin tarafından tetiklenen karaciğer kanserinden farklılık göstermektedir (Vinokurova ve diğ., 2007). Aflatoksin kadar toksik ve özellikle karsinojenik olmasa da AFB₁ ile birlikte gıdalarda ve yemlerde bulunması ile önem arz etmektedir. Ayrıca etki mekanizması tümör oluşumunu tetiklediği bilinen thapsigargin'e benzemekte, kötü huylu tümör oluşumunu tetiklemekte ve aflatoksinin etkisini arttırdığı bilinmektedir (Riley ve Petska, 2005).

4.5 Siklopiazonik Asit İle İlgili Yasal Düzenleme Ve Limitler

Ülkemiz ve dünyada siklopiazonik asit ile ilgili herhangi bir yasal düzenleme mevcut değildir. *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait türler tarafından üretilmesine

rağmen aynı türler tarafından üretilen aflatoksin kadar sık rastlanmaması, siklopiazonik asit kaynaklı rapor edilen zehirlenme vaka sayısının sınırlı olması ve nispeten tehlikesiz yapıya sahip olması gibi sebepler yasal düzenleme ihtiyacını engellemektedir. Fakat bu toksinin genellikle aflatoksinlerle birlikte bulunması nedeniyle göz ardı edilmesinden kaynaklanan bir durumun söz konusu olduğu ve maruziyetinin aslında seyrek olmadığı da düşünülmektedir (Burdock ve Flamm, 2000).

Gıda Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Teşkilatının Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) domuzlarda herhangi bir toksik etkinin görülmediği (NOEL-No Effect Level) 1 mg/kg/gün değerini dikkate alarak günlük alınabilecek limit (ADI-Allowed Daily Intake) değerini 10 µg/kg vücut ağırlığı (ortalama ağırlıktaki birey için yaklaşık 700 µg/gün) olarak belirlemiştir (Burdock ve Flamm, 2000). Köpekler üzerinde yapılan deneysel çalışmada 0,5 ve 1 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde CPA alımı neticesinde deney hayvanlarının hiçbirisi 90 günlük deney çalışması süresince canlı kalmamıştır. Bu bulgu daha düşük NOEL değeri belirlenmesinin gerekliliğini gündeme getirmektedir (Chang ve diğ., 2009).

4.6 Siklopiazonik Asit Tayininde Kullanılan Analitik Metodlar

CPA'nın floresans verme özelliğinin olmaması ve maksimum UV absorpsiyonu verdiği 284 nm'nin özgün olmaması nedeniyle CPA tayininde güçlük yaşanmaktadır (Yu ve Chu, 1998).

CPA'nın tayininde kullanılan analitik metotların başında ince tabaka kromatografisi, spektrofotometrik teknikler, ELISA, GC, HPLC (normal ve ters faz) gelmektedir. Bu metotların yanısıra nükleer manyetik rezonans, kapillar elektroforez ve tarımsal ürünlerde CPA taramalarında kullanılmak üzere basit kolorimetrik yöntemler de geliştirilmiştir (Weidenbörner, 2001). ELISA ile fungal kültürlerde CPA tayininin yanısıra (Hahnau ve Weiler, 1991), mısır, yer fıstığı ve karışık yemde uygulamaları da geliştirilmiştir (Yu ve Chu, 1998). Çeşitli gıdalarda ve fungal kültürlerde siklopiazonik asit varlığının ve miktarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

İnce tabaka kromatografisi (TLC) yer fıstığı (Lansden ve Davidson, 1983; Lansden, 1986; Pinto ve diğ., 2001), peynir (Le Bars, 1979), mısır (Lansden, 1986) ve fungal

kültürlerde (Hermansen ve diğ., 1984) CPA analizlerinde kullanılmıştır. Bu yöntemin tespit limiti 20 ile 125 ng/g arasında değişmektedir.

Kimyasal metotların çoğu türevlendirme ve örneklerin saflaştırmasını içermekte ve bu nedenle de oldukça zaman almakla beraber hassasiyeti düşük olmaktadır. Tespit limitleri spektrofotometrik yöntemler için olan 80 ppb'den TLC için olan 125 ppb'ye kadar değişmektedir. HPLC ile ise oldukça hassas olup bazı matrisler için gıdalarda tespit limiti 16 ppb'ye kadar düşürülmüştür. Fakat HPLC yöntemi, uzun süre alan saflaştırma basamağını ve pahalı ekipman gerekliliğini doğurmaktadır (Urano ve diğ., 1992).

Sütte siklopiazonik asit tespitine yönelik geliştirilen kapiler elektroforez metodunda tespit limit 20 ppb ve geri kazanım oranı % 78-81 olarak belirlenmiştir (Prasongsidh ve diğ., 1998).

Keçi peyniri örneklerinde Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR/FTIR) ile siklopiazonik asitin hızlı bir şekilde tayini üzerine yapılan bir çalışmada özellikle büyük miktardaki örneklerin kalitatif ve yarı kantitatif analizlerinde kullanılmasına uygun olduğu belirlenmiştir. Metodun uygulamasında örneğin hiçbir ön işlem gerektirmemesi ile de izleme çalışmalarında kullanılmak üzere başarılı olduğu belirtilmiştir (Monaci ve diğ., 2007).

Çeşitli gıdalarda ve fungal kültürlerde siklopiazonik asit analizleri için kullanılan diğer metot da yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir (HPLC). Metodun tespit limiti uygulanan gıda tipine ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine göre değişmekle beraber 0,25 ile 16 ppb arasındadır.

Siklopiazonik asit için herhangi bir standart referans metot mevcut değildir. Bundan dolayı araştırmacılar ihtiyaca göre metot geliştirmektedirler.

Çizelge 4.3 : Siklopiazonik asit analizlerinde kullanılan yöntemler.

Yöntem	Örnek	Ekstraksiyon	LOQ ¹ (ng/g)	LOD ² (ng/g)	Kaynak
TLC	Yer fıstığı, Mısır	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	150	125	Lansden, 1986
TLC	Yer fıstığı	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	- ³	26	Lansden ve Davidson, 1983
TLC	Peynir	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	-	20	Le Bars, 1990
TLC	Fungal Kültür	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	-	-	Hermansen ve diğ., 1984
Spektrofotometre	Hayvan yemi	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, kolon kromatografisi	160	80	Chang-Yen ve Bidasee, 1990
HPLC	Mısır	Katı faz ekstraksiyonu	100	-	Goto ve diğ., 1987
HPLC	Kümes hayvanı eti	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, minikolon	16	16	Norred ve diğ., 1987
HPLC	Mısır, Yer fıstığı	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu	50,100	-	Urano ve diğ., 1992
HPLC	Fungal Kültür	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	-	0,3	Matsuda ve Sasaki, 1995
HPLC	Fungal Kültür	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	-	0,25	Sobolev ve diğ., 1998
HPLC	Fungal Kültür	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	-	1,25	Monaci ve diğ., 2002
HPLC	Peynir	Katı faz ekstraksiyonu	-	7	Zambonin ve diğ., 2001
HPLC	Mısır gevreği	-	7	-	Aresta ve diğ., 2003
HPLC	Mısır ve pirinç	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	25	-	Hayashi ve Yoshizawa, 2005
HPLC	Domates ürünleri	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	8	-	Da Motta ve Valente Soares, 2001

Çizelge 4.3 (devam) : Siklopiazonik asit analizlerinde kullanılan yöntemler.

Yöntem	Örnek	Ekstraksiyon	LOQ ¹ (ng/g)	LOD ² (ng/g)	Kaynak
Kapilar Elektroforez	Süt	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu	-	-	Prasongsidh ve diğ., 1998
LC/MS-MS	Hayvan yemi, pirinç, buğday, yer fıstığı	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	20	5	Moldes-Anaya ve diğ., 2009
ELISA	Mısır, hayvan yemi, yer fıstığı	Yok	-	100, 300, 600	Yu ve Chu, 1998
ELISA	Mısır	Immunoafinite kolon	10	2	Yu ve diğ., 1998
ELISA	Yer fıstığı	Immunoafinite kolon	10	2,5	Dorner ve diğ., 2000

¹: Ölçüm limiti

²: Tespit limiti

³: Değer belirtilmemiştir

5. β -NİTROPROPİONİK ASİT VE ÖZELLİKLERİ

5.1 β -Nitropropionik Asit Üreticisi Küfler Ve β -Nitropropionik Asit Biyosentezi

β -Nitropropionik asit (BNP) başlıca *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ve nadir olarak da *Arthrimum* spp. türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Scott, 2004). BNP ilk olarak 1920 yılında Gorter tarafından hiptagenik asit olarak Javanese ağacının kökünden izole edilerek tanımlanmış ve bu bilgi 1949 yılında Carter ve McChesney tarafından doğrulanmıştır. BNP ayrıca *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium atrovenetum*, *Arthrimum sacchari*, *Arthrimum saccharicola* ve *Arthrimum phaeospermum* tarafından da üretilmektedir (Bush ve diğ., 1951; Bhatnagar ve Garcia, 2001; Burdock ve diğ., 2001). Gıdalarda bulunmayıp yalnızca toprakta bulunan *Penicillium atrovenetum* tarafından 2000 mg/l düzeyinde üretildiği belirlenmiştir (Frisvad ve diğ., 2006). Bazı kaynaklarda *A. parasiticus* tarafında da üretildiği belirtilmektedir (Desphande, 2002). 1982-1987 yılları arasında, 10 adet toksin içeren şeker kamışı örneğinden 442 adet *Arthrimum* suşu izole edilmiş ve bu şuşların toksijeniteleri deneysel olarak araştırılmıştır. İzolatların % 40,7'sinin β -nitropropionik asit üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Liu ve diğ., 1992).

Arthrimum spp. türleri ile yapılan bir başka çalışmada türler ve hatta aynı türün farklı suşları arasında β -nitropropionik asit üretimi açısından önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir (Wei ve diğ., 1994). *Arthrimum* suşlarının β -nitropropionik asit üretim miktarları Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Kinosita ve diğ. 1968 yılında Japonya'da katsuobushi, miso ve soya satış yerlerinden örnek alarak, *A. oryzae*, *A. sojae*, *Penicillium cyclopium* izole etmişler ve bu küf türlerinin besiyerinde BNP üretimini incelemişlerdir. *A. sojae*'nin 0,4 mg/ml ile en yüksek üretici olduğu belirlenmiştir (Burdock ve diğ., 2001). Iwasaki ve Kosikowski (1973), 18 adet referans kültürün sıvı besiyerinde toksin üretimlerini incelemişler ve Çizelge 5.1'de görüldüğü gibi yalnızca 5 suşun tespit edilebilir düzeyde β -nitropropionik asit ürettiğini kaydetmişlerdir.

Starter kültür olarak kullanılan *A. oryzae* suşlarının toksin üretimi üzerine yapılan bir başka çalışmada 16 suşun hiçbirisi aflatoksin üretmezken 7 adedinin 1,9 ile 43,6 mg/l düzeyinde β -nitropropionik asit ürettiği, suşların 3 adedinin siklopiazonik asiti de birlikte ürettiği belirlenmiştir (Orth, 1977).

A. oryzae, *A. flavus*, *A. niger*, *A. sojae* ve *Penicillium roqueforti* referans suşlarının sıvı besiyerinde 34°C’de 7 gün inkübasyon sonunda β -nitropropionik asit üretimlerinin araştırıldığı bir çalışmada *A. oryzae* suşunun 55 ppm, *A. flavus* suşunun ise 1 ppm düzeyinde β -nitropropionik asit üreticisi olduğu kaydedilmiştir (Gilbert ve diğ., 1977).

Çizelge 5.1 : Bazı küf suşlarının besiyerinde BNP üretimleri.

Küf Türü	BNP (mg/l)	Kaynak
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 11494	1	
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 12892	1279	Iwasaki ve
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 7252	40	Kosikowski,
<i>Aspergillus oryzae</i> Higati	111	1973
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 11500	17	
<i>Arthriniun sacchari</i> ATCC 76289	716	
<i>Arthriniun sacchari</i> ATCC 76290	295	
<i>Arthriniun sacchari</i> ATCC 76981	1716	
<i>Arthriniun phaeospermum</i> ATCC 24357	1620	Wei ve diğ.,
<i>Arthriniun phaeospermum</i> ATCC 76291	1593	1994
<i>Arthriniun terminalis</i> ATCC 24358	692	
<i>Arthriniun aureum</i> ATCC 56042	1211	
<i>Arthriniun sereasensis</i> ATCC 76309	1527	
<i>Penicillium roqueforti</i> (Cornell Üniversitesi)	-	
<i>P. roqueforti</i> (Cornell Üniversitesi)	-	
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 12892	55	
<i>Aspergillus flavus</i> NRLLA-17-379	1	
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 9362	-	Gilbert ve diğ.,
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 11494	-	1977
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 14895	-	
<i>A. niger</i> NRLLA	-	
<i>A. sojae</i> (Cornell Üniversitesi)	-	

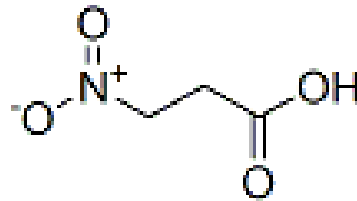
Wei ve diğ. (1994), *Arthriniun* türleri ile yaptıkları çalışmada β -nitropropionik asit üretimi için optimum sıcaklığı 24°C ve pH’yı ise 5 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada 14 gün inkübasyon ve inkübasyon sırasında çalkalamalı etüv kullanımının toksin miktarını arttırdığı kaydedilmiştir.

β -nitropropionik asit sadece küfler tarafından üretilmemektedir. Bitkiler aleminden Leguminosea ailesine ilave olarak Malpighiaceae, Corynocarpaceae ve Violaceae ailelerine dahil bazı türlerde de varlığı bildirilmiştir. Bu bitki türleri özellikle meralarda bulunmak suretiyle hayvanlar tarafından alınarak akut problemler oluşmaktadır. Küfler yalnızca β -nitropropionik asit üretirken, bazı bitkiler tarafından hem β -nitropropionik asit hem de bunun ester formları üretilmektedir (Burdock ve diğ., 2001).

β -Nitropropionik asitin biyosentezi üzerine yapılan az sayıda çalışma, *Penicillium atrovenetum* ile yürütülmüştür. Yapılan çalışmalarda aspartik asit'in içerdiği amino grubu ve karbon yapısıyla β -nitropropionik asit üretiminin prekürsörü olduğu tespit edilmiştir. (Shaw ve Wang, 1964). *Penicillium atrovenetum* ile yapılan çalışmalarda besiyerinde nitrojen kaynağı olarak amonyum varlığında toksin üretiminin arttığı fakat Czapek Dox gibi nitrat içeren besiyerinde toksin üretiminin azaldığı bildirilmiştir (Shaw ve De Angelo, 1969).

5.2 β -Nitropropionik Asit'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

3-Nitropropionik asit, hiptagenik asit, bovinosidin, beta-nitropropionik asit gibi isimler de verilen β -nitropropionik asit 65-67°C erime noktasına sahip beyaz renkli kristal yapıda bir bileşiktir. *Streptomyces* bakteri türleri tarafından üretildiği belirlenen bileşik bovinocidin olarak isimlendirilmiş ve tuberküloz etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* üzerine zayıf etkisi olduğu tespit edilmiştir (Wilson, 1966). Endofitik küf türleri (*Phomopsis* sp.) tarafından üretilen β -nitropropionik asit'in antimikrobiyal özelliği üzerine yapılan çalışmalarda *Mycobacterium tuberculosis* üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği en düşük konsantrasyon 3 μ M olarak tespit edilmiştir (Chomcheon ve diğ., 2005). β -Nitropropionik asitin kimyasal yapısı Şekil 5.1'de görülmektedir.



Şekil 5.1 : β -nitropropionik asitin kimyasal yapısı (Burdock ve diğ., 2001).

BNP içerdği nitro grubuyla küflerin nitro grubu içeren çok az sayıdaki sekonder metabolitlerinden biridir. Biyolojik kaynaklı nitro bileşiklerinden kloramfenikol antibiyotiği bu anlamda en iyi bilinen bileşiktir (Burdock ve diğ., 2001).

5.3 Gıdalarda β -Nitropropionik Asit Varlığı

Özellikle merada beslenen hayvanlarda toksik etkileri olan alifatik nitro bileşiklerden serbest formdaki BNP ve β -nitropropionik asitin esterleri doğal olarak başlıca *Leguminosae* ailesinin *Astragalus*, *Coronilla* ve *Indigofera* cinslerinde *Violaceae*, *Corynocarpaceae* ve *Malpighiaceae* ailelerinde bulunmaktadır (Chomcheon ve diğ., 2005). Bu bileşikler tarafından hayvanlarda şekillenen akut toksisite vakaları önem taşımaktadır. Arjantin’de 32 *Astragalus* türü ile yapılan çalışmada 2000’den 13.000 ppm’e kadar değişen düzeylerde BNP tespit edilmiştir. İran’da yapılan bir çalışmada analizlenen *Astragalus* türlerinin % 8,4’ü 2000-25.000 ppm düzeyinde BNP içerdği tespit edilmiştir (Ebrahimzadeh ve diğ., 1999). İran’da yapılan bir başka çalışmada 78 *Astragalus* türünden 6’sında BNP varlığı tespit edilmiştir (Niknam ve diğ., 2002).

İnsanlar için kaynağı incelendiğinde BNP’nin başlıca iki önemli yolla alındığı görülmektedir. Birincisi özellikle Yeni Zellanda ve Chatnam adası’nda yetişen karaka ağacı meyvesinin çekirdeğidir. Bu çekirdek, fındık benzeri bir çeşit kabuklu yemiş gibi tüketilmektedir. İkinci yol ise özellikle enzim ve fermente gıdaların üretiminde kullanılan ekonomik değeri yüksek olan küflerin oluşturduğu toksin olup, insanlar için tehlike yaratmaktadır (Burdock ve diğ., 2001). Çok sayıda *Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp. türleri uzakdoğuda bazı geleneksel gıdaların (miso, shoyu, katsuobushi) üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Küfler ile üretilen soya sosu ve miso tüketimiyle Japonya’da BNP alımının yaklaşık 5,5 mg/gün olduğu tahmin edilmektedir (Scott, 2004). Bütün bu çalışmaların ışığı altında söz konusu küflerin geleneksel ürünlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılması ile veya gıdaların küfler ile kontaminasyonu neticesinde BNP üretmeleri ile insan vücuduna bu toksin girmektedir. *Arthrimum* türleri tarafından şeker kamışında, *Aspergillus* spp. türleri tarafında da tahıllarda oluşturulmak suretiyle insanlarda zehirlenmelere neden olmaktadır (Scott, 2004).

Peynirde doğal olarak bulunduğu dair çalışmalar mevcuttur (Weidenbörner, 2001). Iwasaki ve Kosikowski tarafından 1973 yılında yapılan çalışmada incelenen 18 peynir örneğinin 5’inde BNP bulunduğu tespit edilmiştir. Gilbert ve diğ. (1977),

tarafından yapılan başka bir çalışmada ise blue, brie, kamember, rokfor gibi 11 farklı peynir türünde BNP varlığı araştırılmış fakat örneklerin hiçbirisinde tespit edilmemiştir.

Aspergillus oryzae ATCC 12892 ile aşılanan peynir, soya, yer fıstığı, çedar peyniri, tatlı patates, muz gibi yaygın olarak tüketilen gıdalarda BNP üretiminin araştırıldığı bir çalışmada 248 mg/kg ile peynirde üretim en yüksek iken 1 mg/kg ile tatlı patates en son sırada yer almaktadır (Penel ve Kosikowski, 1990).

5.4 β -Nitropropionik Asitin Sağlık Üzerine Etkileri

BNP'nin bitkilerde doğal olarak 26.000 ppm gibi çok yüksek miktarlarda bulunması nedeniyle meralarda beslenen çiftlik hayvanlarına etkisinin incelenmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yabani bitkilerin insanlar tarafından tüketimine dair herhangi bir kayıt bulunmazken bu bitkilerle beslenen hayvanlar üzerine olan toksik etkileri iyi bir şekilde belgelenmiştir. Bu çalışmaların yoğun şekilde yapılmasının başlıca sebebi çayırdaki otlayan hayvanların BNP nedeniyle uğradıkları zararın yol açtığı ekonomik kayıplardır. İnsanların BNP'ye maruziyeti yıllardır Yeni Zelanda'da fındık tüketimi, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küflerin fermente ürünlerin üretiminde kullanıldığı miso ve katsobushi tüketimiyle ortaya çıkmaktadır (Burdock ve diğ., 2001).

Çin'de doğru şekilde depolanmamış şeker kamışı tüketimiyle ortaya çıkan toplu akut gıda zehirlenme vakaları MSP (Moldy Sugarcane Poisoning) olarak adlandırılmış ve etiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda, zehirlenme etkeni olarak *Arthrimum sacchari*, *A. saccharicola* ve *A. phaeospermum* türlerinin varlığı ve bu türler tarafından üretilen BNP tespit edilmiştir. 1972-1989 yılları arasında 217 MSP vakası ortaya çıkmış, 884 hastanın 84'ü ölmüştür. Ölümün çoğu çocuklar ve gençler arasında şekillenmiş ve insanlarda zehirlenmeye neden olan en yüksek konsantrasyondaki BNP'nin 6600 mg/kg olduğu belirlenmiştir (Peraica ve diğ., 1999; Burdock ve diğ., 2001; Scott, 2004). 1982-1987 yılları arasında alınan 10 adet zehirli şeker kamışı örneğinden 442 adet *Arthrimum* suşu izole edilmiş ve bu suşların toksijeniteleri deneysel olarak araştırılmıştır. İzolatların % 40,7'sinin BNP üreticisi olduğu kaydedilmiştir (Liu ve diğ., 1992).

BNP'nin etki mekanizması, mitokondride süksinik asit dehidrojenaz enziminin geri dönüşümsüz olarak, fumaraz ve aspartaz enzimlerinin ise geri dönüşümlü olarak inhibisyonu ile açıklanmaktadır. Çok düşük miktarlarda alınsa dahi memelilerin beyinde meydana getirdiği toksisite nedeniyle geri dönüşümsüz hasarlar meydana getirebilmektedir (Szabo ve diğ., 2005). BNP'nin vücutta birikimine dair bir kanıt yoktur (Burdock ve diğ., 2001). BNP'nin karsinojen veya mutajen olmadığı, en önemli özelliğinin beyin üzerine olan nörotoksin etkisi olduğu düşünülmektedir. Ortaya çıkardığı semptomlar nedeniyle Huntington ve Alzheimer hastalıklarının araştırma çalışmalarında model oluşturmada etken madde olarak kullanılmaktadır (Bogdanov ve diğ., 2001; Silva ve diğ., 2001).

Bu mikotoksin'in alımı apne, konvülziyonlar, ciğerlerde tıkanma ve karaciğerde hasara neden olmaktadır (Bhatnagar ve Garcia, 2001). Sindirim yolu ile alınan BNP hızlı bir şekilde kana karışmakta ve solunum sisteminin baskılanması, koordinasyon bozukluğu, kaslarda zayıflama, methemoglobini ve sonunda büyük, küçükbaş hayvanlarda ölüm ortaya çıkmaktadır (Wei ve diğ., 1994). İnsanlarda düşük dozdaki alımları sonucunda akut ensefalopati şekillenmektedir. Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalar motor sinirlerin yavaşladığını göstermiştir (Bogdanov ve diğ., 1998; Szabo ve diğ., 2005).

Alımından 2-3 saat sonra ortaya çıkan klinik semptomları arasında hızlı solunumu takiben apne, koordinasyon bozukluğu, derialtı ve kan damarlarında genişleme ve karaciğerde beneklenme mevcuttur. Erkek ve dişi farelerde oral LD₅₀ dozu 110 ve 68,1 mg/kg vücut ağırlığı şeklindedir (Weidenbörner, 2001). Fareler için LD₅₀ değeri başka bir çalışmada ise 250 mg/kg v.a olarak tespit edilmiştir (Desphande, 2002). Tavşanlarda ve diğer memeli hayvanlarda LD₅₀ değeri daha yüksektir (Burdock ve diğ., 2001).

5.5 β -Nitropropionik Asit İle İlgili Yasal Düzenleme Ve Limitler

Dünyada ve Ülkemizde BNP ile ilgili herhangi bir yasal düzenleme mevcut değildir. Fakat *A. flavus* tarafından aflatoksin B₁, CPA ve kojik asit ile birlikte üretilbildiği düşünülmektedir ve bu mikotoksinlerin memeliler üzerindeki ortak etkisi günümüzde soru işareti olmaya devam etmektedir (Frisvad ve diğ., 2006).

Deney fareleri kullanılarak yapılan kronik toksikoloji çalışmaları sonucunda herhangi bir toksik etkinin görülmediği NOEL (No effect level) değeri erkek fareler için 50 ppm (2,5 mg/kg/gün) ve dişi fareler için 75 ppm (3,75 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir. NOEL değeri dikkate alınarak günlük tolere edilebilir alım miktarı (ADI) hesaplandığında ortalama ağırlığı 70 kg olan bir insan için 25 µg/kg/gün v.a olarak belirlenmiştir (Scott, 2004).

5.6 β-Nitropropionik Asit Tayininde Kullanılan Analitik Metodlar

İnce tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) uygulanan başlıca tekniklerdir.

İnce tabaka kromatografisi ile BNP analizleri *Astralagus miser* var. *seratinus* türlerinde (Majak ve Bose, 1974), lor, soya ve yer fıstığı örneklerinde (Iwasaki ve Kosikowski, 1973), büyükbaş hayvanların rumen sıvısında (Majak ve Clark, 1980) ve *Arthrinium* spp. fungal kültürlerinde (Wei ve diğ., 1994) gerçekleştirilmiştir. İnce tabaka kromatografisinde kullanılan silika jel plakalar diazotize p-nitroanilin reaktifi ile spreylenecek BNP'nin turuncu renk vererek görünür hale gelmesi sağlanmaktadır.

BNP analizlerinde gaz kromatografisinin kullanıldığı bir metod mevcuttur ve metod hem fungal kültürlerde hem de peynir örnekleri üzerinde çalışılarak tespit limiti sırasıyla 1 ve 3 ppm olarak belirlenmiştir (Gilbert ve diğ., 1997).

BNP analizlerinde kullanılan bir diğer metod yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir (HPLC). Bu metod ile plazmada (Muir ve Majak, 1984), idrarda (Majak ve McDiarmid, 1990) ve *Arthrinium* spp. fungal kültürlerinde (Wei ve diğ., 1994) BNP analizleri gerçekleştirilmiştir. HPLC analizleri 210 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılarak yapılmaktadır.

Peynir, tatlı patates, muz gibi bazı gıdalara *A. oryzae* aşılansak BNP üretiminin araştırıldığı bir çalışmada ise analizler spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir (Penel ve Kosikowski, 1990).

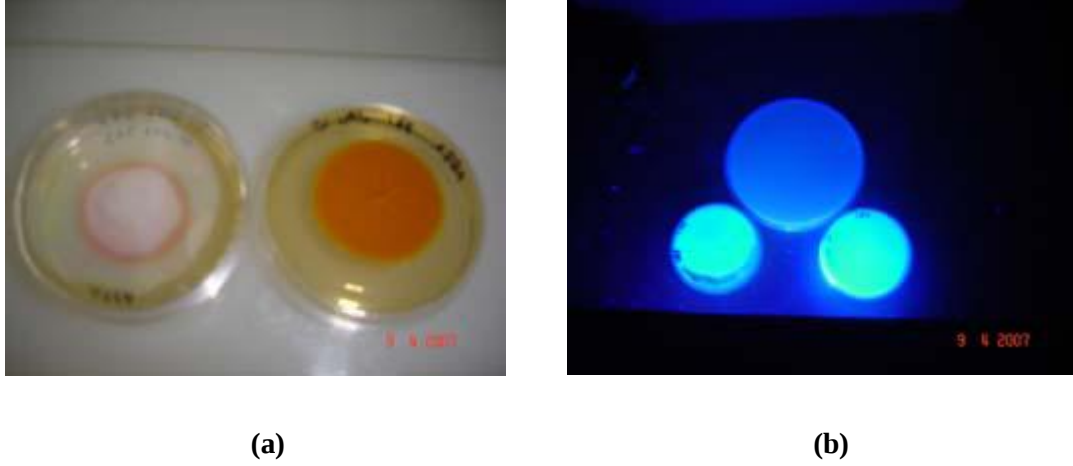
6. *ASPERGILLUS* SECTION *FLAVI* İZOLATLARININ İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ

6.1 *Aspergillus* Section *Flavi* İzolatlarının Geleneksel Yöntem İle İdentifikasyonu

Tarih boyunca küfler ya doğrudan görsel olarak ya da dolaylı olarak geliştikleri gıdalarda meydana getirdikleri etkileri ile tayin edilmişlerdir. Küf identifikasyon çalışmaları geleneksel olarak farklı besiyerleri kullanımıyla koloni özelliklerinin ve küfün mikromorfolojik özelliklerinin tanımlanmasına dayanmaktadır. Özellikle *Aspergillus* section *Flavi* grubundaki türlerin tanımlanmasında morfolojik karakterizasyon, genellikle aflatoksinler ve siklopiazonik asit oluşturma özelliklerinin belirlenerek mikotoksin profillerinin çıkarılması ile desteklenmektedir (Giorni ve diğ., 2007; Rodrigues ve diğ., 2009).

Küflerin identifikasyonu öncelikle bulunduğu ortamdan izolasyonunu gerektirmektedir. Direk ekim ve dilüsyon ekim yöntemleri küflerin tayin ve sayımlarında kullanılan başlıca yöntemlerdir. Bu yöntemlerin uygulanmasında besiyeri seçimi analizin başarısı açısından önem kazanmaktadır. Bunun için genel amaçlı besiyerlerinin yanısıra hedef mikroorganizmayı ayırt edebilmek üzere seçici besiyerleri de geliştirilmiştir. İzole edildikten sonra saflaştırmak için bir dizi kültürel ekim çalışmasının yapılma ihtiyacı da ortaya çıkabilmektedir (Nicholson ve Centre, 2004). Son 20 yıldır araştırmacılar küflerin tayin ve sayım yöntemlerinde kullanılmak üzere seçici ve ayırt edici besiyerleri geliştirmişlerdir. Aflatoksijenik *Aspergillus* türlerini ayırmak için ilk geliştirilen seçici besiyeri *Aspergillus* differential medium (ADM). *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri besiyerinin içindeki demir sitrat nedeniyle oluşturdukları, petri kutusunun tersinde izlenebilen turuncu-sarı renk ile tanımlanmaktadır. Benzer şekilde *Aspergillus flavus-parasiticus* agar (AFPA) besiyerinde *A. flavus* ve *A. parasiticus* ADM'den daha net turuncu-sarı renk oluşturmak suretiyle gıdalarda seçici bir şekilde tayininde kullanılmaktadır (Pitt ve Hocking, 1997). Ek olarak *A. flavus* ve *A. parasiticus*, Coconut agar (CA) besiyerinde verdikleri floresans ışığının farklılığı ile tespit edilebilmekte ve birbirlerinden ayrımları yapılabilmektedir. Coconut agar kullanımı ile aflatoksin

üretimi de belirlenebilmektedir (Davis ve diğ., 1987; Dyer ve McCammon, 1994). Portekiz’de yapılan bir çalışmada bademlerden izole edilen *A. section Flavi* üyesi suşların aflatoksin üretimi Coconut agar besiyerinde izlenmiş ve bulguların HPLC analiz bulguları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Rodrigues ve diğ., 2009). Şekil 6.1’de *A. flavus*’un AFPA ve CA besiyerlerindeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 6.1 : (a) *A. flavus*’un AFPA besiyerinde 25°C’de 7 gün inkübasyon sonrası görüntüsü (b) CA besiyerinde 7 gün inkübasyon sonrası gelişen aflatoksijenik *A. flavus*’un verdiği fluoresans görüntüsü (küçük petri kutuları) (Rodrigues ve diğ., 2007).

Kültürel yöntemlerin yanısıra küflerin identifikasyonunda kullanılan kimyasal ve biyokimyasal yöntemler de mevcuttur. Bu yöntemler küflerin yapısında bulunan ve küflere özgün olan kitin, ergosterol, uçucu maddeler ve ATP gibi bileşiklerin tespit ve miktar tayinine dayanmaktadır. Ergosterol; membran yapısında bulunan bir steroldür ve küf gelişimi ve mikotoksin üretimi ile sterol içeriği arasında iyi bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Castro ve diğ., 2002; Gawrysiak-Witulska ve diğ., 2008). Ergosterol tayininde kullanılan başlıca yöntemler TLC (Naewbanij ve diğ., 1984; Saxena ve diğ., 2001), HPLC (Jedlickova ve diğ., 2008) ya da spektrofotometrik (Borjesson ve diğ., 2007) teknikler olarak sayılabilir. Tahıllarda HPLC kullanılarak ergosterol miktar tayinin metot validasyon çalışması da yapılmıştır (Miyagawa ve diğ., 2009). Kitin ise küf spor ve misellerinde bulunan başlıca polisakkarittir ve kitin ya da kitinin parçalanma ürünleri ile meyve ve sebzelerde misel gelişimi arasındaki korelasyonun da anlamlı olduğu belirlenmiştir (Amalaradjou ve Venkitanarayanan, 2008). Bir çalışmada fıstık örneklerinde *A. parasiticus* kontaminasyonu kitin miktarının analizi ile gerçekleştirilmiştir (Reding ve diğ., 1993).

Küflerin identifikasyonunda kullanılan immunolojik metotlar ise küf antijeninin monoklonal ve poliklonal antikorların kullanımı ile bağlanması prensibiyle çalışan yöntemlerden oluşmaktadır. Immunolojik metotlar arasında en yaygın kullanılan ELISA yöntemi ile tahıl ürünlerinde *A. parasiticus* (Tsai ve Yu, 1999) ve *Aspergillus* türlerinin tayini (Fusheng ve diğ., 2009), üzüm suyunda *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin tayini (Dewey ve Meyer, 2004), mısır ve pirinçte toksijenik *Aspergillus* türlerinin tespiti (Wang ve Yu, 1998), tahıllardan izole edilmiş *A. flavus* ve *A. parasiticus* suşlarının identifikasyonu (Tsai ve Yu, 1997), toz kahve, toz kırmızıbiber ve kanatlı yemlerinde *A. ochraceus*'un varlığının tespitinde (Anand ve Rati, 2006) kullanılmak üzere metotlar geliştirilmiştir. Çizelge 6.1'de *Aspergillus* türlerinin tayininde kullanılan klasik yöntemler gösterilmektedir.

Çizelge 6.1 : Mikotoksijenik *Aspergillus* türlerinin tayininde kullanılan klasik yöntemler.

Tayin Yöntemi	Kaynak
<i>Kültürel Yöntemler (Seçici besiyeri)</i>	
Saboraud agar (% 0,3 cyclodextrin)	Jamiez ve diğ., 2003
Coconut cream agar	Dyer ve McCammon, 1994
<i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> agar (AFPA)	Pitt ve Hocking, 1997
<i>Immunolojik Yöntemler</i>	
ELISA	Tsai ve Yu, 1997 Anand ve Rati, 2006
<i>Spektroskopik Yöntemler</i>	
FTIR-PAS (Fourier transform infrared)	
Spektroskopi-Fotoakustik spektroskopi)	Gordon ve diğ., 1999
Luminesens spektra	Chen ve diğ., 2005
<i>Kromatografik Yöntemler</i>	
Misellar Elektrokinetik Kapılar	
Kromatografi	Martin ve diğ., 2005

Geleneksel identifikasyon teknikleri ile gıdalardan izole edilen mikroorganizmaların tanımlanması elde edilen kültürlerin saflığı ile yakından ilişkilidir. Seleksiyon basamakları ve türlerin makroskopik, mikroskopik morfolojik tanımlamalarının oldukça zaman almasının yanısıra, dezavantajlarının başında zaman ve işgücü kaybına sebep olması, özel çalışma alanlarına ihtiyaç duyulması, bu alanda uzmanlık gerektirmesi ve bu metotların bazıları ile tekrar edilebilir sonuçlar alınamaması gelmektedir. Son yıllarda bu sorunların üstesinden gelebilmek için moleküler tekniklere dayalı hassas ve hızlı identifikasyon yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Amalaradjou ve Venkitanarayanan, 2008).

6.2 *Aspergillus* Section *Flavi* İzolatlarının Moleküler Yöntem İle İdentifikasyonu

Küf türlerinin geleneksel yöntemle identifikasyonu farklı besiyerlerinin kullanıldığı morfolojik ve fenotipik çalışmaları içermektedir. Fakat bu yöntemler zaman, işgücü ve özellikle de her bir sınıf için uzmanlık gerektiren kalifiye eleman ihtiyacı göstermektedir. Ayrıca morfolojik karakterler zaman zaman değişkenlik gösterebilmekte ve dolayısıyla toksin üretimi gibi başka bir özellikte desteklenmesi gerekmektedir. Bunun yansıması geleneksel yöntemler toksijenik ve atoksijenik türlerin ayırımında yetersiz kalmaktadır (Samson ve diğ., 2007). Deoksiribonükleik asit'i (DNA) hedef alan Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR)'a dayalı moleküler teknikler pahalı olmalarına rağmen gün geçtikçe daha iyi bir alternatif olmaktadır. Çizelge 6.2'de *Aspergillus* türlerinin tayininde kullanılan moleküler yöntemler gösterilmektedir.

Çizelge 6.2 : Mikotoksijenik *Aspergillus* türlerinin tayininde kullanılan moleküler yöntemler.

Tayin Yöntemi	Kaynak
PZR	Shapira ve diğ., 1996 Farber ve diğ., 1997 Criseo ve diğ., 2001 Zachova ve diğ., 2003
Yuvalanmış (Nested) PZR	Manonmani ve diğ., 2005
Çoklu (Multiplex) PZR	Sartori ve diğ., 2006
AFLP	Niessen ve diğ., 2005
RAPD	Brandt ve diğ., 1998 Fungaro ve diğ., 2004
Gerçek zamanlı (Real time) PZR	Atoui ve diğ., 2007 Mule ve diğ., 2004
Kantitatif (Quantitative) PZR	Perrone ve diğ., 2006
RFLP	Someshekar ve diğ., 2004

DNA'yı hedef alan PZR'ye dayalı metotlar yüksek spesifiklik ve hassasiyeti ile hızlı tayinler için iyi bir alternatif olmaktadır. Özellikle PZR saf kültüre olan ihtiyacın önüne geçerek analiz süresini kısaltmakta ve gıda örneklerinin analizi 3-4 saat gibi kısa bir süre içinde tamamlanmaktadır (Gonzalez-Salgado ve diğ., 2008). PZR ile saf kültürlerin analizlenmesi de yaygındır fakat genellikle taksonomik, filogenetik sınıflandırma amaçlıdır (Paterson, 2006).

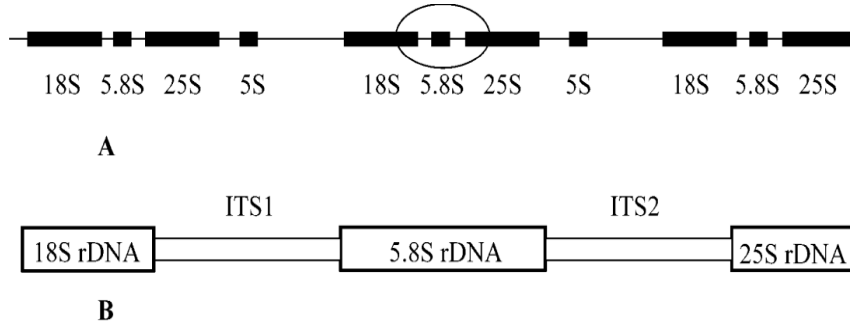
Nükleik asite dayalı diğer metotlar başlıca rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD-Random amplified polymorphic DNA) (Niessen ve diğ., 2005), çoğaltılan

parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP-Amplified fragment length polymorphism) (Niessen ve diğ., 2005), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP-Restricted fragment length polymorphism) (Niessen ve diğ., 2005), gerçek zamanlı kantitatif PZR (Niessen ve diğ., 2005), multiplex PZR (Yang ve diğ., 2004) ve PZR-ELISA (Grimm ve Geisen, 1998) olarak sayılabilmektedir.

Bu metodoloji ana hatlarıyla mikroorganizmadan DNA ekstraksiyonunu, PZR ile amplifikasyonunu, hedef bölge genlerinin klonlanmasını, sekans analizi ve son olarak da filogenetik bir yazılım yardımıyla izole edilen klonların değerlendirilmesinden meydana gelmektedir.

PZR yöntemi amplifikasyona uğrayacak DNA'ya spesifik dizayn edilen primerlere dayanan bir yöntemdir. Yöntem çoğaltılacak bölgenin iki ucuna özgül, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. PZR ile hedef DNA parçasından 10 kb (kilo baz çifti) çoğaltmak mümkün olmaktadır. PZR ürünlerinin karakterizasyonu için kullanılan en yaygın yöntem jel elektroforezdir. Agaroz jel elektroforez, agaroz jel içerisinde elektrik akımı ile DNA parçalarının hareket ettirilmesi prensibi ile çalışır ve DNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrılması sağlanır. Büyüklüğü bilinen bir veya birkaç DNA parçası yardımıyla (marker DNA) elde edilen ürünler kontrol edilmektedir (Fairchild ve diğ., 2006).

PZR kullanılarak DNA amplifikasyonu ile DNA sekans analizleri taksonomik çalışmalarda kullanılan güçlü bir yöntemdir. *Aspergillus* spp. türlerinin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmasında ve filogenetik analizlerde ribozomal DNA genlerinin (rDNA) kullanılması büyük öneme sahiptir. Bunun sebebi rDNA'nın yüksek düzeyde konservatif genlere sahip olması ve ITS bölümleri arasına yerleşmiş olmalarıdır (Henry ve diğ., 2000). Bu genler ökaryot hücrelerin nükleer genomunda birbirini ardı sıra tekrarlayan üniteler şeklindedir. Tekrarlayan her ünite konservatif bölümler ITS 1 ve ITS 2 olarak isimlendirilen iki internal transcribed spacer ile ayrılır. Şekil 6.2'de görüldüğü gibi bir rDNA ünitesi genellikle eksternal transcribed (ETS), 18S rDNA, internal transcribed spacer 1 (ITS 1), 5.8S rDNA, internal transcribed spacer 2 (ITS 2), 28S rDNA ve non transcribed spacer (NTS)'den oluşur (Güzeldag, 2007).



Şekil 6.2 : rDNA gen organizasyon şeması (A) ve daire içine alınan kısmın büyütülmüş şekli (B) (Güzeldağ, 2007).

Aspergillus spp. türlerinin PZR'a dayalı tayin ve identifikasyonları, 18S rDNA, mitokondriyal DNA, intergenic spacer bölgesi (IGS) ve internal transcribed spacer (ITS) bölgelerine dayanmaktadır. Sekans analizi ile rDNA'da 18S ve 28S rDNA genlerinin arasında yerleşmiş internal transcribed region (ITS) baz diziliminin belirlenmesi yaygın olarak son 15 yıldır kullanılmaktadır. Hemen hemen bütün organizmalarda bulunmaları, mutasyona karşı stabil olmaları ve tekrar etmek suretiyle miktarlarının fazla olması nedeniyle hassasiyeti arttırarak diğer moleküler hedeflere nazaran avantaj sağlamaktadır (Hinrikson ve diğ., 2005; Rodrigues ve diğ., 2007; Gonzalez-Salgado ve diğ., 2008). *Aspergillus* spp. türlerinin PZR'a dayalı tayin ve tanımlama sistemlerinin 18S ve 28S rDNA bölgeleri hedef alınarak tasarlanmasında, bu bölgelerin sekanslarının çok sayıda küf için korunaklı bir durumda olması nedeniyle türe özgün primer dizayn edilmesi zorlaşmaktadır. Bundan dolayı daha çeşitli olabilen ITS bölgesinin küf türlerinin identifikasyonunda daha kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır (Sugita ve diğ., 2004).

Yakın akraba olan küf türlerinin ayırımında kullanılan diğer bir yaklaşım ise aflatoksin biyosentezinde görevli anahtar enzimlerin üretimindeki düzenleyici genlerin hedef alınarak araştırılmasıdır. Aflatoksijenik *A. section Flavi* üyelerinin belirlenmesinde kullanılan genler başlıca afl, omt, aflD (nor1), aflQ (ord1=ordA), ver-1, apa-2 ve pksA olarak sayılabilmektedir (Shapira ve diğ., 1996; Somashekar ve diğ., 2004; Manonmani ve diğ., 2005; Rodrigues ve diğ., 2009). Bugüne kadar *A. section Flavi* üyelerinin tayininde PZR kullanımı ile yapılmış çalışmalar *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae* ve *A. sojae* türleri hedeflenerek gerçekleştirilmiştir (Niessen, 2007). *A. bombycis* ve *A. pseudotamarii* üzerine yapılmış çalışmalar henüz kaydedilmemiştir.

7. MATERYAL VE METOT

7.1 Küf İzolatları

Çalışmada materyal olarak 57 adet *Aspergillus* section *Flavi* üyesi küf suşu kullanılmıştır. Suşlar, 2003-2004 yılları arasında Ege Bölgesi'nde kurutma aşamasında toplanan 115 adet incir örneğinden izole edilmiştir. İzolatlar çalışma süresince yatık Malt Eksrakt Agar (MEA-Oxoid) besiyerinde +4°C'de saklanarak kullanılmış ve 6 ay aralıklarla pasajları yapılmıştır.

7.2 Küf İzolatlarının Moleküler Yöntemle İdentifikasyonu

Kuru incir örneklerinden izole edilmiş 57 adet *A. section Flavi* üyesi küf suşunun identifikasyonu moleküler yöntemle PZR kullanılarak yapılmıştır. İzolatların tamamı analizleninceye kadar yatık MEA besiyerinde +4°C sıcaklıkta saklanmıştır.

Küf izolatlarının Potato Dekstroz Agar (PDA) besiyerine 3 nokta ekimleri yapılmış 25°C'de 5 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen küf kolonilerinden 1 cm çapında diskler kesilerek 20 ml Potato Dekstroz Brot (PDB) sıvı besiyeri içeren 30 ml hacimli vida kapaklı tüplere aktarılmış ve çalkalamalı inkübatörde 25°C 150 rpm hızda inkübasyona bırakılmıştır. 2 gün inkübasyon sonunda sıvı besiyeri Whatman No.1 filtre kâğıdından süzülerek uzaklaştırılmıştır (Shapira ve diğ., 1996). Küf miselleri DNA izolasyonunda kullanılmak üzere ependorf tüplerine aktararak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

7.2.1 DNA izolasyonu ve PZR amplifikasyon protokolü

Küf izolatlarının genomik DNA ekstraksiyonu PZR fungal / bakteriyal DNA sistemi (Zymo Research, Orange, CA, USA) ile üretici protokolü doğrultusunda yapılmıştır. Ektrakte edilen tüm genomik DNA örnekleri *Aspergillus* cinsinin 18S ve 28S rDNA (ribozomal DNA) bölgesini çoğaltmak amacıyla dizayn edilmiş ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer çifti kullanılarak PZR (Biometra T professional thermocycler, Goettingen,

Germany) ile çoğaltılmıştır. PZR amplifikasyon protokol basamakları aşağıda verilmiştir: 1 siklus 95°C’de 5 dakika; 30 siklus 95°C’de 1 dakika (denatürasyon), 55°C’de 1 dakika (bağlanma) ve 72°C’de 1 dakika 40 saniye (uzama) ve son olarak 72°C’de 10 dakikadır. DNA’nın çoğaltılmasında PZR reaksiyon hacmi; 1 µl hedef DNA, her bir primerden 1 µl, 5 µl 10 x PZR tamponu, 4 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP (deoksinnükleosid trifosfat) ve 0,5 µl Taq DNA polimeraz enzimi içermek suretiyle toplam 50 µl’dir. Bu protokol ile yaklaşık olarak 600 baz çifti (bp) büyüklüğünde DNA bölgesi çoğaltılmıştır.

7.2.2 Agaroz jel elektroforezi

Hem DNA izolasyonu hem de PZR amplifikasyonu sonrası ürünlerin kontrolü agaroz jel elektroforezde yürütülerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri buz içerisinde bekletilmiştir. 0,5 g agaroz, 50 ml TBE (45 mM Tris-borat ve 1 mM EDTA) içerisinde 1,5 dakika mikrodalgada ısıtılarak eritilmiş ve 50°C’ye soğuyan jele 2,5 µl etidyum bromür ilave edilip tarak yerleştirildikten sonra jel aparatına dökülerek donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra ilk göze 2-3 µl kadar DNA izolasyon ürünlerinin kontrolü için Lambda/HindIII Marker DNA ve PZR amplifikasyon ürünlerinin kontrolü için ise PhiX174 DNA/BsuRI HAEIII Marker DNA, diğer gözlemlere ise 1 µl boya ve 5 µl örnek karıştırılarak yüklenmiş ve 15 dakika süreyle 120 volt akım uygulanarak elektroforez gerçekleştirilmiştir.

7.2.3 Sekans analizi

DNA amplifikasyonundan sonra dizi analizi (sekans analizi) ABI PRISM 3100-Avant marka otomatik sekans analizatörü kullanılarak yapılmıştır. 18S sekans analizleri için ITS 1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) veya ITS 4 (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) primerlerinden birisi kullanılmıştır. Sekans dizilimi Finch TV (Versiyon 14) yazılım programı ile tespit edilmiştir. Bu şekilde Electropherogram veri kalitesi görsel anlamda teyit edilerek sekansların manuel olarak tespiti sağlanmıştır. Küf izolatlarının identifikasyonu, kısmi 18S rDNA’ya ait olan sekans dizilim sonuçlarının BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizleri NCBI (GenBank USA) gen bankasındaki mevcut Gen Bank koleksiyonunda bilinen ribozomal sekans sonuçları ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir (Kumar ve diğ., 2004).

7.3 K f İzolatlarının Besiyerinde Mikotoksin Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen 57 adet *A. section Flavi* k f suşunun besiyerinde aflatoksin ve siklopiazonik asit (CPA) oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC),  -nitropropionik asit (BNP) oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde ise ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılmıştır.

7.3.1 Spor süspansiyonlarının hazırlanması

İdentifiye edilen *A. section Flavi* saf kültürlerinden yatık MEA besiyerine alınmış ve 25 C’de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplerde daha önceden hazırlanmış olan steril 10 ml % 0,05 Tween 20  z ltisine aseptik şartlarda steril bir öze yardımıyla agarı zedelemeyen k f sporları aktarılmış ve tüpler t p karıştırıcıda karıştırılmıştır. K f sporları Thoma lamı kullanılarak mikroskopun 40’lık objektifi altında sayılmıştır. $1-5 \times 10^6$ cfu/ml olacak şekilde hazırlanan spor süspansiyonlarından seçilen besiyerine tek spor olacak şekilde ekimleri yapılmıştır.

7.3.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile aflatoksin tayini

A. section Flavi izolatlarının besiyerinde aflatoksin oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde aflatoksin üretimini en iyi şekilde sağlayan Yeast Ekstrakt Sukroz Agar (YES) besiyeri kullanılmıştır (Bragulat ve diğ., 2001; Klich, 2007). YES besiyeri 55 mm çapındaki petri kutularına 5 ml olacak şekilde döküldükten sonra *Aspergillus section Flavi* izolatlarının % 0.05 Tween 20  z ltisinde $1-5 \times 10^6$ cfu/ml olarak hazırlanan spor süspansiyonundan tek spor olacak şekilde merkezi tek nokta ekim yapılmış ve 25 C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra sonra başlıca Stroka ve diğ. (2000) ve AOAC 999.07 (AOAC, 2000)’de belirtilen yöntemler izlenmiştir.

7.3.2.1 Aflatoksin standartlarının hazırlanması

1 ml’lik ampul aflatoksin standardı (Supelco; 46304-U) metanol içerisinde    n m ş olarak 0,3  g/ml aflatoksin B₂, G₂ ve 1  g/ml aflatoksin B₁, G₁ içermektedir. Aflatoksin standardının 0,5 ml’si alınarak 5 ml’lik balon jojede metanolla seyreltilmiş ve 2. aşama standart  z ltisi hazırlanmıştır. HPLC’de kalibrasyon grafiğinin çizilebilmesi için kalibrasyon  z ltileri, 2. aşama standart  z ltisinden

gerekli miktarların alınarak balon jodede metanol:su (20:30, HA) ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Herbir toksin için 7 farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon çözeltilerinin içerdikleri aflatoksin miktarları Çizelge 7.1’de görülmektedir. Hazırlanan standart çözeltilerinin HPLC enjeksiyonları 3 paralelli olarak yapılmıştır. Lineer regresyon $y=ax+b$ kullanılarak kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2), G_2 0,99955; G_1 0,99978; B_2 0,99892 ve B_1 için 0,99877 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 7.1 : Aflatoksin kalibrasyon çözeltileri ve içerdikleri toksin miktarları.

Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonu (ng/ml)				2. aşama std. (µl)	MeOH (µl)	Saf su (µl)
B_1	B_2	G_1	G_2			
0,40	0,12	0,40	0,12	20	1980	3000
1,00	0,30	1,00	0,30	50	1950	3000
2,00	0,60	2,00	0,60	100	1900	3000
3,60	1,08	3,60	1,08	180	1820	3000
7,20	2,16	7,20	2,16	360	1640	3000
10,80	3,24	10,80	3,24	540	1460	3000
14,40	4,32	14,40	4,32	720	1280	3000

7.3.2.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi

Aflatoksin B_1 , G_1 , B_2 ve G_2 ’nin besiyerinde geri kazanım oranlarının belirlenmesi amacıyla 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan toksin çözeltileri besiyerlerine ilave edilmiş, 25°C’de 24 saat karanlıkta bekletildikten sonra analize alınmıştır (Bragulat ve diğ., 2001). Örnekte aflatoksin konsantrasyonu B_1 ve G_1 için 15 ng/ml; 30 ng/ml; 60 ng/ml; B_2 ve G_2 için ise 4,5 ng/ml, 9 ng/ml, 18 ng/ml olacak şekilde standart ilave edilmiştir.

7.3.2.3 Aflatoksin ekstraksiyonu

Aflatoksin analizlerinde Stroka ve diğ. (2000) ve AOAC 999.07 (AOAC, 2000)’de belirtilen yöntemler uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik veya HPLC kalitededir, kullanılan immunoafinite kolonları (Aflatest®) Vicam firmasından temin edilmiştir. Önceden aseton’dan (teknik) geçirilmiş ve 200°C’deki sterilizatörde 4 saat boyunca sterilize edilmiş cam kavanozlara petri içerikleri boşaltılarak üzerine 1 g sodyum klorür (NaCl) ve 60 ml metanol:su (80:20, HA) ilave edilerek mekanik çalkalayıcıda 60 dakika süreyle 150 rpm hızda çalkalanmıştır. Karışım Whatman No 4 filtre kağıdından süzölmüştür. Immunoafinite kolonda (IAK) saflaştırma işleminden önce kolonun koşullandırılması fosfat tampon çözeltisi (PBS)

kullanılarak yapılmıştır. PBS 900 ml ultra saf su içerisine 0,2 g potasyum klorit, 0,2 g potasyum dihidrojen fosfat, 1,16 g susuz disodyum hidrojen fosfat ve 8 g sodyum klorit ilave edilerek çözündürüldükten sonra 0,1 M hidroklorik asit (HCl) veya 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak pH 7,4'e ayarlanarak ve ultra saf su ilavesi ile çözelti hacmi 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. 15 ml PBS geçirilerek koşullandırılmış immunoafinite kolondan önce 1,5 ml filtrat ve sonra 9 ml PBS dakikada 2-3 ml hızda geçirilmiştir. Ardından kolon 15 ml saf su geçirilerek yıkanmıştır. Kolon 10 ml'lik tüpe alınarak üzerinden 500+750 µl metanol yerçekimi yardımıyla geçirilmiş ve üzerine 1750 µl saf su ilave edilerek HPLC ile analiz edilmiştir.

7.3.2.4 Aflatoksin analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) koşulları

Aflatoksin analizlerinde kullanılan Agilent 1100 serisi HPLC cihazının özellikleri ve koşulları; tespit eksitasyon dalga boyu 360 nm (λ_{ex}) ve emisyon dalga boyu 420 nm (λ_{em})'dir. Floresans dedektör ile ayırım ise ODS-C18 250 mmx4,6 mm, 5 µm partikül çaplı ters faz kolonda (Hypersil) gerçekleştirilmiştir. Mobil faz 110 µL % 65'lik nitrik asit ve 132 mg potasyum bromid (KBr) ilave edilmiş su/asetonitril/metanol (60+20+30, HA) karışımı olup akış hızı 1 ml/dak'dır. KBr ile kolon sonrası türevlendirme KoBra-cell (Rhone Diagnostic, Glasgow, UK) ile 100 µA akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Örnek enjeksiyon hacmi 100 µl'dir. Kolonda alıkonma süreleri aflatoksin B₁ için yaklaşık 11 dakika, aflatoksin B₂ için 9 dak., aflatoksin G₁ için 8 dak ve aflatoksin G₂ için 7 dak.'dır. Mobil faz ve enjeksiyon çözgeni kullanılmadan önce Sartolon 25006-47-N (0,45 µm) filtre ile süzölmüştür. Veriler Chemstation 3D yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Miktar hesabı denklem 7.1'e göre yapılmıştır.

$$\text{ng AF/g} = C_{\text{smp}} \times S \times E / (W \times A) \quad (7.1)$$

C_{smp} : Enjeksiyonda HPLC'de okunan AF miktarı (ng/ml)

S: Ekstrakt çözgeninin hacmi (ml)

E: Immunoafinite kolondan örnek toplama hacmi (ml)

W: Örnek ağırlığı (g)

A: Immunoafinite kolondan geçirilen miktar (ml)

7.3.3 HPLC ile siklopiazonik asit tayini

A. section *Flavi* izolatlarının besiyerinde siklopiazonik asit (CPA) oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde CPA üretimini en iyi şekilde desteklediği

belirlenmiş Czapek Yeast Ekstrakt Agar (CYA) besiyeri kullanılmıştır (Bragulat ve diğ., 2001). 55 mm çaplı petrilere 5 ml CYA dökülerek hazırlanan besiyerlerine bölüm 7.3.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan spor süspansiyonlarından tek spor olacak şekilde merkezi tek nokta ekim yapılmış ve 30°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra sonra başlıca Urano ve diğ. (1992), Hayashi ve Yoshizawa (2005) belirtilen yöntemler izlenmiştir.

7.3.3.1 Siklopiazonik asit standartlarının hazırlanması

Toz haldeki CPA (Sigma C1530, $\geq$ % 98 saflıkta) standardına 4 ml metanol ilave edilerek yaklaşık 10 µg/ml konsantrasyonunda CPA stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonu spektrofotometre kullanılarak tespit edilmiştir. Spektrofotometrenin kalibrasyonu AOAC 970.44’deki aflatoxin standart çözeltisinin hazırlanması için önerilen yöntem kullanılarak yapılmıştır (AOAC, 2000). Potasyum dikromatın 0,009 M sülfürik asit içerisinde 0,25 mM, 0,125 mM ve 0,0625 mM çözeltileri hazırlanmış ve 285 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri (A) ölçülmüş ve herbir konsantrasyon için molar absorptivitesi [$\epsilon = (A \times 1000) / \text{konsantrasyon (mM)}$] hesaplanmıştır. Ölçüm sonunda elde edilen üç ϵ değerinin ortalaması kullanılarak düzeltme faktörü (correction factor, CF = 3160 / ϵ) bulunmuştur (Bu faktörün 0,95’ten küçük ve 1,05’ten büyük olması durumunda kullanılan cihaz veya tekniğin kontrol edilmesi gereklidir). Spektrofotometrenin kalibrasyonu tamamlandıktan sonra CPA stok çözeltisinin de aynı dalga boyunda absorpsiyon değeri ölçülmüş ve çözeltinin konsantrasyonu $\mu\text{g CPA/ml} = (A \times \text{Molekül ağırlığı (CPA)} \times 1000) / \epsilon$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denkleme göre hazırlanan iki farklı stok çözeltisinin konsantrasyonu 10,48 µg/ml ve 12,15 µg/ml olarak hesaplanmıştır. CPA stok çözeltileri karanlıkta ve -18°C’de muhafaza edilmiştir.

Stok çözeltiden 10 µg/ml konsantrasyonunda enjeksiyon çözgeni olan asetonitril:0,05 M amonyum asetat tampon çözeltisi (80:20, HA) içerisinde 2. aşama standart çözeltisi hazırlanmıştır. 7 farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon çözeltilerinin içerdikleri CPA miktarları Çizelge 7.2’de görülmektedir. Hazırlanan standart çözeltilerinin HPLC enjeksiyonları 3 paralel olarak yapılmıştır. Lineer regresyon $y=ax+b$ kullanılarak kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2) CPA için 0,99854 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 7.2 : CPA kalibrasyon çözeltileri ve içerdikleri toksin miktarları.

Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonu (ng/ml)	Çalışma standardından alınan miktar (µl)	Enjeksiyon çözgeni miktarı (µl)
50	25	4975
100	50	4950
200	100	4900
500	250	4750
750	375	4625
1000	500	4500
5000	2500	2500

7.3.3.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi

CPA'nın besiyerinde geri kazanım oranlarının belirlenmesi amacıyla 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan toksin çözeltileri besiyerlerine ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat karanlıkta bekletildikten sonra analize alınmıştır (Bragulat ve diğ., 2001). Örnekte 50 ng/ml; 100 ng/ml; 200 ng/ml ve 500 ng/ml konsantrasyon düzeyinde CPA olacak şekilde ilave edilmiştir.

7.3.3.3 Siklopiazonik asit ekstraksiyonu

Siklopiazonik asit ekstraksiyonunda kullanılan yöntem sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemidir ve Urano ve diğ. (1992), Hayashi ve Yoshizawa (2005)'da belirtilen yöntemler esas alınarak uygulanmıştır. Çalışmada analitik veya HPLC kalitede kimyasal maddeler kullanılmıştır. Petri içerikleri önceden aseton (teknik) ile çalkalanmış ve 200°C'deki sterilizatörde 4 saat boyunca steril edilmiş cam kavanozlara boşaltılarak üzerine 100 ml MeOH:% 2 NaHCO₃ (70:30, HA) ilave edilerek mekanik çalkalayıcıda 60 dakika süreyle 150 rpm hızda karıştırılmıştır. Karışım Whatman No 1 filtre kağıdından süzölmüştür. Süzüntüden 50 ml ayırma hunisine alınarak üzerine 50 ml hekzan ilave edilmiş, 1 dakika yavaşça çalkalandıktan sonra fazların ayrılması beklenmiştir. Alt faz başka bir ayırma hunisine aktarılmış üzerine 50 ml % 10'luk KCl çözeltisi eklenerek 6 N HCl ile pH'sı 2'ye ayarlanmıştır. Son olarak ayırma hunisi kullanılarak iki defa 50 ml kloroform ile ekstraksiyon yapılmıştır. Kloroformlar birleştirilip 10 g susuz sodyum sülfat bulunan kaba filtre kağıdından süzülerek balon içerisinde toplanmış ve 40°C'de döner buharlaştırıcıda uçurulmuştur. Ardından balonlar 4 ml kloroform ile yıkanarak ekstraktlar tüplere aktarılmış ve kloroform azot gazı altında uçurulmuştur. Tüp içerisindeki kalıntı 3 ml mobil faz içinde çözülmüş ve HPLC enjeksiyonları yapılmıştır.

7.3.3.4 Siklopiazonik asit analizi HPLC koşulları

Siklopiazonik asit analizlerinde kullanılan Agilent 1100 serisi HPLC cihazının özellikleri ve koşulları şöyledir. Analiz mobil faz olarak asetonitril:amonyum asetat buffer (0,05 M, pH 5) (80:20, HA); DAD dedektör (279 nm), LiChrosorb -NH₂ 250 mmx2,1 mm, 5 µm partikül çaplı kolon (Supelcosil) kullanılarak 1 ml/dak akış hızı ile 250C’de gerçekleştirilmiştir. Amonyum asetat buffer’ın pH’sı asetik asit veya amonyak kullanılarak ayarlanmıştır. Örnek enjeksiyon hacmi 20 µl’dir. Kolonda alıkonma süresi yaklaşık 5 dakikadır. Mobil faz ve enjeksiyon çözgeni kullanılmadan önce Sartolon 25006-47-N (0,45 µm) filtre ile süzölmüştür. Veriler Chemstation 3D yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Miktar hesabı denklem 7.2’ye göre yapılmıştır.

$$\text{ng CPA/g} = X \times (\text{Tv/Iv}) \times (1/W) \quad (7.2)$$

X: Enjeksiyonda HPLC’de okunan CPA miktarı (ng)

Tv: Ekstraktın çözöldüğü mobil faz hacmi (µl)

Iv: Enjeksiyon hacmi (µl)

W: Örnek ağırlığı (g)

7.3.4 İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile β-nitropropionik asit tayini

Aspergillus section *Flavi* izolatlarının besiyerinde BNP oluşturma özelliklerinin belirlenmesi Wei ve diğ. (1984)’ne ait ekstraksiyon ve Frisvad ve Thrane (1987)’e göre TLC yöntemlerinin modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların % 0.05 Tween 20 çözeltisinde $1-5 \times 10^6$ cfu/ml olacak şekilde hazırlanan spor süspansiyonundan tek spor olacak şekilde Potato Dekstroz Agar (PDA) besiyerine merkezi tek nokta ekim yapılmış ve 7 gün 25°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen küf kolonisinden yaklaşık 10x10 mm çapında kesilip 100 ml Potato Dekstroz Brot (PDB) sıvı besiyeri içeren tüplere aktarılmış ve 25°C’de tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 7 gün sonunda sıvı besiyeri Whatman No.1 filtre kağıdından süzölmüş ve süzöntünün pH’sı 6 N HCl ile 2-3’e ayarlanmıştır. Ardından süzöntü ayırma hunisine aktararak 100 ml etil asetat ile iki kere ekstrakte edilmiştir. Balon içerisinde toplanan ekstraktlar 10 g susuz sodyum sülfat içeren filtre kağıdından süzölmüş ve süzöntü 40°C’de döner buharlaştırıcıda uçurulmuştur. Balon 4 ml etil asetat ile yıkanarak ekstraktlar tüpe aktarılmış, etil asetat azot gazı altında uçurulmuştur. Kalıntı 2 ml kloroform:metanol (2:1, HA) içerisinde çözöldükten sonra silika jel 60 alüminyum TLC plakalarına (Merck, 5554) 60 µl olarak spotlanmıştır.

Plakalara örnek ekstraktı ile birlikte kantitatif analiz amacıyla hazırlanan BNP stok çözeltisinden de spotlanmıştır. Stok çözelti 10 ppm konsantrasyonunda olacak şekilde toz haldeki BNP (Sigma N5636, $\geq$ % 97 saflıkta) standardının kloroform:metanol (2:1, HA) içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Plakalara örnek ekstraktı ile birlikte miktarın belirlenmesi amacıyla 10 ppm BNP konsantrasyonundaki standart çözeltisinden 1-3-5-7-10 μ l spotlanmıştır. Plakalar toluen-etil asetat-% 90 formik asit (5:4:1, HA) çözgen sistemi kullanılarak geliştirilmiştir.

BNP toksininin gözle görülebilir hale gelmesi için diazotize p-nitroanilin reaktifi [6,5 ml % 2,5 NaNO₂ (su içinde) ve 100 ml % 0,3 paranitroanilin (1 N HCl içinde)] ile sprey edilmiştir. Plakalar kuruduktan sonra sarımsı-turuncu renk oluşturan spotlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Renk şiddetine göre standartlar ile karşılaştırılarak miktar hesabı denklem 7.3'e göre gerçekleştirilmiştir (Bailly ve diğ., 2005; Vaamonde ve diğ., 2006).

$$\mu\text{g BNP/kg} = (\text{S} \times \text{Y} \times \text{V}) / (\text{X} \times \text{W}) \quad (7.3)$$

S: Örnek ekstraktıyla aynı şiddetteki BNP standart miktarı (μ l)

Y: BNP standartının konsantrasyonu (μ g/ml)

V: Örnek ekstraktının seyreltme miktarı (μ l)

X: S miktardaki mikotoksin standartıyla aynı şiddeti veren örnek miktarı (μ l)

W: Ayırma hunisine aktarılan sıvıdaki örnek miktarı

7.4 *Aspergillus* Section *Flavi* Üyelerinin Kuru İncirde Toksin Oluşturma Özelliklerine Sıcaklık Ve Zamanın Etkisinin Belirlenmesi

Kuru incirde *Aspergillus* section *Flavi* üyelerinin aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturma özelliklerine sıcaklık ve zamanın etkisinin incelenmesi amacıyla 5 farklı küf suşu besiyerinde toksin üretim özellikleri dikkate alınarak seçilmiştir. Seçilen suşların özellikleri sırasıyla aşağıda listelenmiştir.

- AFB₁, AFB₂ ve CPA'yı farklı miktarlarda üreten 2 adet *Aspergillus flavus* suşu
- AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ üreten 1 adet *Aspergillus parasiticus* suşu
- AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve CPA'yı birlikte üreten 1 adet *Aspergillus parasiticus* suşu
- Yalnızca CPA üreten 1 adet *Aspergillus tamarii* suşu

Seçilen kf suşları ile aşılanan incir rnekleri 20°C, 25°C, 27,5°C, 30°C, 35°C ve 40°C olmak üzere 6 farklı sıcaklıktaki etüvlerde inkübe edilmiş ve 1., 3., 7. ve 14. günlerde aflatoksin ve CPA analizleri gerçekleştirilmiştir.

7.4.1 Örneklerin hazırlanması ve aşılama alışmaları

Aşılama çalışmalarında kullanılmak üzere Ege Bölgesi'nden temin edilen incir örneklerinde aflatoksin ve CPA analizleri yapılmış ve negatif olduğu belirlenen incir örnekleri kıyma makinesinden geçirilerek % 50 oranında steril su ile stomacher cihazında (Stomacher 400, Seward Medical) homojenize edilmiştir. Homojen incir örneklerine 6 Kilogray (kGy) düzeyinde ışınlama uygulanmış (Gama Pak A.ř., erkezky) ve ışınlanan örnekler aşılama çalışmalarında kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır. Aşılama çalışmalarında kullanılacak incir örneklerinin su aktivitesi aseptik koşullarda steril su ile 0,98'e ayarlanmış ve 10 g'lık porsiyonlar halinde petri kutularına dklmştir. Su aktivitesi Decagon Pawkit marka su aktivitesi tayin cihazıyla 25°C sabit sıcaklıkta llmştir. Bölüm 7.3.1'de anlatılan şekilde hazırlanmış spor süspansiyonu ile incir örnekleri aseptik koşullarda $1-5 \times 10^6$ cfu/ml olacak şekilde inoküle edilmiştir. Aşılanan örneklerin 14 gün sürecek inkübasyonu sırasında su aktivitesinin sabit kalması için petri kutuları Tupperware marka kaplar içinde etüv'e yerleştirilmiştir. Kapların içerisinde gliserol ile 0,98 su aktivitesine ayarlanmış steril su kullanılarak ortamın bağıl neminin dengede olması sağlanmıştır. Belirlenen sıcaklıklar ve inkübasyon süreleri sonunda AF ve CPA analizleri gerçekleştirilmiştir.

7.4.2 Kuru incir örneklerinde aflatoksin analizleri

Kuru incir örneklerinde aflatoksin analizi ekstraksiyon aşamasındaki farklılık dışında bölüm 7.3.2'de anlatıldığı gibi HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon, örneklerin paslanmaz elik karıştırıcıda (Waring blender) metanol:su (80:20, HA) zgen sistemi ilavesiyle 3 dakika yüksek hızda karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir.

7.4.3 Kuru incir örneklerinde siklopiazonik asit tayini

Kuru incir örneklerinde siklopiazonik asit tayini birkaç farklılık dışında bölüm 7.3.3'de anlatıldığı gibi HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon, örneklerin paslanmaz elik karıştırıcıda (Waring blender) 40 ml metanol:% 2 NaHCO₃ (70:30, HA) zgen sistemi ilavesiyle 3 dakika yüksek hızda karıştırılması

ile gerçekleştirilmiştir. Whatman No 1'den filtre edilip, hekzan ile yağ ayırımı gerçekleştirilen örnek filtratına 0,05 M kurşun asetat çözeltisinden 10 ml ilave edilmiş ve kaba filtre kâğıdından szldkten sonra sznt 25 ml kloroform ile iki kere ekstrakte edilmiştir. Bunun dışındaki basamaklar metot bölümünde belirtildiği şekilde uygulanmıştır. Kuru incir örneklerinde CPA analizlerinde SHIMADZU 10Avp serisi HPLC cihazı kullanılmıştır.

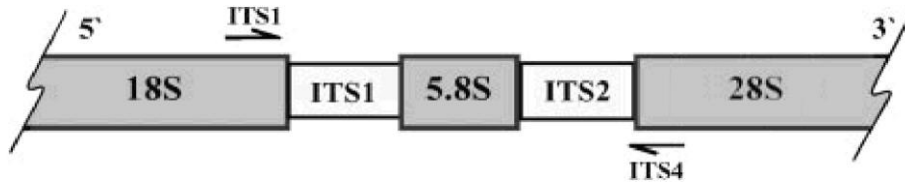
7.5 İstatistiksel Analiz

Seçilen izolatların kuru incirde toksin oluşturma özellikleri tek yollu varyans analizi (ANOVA) testi ile incelenmiştir. İzolatların aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşurmalarına sıcaklık, sürenin etkisi ve aralarındaki ilişki ise faktöriyel (ok faktörlü) desen yöntemi ile incelenmiştir. Değişkenlerin gösterdiği farklılık LSD oklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (Versiyon 17) kullanılarak yapılmıştır.

8. BULGULAR VE TARTIŞMA

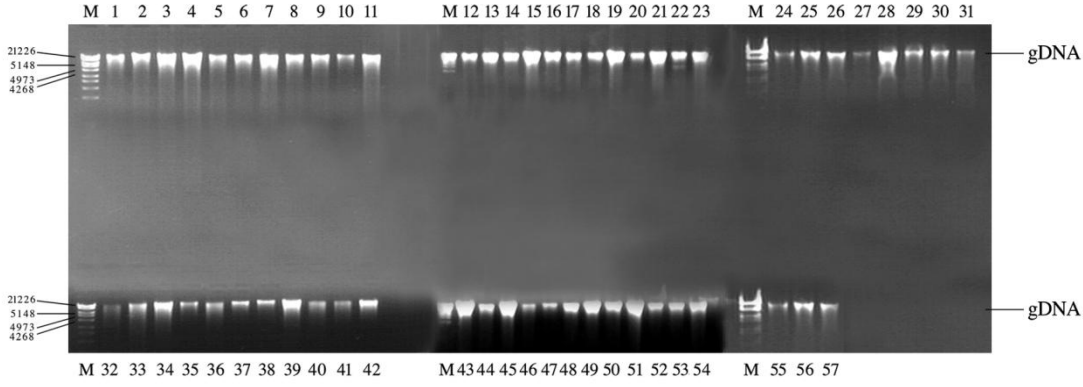
8.1 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen *Aspergillus Section Flavi* Üyelerinin Moleküler İdentifikasyonu

Ege Bölgesi'nde yedi farklı yöreden kurutma aşamasında toplanan kuru incir örneklerinden izole edilmiş 57 adet *A. section Flavi* üyesi izolatın moleküler identifikasyonu için ribozomal deoksiribonükleik asit (rDNA) üzerindeki ITS ve 5.8S bölgelerine yönelik sekans analizleri yapılmıştır. Bu amaçla ITS 1 ve ITS 2 (Internal Transcribed Spacer) bölgeleri ile 5.8S bölgesine özgün olarak tasarlanan primerler kullanılarak sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 8.1'de Ribozomal DNA'da hedef bölgeler ve ITS 1, ITS 4 primerleri görülmektedir.



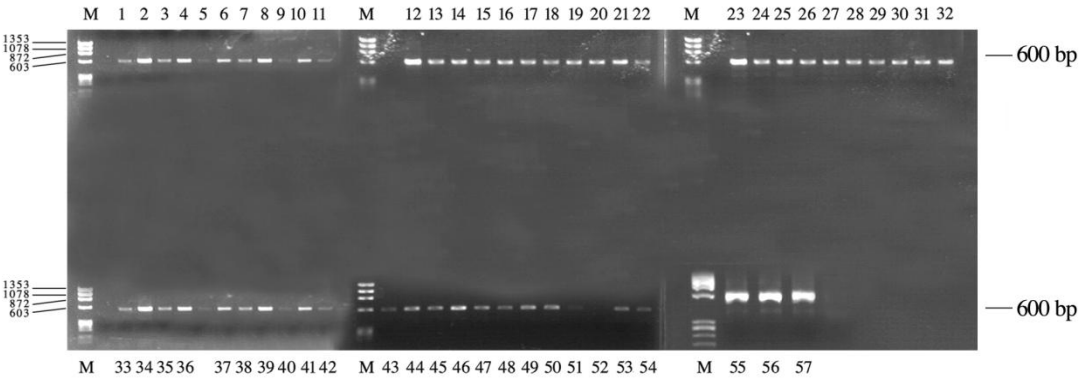
Şekil 8.1 : Çalışmada kullanılan ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile hedef alınan fungal ribozomal DNA'nın şematik görüntüsü (Edwards ve diğ., 2002).

Küf izolatlarının DNA izolasyonu ve Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu bölüm 7.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 8.2'de 57 adet izolatın genomik DNA ekstraksiyonunun PZR ile amplifikasyon işleminin karakterizasyonu amacıyla uygun büyüklükte işaretleyici (marker) DNA kullanılarak yapılan agaroz jel elektroforez fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 8.2 : İzole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sıra M, marker DNA (Lambda/HindIII); Sıra: 1-7; 9-24; 26-28; 30; 32-35; 37-41 ve 43-57 *A. flavus*, Sıra: 8; 25; 31; 36; 42 *A. parasiticus*, Sıra 29 *A. tamarii*).

Genomik DNA izolasyonu sonrasında izolatların ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak yapılan PZR amplifikasyonu sonucunda ITS 1, ITS 2 bölgeleri, 5.8S bölgesinden yaklaşık 600 baz çifti (bp) büyüklüğünde bir parça çoğaltılmıştır. Şekil 8.3'de *Aspergillus* section *Flavi* izolatlarının 600 bp'lik fragmentinin karakterizasyonuna ait agaroz jel elektroforez fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 8.3 : ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak çoğaltılan ITS ve 5.8S bölgelerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı (Sıra M, marker DNA (PhiX174 DNA/BsuRI HAEIII); Sıra: 1-7; 9-24; 26-28; 30; 32-35; 37-41 ve 43-57 *A. flavus*, Sıra: 8; 25; 31; 36; 42 *A. parasiticus*, Sıra 29 *A. tamarii*).

İzolatların ITS ve 5.8S rDNA bölgesine ait 600 bp'lik üniteleri çoğaltıldıktan sonra tanımlanmaları amacıyla dizi analizi bölüm 7.2.3.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Sınıflandırma analizinde ITS 1 ve ITS 2 sekansları temel alınarak çoklu nükleotid dizi analizi gerçekleştirilmiştir. İzolatların nükleotid sekans

dizilimi MEGA sekans analizi programı (Versiyon 4) ile tanımlanmıştır (Kumar ve diğ., 2004). Şekil 8.4’de primer pik değerlerinin ve ait olduğu bazların elektroferogram grafiğine bir örnek görülmektedir.

Şekil 8.4 : Dizi analizi sonrası MEGA sekans analizi programı yardımıyla elde edilen elektroferogram grafiği.

Çizelge 8.1 : Referans kültür olarak kullanılan *Aspergillus* türleri.

Küf izolatlarının ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak belirlenen baz dizilimlerinin referans kültürler ile karşılaştırmasından elde edilen benzerlik oranları Çizelge 8.2’de görüldüğü gibi % 95 ile % 99 arasında değişmektedir. % 95’in altında benzerlik oranına sahip örneklerin analizleri, PZR amplifikasyonu basamağından itibaren tekrar edilmiştir. Mikrobiyal çeşitlilik açısından bakıldığında tüm suşların hem ITS hem de 5.8S bölgelerine ait DNA sekansları ile veritabanındaki sekanslar arasındaki

benzerlik oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Hedef bölgelerin amplifikasyonu sonucu referans kültürler ile farklılığı karşılaştırılan baz çifti sayısı 5’dir.

Çizelge 8.2 : *Aspergillus* section *Flavi* izolatlarının moleküler identifikasyonu.

İzolat Sıra No	Referans Kültüre Benzer Baz Sayısı*		Referans Kültüre Benzerlik (%)	Tür	İzolat Sıra No	Referans Kültüre Benzer Baz Sayısı*		Referans Kültüre Benzerlik (%)	Tür
	ITS 1	ITS 2				ITS 1	ITS 2		
1	3	3	99	<i>A. flavus</i>	30	2	2	98	<i>A. flavus</i>
2	3	3	99	<i>A. flavus</i>	31	2	1	96	<i>A. parasiticus</i>
3	3	3	99	<i>A. flavus</i>	32	2	1	95	<i>A. flavus</i>
4	3	3	99	<i>A. flavus</i>	33	3	2	99	<i>A. flavus</i>
5	3	3	99	<i>A. flavus</i>	34	2	2	97	<i>A. flavus</i>
6	3	3	99	<i>A. flavus</i>	35		4	95	<i>A. flavus</i>
7	3	3	99	<i>A. flavus</i>	36	3	3	99	<i>A. parasiticus</i>
8	3	3	98	<i>A. parasiticus</i>	37	2	3	95	<i>A. flavus</i>
9	3	3	99	<i>A. flavus</i>	38	4	2	99	<i>A. flavus</i>
10	3	3	99	<i>A. flavus</i>	39	3	5	99	<i>A. flavus</i>
11	3	3	99	<i>A. flavus</i>	40	2	2	97	<i>A. flavus</i>
12	3	3	99	<i>A. flavus</i>	41	2	3	97	<i>A. flavus</i>
13	3	3	98	<i>A. flavus</i>	42	1	3	98	<i>A. parasiticus</i>
14	3	3	98	<i>A. flavus</i>	43	1	2	99	<i>A. flavus</i>
15	2	2	95	<i>A. flavus</i>	44	2	2	97	<i>A. flavus</i>
16	2	2	98	<i>A. flavus</i>	45	2	3	99	<i>A. flavus</i>
17	2	2	95	<i>A. flavus</i>	46	2	3	98	<i>A. flavus</i>
18	2	1	96	<i>A. flavus</i>	47	3	2	99	<i>A. flavus</i>
19	2	2	95	<i>A. flavus</i>	48	3	2	99	<i>A. flavus</i>
20	3	1	98	<i>A. flavus</i>	49	2	2	95	<i>A. flavus</i>
21	2	3	98	<i>A. flavus</i>	50	3	3	99	<i>A. flavus</i>
22	3	2	99	<i>A. flavus</i>	51	3	3	98	<i>A. flavus</i>
23	2	2	97	<i>A. flavus</i>	52	2	2	99	<i>A. flavus</i>
24	3	5	99	<i>A. flavus</i>	53	3	2	99	<i>A. flavus</i>
25	3	1	95	<i>A. parasiticus</i>	54	2	1	97	<i>A. flavus</i>
26	3	3	99	<i>A. flavus</i>	55	3	4	99	<i>A. flavus</i>
27	3	2	99	<i>A. flavus</i>	56	2	1	98	<i>A. flavus</i>
28	1	3	95	<i>A. flavus</i>	57	2	2	98	<i>A. flavus</i>
29	3	3	99	<i>A. tamarii</i>					

* Referans kültürler ile karşılaştırılması yapılan baz sayısı toplam 5’dir.

Aspergillus spp. ailesinin cins düzeyinde tayini ve filogenetik analizlerinde 5.8S, 18S, ITS sekansları ve mitokondriyal rDNA’lar sekans verileri açısından sıklıkla tercih edilmektedir. Cins ve tür düzeyinde yapılacak filogenetik çalışmalar için ITS bölümleri en güvenilir metotlardandır. ITS bölgesinin hedef olarak alınmasının

başlıca sebebi genellikle türler arasında sekans farklılıkları göstermesine rağmen aynı türün suşları arasında çok küçük farklılık bulunmasıdır. Küflerin tanımlanmasında ve filogenetik analizlerinde sıklıkla kullanımı tercih edilen ribozomal DNA'daki 18S, 5.8S ve 28S bölgelerindeki genlerin yüksek düzeyde konservatif olması, tekrar ediyor olması, ITS bölümleri arasında konumlanması ve bir genomda yaklaşık 100 kopya bulunmak suretiyle analiz hassasiyetini arttırması gibi nedenlerle diğer hedef bölgelere nazaran avantaj sağlamaktadır (Henry ve diğ., 2000).

Günümüze kadar aflatoksin biyosentezinde görevli genlerin hedef alınarak aflatoksijenik küf türlerinin tayinine yönelik çalışmalar olmasına rağmen Gonzales-Salgado ve diğ.'nin yaptıkları çalışma ITS bölgesi kullanılarak gıdalarda *A. flavus* türlerinin tayininde PZR protokülünün geliştirildiği ilk çalışmadır (Gonzales-Salgado ve diğ., 2008). Bu çalışmada *Aspergillus* türü ile yoğun şekilde kontamine buğday unu örneklerinde PZR kullanarak *A. flavus* tayini için ITS 1-5.8S-ITS 2 bölgesini hedef alan primerler tasarlanmış ve primerler FLA 1 ve FLA 2 olarak isimlendirilmiştir. Primerler kullanılarak yaklaşık 500 bp'lik bir bölge çoğaltılmış ve primerlerin hedef bölgeyi spesifik bir şekilde çoğalttığı belirlenmiştir. *A. flavus* tayini için geliştirilen protokolde dizayn edilen primerler *A. parasiticus* türleri ile çapraz reaksiyona girmemiş ve tür ayrımı gerçekleşmiştir. Fakat geliştirilen protokol ile *A. flavus* ve *A. oryzae* türlerinin ayrımı sağlanamamıştır. Bunun başlıca sebebinin izoenzim analizleri ve DNA hibridizasyon çalışmaları ya da DNA sekans analizi ve tüm genom yapısının karşılaştırmasına dayalı moleküler metotlar ile bu iki türün neredeyse genetik olarak özdeş olduğunun belirlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Hedayati ve diğ., 2007).

Bu çalışmada Gonzales-Salgado ve diğ. (2008) yaptıkları çalışmayla benzer olarak *A. flavus* ile *A. parasiticus* türlerini birbirinden ayırmada hedef bölge ve kullanılan primerler ile güçlük yaşanmamıştır. Fakat özellikle *A. flavus* ile *A. oryzae* ve *A. parasiticus* ile *A. sojae* türlerinin birbirinden ayırımında baz çiftleri arasındaki farkın çok küçük olması nedeniyle güçlük yaşanmıştır. Aradaki farkın 1-2 bp kadar küçük oluşu bazı izolatlarda amplifikasyonun bir çok kez tekrarlanmasına yol açmıştır. Bu durum daha önceki çalışmalarda *A. flavus* ile *A. oryzae* ve *A. parasiticus* ile *A. sojae* türlerinin DNA akrabalığının sırasıyla % 100 ve % 91 olarak belirlenmesi ile açıklanabilmektedir (Rodrigues ve diğ., 2007).

Moleküler teknikler kullanılarak gıdalarda bulunan küflerin identifikasyon yöntemleri yoğun şekilde araştırılmaktadır. Moleküler yöntemlerin saf kültürlerin tanıları ile ilgili uygulamaları, mikoflora çeşitliliğine ve farklı bileşenlere sahip gıdalardaki mikroorganizmaların tanılarına ait uygulamalarından daha kolaydır. De Santi ve diğ. (2010), tarafından bir çeşit İtalyan peynirinde (Fossa peyniri) mikofloranın belirlenmesinde hem moleküler hem de morfolojik teknikler kullanılmıştır. Moleküler olarak rDNA'nın 18S ve ITS 1-5.8S-ITS 2 bölgelerine yönelik primerler kullanılmıştır. Tür düzeyinde yapılan tanımlamada morfolojik tanımlama ile uyumlu bulgular elde edilmiştir. İtalya'da yapılmış bir başka çalışmada vakum paketlenmiş sert peynir ve meyveli yoğurt örneğinde maya ve küf identifikasyonu rDNA'nın 18S bölgesine uygun primerler tasarlanarak 581 bp'lık bir parçanın amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonunda geliştirilen protokol ile 6 farklı maya ve küf tanımlanmıştır (Cappa ve Cocconcelli, 2001). Kakao çekirdeklerinde mikofloranın belirlendiği bir başka çalışmada 5.8S-ITS bölgelerine yönelik ITS 4 ve ITS 5 primerleri kullanılmış ve *A. section Flavi* üyesi olarak *A. flavus* ve *A. tamarii* varlığı belirlenmiştir (Sanchez-Hervas ve diğ., 2008).

Mısır'dan izole edilen *A. flavus* türlerinin PZR ile identifikasyonunda ITS 1-5.8S-ITS 2 bölgeleri kullanılmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak 580 bp uzunluğunda bir bölge çoğaltılmış ve gen veri bankası kullanılarak yapılan karşılaştırma sonucu *A. flavus* referans kültürleri ile olan benzerlik oranlarının % 12 ile % 99 arasında değiştiği belirlenmiştir (Karthikeyan ve diğ., 2009).

ITS 1 ve ITS 2 bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu ile küf türlerinin identifikasyonu tıp alanında çok daha fazla uygulama alanına sahiptir. İnsanlarda aspergillozis'ten sorumlu *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger* ve *A. ustus* klinik izolatlarının belirlendiği bir çalışma 2000 yılında gerçekleştirilmiştir. Yöntemde rDNA'nın ITS 1-5.8S-ITS 2 bölgesi hedef alınarak primer dizaynları gerçekleştirilmiş ve PZR reaksiyonu ile çoğaltılan bölgenin büyüklüğü 565 ile 613 bp arasında olmuştur. Tür düzeyinde identifikasyon için her iki ITS bölgesine de ihtiyaç duyulduğu ve bu şekilde aspergillozisin erken tanısının mümkün olduğu belirlenmiştir (Henry ve diğ., 2000). Tıbbi açıdan önem taşıyan üç *Aspergillus* spp. türünün (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*) ayrımı için yapılan bir başka çalışmada rDNA'nın konservatif ITS 1 bölgesi için her bir türe özgün primerler

tasarlanmıştır. PZR ile yaklaşık 521 bp'lik bir parça çoğaltılmış ve identifikasyonlar başarılı olmuştur (Sugita ve diğ., 2004).

2008 yılında Avusturya'da yapılan bir diğer çalışmada fungus-pozitif 26 hastadan alınan pulmoner infiltrasyon biyopsi örneği, bronkotrakeal salgı, kan, serebrospinal sıvı ve plazma örneklerinden ITS 2 bölgesinin hedef alındığı PZR yöntemi kullanılarak *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Rhizopus oryzae* ve *Fusarium oxysporum* patojen türleri identifiye edilmiştir (Landlinger ve diğ., 2008).

ITS 1-5.8S-ITS 2 rDNA bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu ile *A. section Flavi* üyelerinin birbirinden ayrımı yapılabilmektedir. Fakat bazı çalışmalarda ITS bölgesinin diğer bazı küf türlerinin ayrımında yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Örneğin *Fusarium culmorum* ve *F. graminearum* türlerinin ITS 1 ve ITS 2 bölgelerinde spesifik primerler dizayn edilebilecek kadar farklılık belirlenememiştir (Nicholson ve Centre, 2004).

18S ve ITS rDNA bölgelerinin moleküler identifikasyonda kullanımının en önemli dezavantajı toksijenik ve atoksijenik türlerin bu yöntemle ayrılamamasıdır. Küflerin toksijenik karakterlerinin belirlenmesi için ilave olarak toksin üretiminden sorumlu genlerin hedef alındığı moleküler yöntemlerin uygulanması veya HPLC (Urano ve diğ., 1992; Stroka ve diğ., 2000), LC-MS (Rundberget ve Wilkins, 2002) veya LC-MS/MS (Spanjer ve diğ., 2008) gibi ekipmanlar kullanılarak mikotoksin analizlerinin yapılmasıdır.

Toksijenik ve atoksijenik türlerin ayrımında kullanılan bir diğer yaklaşım da toksin biyosentezinde görevli genlerin PZR analizinde hedef alınmasıdır. Aflatoksin biyosentezinde görevli genlerin hedef alındığı çalışmalar ile *A. flavus* ve *A. parasiticus* tür ayrımının yapılması mümkün olmamaktadır. (Shapira ve diğ., 1996; Zachova ve diğ., 2003). Fakat *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin ayrımı farklı mikotoksin profillerine sahip oldukları için aflatoksin üretimleri dışında da önem taşımaktadır.

Aflatoksijenik *A. section Flavi* üyelerinin belirlenmesinde kullanılan genler başlıca *afl*, *omt*, *aflD* (*nor1*), *aflQ* (*ord1=ordA*), *ver-1* ve *apa-2* olarak sayılabilmektedir (Edwards ve diğ., 2002). Portekiz'de bademden izole edilen 31 adet *A. section Flavi* üyesinin morfolojik, kimyasal ve moleküler karakterizasyonlarının yapıldığı bir çalışmada morfolojik karakterizasyon sonucunda 18 izolat *A. parasiticus* ve 13 izolat

ise *A. flavus* olarak tanımlanmıştır. Kimyasal olarak 31 izolatın aflatoksin ve siklopiazonik asit (CPA) üretimleri araştırılmıştır. Moleküler olarak ise aflatoksin biyosentezinde görevli *aflD* (*nor1*) ve *aflQ* (*ord1=ordA*) genlerinin varlığı araştırılmıştır. *aflD* geni ile aflatoksijenik karakter arasında korelasyon bulunmazken *aflQ* geni ile aflatoksin üretimleri arasında istatistiki olarak önemli bir korelasyon bulunmuştur (Rodrigues ve diğ., 2009).

1996 yılında yer fıstığı ve mısır örnekleri ile yapılan bir çalışmada aflatoksijenik *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin belirlenmesi için toksin biyosentezinde görevli *ver-1*, *omt-1* ve *apa-2* genleri hedef alınmıştır. Yalnızca toksijenik suşların aşılandığı ürünlerde pozitif DNA amplifikasyonu gözlenmiştir (Shapira ve diğ., 1996).

Hindistan’da yapılan bir çalışmada mısır, arpa, pirinç, yer fıstığı, kırmızıbiber, kahve çekirdeği, tavuk yemi, pamuk tohumu olmak üzere farklı gıda örneklerinde aflatoksin biyosentezinde görevli *aflR* ve *omt* genleri hedef alınarak aflatoksijenik küflerin varlığının belirlenmesi üzerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak her iki gen ve *A. flavus* grubu küf arasında beklenen pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu protokol ile aflatoksin biyosentezinde görevli genleri hedef alan primerler kullanılmış ve *A. flavus* grubu küflerin varlığı tespit edilmiştir. Ancak toksijenik ve atoksijenik ayrımı yapılamamıştır (Somashekar ve diğ., 2004).

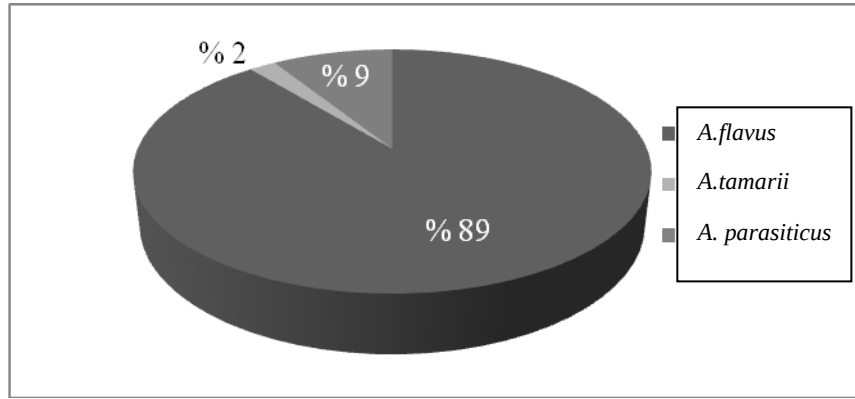
2005 yılında yine Hindistan’da yapılan bir başka çalışmada ise yer fıstığı ve mısır örneklerinde mevcut aflatoksijenik *A. flavus* türleri *aflR1* ve *aflR2* genleri hedef alınarak hızlı bir şekilde tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *aflR* primeri yüksek hassasiyet sağlamış ve hatalı pozitif sonuç alınmamıştır. Bu primer kullanılarak saf veya karışık kültürde aflatoksijenik *Aspergilli* türlerinin ayrımı için geliştirilen PZR yöntemi yüksek hassasiyet ve spesifiklik göstermiştir (Manonmani ve diğ., 2005).

Aflatoksijenik *A. flavus* suşu ve bu suş ile aşılanan taze incir örneklerinde *nor-1*, *ver-1* ve *omt-1* genlerinin PZR ile amplifikasyonu yapılmıştır. Sonuçta gıda örneklerinde yapılan PZR analizinin hassasiyeti saf kültürler ile yapılan uygulamadan 10 kat daha düşük bulunmuştur (Farber ve diğ., 1997).

Gıdalar üzerinde yapılan araştırmalara ilave olarak 2003 yılında hayvan yemi örneklerinde aflatoksijenik *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Aflatoksin biyosentezinde görevli genlerden *ver-1* ve *apa-2* PZR ile hedef alınmış ve metot karşılaştırması amacıyla AFPA

besiyerinde ekimler gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırılan iki metot arasında 50 örnekten yalnızca iki adedi AFPA besiyerinde toksijenik olarak belirlenmişken PZR ile aflatoksinjenik olarak belirlenmemiştir. Kullanılan primerler Shapira ve diğ. (1996) tarafından kullanılan primerlerin aynısıdır ve aflatoksinjenik küfler için yüksek spesifiktir olduğu belirlenmiştir (Zachova ve diğ., 2003).

Çalışmada *A. section Flavi* izolatlarının moleküler yöntemle identifikasyonu ile 3 farklı *Aspergillus* türü tanımlanmıştır (Çizelge 8.2). Toplam 57 izolatın 51'inin *A. flavus*, 5'inin *A. parasiticus* ve 1'inin de *A. tamarii* olduğu belirlenmiştir. Şekil 8.5'de identifikasyonu yapılan türlerin yüzde dağılımı görülmektedir.



Şekil 8.5 : İzole edilen *Aspergillus section Flavi* üyelerinin dağılımı (%).

Bu çalışmada elde edilen bulgular, önceki çalışmada (Heperkan ve Karbancıoğlu-Güler, 2009) aynı suşların morfolojik ve fenotipik özellikleri esas alınarak yapılan identifikasyon ile büyük benzerlik göstermektedir. Sadece 1 izolatta farklılık belirlenmiştir. Önceki çalışmada *A. flavus* olarak tanımlanan, aflatoxin B₁ ve B₂ üreticisi olan izolat bu çalışmada *A. parasiticus* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatın mikotoksijenik karakteri HPLC ile yeniden analiz edilmiş ve benzer şekilde aflatoxin B₁ ve B₂ ürettiği ancak CPA üretmediği gözlenmiştir. Sonuçta 36 numaralı izolat aflatoxin B₁ ve B₂ üreten atipik *A. parasiticus* olarak tanımlanmıştır.

A. flavus çalışmada hakim küf türü olarak belirlenmiştir. Türkiye'de kuru incir örneklerinin mikoflorasının morfolojik ve mikroskopik teknikler kullanılarak belirlenmesine yönelik çalışmalarda hakim floranın incirin temin edildiği döneme göre değişebildiği ve çoğunluğun *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *Fusarium* küf türlerinden oluştuğu belirlenmiştir (Heperkan, 2006).

Karapınar ve diğ. (1989), tarafından yapılan bir çalışmada Ege bölgesinden toplanan 206 adet sergi örneğinin % 23'ünde *A. flavus* kontaminasyonu saptanırken *A. parasiticus* varlığı belirlenmemiştir.

İşman tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada Aydın, Nazilli ve İncirlioza pazarlarından alınan 50 adet kuru incir örneğinden izole edilen 127 küf türünün *Aspergillus* (% 58), *Trichoderma* (% 19), *Fusarium* (% 13) ve *Acremonium* (% 10) cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. *Aspergillus* cinsine ait türlerin büyük çoğunluğunu *A. flavus* oluşturmaktayken yalnızca 1 adet *A. parasiticus* mevcudiyetine rastlandığı belirtilmiştir.

Karbancıoğlu-Güler tarafından 2003-2004 yıllarında Ege Bölgesinden kurutma aşamasından toplanan 115 kuru incir örneğinin mikoflorasının belirlendiği çalışmada örneklerin % 93,9'undan *Aspergillus* section *Nigri*, % 76,5'inden *Fusarium* spp., % 41,7'sinden *Aspergillus* section *Flavi*, % 8,7'sinden *Penicillium* spp., izole edilmiştir. İzole edilen *Aspergillus* section *Flavi* üyelerinin % 91,2'si *A. flavus*, % 7'si *A. parasiticus* ve % 1,7'si *A. tamarii* olarak tanımlanmıştır (Karbancıoğlu-Güler, 2008).

1991, 1992, 1993 ve 1994 yılı hasatlarında Kaliforniya incirlerinden (*Calimyrna*) alınmış örneklerde *A. parasiticus* nadir olarak bulunmuşken *A. flavus* türleri dört yıl içinde yüksek oranda belirlenmiştir (Doster ve diğ., 1996).

İncir meyvesi *A. flavus* türleri ile kontaminasyona uygun bir meyvedir fakat bu durum incirin olgunluğu ile yakından ilişkilidir. İncir tazeyken küf tarafından saldırıya karşı dirençli olduğu halde olgunlaştıkça meyve yumuşamakta ve hassasiyeti artmaktadır (Buchanan ve diğ., 1975). Kuru incir yüksek karbonhidrat içeriği ile küf gelişimine nazaran toksin üretimini desteklediği için küflerin yerleşmesi toksin üretimi ile sonuçlanmaktadır. Kuru meyvelerden incir, kayısı, üzüm ve ananasta aflatoksin oluşumunun incelendiği bir çalışmada kuru incirde diğer kuru meyvelere göre aflatoksin üretiminin en yüksek düzeyde gerçekleştiği belirlenmiştir (Morton ve diğ., 1979).

Dünya genelinde yapılan çalışmalar sonucunda *A. flavus* türlerinin gıdalar, su, toprak ve havada *A. parasiticus* ve *A. tamarii*'den daha yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir (Mphande ve diğ., 2004). Kuru incir örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda *A. flavus* türünün *A. parasiticus*'a göre baskın olduğunu göstermektedir. Bu durumun tahıllar, yer fıstığı, Brezilya fındığı gibi farklı gıdalar içinde benzer

olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Vaamonde ve diğ. tarafından 2003 yılında Arjantin’de yapılan çalışmada buğday (20) ve soya fasulyesinden (43) izole edilmiş toplam 63 *A. section Flavi* üyesi suşun, buğday’da 5 adedinin *A. parasiticus* 15 adedinin *A. flavus*, soyada ise 2 adedinin *A. parasiticus* ve 41 adedinin *A. flavus* olduğu belirlenmiştir. Kuzey İtalya’da mısırdan izole edilen *A. section Flavi* izolatlarının identifikasyonları morfolojik özelliklerine göre yapılmış ve % 93’ünün *A. flavus* kalanının ise *A. parasiticus* olduğu belirlenmiştir (Giorni ve diğ., 2007). Gıdalarda olduğu gibi bölgelerde de bu durum ortaya çıkmaktadır. Amerika kıtasında da *A. flavus* türü *A. parasiticus*’tan daha yaygın olarak bulunmaktadır (Horn, 2007).

Yer fıstığı örneklerinde de *A. flavus*’un baskın küf türü olduğu belirtilmiştir (Gonçalez ve diğ., 2008). İsrail’de 1993 yılında yapılan bir çalışmada yer fıstığından izole edilen 200 adet *A. section Flavi* üyesi suşun morfolojik olarak identifikasyonu sonucu % 98’i *A. flavus* ve % 2’si de *A. parasiticus* olarak belirlenmiştir (Lisker ve diğ., 1993). Mphande ve diğ. (2004), yer fıstığının mikoflorası üzerine yaptıkları çalışmada izole ettikleri suşların % 8,5’inin, çoğunluğu *A. flavus* olmak üzere *A. flavus* ve *A. parasiticus*’dan oluştuğunu belirtmişlerdir.

Aspergillus spp. türlerinin baskın olarak bulunduğu belirlenen Brezilya fıstığı üzerinde yapılan bir çalışmada örneklerde *A. parasiticus* varlığı bulunmamışken 7 adet *A. flavus* izolatı tespit edilmiştir (Arrus ve diğ., 2005). Kakao çekirdeklerinde de % 29 oranında *A. flavus* kontaminasyonu belirlenmiş, *A. parasiticus* varlığına rastlanmamıştır (Sanchez-Hervas ve diğ., 2009). *A. flavus* genel olarak tüm ürünlerde aflatoksin üretiminden sorumlu *A. section Flavi* türüdür. Doğada ve toprakta yaygın olarak bulunan *A. flavus* türünün ürünleri daha kolay kontamine edebildiği ve diğer türlerden daha yarışmacı olduğu düşünülmektedir.

Kuru incirin mikoflorasının belirlendiği çalışmalarda *A. tamari* varlığına rastlanmamıştır. Çalışmada yalnızca bir adet olarak belirlenmiş olan *A. tamarii* küf türü kuru incirlerde seyrek olarak bulunmasıyla daha az önem taşımaktadır. Kakao çekirdeklerinde yapılmış çalışmada *A. section Flavi* izolatlarının identifikasyonu ITS bölgesi hedeflenerek yapılmış ve grubun % 56,1’inin *A. flavus* ve % 43,9’unun ise *A. tamarii*’den oluştuğu belirlenmiştir (Sanchez-Hervas ve diğ., 2008). Bu durum nadir olarak bulunan ürünlerde, morfolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyon basamağında bu türün gözden kaçırılabilceğini düşündürmektedir.

8.2 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen *Aspergillus Section Flavi* Üyelerinin Aflatoksin Oluşturma Özellikleri

Toplam 57 adet *A. section Flavi* izolatının aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ oluşturma özellikleri YES besiyerinde 25°C sıcaklıkta 7 gün inkübasyon, sonra ekstraksiyon ve takiben HPLC ile belirlenmiştir. HPLC yöntemi ile aflatoksin analizleri için tespit limiti ve geri kazanım oranları Çizelge 8.3’de görülmektedir. Aflatoksin B₁, G₁, B₂ ve G₂’nin besiyerinde geri kazanım oranlarının belirlenmesi için 3 farklı seviyede hazırlanan toksin konsantrasyonları aflatoksin B₁ ve G₁ için 15 ng/ml; 30 ng/ml; 60 ng/ml; B₂ ve G₂ için 4,5 ng/ml, 9 ng/ml, 18 ng/ml şeklindedir.

Çizelge 8.3 : HPLC yöntemi ile aflatoksin analizlerinde tespit limiti ve geri kazanım oranları.

Toksin	Tespit Limiti (ng/ml)	R ² *	Geri kazanım (%)
AFB ₁	0,05	0,99877	80,4-95
AFB ₂	0,03	0,99892	84,2-100,5
AFG ₁	0,05	0,99978	81,5-99,5
AFG ₂	0,03	0,99955	70,3-88,1

51 *A. flavus* izolatının yalnızca 1 adedi (% 2) aflatoksin üretmemiştir. Aflatoksijenik *A. flavus* izolatları içerisinde 10 adedi sadece AFB₁ üretirken kalan 40 adedi hem AFB₁ hem de AFB₂ üretmiştir. *A. parasiticus* izolatlarının ise tamamı aflatoksijenik özelliktedir. Yalnızca 1 izolat AFB₁ ve AFB₂ üreterek atipik *A. parasiticus* özelliği göstermiştir. Diğer 4 izolat beklendiği gibi B ve G grubu aflatoksinleri birlikte üretmiştir. İzolatların aflatoksin oluşturma miktarları Çizelge 8.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 8.4 : Küf izolatlarının besiyerinde aflatoksin oluşturma özellikleri.

İzolat Kodu	Tür	Aflatoksinler (ng/ml)			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
1	<i>A. flavus</i>	1020,67	5,38	-*	-
2	<i>A. flavus</i>	1110,51	13,62	-	-
3	<i>A. flavus</i>	164,24	0,48	-	-
4	<i>A. flavus</i>	1,13	-	-	-
5	<i>A. flavus</i>	448,91	13,34	-	-
6	<i>A. flavus</i>	1251,55	10,08	-	-
7	<i>A. flavus</i>	3,30	0,58	-	-
8	<i>A. flavus</i>	503,30	16,40	-	-
9	<i>A. parasiticus</i>	32,56	0,33	72,64	0,91
10	<i>A. flavus</i>	1106,70	17,35	-	-
11	<i>A. flavus</i>	1213,56	3,15	-	-
12	<i>A. flavus</i>	1314,72	5,18	-	-
13	<i>A. flavus</i>	1,79	-	-	-
14	<i>A. flavus</i>	1067,65	8,55	-	-

Çizelge 8.4 (devam) : Küf izolatlarının besiyerinde aflatoksin oluşturma özellikleri.

İzolat Kodu	Tür	Aflatoksinler (ng/ml)			
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
15	<i>A. flavus</i>	945,47	15,08	-	-
16	<i>A. flavus</i>	1446,40	7,35	-	-
17	<i>A. flavus</i>	1311,06	4,76	-	-
18	<i>A. flavus</i>	239,70	0,84	-	-
19	<i>A. flavus</i>	45,11	0,56	-	-
20	<i>A. flavus</i>	912,25	10,51	-	-
21	<i>A. flavus</i>	29,98	1,77	-	-
22	<i>A. flavus</i>	0,78	-	-	-
23	<i>A. flavus</i>	251,12	2,15	-	-
24	<i>A. flavus</i>	0,30	-	-	-
25	<i>A. flavus</i>	1166,33	19,70	-	-
26	<i>A. parasiticus</i>	242,28	2,94	54,49	0,24
27	<i>A. flavus</i>	1570,60	10,98	-	-
28	<i>A. flavus</i>	11,97	0,85	-	-
29	<i>A. tamarii</i>	-	-	-	-
30	<i>A. flavus</i>	1606,83	12,96	-	-
31	<i>A. parasiticus</i>	478,05	5,36	185,06	2,52
32	<i>A. flavus</i>	1163,09	11,16	-	-
33	<i>A. flavus</i>	1447,28	17,99	-	-
34	<i>A. flavus</i>	1370,58	15,13	-	-
35	<i>A. flavus</i>	394,23	5,08	-	-
36	<i>A. parasiticus</i>	539,06	3,39	-	-
37	<i>A. flavus</i>	960,02	7,18	-	-
38	<i>A. flavus</i>	2,09	-	-	-
39	<i>A. flavus</i>	1239,35	12,03	-	-
40	<i>A. flavus</i>	281,26	3,27	-	-
41	<i>A. flavus</i>	1328,45	2,72	-	-
42	<i>A. flavus</i>	624,48	8,50	-	-
43	<i>A. parasiticus</i>	793,80	6,39	452,94	1,85
44	<i>A. flavus</i>	436,74	1,91	-	-
45	<i>A. flavus</i>	867,76	11,55	-	-
46	<i>A. flavus</i>	495,05	6,83	-	-
47	<i>A. flavus</i>	759,92	15,53	-	-
48	<i>A. flavus</i>	1,82	-	-	-
49	<i>A. flavus</i>	1,07	-	-	-
50	<i>A. flavus</i>	267,93	5,79	-	-
51	<i>A. flavus</i>	312,93	4,95	-	-
52	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-
53	<i>A. flavus</i>	1,42	-	-	-
54	<i>A. flavus</i>	1,70	-	-	-
55	<i>A. flavus</i>	628,32	5,69	-	-
56	<i>A. flavus</i>	10,01	0,99	-	-
57	<i>A. flavus</i>	1,38	-	-	-

*: Toksin üretimi olmamıştır.

Kuru incir örneklerinden izole edilen *A. flavus* türlerinin in vitro olarak aflatoksin üretimlerinin araştırıldığı çalışmalardan birinde izolatların % 66'sının aflatoksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir (Karapınar ve Gönül, 1989). Çalışmada izole ettiğimiz *A. flavus* izolatlarının neredeyse tamamı (% 98) aflatoksijenik özellik göstererek

diğer çalışmalardan ayrılmaktadır. Aradaki bu farklılık çalışmada kullanılan HPLC metodu ile daha hassas sonuçlar alınması ile açıklanabilir. Diğer alışmalar TLC yöntemi ile kalitatif olarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm *A. flavus* izolatlarının doğada toksin üreticisi olmadığı atoksijenik suşlarında mevcut olduğu bilinmektedir. Ve atoksijenik *A. flavus* suşları bu kf türünün toksijenik suşlarına karşı hassas olan fıstık, pamuk gibi ürünlerin yetiştiği topraklarda kf gelişimini önlemek ve toksin üretimini azaltmak amacıyla kullanılmaktadır (Perrone ve diğ., 2007). Literatür incelendiğinde coğrafi kaynaklarına ve substrata bağlı olarak toksijenik, atoksijenik suş oranı açısından farklı sonuçlar alındığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, topraktan izole edilen *A. flavus* suşlarının yaklaşık % 40'ının atoksijenik özellikte olduğu bulunmuştur (Cotty ve diğ., 1994). Aflatoksijenik *A. flavus* türlerinin bölgelere göre değişimine örnek olarak İtalyan *A. flavus* populasyonunun yaklaşık % 70'i aflatoksijenik iken bu oranın ABD'de % 53 olduğu belirtilmiştir (Giorni ve diğ., 2007). Aflatoksijenik *A. flavus* suşlarının %'si gıda tipine ve çevresel faktörlere göre de değişiklik göstermektedir (Horn, 2003; Klich, 2007). Örneğin aflatoksijenik *A. flavus* suşları yer fıstığında (% 69) buğdaya göre (% 13) daha yüksek oranda bulunmaktadır (Vaamonde ve diğ., 2003). Bununla beraber *Aspergillus* türleri içinde aflatoksin üretiminde büyük bir çeşitlilik söz konusudur ki bu durum özellikle aflatoksin üreticisi olan *A. flavus* türleri içinde yaygındır. Sonuç olarak yapılan çeşitli çalışmalarla *A. flavus* türlerinin aflatoksin üretme özelliklerinin stabil olmayan bir özellik olduğu, coğrafik bölgelere ve bulunduğu ürüne göre farklılık gösterdiği ortaya konmuştur.

Bu alışma ile benzer şekilde Arrus ve diğ. (2005), Brezilya fındığından izole ettikleri *A. flavus* suşlarının tamamının aflatoksijenik olduğunu belirlemişlerdir. Iamanaka ve diğ. (2007), ise Brezilyada marketlerden temin ettikleri 62 kuru meyve örneğinde (24 siyah sultani, 19 beyaz sultani, 19 kuru incir) 9'u beyaz sultani ve 1'i de kuru incirden olmak üzere toplam 10 adet *A. flavus* suşu izole etmişlerdir. Bu suşların YES besiyerinde aflatoksin üretimleri (25°C'de 7 gün) TLC ile incelenmiş ve suşların tamamının AFB₁ ve AFB₂ reticisi olduğu belirlenmiştir.

Vaamonde ve diğ. (2003), Arjantin'de izole ettikleri 130 suşun (67 yer fıstığı, 20 buğday ve 43 soya fasulyesi örneğinden) 37 adedi *A. parasiticus* ve 93 adedi *A. flavus* olmak üzere, aflatoksin oluşturma özelliklerini CYA besiyerinde TLC yöntemi ile incelemişlerdir. Aflatoksijenik *A. flavus* suşlarının oranı; yer fıstığında % 73

buğdayda % 13 ve soya fasulyesinde ise % 5 olarak belirlenmiştir. Buğday’da yapılan bir başka çalışmada da 144 adet *A. flavus* izolatının % 72’sinin aflatoksijenik olduğu belirlenmiştir.

İsrail’de 1993 yılında yapılan bir çalışmada yer fıstığından izole edilen 200 adet *Aspergillus* section *Flavi* üyesinin PDB sıvı besiyerinde (25°C’de 7 gün) aflatoksin üretme özelliklerinin TLC yöntemi ile incelendiği bir çalışmada izolatların yaklaşık % 77’sinin B grubu aflatoksinleri ürettiği belirlenmiştir (Lisker ve diğ., 1993).

Yapılan çalışmalar *A. parasiticus* izolatlarında durumun daha farklı olduğunu göstermektedir. Doğada ve gıdalarda daha nadir bulunmaktaysa da çoğunlukla hem B hem de G grubu aflatoksinleri yüksek miktarda üretmekte ve atoksijenik suşları nadir olarak görülmektedir. Örneğin yer fıstığı, buğday ve soya fasulyesi örneklerinden izole edilen 37 adet *A. parasiticus* izolatının % 94,6’sı B ve G grubu aflatoksinleri birlikte üretmek suretiyle aflatoksijenik özelliktedir. 2 adet atoksijenik *A. parasiticus* suşu da yer fıstığından izole edilmiştir (Vaamonde ve diğ., 2003). Portekiz’de bademden izole edilen 18 adet *A. parasiticus* suşunun ve İran’da mısır tarlalarının topraklarından izole edilen *A. parasiticus* suşlarının tamamının B ve G grubu aflatoksinlerin üreticisi olduğu belirlenmiştir (Rodrigues ve diğ., 2009; Razzaghi-Abyaneh ve diğ., 2006). Çalışmada da az sayıda izole edilmesine rağmen *A. parasiticus* suşlarının tamamı aflatoksin üreticisi olarak belirlenmiştir. Bazı araştırmacılar doğada çok nadir rastlanan atoksijenik *A. parasiticus* suşlarını izole etmişlerdir (Horn ve diğ., 1996; Vaamonde ve diğ., 2003). Avustralya’da toprak örneklerinden alınmış izolatların içinde 5 adet *A. parasiticus* izolatı atoksijenik olarak belirlenmiştir (Tran-Dinh ve diğ., 1999).

Çalışmada izole edilen 1 adet *A. tamarii* suşu aflatoksin üreticisi değildir. *A. tamarii* türünün aflatoksin üreticisi olmadığı başka çalışmalarla da desteklenmektedir. Kakao çekirdeklerinden izole edilmiş 94 adet ve mısırdan izole edilmiş 6 adet *A. tamarii* suşunun tamamının aflatoksin üreticisi olmadığı kaydedilmiştir (Sanchez-Hervas ve diğ., 2008). Goto ve diğ. 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada CPA üreticisi olduğu kesin olarak belirlenmiş olan *A. tamarii* türünün aflatoksin ürettiğini belirlemişlerdir. Fakat Ito ve diğ. (2001), aflatoksin üreticisi olan *A. tamarii* suşlarının genetik, morfolojik ve mikotoksijenik farklılıkları nedeniyle *A. pseudotamarii* sp. nov. olarak tanımlanmaları gerektiğini savunmuşlardır.

İzolatların kantitatif olarak toksin oluşturma özellikleri en yüksek ve en düşük değerler halinde Çizelge 8.5'te gösterilmiştir. Aflatoksijenik *A. flavus* izolatlarının 15 adedinin (% 30) <45,67 ng/ml ile düşük, 18 adedinin (% 36) 100-1000 ng/ml olarak orta ve kalan 17 adedinin de (% 34) >1000 ng/ml ile yüksek düzeyde aflatoksin üreticisi olduğu bulunmuştur. *A. parasiticus* izolatlarının toksin oluşturma miktarlarının ise aflatoksin B₁ için 32,56-793,80 ng/ml, B₂ için 0,33-6,39 ng/ml, G₁ için 54,49-452,94 ng/ml ve G₂ için 0,24-2,52 ng/ml aralığında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 8.5 : *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarının aflatoksin oluşturma miktarları.

Tür	Toplam izolat sayısı	AF pozitif izolat sayısı (üretim aralığı ng/ml)			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
<i>A. flavus</i>	51	50 (1,07-1606,83)	47 (0,48-19,70)	-	-
<i>A. parasiticus</i>	5	5 (32,56-793,80)	5 (0,33-6,39)	4 (54,49-452,94)	4 (0,24-2,52)

İtalya'da mısırdan izole edilen 70 adet *A. section Flavi* üyesinin Coconut agar besiyerinde aflatoksin oluşturma özelliklerinin (25°C'de 14 gün) HPLC ile belirlendiği çalışmada izolatların % 93'u *A. flavus* ve tüm izolatların da % 70'i aflatoksin üreticisi olarak belirlenmiştir. Aflatoksin üreticisi izolatların da % 22,8'i <10 ng/g, % 10'u 10-100 ng/g, %12,8'i 100-1000 ng/g ve % 24,3'ü de >1000 ng/g olarak belirlenmiştir (Giorni ve diğ., 2007).

Arrus ve diğ. (2005), Brezilya fıındığından izole edilen 7 adet *A. flavus* suşunun besiyerinde (21°C'de 7-10 gün) ELISA yöntemi ile toplam aflatoksin üretimlerini 10.02 ile 778,09 ng/ml aralığında belirlemişlerdir.

Hayvan yemlerinden izole edilen 45 *A. flavus* suşunun aflatoksin oluşturma özellikleri hayvan yemi ile hazırlanan ortamda in vitro olarak (28°C'de 14 gün) HPLC ile analizlenmiştir. Suşların 23 adedi (% 51,1) AFB₁'i 1-844 ppb aralığında üretmiştir (Martins ve Martins, 1999).

286 tahıl örneği ve 194 fûme et ürünü örneğinden izole edilen 96 adet *A. flavus* türünün besiyerinde aflatoksin üretme özelliklerinin (25°C'de 14 gün) TLC ile belirlendiği çalışmada % 85,4'ü atoksijenik özellik göstermiş, % 9,3'ünün 0,1 ile 14,8 mg/kg aralığında AFB₁ üreticisi olduğu görülmüştür (Cvetnic ve Pepeljnjak, 1998). Çalışmamız ile karşılaştırıldığında toksijenik suş oranı olarak bulgularımızdan

düşük fakat ürettikleri toksin miktarı bakımından ise oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Trucksess ve diğ. (1987), yaptıkları çalışmada fasulye, makarna, mısır ve Brezilya cevizi gibi farklı ürünlerden izole ettikleri *A. flavus* türlerinin sıvı besiyerinde (28°C'de 8 gün) TLC ile aflatoksin üretimlerini incelemişlerdir. Mısırdan izole edilenlerin 3'ü (3/8) 4-10 000 ppb arasında, fasulyeden izole edilenlerin biri (1/3) 1000 ppb düzeyinde ve Brezilya cevizinden izole edilenlerin 2'si (2/3) 5-200 ppb aralığında aflatoksin üreticisi olarak belirlenmiştir.

Sanchez-Hervas ve diğ. (2008), kakao çekirdeklerinden izole ettikleri 214 *Aspergillus* section *Flavi* üyesi suşun (120 *A. flavus*, 94 *A. tamarii*) YES besiyerinde aflatoksin üretimini (25°C'de 14 gün) incelemişlerdir. 77 izolat (% 64,1) *A. flavus* olarak belirlenmiş ve 8 izolat atipik özellik göstererek B ve G toksinlerini birlikte üretmiştir. 9 izolat (% 7,5) için toplam aflatoksin üretimi 1000 ng/g'ın üzerindeyken kalan izolatların üretimi ortalama 100 ile 1000 ng/g aralığında belirlenmiştir.

Mısırdan izole edilen 19 *A. flavus* suşunun sıvı besiyerinde (28°C'de 8 gün) TLC kullanılarak aflatoksin üretme özellikleri incelenmiş ve 4 adedi atoksijenik olarak belirlenmiş, 12 izolat (% 63) aflatoksin B₁ ve B₂'yi toplam 10 ile 700 ppb arasında üretmiştir. İzolatların hiçbirisi G grubu üretmek suretiyle atipik özellik göstermemiştir (Lee ve Hagler, 1991).

Cezayir'de buğday ve buğday ürünlerinden izole edilmiş toplam 144 *A. flavus* suşunun CYA besiyerinde (28°C'de 7 gün) HPLC ile aflatoksin üretim potansiyelleri incelenmiş ve % 72'sinin 0,02-234,6 µg/g aralığında AFB₁ üreticisi olduğu belirlenmiştir. 25 (% 15) izolat 103-234,6 µg/g aralığında yüksek toksin üreticisi, 37 izolat (% 25) 12,1-95,7 µg/g aralığında orta düzeyde aflatoksijenik ve 40 izolat (% 27) ise 0,02-0,09 µg/g aralığında düşük toksin üreticisi olarak belirlenmiştir. Yüksek AFB₁ üreticisi olan izolatlar aynı zamanda 4-125 µg/g aralığında AFB₂ üreticisi olarak belirlenmiştir. G grubu üreticisi ise belirlenmemiştir (Riba ve diğ., 2010).

Çalışmada yalnızca B grubunu üreten atipik *A. parasiticus* suşları bulunmuş olmasına rağmen bir çok ülkede varlığı bildirilmiş olan (Vaamonde ve diğ., 2003; Pildain ve diğ., 2004; Giorni ve diğ., 2007; Sanchez-Hervas ve diğ., 2008) B ve G grubunu birlikte üreten atipik *A. flavus* türleri belirlenmemiştir. Ayrıca çalışmada

İtalya’da Giorni ve diğ. (2007), tarafından yapılan çalışma ile benzer olarak AFB₂ > AFB₁ üreticisi olan *A. flavus* suşu da tespit edilmemiştir.

Çeşitli bölgelerde farklı gıdalardan izole edilen *A. flavus* suşlarının aflatoksin üretimlerinin incelendiği çalışmalardan elde edilen bulguların bir kısmı bu çalışmada belirlenen toksin miktarı ve oranları ile uyum içindedir. Fakat bazı çalışmalarda az ya da daha yüksek toksin üretimi tespit edilmiştir. Bulgular arasındaki bu farklılıklar küf gelişimi ve toksin oluşturma özelliklerinin araştırılmasında farklı besiyerleri, sıcaklık ve inkübasyon sürelerinin uygulanması ve analizlerin farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmesi ile açıklanabilir. Sonuç olarak küflerin aflatoksin oluşturma özelliklerinin gıdalarda doğal olarak aflatoksin bulunması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

8.3 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen *Aspergillus Section Flavi* Üyelerinin Siklopiazonik Asit Oluşturma Özellikleri

Toplam 57 adet *A. section Flavi* izolatının siklopiazonik asit (CPA) üretme potansiyelleri CYA besiyerinde 25°C sıcaklıkta 7 gün inkübasyon, sonra ekstraksiyon ve takiben HPLC ile belirlenmiştir. HPLC yöntemi ile CPA analizleri için belirlenen tespit limiti 50 ng/g ve geri kazanım oranları 50 ve 500 ng/g için sırasıyla % 73,3 ve % 73,9 olarak belirlenmiştir. Çizelge 8.6’da görüldüğü gibi *A. flavus* izolatlarının sadece birinin (% 2) CPA üretmediği kalan 50 adedinin (% 98) ve bir *A. tamarii* izolatının CPA üreticisi olduğu belirlenmiştir. 5 adet *A. parasiticus* izolatının 2 adedi atipik özellik göstererek CPA üreticisi olarak belirlenmiştir.

Çizelge 8.6 : Küf izolatlarının besiyerinde CPA oluşturma özellikleri.

İzolat No	Tür	CPA (µg/ml)	İzolat No	Tür	CPA (µg/ml)
1	<i>A. flavus</i>	8,68	14	<i>A. flavus</i>	9,01
2	<i>A. flavus</i>	7,91	15	<i>A. flavus</i>	9,21
3	<i>A. flavus</i>	35,98	16	<i>A. flavus</i>	10,00
4	<i>A. flavus</i>	2,23	17	<i>A. flavus</i>	21,78
5	<i>A. flavus</i>	38,12	18	<i>A. flavus</i>	47,60
6	<i>A. flavus</i>	9,13	19	<i>A. flavus</i>	10,83
7	<i>A. flavus</i>	8,65	20	<i>A. flavus</i>	6,43
8	<i>A. flavus</i>	31,24	21	<i>A. flavus</i>	3,15
9	<i>A. parasiticus</i>	-	22	<i>A. flavus</i>	3,87
10	<i>A. flavus</i>	22,19	23	<i>A. flavus</i>	24,92
11	<i>A. flavus</i>	16,30	24	<i>A. flavus</i>	6,87
12	<i>A. flavus</i>	8,71	25	<i>A. flavus</i>	4,78
13	<i>A. flavus</i>	10,45	26	<i>A. parasiticus</i>	-

Çizelge 8.6 (devam) : Küf izolatlarının besiyerinde CPA oluşturma özellikleri.

İzolat No	Tür	CPA (µg/ml)	İzolat No	Tür	CPA (µg/ml)
27	<i>A. flavus</i>	398,16	43	<i>A. parasiticus</i>	0,052
28	<i>A. flavus</i>	35,93	44	<i>A. flavus</i>	7,14
29	<i>A. tamarii</i>	2,69	45	<i>A. flavus</i>	4,60
30	<i>A. flavus</i>	18,16	46	<i>A. flavus</i>	4,40
31	<i>A. parasiticus</i>	0,059	47	<i>A. flavus</i>	4,39
32	<i>A. flavus</i>	38,31	48	<i>A. flavus</i>	0,072
33	<i>A. flavus</i>	8,55	49	<i>A. flavus</i>	-
34	<i>A. flavus</i>	6,24	50	<i>A. flavus</i>	21,71
35	<i>A. flavus</i>	33,75	51	<i>A. flavus</i>	21,44
36	<i>A. parasiticus</i>	-	52	<i>A. flavus</i>	13,44
37	<i>A. flavus</i>	30,78	53	<i>A. flavus</i>	0,088
38	<i>A. flavus</i>	4,29	54	<i>A. flavus</i>	0,084
39	<i>A. flavus</i>	50,41	55	<i>A. flavus</i>	32,50
40	<i>A. flavus</i>	20,71	56	<i>A. flavus</i>	0,103
41	<i>A. flavus</i>	6,56	57	<i>A. flavus</i>	11,14
42	<i>A. flavus</i>	8,45			

Vaamonde ve diğ. (2003), Arjantin’de yaptıkları çalışmada izole ettikleri (67 yer fıstığı, 20 buğday ve 43 soya fasulyesi örneğinden toplam 130 suşun) 37 adet *A. parasiticus* ve 93 adet *A. flavus* suşunun CPA oluşturma özelliklerini CYA besiyerinde TLC yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmadaki % 98’lik oran ile benzerlik göstererek, yer fıstığından izole edilen *A. flavus* suşlarının % 94’ü, buğday’dan izole edilenlerin % 93’ü ve soya fasulyesinden izole edilenlerin % 73’ü CPA üreticisi olarak belirlenmiştir. Fakat izole edilen *A. parasiticus* suşlarının CPA üretmediği kaydedilmiştir. Arjantin’de kuru üzümünden izole edilen 5 adet *A. flavus* izolatının TLC ile analizinde tamamı CPA üreticisi olarak belirlenmiştir (Romero ve diğ., 2005).

Literatürdeki çalışmalar toksijenik suş oranı açısından incelendiğinde bulgularımızdan düşük oranların tespit edildiği çalışmalar da mevcuttur. İsrail’de 1993 yılında yer fıstığından izole edilen 200 adet *A. section Flavi* üyesi suşun PDB sıvı besiyerinde (25°C’de 7 gün) CPA üretme özelliklerinin TLC yöntemi ile incelendiği çalışmada izolatların % 22,5’i CPA üreticisi olarak belirlenmiştir (Lisker ve diğ., 1993). Cezayir’de buğday ve buğday ürünlerinden izole edilmiş 144 adet *A. flavus* izolatının, yalnızca % 10’u CYA besiyerinde (28°C’de 10 gün) TLC yöntemi kullanılarak CPA üreticisi olarak belirlenmiştir (Riba ve diğ., 2010). 286 tahıl örneği ve 194 fûme et ürünü örneğinden izole edilen 96 adet *A. flavus* türünün besiyerinde CPA üretme özelliklerinin (25°C’de 14 gün) TLC ile belirlendiği başka bir çalışmada

izolatların % 5,2'sinin CPA üreticisi olduğu kaydedilmiştir (Cvetnic ve Pepelnjak, 1998). Kakao çekirdeklerinden izole edilen 120 adet *A. flavus* ve 94 adet *A. tamarii* suşunun CYA besiyerinde CPA oluşturma özelliklerinin (25°C'de 14 gün) HPLC ile belirlendiği bir diğer çalışmada *A. tamarii* izolatlarının % 98'i ve *A. flavus* izolatlarının % 34,2'si CPA üreticisi olarak belirlenmiştir (Sanchez-Hervas ve diğ., 2008). Moleküler yöntem ile identifikasyonu sonucu *A. tamarii* olduğu belirlenen izolatın literatür ile uyumlu olarak aflatoksin üretmediği fakat CPA üreticisi olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada *A. section Flavi* izolatlarının CPA oluşturma özellikleri kantitatif olarak değerlendirildiğinde 50 adedinin 0,072-398,16 µg/ml aralığında CPA ürettiği görülmektedir. *A. parasiticus* izolatlarının 2 adedi (% 40) B ve G grubu aflatoksinlere ilave olarak tespit limiti olan 0,05 µg/ml'nin çok az üzerinde olmak kaydıyla 0,052 ve 0,059 µg/ml miktarlarında CPA üretmiştir. *A. tamarii* izolatı ise CPA toksinini 2,69 µg/ml miktarında üretmiştir.

Sanchez-Hervas ve diğ. (2008), tarafından kakao çekirdeklerinden izole edilen 120 adet *A. flavus* suşunun CPA üretimleri ortalama 33,3 ile 240,7 µg/g aralığında ve 94 adet *A. tamarii* suşunun ise 28,62 ile 253,3 µg/g aralığında bulunmuştur.

Kuzey İtalya'da mısırdan izole edilen 70 adet *A. section Flavi* üyesinin Czapek agar besiyerinde CPA oluşturma özelliklerinin (30°C'de 14 gün) HPLC ile belirlendiği çalışmada *A. flavus* izolatlarının % 61'i CPA üreticisi olarak bunların da % 16'sı <1000 ng/g, % 24'ü 1000-2000 ng/g ve % 21'i de >2000 ng/g olarak belirlenmiştir. *A. parasiticus* izolatlarının hiçbirisi CPA üreticisi olarak belirlenmemiştir (Giorni ve diğ., 2007).

Turksess ve diğ. (1987), fasulye, mısır, makarna ve Brezilya cevizinden izole ettikleri *A. flavus* suşlarının sıvı besiyerinde (28°C'de 8 gün) CPA üretme özelliklerini TLC ile incelemişlerdir. Tüm gıdalardan izole edilen suşlarda 0,2 ppm'den 10 ppm'e kadar değişen miktarlarda toksin üretimi belirlenmiştir.

Mısırdan izole edilen 19 *A. flavus* suşunun sıvı besiyerinde (28°C'de 8 gün) TLC kullanılarak CPA üretme özellikleri incelenmiş ve 4 adedi atoksijenik olarak belirlenmiş, 14 izolatın ise (% 74) CPA'yı 0,5 ile 135 ppm arasında üretmiştir (Lee ve Hagler, 1991).

286 tahıl örneği ve 194 fûme et ürünü örneğinden izole edilen 96 adet *A. flavus* türünün besiyerinde CPA üretme özelliklerinin (25°C’de 14 gün) TLC ile belirlendiği çalışmada yalnızca % 5,2’sinin 0,5 ile 30,0 mg/kg aralığında CPA üreticisi olduğu belirlenmiştir (Cvetnic ve Pepeljnjak, 1998). Bu çalışmada belirlenen toksijenik suş oranı bulgularımızdan düşük olmasına rağmen üretilen toksin miktarı çalışmamızda elde edilen değerlerden çok farklı değildir.

Hayvan yemlerinden izole edilen 45 *A. flavus* suşunun CPA oluşturma özellikleri hayvan yemi ile hazırlanan ortamda in vitro olarak (25°C’de 21 gün) TLC ile analizlenmiştir. 19 (% 42,2) izolat CPA’yı 0,5-1,45 mg/kg aralığında üretmiştir (Martins ve Martins, 1999).

Çalışmada *A. flavus* izolatlarının CPA üretim miktarları diğer çalışmalarda elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir. Fakat *A. parasiticus* izolatları söz konusu olduğunda B ve G grubu aflatoksinlerin yanısıra CPA üreten *A. parasiticus* bulgumuzu destekleyen yalnızca Avustralya’da yapılmış bir çalışma mevcuttur (Tran-Dinh ve diğ., 1999).

8.4 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen *Aspergillus* Section *Flavi* Üyelerinin β -Nitropropionik Asit Oluşturma Özellikleri

Toplam 57 adet *A. section Flavi* izolatının besiyerinde β -nitropropionik asit oluşturma özellikleri TLC yöntemi ile incelenmiştir. Çizelge 8.7’de görüldüğü gibi *A. parasiticus* ve *A. tamarii* suşlarının BNP üretmediği, yalnızca *A. flavus* izolatlarının 16 adedinin (% 31) BNP’yi 7,90-1571,20 ng/g aralığında ürettiği belirlenmiştir.

Çizelge 8.7 : Küf izolatlarının besiyerinde BNP üretme özellikleri.

İzolat No	Tür	BNP (ng/ml)	İzolat No	Tür	BNP (ng/ml)
1	<i>A. flavus</i>	-	12	<i>A. flavus</i>	-
2	<i>A. flavus</i>	293,30	13	<i>A. flavus</i>	261,90
3	<i>A. flavus</i>	-	14	<i>A. flavus</i>	392,80
4	<i>A. flavus</i>	279,30	15	<i>A. flavus</i>	-
5	<i>A. flavus</i>	-	16	<i>A. flavus</i>	-
6	<i>A. flavus</i>	-	17	<i>A. flavus</i>	785,60
7	<i>A. flavus</i>	-	18	<i>A. flavus</i>	1047,50
8	<i>A. flavus</i>	-	19	<i>A. flavus</i>	-
9	<i>A. parasiticus</i>	-	20	<i>A. flavus</i>	-
10	<i>A. flavus</i>	523,70	21	<i>A. flavus</i>	-
11	<i>A. flavus</i>	-	22	<i>A. flavus</i>	-

Çizelge 8.7 (devam): Küf izolatlarının besiyerinde BNP üretme özellikleri.

İzolat No	Tür	BNP (ng/ml)	İzolat No	Tür	BNP (ng/ml)
23	<i>A. flavus</i>	-	41	<i>A. flavus</i>	-
24	<i>A. flavus</i>	183,30	42	<i>A. flavus</i>	-
25	<i>A. flavus</i>	-	43	<i>A. parasiticus</i>	-
26	<i>A. parasiticus</i>	-	44	<i>A. flavus</i>	34,90
27	<i>A. flavus</i>	-	45	<i>A. flavus</i>	69,80
28	<i>A. flavus</i>	7,90	46	<i>A. flavus</i>	-
29	<i>A. tamarii</i>	-	47	<i>A. flavus</i>	-
30	<i>A. flavus</i>	13,10	48	<i>A. flavus</i>	-
31	<i>A. parasiticus</i>	-	49	<i>A. flavus</i>	-
32	<i>A. flavus</i>	10,50	50	<i>A. flavus</i>	-
33	<i>A. flavus</i>	-	51	<i>A. flavus</i>	-
34	<i>A. flavus</i>	-	52	<i>A. flavus</i>	1571,20
35	<i>A. flavus</i>	-	53	<i>A. flavus</i>	-
36	<i>A. parasiticus</i>	-	54	<i>A. flavus</i>	-
37	<i>A. flavus</i>	-	55	<i>A. flavus</i>	-
38	<i>A. flavus</i>	144,00	56	<i>A. flavus</i>	-
39	<i>A. flavus</i>	-	57	<i>A. flavus</i>	18,30
40	<i>A. flavus</i>	-			

Literatürde BNP ile ilgili çok az çalışma mevcuttur. *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. sojae* ve *P. roqueforti* referans suşlarının sıvı besiyerinde 34°C’de 7 gün inkübasyon sonunda BNP üretimlerinin araştırıldığı bir çalışmada *A. oryzae* suşunun 55 ppm, *A. flavus* suşunun ise 1 ppm düzeyinde BNP üreticisi olduğu kaydedilmiştir (Gilbert ve diğ., 1977). Çalışmada da en yüksek BNP üretim miktarı 1,57 ppm olarak bulunmuştur.

Mısır’da silaj örneklerinden izole edilen 15 adet *A. flavus* suşunun Czapek sıvı besiyerinde BNP oluşturma özellikleri (28°C’de 10 gün) TLC yöntemi ile incelenmiş ve bir adedinin BNP üreticisi olduğu belirlenmiştir (El-Shanawany ve diğ., 2005).

Starter kültür olarak kullanılan *A. oryzae* suşlarının toksin üretimi üzerine yapılan bir başka çalışmada 7 suşun 1,9 ile 43,6 mg/l düzeyinde BNP ürettiği belirlenmiştir (Orth, 1977).

Iwasaki ve Kosikowski (1973), tarafından 18 adet referans kültürün sıvı besiyerinde BNP üretimleri incelenmiş ve 4’ü *A. oryzae* ve 1’i *A. flavus* olmak üzere yalnızca 5 suşun tespit edilebilir düzeyde BNP ürettiği kaydedilmiştir. *A. flavus* suşunun 17 mg/l düzeyinde toksin üreticisi olduğu belirlenmiştir.

8.5 Kuru İncir Örneklerinden İzole Edilen *Aspergillus Section Flavi* Üyelerinin Aflatoksin, Siklopiazonik Asit ve β -Nitropropionik Asiti Birlikte Oluşturma Özellikleri

Çalışmada incelenen izolatların tamamının en az bir toksini üreterek toksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Yalnızca 49 numaralı izolat β -nitropropionik asit ve siklopiazonik asit üretmeyerek ve aflatoksin B₁'i 1,07 ng/g miktarında üreterek çok zayıf toksijenik özelliktedir.

İzolatların aflatoksin, siklopiazonik asit ve β -nitropropionik asit toksinlerini birlikte üretme özellikleri incelendiğinde farklı toksin oluşturma profillerinin ortaya çıktığı görülmektedir. *A. flavus* izolatlarının mikotoksin oluşturma özelliklerine göre belirlenen 5 farklı kemotip Çizelge 8.8'de görülmektedir. Bunlar sırasıyla, yalnızca aflatoksin B₁ oluşturan (a); AFB₁ ve CPA oluşturan (e); AFB₁, CPA ve BNP oluşturan (d), AFB₁, AFB₂, CPA ve BNP oluşturan (b) son olarak da AFB₁, AFB₂ ve CPA oluşturan (c) küfler şeklinde sınıflandırılabilir.

Çizelge 8.8 : *A. flavus* suşlarının toksin profilleri.

Toksin Profili	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	CPA	BNP	İzolat Sayısı (%)
a	+	-	-	-	-	-	1 (2)
b	+	+	-	-	+	+	10 (20)
c	+	+	-	-	+	-	30 (58)
d	+	-	-	-	+	+	6 (12)
e	+	-	-	-	+	-	4 (8)

5 kemotip içerisinde % 58 ile en büyük grubu AFB₁, AFB₂ ve CPA'yı bir arada üreten izolatlar oluşturmaktadır. Vaamonde ve diğ. (2003), tarafından yer fıstığından izole edilen *A. flavus* suşlarının % 63 ile en büyük grubunu AFB ve CPA'yı birlikte üreten izolatlar meydana getirmektedir. Giorni ve diğ. (2007), tarafından mısırdan izole edilen *A. flavus* suşları için bu oran % 39 ile yine en yüksek olarak belirlenmiştir. Arjantin'de yer fıstığından izole edilmiş *A. flavus* suşlarının toksin profillerinin belirlendiği çalışmada ise besiyerinde (25°C'de 7 gün) TLC yöntemi kullanılarak yapılan analizler sonucu B grubu aflatoksinler ile CPA, B ve G grubu aflatoksinler ile CPA ve yalnızca CPA üreticisi olan suşların varlığı belirlenmiştir. En büyük grubu yine B grubu aflatoksinleri ve CPA'yı birlikte üreten izolatlar oluşturmaktadır (Pildain ve diğ., 2004). Rodrigues ve diğ. (2009), tarafından yapılan

çalışmada ise Portekiz bademinden izole edilen *A. flavus* suşlarından “c” profiline girenlerin oranı düşüş göstermiş ve % 15 olarak belirlenmiştir.

Çalışmada yalnızca AFB₁ üreten *A. flavus* izolatları oranı oldukça düşüktür ve toplam izolatların % 2’sini oluşturmaktadır. Vaamonde ve diğ. (2003), çalışmasında bu oran çalışmamızla benzerlik göstererek % 2,2 olarak belirlenmiştir. Cezayir’de buğday ve buğday ürünlerinden izole edilen 150 adet *A. section Flavi* suşunun (144 *A. flavus* ve 6 *A. tamarisii*) CYA besiyerinde AFB₁ ve CPA oluşturma özelliklerinin incelendiği çalışmada ise AFB₁ ve CPA’yı birlikte üretenlerin oranı % 6 olarak belirlenmiştir (Riba ve diğ., 2010). Literatürde bu oranın çok daha yüksek olduğu çalışmalarda mevcuttur. Hayvan yemlerinden izole edilen 45 adet *A. flavus* suşunun CPA ve aflatoxin oluşturma özelliklerinin hayvan yemi ile hazırlanan ortamda in vitro olarak analizlendiği bir çalışmada izolatların % 22,2’si CPA ve AFB₁’i birlikte üretmiştir (Martins ve Martins, 1999).

Çalışmada B ve G grubu aflatoxinler ile CPA’yı birlikte üreten atipik *A. flavus* suşu belirlenmemiştir. Ancak benzer profile uyan küf moleküler yöntemle *A. parasiticus* olarak identifiye edilmiştir. Yapılan başka çalışmalarda bu toksin profilini gösteren suşların varlığı bildirilmiştir. Atipik *A. flavus* suşlarının izole edildiği gıdaların arasında başlıca kakao çekirdeği (Sanchez-Hervas ve diğ., 2008), mısır (Giorni ve diğ., 2007), yer fıstığı (Pildain ve diğ., 2004), buğday ve soya fasulyesi (Vaamonde ve diğ., 2003) yer almaktadır.

Arjantin’de de yer fıstığı ekilen tarlalardan alınan toprak örneklerinden izole edilen *A. flavus* suşlarının 7 adedi aflatoxin B ve G grupları ile CPA’yı birlikte üreterek atipik özellik göstermiştir. Atipik *A. flavus* suşlarının dünyada Güneydoğu Asya, Batı Afrika, Avustralya ve Güney Amerika’da yapılmış çalışmalarla varlığı bildirilmiştir (Barros ve diğ., 2006).

Literatürde *A. flavus* suşlarının kemotip belirleme çalışmalarında B grubu aflatoxinler ve CPA’yı B₁>B₂ olacak şekilde, B grubu aflatoxinler ve CPA’yı B₁<B₂ olacak şekilde iki farklı kemotip varlığı belirlenen çalışmalar İspanya’dan ve İran’dan bildirilmiştir (Sanchez-Hervas ve diğ., 2008; Razzaghi-Abyaneh ve diğ., 2006). Çalışmamızda ve Giorni ve diğ. (2007), tarafından İtalya’da yapılan çalışmada izole edilen *A. flavus* suşları 25°C inkübasyonda tipik olarak B grubu aflatoxinleri her zaman B₁>B₂ olacak şekilde üretmektedirler.

Yalnızca CPA üreticisi olan *A. flavus* suşu çalışmada belirlenmemiştir. *A. tamarii* suşu bu profile sahip tek küf türüdür. Bu durumun benzeri Cezayir’de Riba ve diğ. (2010), tarafından buğday ve buğday ürünlerinden izole edilen 144 *A. flavus* ve 6 *A. tamarii* suşunun AFB₁ ve CPA oluşturma özelliklerinin incelendiği çalışmada belirlenmiştir. Yalnızca CPA üreticisi olan % 4’lük oranın tamamının *A. tamarii* izolatları tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir.

Turcksess ve diğ. (1987), fasulye, mısır, makarna ve Brezilya cevizinden izole ettikleri *A. flavus* suşlarının sıvı besiyerinde (28°C’de 8 gün) aflatoksin ve CPA’yı birlikte oluşturmalarını incelemişler ve mısır, fasulye ve Brezilya cevizinden izole edilenlerde birlikte üretim söz konusuysa, makarnadan izole edilen *A. flavus*’larda sadece CPA üretimi görülmüştür.

Mısır örneklerinden izole edilen 19 adet *A. flavus* suşunun sıvı besiyerinde (28°C’de 8 gün) TLC ile aflatoksin ve CPA üretiminin araştırıldığı bir çalışmada 11 izolat hem aflatoksin hem de CPA üretmiştir (Lee ve Hagler, 1991).

A. section Flavi grubuna dahil toksijenik ve atoksijenik *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin genetik yapılarının RAPD analizi ile incelendiği bir çalışmada *A. flavus* türleri arasında genetik olarak heterojen bir yapı gözlenmiş, *A. flavus* küfünde genetik çeşitliliğin çok fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durum *A. flavus* türlerinin toksin profillerinin belirlendiği çalışmalarda farklı toksin profillerinin ortaya çıkışını açıklamaktadır (Tran-Dinh ve diğ., 1999). *A. flavus* türlerinin aksine *A. parasiticus* popülasyonunun genetik olarak çok farklılık içermediği, türlerin genetik olarak daha homojen yapıda olduğu belirlenmiştir (Vaamonde ve diğ., 2003). *A. parasiticus* türlerinin toksin profillerinin belirlendiği çalışmalar incelendiğinde bu bulguyu destekleyecek şekilde az sayıda toksin profiline sahip kemotip belirlendiği görülmektedir.

Çalışmada *A. parasiticus* izolatlarının mikotoksin oluşturma özelliklerine göre belirlenen 3 farklı profil Çizelge 8.9’da görülmektedir. Bunlar aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ toksinlerinin hepsini B₁’i G₁’den fazla olacak şekilde üretenler, yalnızca aflatoksin B₁ ve B₂ üreten ve aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂’ye ilave olarak CPA üretenler şeklinde sıralanabilmektedir.

Çizelge 8.9 : *A. parasiticus* suşlarının toksin profilleri.

Toksin Profili	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	CPA	BNP	İzolot Sayısı (%)
f (B ₁ >G ₁)	+	+	+	+	-	-	2 (40)
g	+	+	+	+	+	-	2 (40)
h	+	+	-	-	-	-	1 (20)

Çizelge 8.9 incelendiğinde *A. parasiticus* suşlarının ikisinin B ve G toksinlerine ilave olarak CPA üreticisi olduğu, bir adedinin ise yalnızca B₁ ve B₂ toksinlerinin üreticisi olmak üzere üçünün (% 60) toksin üretimleri açısından atipik özellik gösterdiği belirlenmiştir. CPA üreticisi olan atipik *A. parasiticus* suşları bu toksini yalnızca belirleme limitinin çok az üzerinde olmak kaydıyla sırasıyla 59 ve 52 ng/ml düzeyinde üretmektedir.

Avustralya’da 1979-1995 yılları arasında coğrafik bölgenin toksijenite üzerine olan etkisini elimine etmek için aynı bölgeden toplanan toprak ve yer fıstığı örneklerinden izole edilmiş *A. flavus* ve *A. parasiticus* suşlarının toksijenik ve atoksijenik özelliklerinin genetik düzeydeki ilişkilerinin incelendiği bir çalışmada CPA üreticisi olan bir adet *A. parasiticus* suşu belirlenmiştir. Bu izolatın diğer toksijenik ve atoksijenik *A. parasiticus* izolatlarından genetik düzeyde farklılık gösterdiği ve bunun da farklı evrimsel tarihe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tran-Dinh ve diğ., 1999).

Literatür incelendiğinde *A. parasiticus* izolatlarının genellikle B ve G grubu aflatoksinleri birlikte ürettiği görülmektedir. Rodrigues ve diğ. (2009), tarafından bademden izole edilen *A. parasiticus* suşlarının 1 adedi dışında tamamının B ve G aflatoksinlerini birlikte üreterek yüksek aflatoksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde Vaamonde ve diğ. (2003), tarafından yapılan çalışmada da *A. parasiticus* suşlarının ortalama % 98’inin yüksek miktarda B ve G grubu aflatoksinlerin üreticisi olduğu belirlenmiştir.

Giorni ve diğ. (2007), mısırdan izole ettikleri 70 adet *A. section Flavi* izolatını aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturma özelliklerine göre 6 gruba ayırmıştır. Bu profiller içinde tüm suşların % 61’i CPA üreticisi olarak belirlenmiştir fakat hiçbirisi *A. parasiticus* olarak tanımlanmamıştır.

Literatürde çeşitli gıdalardan izole edilmiş *A. section Flavi* suşlarının çalışmadakine benzer şekilde aflatoksin ve CPA üretimlerine göre sınıflandırıldığı çalışmalar mevcutken BNP'nin dahil olduğu çalışmalar oldukça azdır.

Mısır'da yapılan bir çalışmada silaj örneklerinden izole edilmiş 15 adet *A. flavus* suşunun besiyerinde (28°C'de 10 gün) aflatoksin, CPA, BNP, aspergillik asit, kojik asit ve sterigmatosistin üretimleri TLC yöntemi ile incelenmiştir. Toksinlerin izolatlar tarafından birlikte üretimleri detaylı olarak açıklanmamasına rağmen 4 izolatın B ve G grubu aflatoksinleri, 3 izolatın yalnızca B₁ ve G₁ aflatoksinleri, 9 izolatın CPA, 1'er izolatın BNP, aspergillik asit ve sterigmatosistin ve 2 izolatın ise kojik asit üreticisi olduğu kaydedilmiştir (El-Shanawany ve diğ., 2005).

Starter kültür olarak kullanılan *A. oryzae* suşlarının toksin üretimi üzerine yapılan bir başka çalışmada ise 16 suşun hiçbirisi aflatoksin üretmezken, 7 adedinin 1,9 ile 43,6 mg/l düzeyinde BNP ürettiği, suşların 3 adedinin CPA'yı da birlikte ürettiği kaydedilmiştir (Orth, 1977).

A. section Flavi grubundaki küf türleri üzerine yapılan tarama çalışmaları izolatların doğadaki dağılımı ve ürettikleri toksin oranlarının coğrafik bölgelere ve substrata göre farklı olduğunu ve toksin profillerinin de farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışılan izolat sayısına göre de oranlar değişmektedir. Çalışmadaki izolatların AF, CPA ve BNP'yi birlikte oluşturma özellikleri uygun koşullarda kuru incirde de bu toksinlerin üretilebileceğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Daha önceki çalışmalarla kuru incir örneklerinde aflatoksin (Meçik, 2007) ve CPA'nın (Somuncuoğlu, 2007) doğal olarak bulunabildiği belirlenmiştir.

8.6 İzolatların İncirde Aflatoksin Ve Siklopiazonik Asit Oluşturma Özelliklerine Sıcaklık Ve Sürenin Etkisi

Çalışmanın bu aşamasında, izolatların kuru incirde aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturmada sıcaklık ve sürenin etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 57 izolatın içerisinde 5 izolat seçilmiştir. Seçilen izolatların besiyerinde toksin üretim özellikleri Çizelge 8.10'da görülmektedir. Toksin üretimleri aflatoksin için YES besiyeri, CPA için CYA besiyeri ve BNP için ise CZA besiyeri kullanılarak 25°C'de 7 gün inkübasyon sonunda belirlenmiştir. İzolatların spor süspansiyonlarının hazırlanması ve su aktivitesi 0,98 olarak ayarlanan kuru incir örneklerine aşılınması bölüm 7.4.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 8.10 : Kuru incirde aşılama çalışmalarında kullanılan izolatlar ve besiyerinde toksin oluşturma özellikleri.

İzolat Kodu	Tür	AFB ₁ (ng/ml)	AFB ₂ (ng/ml)	AFG ₁ (ng/ml)	AFG ₂ (ng/ml)	CPA (ng/ml)	BNP (ng/ml)
AF1(18)	<i>A. flavus</i>	1240,00	15,01	-	-	47603,93	1047,50
AF2(23)	<i>A. flavus</i>	1436,00	14,45	-	-	24917,37	-
AP1(26)	<i>A. parasiticus</i>	437,30	14,38	208,80	2,66	-	-
AP2(31)	<i>A. parasiticus</i>	1028,00	20,01	61,59	1,50	59,27	-
AT(29)	<i>A. tamarii</i>	-	-	-	-	2685,52	-

İzolatların kuru incirde aflatoksin ve CPA oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla 2 adet *A. flavus*, 2 adet *A. parasiticus* ve 1 adet *A. tamarii* seçilmiştir. *A. flavus* izolatlarının birisi aflatoksin B₁, B₂, CPA ve BNP, diğeri sadece aflatoksin B₁ ve B₂ üretmektedir. *A. parasiticus* izolatlarının birisi aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂, diğeri ise aflatoksine ilave olarak CPA üretmektedir. *A. tamarii* ise sadece CPA üretmektedir.

8.6.1 İncirde aflatoksin üretimine sıcaklık ve sürenin etkisi

2 adet *A. flavus* (AF1 ve AF2) ve 2 adet *A. parasiticus* (AP1 ve AP2) suşu su aktivitesi ayarlanan kuru incir örneklerine aşılanmış ve 20°C, 25°C, 27,5°C 30°C, 35°C ve 40°C’lerde 14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında 1., 3., 7. ve 14. günlerde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiş ve belirlenen ortalama aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ konsantrasyonları sırasıyla Çizelge 8.11 ve 8.12’de gösterilmiştir. Aflatoksin B₂, G₁ ve G₂ üretiminin gösterildiği Çizelge 8.12’de B₂, G₁ ve G₂ üretimi 20°C ve 35°C’lerde gözlenmediği için çizelgede yer verilmemiştir. İzolatların toplam aflatoksin üretiminin farklı sıcaklık ve sürelerle değişimi ise Çizelge A.1’de verilmiştir.

Çizelge 8.11 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde aflatoksin B₁ üretimi.

Küf	Süre (gün)	Aflatoksin B ₁ Konsantrasyonu (ng/g)					
		20°C	25°C	27,5°C	30°C	35°C	40°C
AF1	1	0,2334±0,0018	0,4067±0,0025	0,2606±0,0065	0,253±0,0047	nd	nd
	3	0,5238±0,0050	1,0988±0,0092	0,7708±0,0017	0,9457±0,0083	nd	nd
	7	0,5256±0,0058	2,1241±0,0002	27,6764±0,2746	0,7404±0,0093	0,1946±0,0033	nd
	14	5,4682±0,0027	2,5345±0,0047	2,779±0,0124	0,6874±0,0054	nd	nd
AF2	1	0,4805±0,0046	1,7368±0,0185	0,6797±0,0004	0,71±0,0110	nd	nd
	3	nd	45,9266±0,1722	14,3422±0,084	70,2008±0,9461	nd	nd
	7	nd	27,4795±0,3335	95,141±0,1927	114,483±0,2417	0,4254±0,0016	nd
	14	nd	23,3606±0,3398	1,7486±0,0127	197,2691±0,0326	0,2408±0,0018	nd
AP1	1	nd	1,7302±0,0088	1,2575±0,0037	1,2509±0,0069	nd	nd
	3	nd	669,7117±0,7054	63,4321±0,1448	840,9924±0,8938	nd	nd
	7	nd	574,2292±1,4164	41,4819±0,7193	672,2751±0,7171	0,3136±0,0017	0,6279±0,0091
	14	nd	624,9135±2,4266	523,7589±0,1457	771,5962±1,622	0,0956±0,001	0,4132±0,004
AP2	1	nd	0,3562±0,0045	0,3039±0,0029	0,1875±0,0035	0,2547±0,0023	nd
	3	1,247±0,0098	1193,6834±1,3044	6,114±0,0204	1024,5494±1,9014	nd	nd
	7	0,7716±0,0069	1193,3209±3,6957	2,1524±0,0474	916,7748±1,1433	0,1472±0,0086	0,8118±0,0008
	14	0,6005±0,0023	1123,0225±1,381	202,3348±0,025	658,2767±1,3649	0,1213±0,002	0,5117±0,009

nd: Mikotoksin üretimi belirlenmemiştir.

Çizelge 8.12 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde aflatoksin B₂, G₁ ve G₂ üretimi.

Küf	Süre (gün)	Aflatoksin B ₂ Konsantrasyonu (ng/g)				Aflatoksin G ₁ Konsantrasyonu (ng/g)				Aflatoksin G ₂ Konsantrasyonu (ng/g)			
		25°C	27,5°C	30°C	40°C	25°C	27,5°C	30°C	40°C	25°C	27,5°C	30°C	40°C
AF1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd	0,05±0,0012	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AF2	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	0,52±0,0054	0,27±0,0068	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	7	0,15±0,0038	0,55±0,0096	0,34±0,0026	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	nd	nd	0,72±0,0045	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AP1	1	nd	nd	nd	nd	1,35±0,0040	0,28±0,0018	0,98±0,0052	nd	nd	nd	nd	nd
	3	2,85±0,0038	nd	9,59±0,0245	nd	136,88±0,5796	0,60±0,0082	103,72±0,7833	nd	nd	nd	nd	nd
	7	2,85±0,0333	nd	11,51±0,2648	nd	181,77±0,2144	3,44±0,0510	108,50±0,0014	0,07±0,0016	1,25±0,0026	nd	0,96±0,0694	nd
	14	2,85±0,0060	13,43±0,3690	14,36±0,3155	nd	180,83±1,0801	94,55±0,5309	109,30±0,2608	0,10±0,0084	1,98±0,0220	0,85±0,0026	1,15±0,0183	nd
AP2	1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	4,51±0,0064	0,20±0,0012	4,15±0,0092	nd	18,69±0,2120	nd	52,56±0,0790	nd	nd	nd	nd	nd
	7	3,04±0,0255	nd	4,80±0,0036	nd	35,20±0,0318	nd	63,26±0,1600	nd	nd	nd	nd	nd
	14	4,77±0,0215	5,30±0,0680	4,93±0,0069	nd	47,32±0,0100	4,09±0,0052	43,83±0,0384	nd	nd	nd	nd	nd

nd: Mikotoksin üretimi belirlenmemiştir.

Çalışmada öncelikle aflatoksin üretimleri yönünden seçilen izolatlar arasında fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmış ve ANOVA tablosu Çizelge 8.13’de verilmiştir. Varyans analizi sonucunda izolatlar arasında aflatoksin üretimi açısından $\alpha=0,01$ düzeyinde önemli farklılık olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 8.13 : İzolatların aflatoksin üretimi varyans analiz tablosu.

Varyasyon Kaynağı		Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
AFB ₁	İzolatlar	2380663.746	3	793554.582	10,434	< 0,01
	Hata	14222446.734	187	76055.865		
	Toplam	16603110.479	190			
TOPLAM AF	İzolatlar	2903229.635	3	967743.212	10,587	< 0,01
	Hata	17092625.563	187	91404.415		
	Toplam	19955855.198	190			

İzolatların arasındaki farklılık en küçük önem farklılığı metodu (LSD) ile değerlendirilmiştir. *A. flavus* suşlarının kendi aralarındaki ve *A. parasiticus* suşlarının kendi aralarındaki farklılığın istatistiki açıdan ($\alpha=0,01$) önemli olmadığı bulunmuştur. Fakat *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri arasındaki farklılık istatistiki açıdan ($\alpha=0,01$) önemli olarak belirlenmiştir. İzolatlar arasındaki LSD analizine ait farklılık tablosu Çizelge 8.14’de verilmiştir.

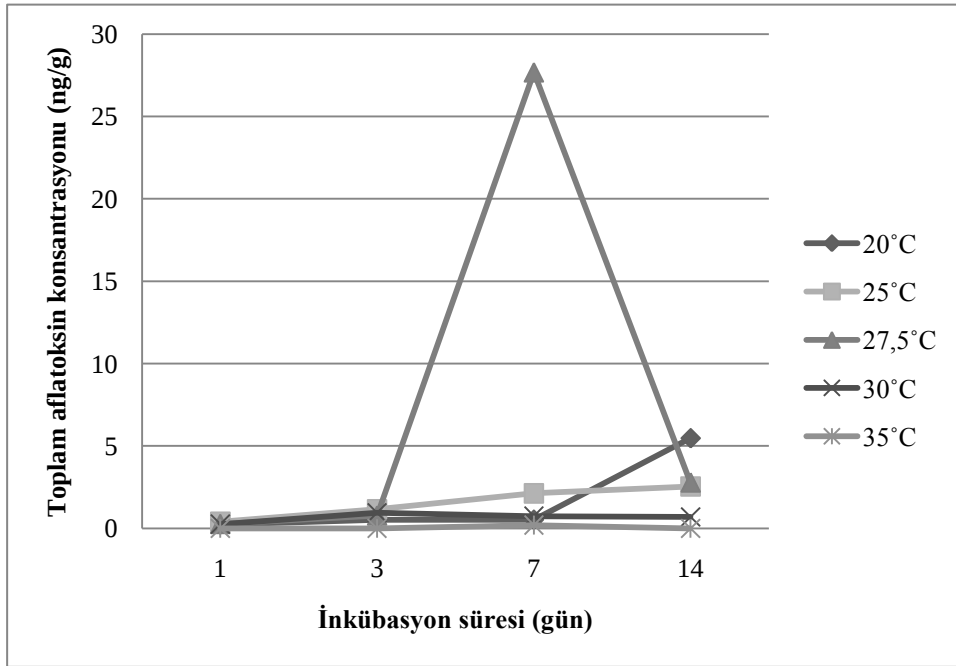
Çizelge 8.14 : Aflatoksin üretimi için izolatların arasındaki fark tablosu.

Küf kodu (I)	Küf kodu (J)	Ortalamaların farkı (I-J)	P	Küf kodu (I)	Küf kodu (J)	Ortalamaların farkı (I-J)	P
AFB ₁				AF Toplam			
AF1	AF2	-22,7548139	0,688	AF1	AF2	-22,8598832	0,713
	AP1	-197,4987805(*)	< 0,01		AP1	-238,7554103(*)	< 0,01
	AP2	-261,5597035(*)	< 0,01		AP2	-273,9198812(*)	< 0,01
AF2	AF1	22,7548139	0,688	AF2	AF1	22,8598832	0,713
	AP1	-174,7439667(*)	< 0,01		AP1	-215,8955271(*)	< 0,01
	AP2	-238,8048896(*)	< 0,01		AP2	-251,0599979(*)	< 0,01
AP1	AF1	197,4987805(*)	< 0,01	AP1	AF1	238,7554103(*)	< 0,01
	AF2	174,7439667(*)	< 0,01		AF2	215,8955271(*)	< 0,01
	AP2	-64,0609229	0,257		AP2	-35,1644708	0,569
AP2	AF1	261,5597035(*)	< 0,01	AP2	AF1	273,9198812(*)	< 0,01
	AF2	238,8048896(*)	< 0,01		AF2	251,0599979(*)	< 0,01
	AP1	64,0609229	0,257		AP1	35,1644708	0,569

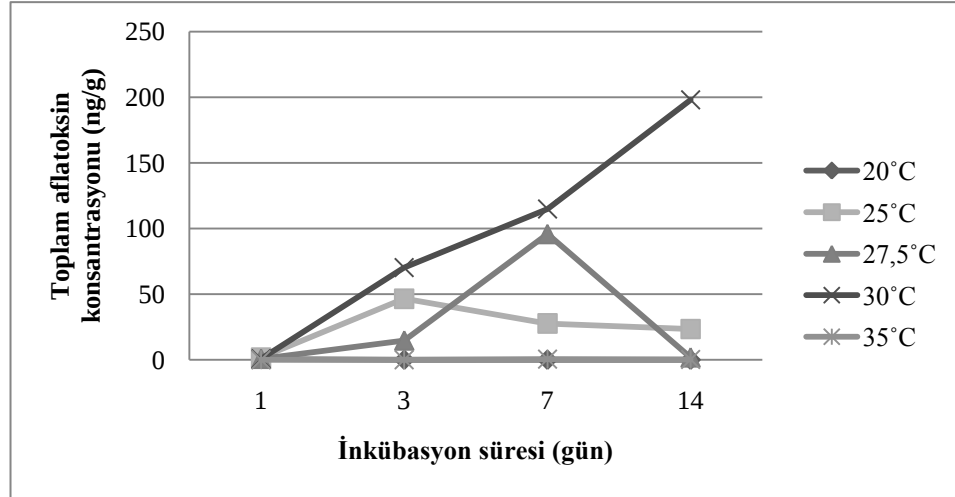
(*) $\alpha=0,01$ önem düzeyinde ortalamaların farkı önemlidir.

A. parasiticus suşlarının kuru incirde *A. flavus* suşlarından önemli düzeyde farklılık göstererek ($\alpha=0,01$) çok daha yüksek miktarda aflatoksin üreticisi olduğu belirlenmiştir. Her iki küf türü için de aflatoksin üretimi açısından optimum sıcaklık

ve süre değişiklik göstermektedir. *A. flavus* türleri arasında istatistiki açıdan farklılık bulunmamasına ve iki suşun YES besiyerindeki aflatoksin üretimleri birbirine çok benzer olmasına rağmen AF2 numaralı izolat kuru incirde 30°C’de 14. günde 198 ng/g miktarı ile daha yüksek miktarda aflatoksin üretmektedir. AF1 olarak numaralandırılmış izolat ise aynı sıcaklık ve sürede yalnızca aflatoksin B₁’i 0,69 ng/g üreterek kuru incirde en zayıf aflatoksijenik özellik gösteren izolat olarak belirlenmiştir. AF1 yalnızca 25°C sıcaklıkta 3. gün çok düşük G₁’de üretmiştir. *A. flavus* türleri tarafından aflatoksin üretimleri en iyi AF1 için 27,5°C’de 7. günde ve AF2 için 30°C’de 14. günde gerçekleşmiştir. 20°C ve 35°C’de toksin üretimi oldukça düşük gerçekleşmiş ve 40°C’de ise aflatoksin üretimi gözlenmemiştir. AF2 numaralı izolatın ise aflatoksin B₁’e ilave olarak B₂ ürettiği, G grubu aflatoksinleri üretmediği gözlenmiştir. *A. flavus* izolatları tarafından aflatoksin üretimi için optimum sıcaklıkların aynı türün üyeleri arasında da değiştii Northolt ve diğ. (1977), tarafından yapılmış çalışma ile gösterilmiştir. *A. flavus* suşlarının toplam aflatoksin üretimlerinin zamana bağlı değişim grafikleri Şekil 8.6 ve 8.7’de, 3 boyutlu grafikleri ise Ek B’de görölmektedir.



Şekil 8.6 : AF1’in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği (40°C’de toksin üretimi olmamıştır).



Şekil 8.7 : AF2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği (40°C'de toksin üretimi olmamıştır).

Çalışmada seçilen izolatlar için aflatoksin üretimine sıcaklık ve sürenin etkisinin önemi varyans analizi ile incelenmiştir. Analiz sonucunda sıcaklık ve sürenin etkisinin $\alpha=0,01$ düzeyinde istatistiki olarak çok önemli olduğu ve aralarındaki ilişkinin önemli olduğu belirlenmiştir ve ANOVA tablosu Çizelge 8.15'de verilmiştir.

Çizelge 8.15 : İzolatların toplam aflatoksin üretimi için sıcaklık ve süre etkisinin ANOVA tablosu.

Varyasyon Kaynağı		Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
AF1	Sıcaklık	355,031	5	71,006	22409.174	< 0,01
	Süre	187,598	3	62,533	19734.942	< 0,01
	Sıcaklık*Süre	909,741	15	60,649	19140.609	< 0,01
	Hata	0,076	24	0,003		
	Toplam	1638.735	48			
AF2	Sıcaklık	55220.015	5	11044.003	210553.729	< 0,01
	Süre	11668.735	3	3889.578	74154.745	< 0,01
	Sıcaklık*Süre	43754.064	15	2916.938	55611.366	< 0,01
	Hata	1,259	24	0,052		
	Toplam	140325.453	48			
AP1	Sıcaklık	3844670.347	5	768934.069	2636838.826	< 0,01
	Süre	1014806.284	3	338268.761	1159995.687	< 0,01
	Sıcaklık*Süre	1650846.735	15	110056.449	377407.023	< 0,01
	Hata	6,999	24	0,292		
	Toplam	9292724.298	48			
AP2	Sıcaklık	6781984.364	5	1356396.873	1330044.339	< 0,01
	Süre	1224028.597	3	408009.532	400082.586	< 0,01
	Sıcaklık*Süre	2464164.328	15	164277.622	161085.981	< 0,01
	Hata	24,476	24	1,020		
	Toplam	14124712.776	48			

1997 yılında Gqaleni ve diğ. tarafından yapılan çalışmada *A. flavus* suşunun YES ve CYA besiyerinde aflatoksin üretimine su aktivitesi, sıcaklık (20°C, 25°C, 30°C, 37°C) ve sürenin (5., 10., 15., 20. gün) etkisi incelenmiş ve çalışmamızla benzer şekilde istatistiki olarak hepsinin aflatoksin üretimi üzerine etkisi önemli ($\alpha=0,01$) bulunmuştur. YES besiyerinin aflatoksin üretimini desteklediği ve CYA besiyerinden % 30 daha yüksek konsantrasyonda aflatoksin üretimi gerçekleştiği belirlenmiştir. En düşük aflatoksin konsantrasyonu 0,996 su aktivitesi'nde 20°C'de 5 günde, 306 ng/ml düzeyindeki en yüksek aflatoksin konsantrasyonu ise aynı su aktivitesi'nde 30°C ve 15 gün inkübasyon sonunda gözlenmiştir. Çalışmanın sonunda aflatoksin üretimi için optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir.

Gqaleni ve diğ. 1996 yılında otoklavlanmış mısır'a aşıladıkları *A. flavus*'un aflatoksin üretimine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisini araştırmışlar ve istatistiki olarak aralarındaki ilişkinin önemli olduğunu kaydetmişlerdir. 0,98 su aktivitesinde (aw) 30°C'de 14 günde en yüksek aflatoksin konsantrasyonuna ulaşılmıştır. 0,98 aw'de 20°C'de de 14 günde yarı yarıya düşmesine rağmen üretim vardır.

Gqaleni ve diğ. (1996), tarafından mısır taneleri üzerinde yapılan çalışmanın benzeri bir çalışmada yer fıstığında *A. flavus* izolatlarının AF üretimleri için belirlenen optimum sıcaklık ve su aktivite değerleri farklılık göstermektedir. En düşük AFB₁ üretimi 0,94 aw'de gözlenmiştir. Bu su aktivite değerinde 25°C ve 30°C'de küf gelişimi iyi, fakat AFB₁ üretimi çok düşük konsantrasyonda olmuştur. Bunun yanısıra 20°C'de gelişim çok zayıf olmasına rağmen 28 gün sonra 1375 ppb miktarında AFB₁ üretimi şekillenmiştir. Bu farklılık çalışmada tek küf suşu kullanmamış olmaları, yer fıstığının otoklavlanmamış, sterilize edilmemiş olması ve çalışmanın 60 güne kadar sürdürülerek farklı çevresel koşullarda küf ve substratın ilişkisini gözleyebilecek yeterli süreye sahip olmaları ile açıklanabilir (Vaamonde ve diğ., 2006).

Giorni ve diğ. (2007), tarafından mısırdan izole edilmiş 70 adet *A. section Flavi* üyesinin 38 adedi in vitro aflatoksin oluşturma özelliklerine göre seçilerek sıcaklık ve su aktivitesinin aflatoksin oluşturmaları üzerine etkisi incelenmiştir. 15, 25 ve 30°C sıcaklık ve 0,83, 0,94 ve 0,995 su aktivite değerlerinde 14 gün karanlıkta inkübe edilerek Czapek agar besiyerinde toksin analizleri gerçekleştirilmiştir. 25°C'nin *A. flavus* suşları tarafından 2406 ng/g konsantrasyonu ile AFB₁ üretimi için

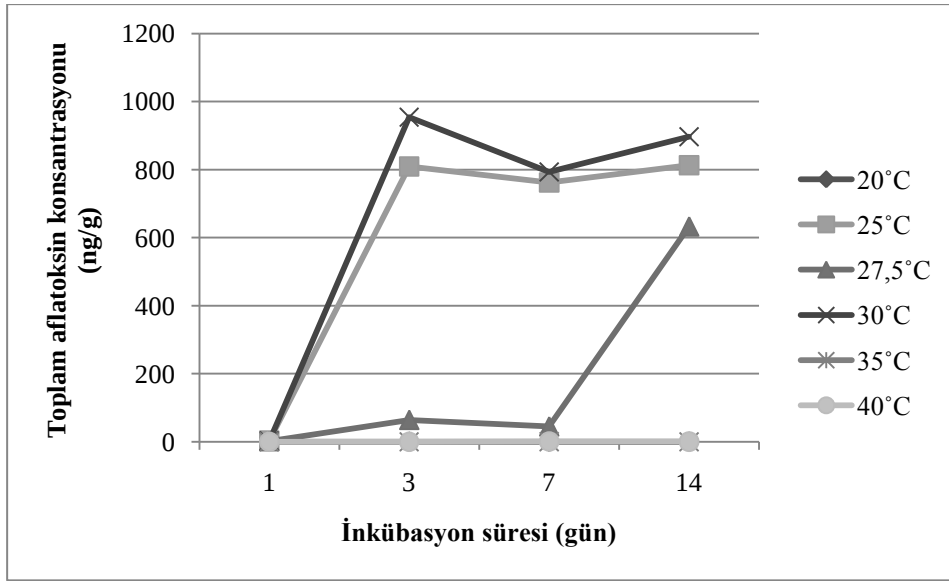
optimum sıcaklık olduğu kaydedilmiştir. Aynı çalışmada hem küf gelişimi hem de toksin üretimi için optimum su aktivite değeri 0,99 olarak belirlenmiştir. Toksin üretimi ve üretici suş sayısında 15°C ve 30°C’de düşüş gözlenmiştir. Giorni ve diğ. (2007), tarafından belirlenen 25°C optimum sıcaklık ile ülkemiz kuru incirlerinden izole edilen *A. flavus* suşları için belirlediğimiz 30°C optimum sıcaklık bulguları, suşlarımızın İtalya’daki suşlardan daha termofilik özellikte olduğunu düşündürmektedir.

Brezilya fındığında aflatoksin üretimi üzerine depolama sıcaklığı, bağıl nem ve süresinin etkisi ve öneminin ortaya konduğu bir diğer çalışmada % 97 bağıl nemde 60 gün depolamada 25°C’de 6817 ng/g ile en yüksek aflatoksin konsantrasyonu ve 30°C’de ise 5046 ng/g ile ikinci en yüksek konsantrasyona ulaşılmıştır. *A. flavus* gelişimi en iyi 29-35°C’ler arasında olmasına rağmen toksin üretimi 25°C’de en yüksek değere ulaşmıştır. Ancak biyokütle ile toksin üretimi arasında lineer bir ilişki olduğu doğrulanamamıştır (Arrus ve diğ., 2005).

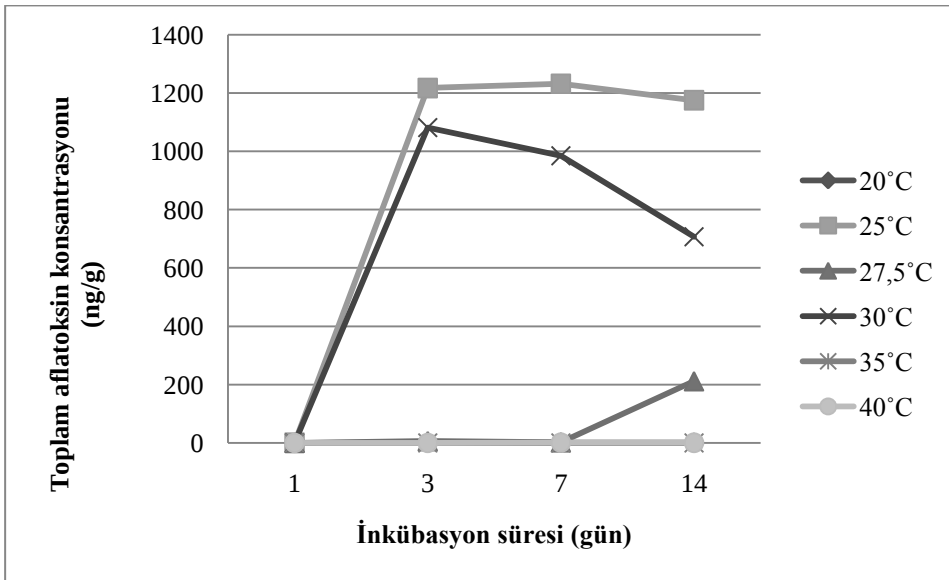
A. flavus tarafından aflatoksin B₁ üretimi için çeşitli yayınlarda bildirilen optimum sıcaklıklar 24-35°C arasında değişmektedir. Sabit su aktivitesinde sıcaklığın düşüşüyle birlikte aflatoksin üretiminin de düştüğü ve 10-13°C’de tamamen durduğu belirtilmiştir (Gqaleni ve diğ., 1997).

A. flavus türlerinin aflatoksin üretimleri ile sıcaklık ilişkisinin açıklanmasına yönelik genetik düzeyde yapılan çalışmalar aflatoksin biyosentezinden sorumlu genlerin (afls ve aflR) 37°C sıcaklıkta mevcut olmadığını fakat 25-30°C sıcaklık aralığında aflatoksin üretiminin artışına paralel olarak bu genlerin ekspresyonunun da arttığını göstermektedir (Schmidt-Heydt ve diğ., 2009).

A. parasiticus suşlarının (AP1 ve AP2) aflatoksin üretimleri incelendiğinde ise kuru incirde 25°C’de 7. günde 1231 ng/g gibi çok daha yüksek düzeyde aflatoksin üretme özelliği gösterdikleri görülmektedir. 30°C sıcaklıkta da yüksek konsantrasyonda aflatoksin üretmişlerdir. 20°C ve 40°C’de aflatoksin üretimi çok daha düşük olmak kaydıyla devam etmiştir. Bu durum *A. parasiticus* türlerinin yüksek ve düşük sıcaklıklara *A. flavus* türlerinden daha dayanıklı olduğunu düşündürmektedir. *A. parasiticus* suşlarının toplam aflatoksin üretimlerinin zamana bağlı değişimleri Şekil 8.8 ve 8.9’da, 3 boyutlu grafikleri ise Ek B’de gösterilmiştir.



Şekil 8.8 : AP1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoxin değişim grafiği.



Şekil 8.9 : AP2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoxin değişim grafiği.

AP1 olarak numaralandırılmış *A. parasiticus* izolatı B ve G grubu aflatoxinlerin tamamını 25, 27,5 ve 30°C'de üreterek tipik özellik göstermiştir. Özellikle 100 ng/g düzeyinde G₁ üretimi ile de kuru incirde yüksek miktarda aflatoxin üretimini desteklemiştir. AP2 ise aflatoxin G₂ dışında diğer aflatoxinleri üretmiş ve optimum koşulda bile G₁ miktarının AP1'in üretiminin yarısı kadar olduğu gözlenmiştir.

A. parasiticus izolatlarından AP1'in 40°C sıcaklıkta kuru incirde yalnızca B₁ ve G₁ ürettiği belirlenmiştir. Bu özellik YES besiyerinde yaptığımız çalışmalarda

belirlenmemiştir. Literatürde *A. parasiticus* türlerinin yalnızca aflatoksin B₁ ve G₁ üreticisi olduğu belirlenmiş çalışmalar mevcuttur (Dorner ve diğ., 1984). Ayrıca bu toksin profilinin kuru incirde sıklıkla şekillendiği de kaydedilmiştir (Meçik, 2007; Bircan ve diğ., 2008).

Sonuçta kuru incirde *A. flavus* izolatları tarafından aflatoksin üretimine G grubu aflatoksinlerin etkisi yoktur. *A. parasiticus* izolatlarından özellikle AP1 izolatu tarafından aflatoksin üretimine ise G grubu aflatoksinlerin katılımı önemlidir.

A. flavus (AF2) ve özellikle *A. parasiticus* (AP1 ve AP2) türlerinin 30°C’de 3. günde yüksek miktarda aflatoksin üretme özelliği göstermesi önemlidir. Bu durum *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri ile kontamine olan incirlerin ağaçta, yerde veya sergide kurutulması esnasında özellikle Ege Bölgesi’nde yüksek aflatoksin içeriğine sahip olabileceklerini düşündürmektedir.

8.6.2 İncirde siklopiazonik asit üretimine sıcaklık ve zamanın etkisi

2 adet *A. flavus* (AF1 ve AF2), 1 adet *A. parasiticus* (AP2) ve 1 adet *A. tamarii* suşu su aktivitesi ayarlanan kuru incir örneklerine aşılınmış ve 20°C, 25°C, 27,5°C 30°C, 35°C ve 40°C’lerde 14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sırasında 1., 3., 7. ve 14. günlerde siklopiazonik asit analizleri gerçekleştirilmiş ve belirlenen ortalama CPA konsantrasyonları Çizelge 8.16’da gösterilmiştir.

Çizelge 8.16 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde CPA üretimi.

Küf	Süre (gün)	CPA Konsantrasyonu (ng/g)					
		20°C	25°C	27,5°C	30°C	35°C	40°C
AF1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	2894,8875±18,7418	3354,06±1,6687	2917,5475±8,7009	1763,585±0,6010	1116,46±8,5135	687,1903±0,2597
	7	4650,1975±3,5107	7334,71±0,6788	3048,5775±2,1955	2396,575±2,8284	1927,66±1,2303	776,98±1,5273
	14	5811,381±3,2399	7811,715±2,5526	3122,91±1,4424	2430,2231±2,1702	2172,165±26,0144	664,1270±0,5231
AF2	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	1540,2625±1,9410	2041,145±0,9545	1298,715±1,8879	1188,2114±2,6537	968,415±1,6617	258,19±1,5414
	7	2123,9342±9,2181	2444,745±1,5909	1597,0602±2,2739	1909,8276±1,8492	1010,783±2,6940	258,19±0,7636
	14	2450,8972±7,8158	2518,6037±3,6918	1742,7975±2,1375	1961,156±5,9623	1021,9705±0,6512	258,19±0,9121
AP2	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AT	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3	121,9705±0,6512	816,705±2,2980	824,0314±1,9142	1286,556±3,9399	624,3895±2,7145	89,9105±0,4942
	7	202,125±0,8555	1187,651±3,4492	1005,4103±7,8027	1641,35±3,8890	801,315±2,5385	98,7161±2,2286
	14	232,79±0,5232	1113,2015±4,2447	1458,1068±3,0817	1851,5125±5,9503	759,27±1,2445	94,1705±1,5860

nd: Mikotoksin üretimi belirlenmemiştir.

Sonuçlar incelendiğinde *A. parasiticus* izolatının CPA üretmediği görülmektedir. Bu durumun substrat özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. CPA üretimini destekleyen CYA besiyerinde yapılan çalışmalarla tespit limitinin çok az üzerinde olmak kaydıyla üretici olduğu belirlenen bu suşun kuru incirde aynı özelliği taşımadığı belirlenmiştir.

Seçilen izolatların siklopiazonik asit üretimleri açısından karşılaştırıldığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) tablosu Çizelge 8.17’de verilmiştir. Seçilen izolatların tamamı arasında CPA üretimi açısından $\alpha=0,01$ düzeyinde önemli farklılık olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 8.17 : İzolatların siklopiazonik asit üretimi varyans analiz tablosu.

Varyasyon Kaynağı		Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
CPA	İzolatlar	135957732,951	3	45319244,317	5,166	< 0,01
	Hata	291279001,854	92	1549356,393		
	Toplam	427236734,805	95			

İzolatlar arasındaki farklılık ise en küçük önem farklılığı metodu (LSD) ile analizlenmiş ve LSD analizine ait izolatlar arasındaki farklılık tablosu Çizelge 8.18’de verilmiştir. LSD analizi neticesi AF1 suşunun daha yüksek miktarda CPA üreterek diğer tüm suşlarla olan farklılığının $\alpha=0,01$ önem düzeyinde istatistiki açıdan da önemli olduğunu göstermiştir. AT izolatının toksin üretimi açısından AF2 ve AP2 izolatları ile arasındaki farklılığının istatistiki açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 8.18 : İzolatların siklopiazonik asit üretimi için fark tablosu.

Küf kodu (I)	Küf kodu (J)	Ortalamaların farkı (I-J)	P
AF1	AF2	1184.2184375(*)	< 0,01
	AP2	2286.7063125(*)	< 0,01
	AT	1694.6570729(*)	< 0,01
AF2	AF1	-1184.2184375(*)	< 0,01
	AP2	1102.4878750(*)	< 0,01
	AT	510,4386354	0,046
AP2	AF1	-2286.7063125(*)	< 0,01
	AF2	-1102.4878750(*)	< 0,01
	AT	-592,0492396	0,021
AT	AF1	-1694.6570729(*)	< 0,01
	AF2	-510,4386354	0,046
	AP2	592,0492396	0,021

(*) $\alpha=0,01$ önem düzeyinde ortalamaların farkı önemlidir.

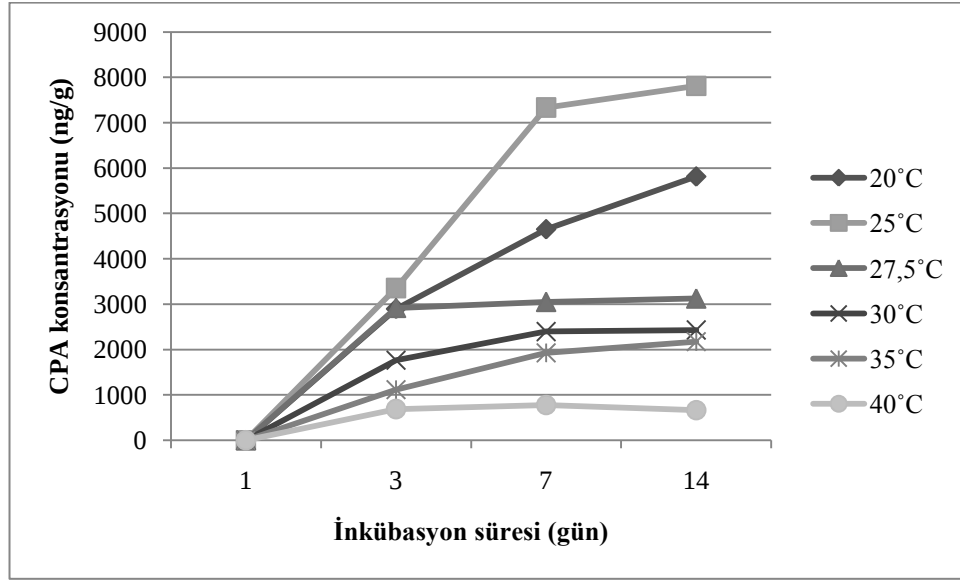
CPA üretimi gözlenmeyen AP2 hariç teker teker tüm izolatların CPA üretimine sıcaklık ve sürenin etkisinin incelendiği ANOVA tablosunda ayrı ayrı ve kombinasyon olarak etkilerinin istatistiki ($\alpha=0,01$) olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Çizelge 8.19’da gösterilmiştir.

Çizelge 8.19 : İzolatların siklopiazonik asit üretimi için sıcaklık ve süre etkisinin ANOVA tablosu.

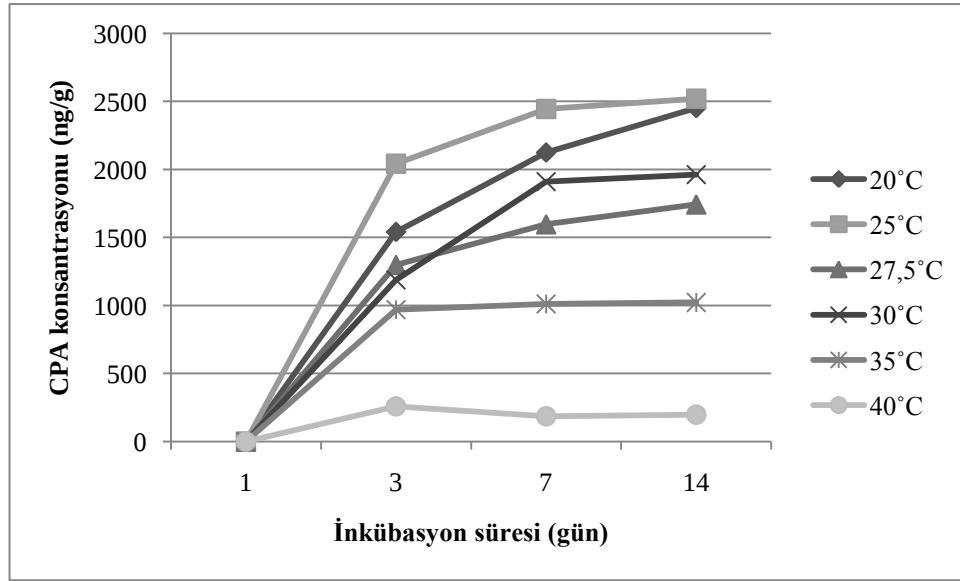
Varyasyon Kaynağı		Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
AF1	Sıcaklık	88229820.990	5	17645964.198	343489.959	< 0,01
	Süre	99708470.236	3	33236156.745	646963.010	< 0,01
	Sıcaklık*Süre	47795178.808	15	3186345.254	62024.245	< 0,01
	Hata	1232.942	24	51,373		
	Toplam	486727939.438	48			
AF2	Sıcaklık	13280794.930	5	2656158.986	276161.756	< 0,01
	Süre	21520136.430	3	7173378.810	745818.642	< 0,01
	Sıcaklık*Süre	5386510.895	15	359100.726	37335.825	< 0,01
	Hata	240,453	24	9,618		
	Toplam	97401934.489	48			
AT	Sıcaklık	7442025.157	5	1488405.031	178775.030	< 0,01
	Süre	6136179.848	3	2045393.283	245675.899	< 0,01
	Sıcaklık*Süre	2906976.267	15	193798.418	23277.480	< 0,01
	Hata	199,814	24	8,326		
	Toplam	33310451.586	48			

CPA üretimi tüm suşlarda 1. günde belirlenmemiş, 3. günden itibaren gözlenmiş ve 14. güne doğru genellikle artış göstermiştir. *A. flavus* izolatlarından AF1 suşunun CPA üretimi enel olarak AF2 suşundan daha yüksektir. En yüksek CPA üretimi her iki *A. flavus* izolatında da 25°C 14 günde görülmüştür. 40°C’de de diğer sıcaklıklardan daha düşük olmak kaydıyla *A. flavus* suşlarının CPA ürettiği belirlenmiştir. En yüksekten düşüğe doğru CPA üretimi açısından bir sıralama yapılacak olursa 25°C>20°C>27,5°C>30°C>35°C>40°C olduğu görülmektedir. *A. tamarii* izolatı ise *A. flavus* türlerinden daha zayıf toksijenik özellik göstermiştir ve en yüksek CPA üretimi 30°C’de 14. günde şekillenmiştir. *A. tamarii* izolatının CPA üretimi için sıcaklık sıralaması ise 30°C>27,5°C>25°C>35°C>20°C>40°C şeklindedir. 27,5°C 14 günde de biraz daha az olmak kaydıyla yine yüksek oranda CPA üretimi gözlenmiştir. AF1, AF2 ve AT izolatlarının CPA üretimlerinin sıcaklık

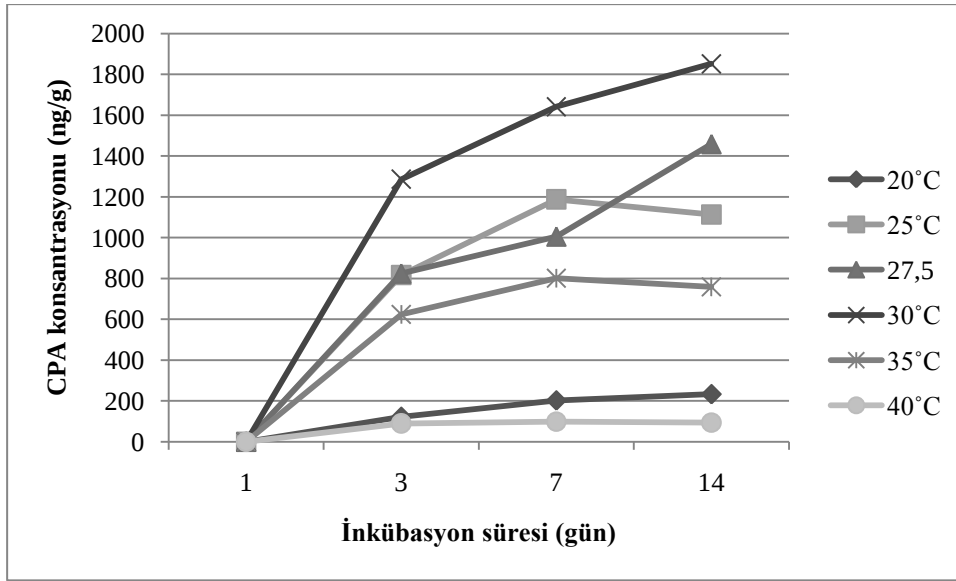
ve zamana bağılı değişim grafikleri Şekil 8.10, 8.11 ve 8.12’de, 3 boyutlu grafikleri ise Ek C’de verilmiştir.



Şekil 8.10 : AF1’in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde CPA değişim grafiği.



Şekil 8.11 : AF2’nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde CPA değişim grafiği.



Şekil 8.12 : AT'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde CPA değişim grafiği.

1997 yılında Gqaleni ve diğ. tarafından yapılan çalışmada *A. flavus* izolatı için inkübasyon süresi, substrat, sıcaklık ve su aktivitesinin CPA üretimi üzerine etkisi önemli bulunmuştur. En yüksek CPA üretimi 0,996 aw'de 25°C'de 15. günde belirlenmiştir. En düşük CPA konsantrasyonu 37°C ve ikinci olarak da 20°C'de gözlenmiştir. CYA besiyeri CPA üretimini desteklemekte ve YES besiyerine nazaran daha yüksek konsantrasyonda üretilmektedir. Yapılan çalışma ile benzer olarak CPA üretimi için optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir.

Gqaleni ve diğ. (1996), tarafından otoklavlanmış mısır'a aşıl原因 *A. flavus* izolatının CPA üretimine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada her iki değişkenin etkisi de $\alpha=0,01$ önem düzeyinde önemli bulunmuştur. 0,98 aw'de 20°C'de 14 gün sonunda 1876 ng/g ile en yüksek CPA üretimi şekillenirken 0,90 aw'de 30°C'de en düşük olmuştur. 0,98 su aktivite değerinde 30°C'de 14 günde 20°C'den daha düşük olmasına rağmen üretim (1614 ng/g) vardır. Genel olarak sabit su aktivitesinde 20°C'de 30°C'ye göre CPA üretimi yüksek olmakta ve su aktivitesi arttıkça toksin üretimi artmaktadır. Çalışmadaki bulgular bu bulguyu desteklemektedir. Yukarıdaki aynı çalışmada araştırılan *P. commune* *A. flavus*'tan daha yüksek miktarda CPA üretme özelliği ile farklılık göstermiştir. *P. commune* için optimum değerler, 0,98 aw 20°C'de 14. günde 7678 ng/g ile en yüksek ve. 0,98 aw'de 30°C'de yarı yarıya düşük olarak belirlenmiştir (4761 ng/g). *A. flavus* ve *P. commune* için yüksek su aktivite, düşük sıcaklığın CPA üretimini arttırdığı ve düşük su aktivite, yüksek sıcaklığın ise azalttığı belirlenmiştir.

Başka bir *Penicillium* türü olan *P. camembertii* ile yapılan bir başka çalışmada da CPA üretimi için optimum sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir (Le Bars, 1979).

Vaamonde ve diğ. (2006), tarafından yer fıstığında *A. flavus* türlerinin CPA üretimi üzerine sıcaklık ve su aktivitesinin etkisinin araştırıldığı çalışmada ise CPA miktarı 0,94 aw'de 25°C'de 28 gün sonra 4469,2 µg/kg ile maksimum seviyeye ulaşmış fakat 20°C'de 21. günde 2690 µg/kg miktarında daha düşük üretim gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan *A. flavus* izolatları Gqaleni ve diğ. tarafından yapılan çalışmada kullanılan *A. flavus* izolatları ile benzer şekilde aflatoksin ve CPA'yı birlikte üretme özelliğindedir. Bu toksinlerin bir izolat tarafından birlikte üretimleri sıcaklık gibi çevresel faktörlerin ve inkübasyon süresinin yanısıra analizde kullanılan kültürel sisteme (besiyeri, gıda örneği) göre de çok farklılık göstermektedir. Örneğin YES besiyeri veya sıvı besiyeri kullanıldığında yüksek su aktivitesine sahip olmasına rağmen 30°C'de 21 günde çok düşük miktarda aflatoksin üretimi şekillenmektedir (Vaamonde ve diğ., 2006). Fakat çalışmanın benzeri otoklavlanmış mısır tanelerinde yapıldığında su aktivite değeri 0,992 olmasına rağmen her iki toksininde üretim miktarları ve oranları çok yüksek olmaktadır (Gqaleni ve diğ., 1996).

Yer fıstığında kuraklık stresi altında 29,6°C sıcaklığın *A. flavus* kolonizasyonu ve aflatoksin oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. 2007 yılı kuru incir hasatında ocak-temmuz ayları arasında 2002-2006 yıllarına nazaran 1-2°C daha yüksek sıcaklık, 300 mm daha az yağış ve % 10-15 düşük bağıl nem görülmüştür. Yaz döneminin ortalama sıcaklığı 29,1°C olarak belirlenmiştir. Ve bu yılın üründe aflatoksin varlığı ve Avrupa Birliği ülkelerinden gelen hızlı alarm sayılarında ciddi artış şekillenmiştir. Bu durum 2007 yılında görülen kuraklıkla ilişkilendirilmiş ve kuraklık stresi neticesi kuru incirler *A. flavus* türleri ile kontaminasyona hassas duruma gelerek daha yüksek konsantrasyonda aflatoksin üretimi şekillenmiştir. Bu durumu açıklamak üzere ileri sürülen teorilerden biri kuraklık ile üründe prolin, asparagin gibi aflatoksin biyosentezini tetikleyen serbest aminoasitlerin artışının olabileceği, bir diğeri ise bitkinin sahip olduğu fitoaleksinler gibi doğal direnç bileşenlerinin kuraklık stresi altında kaybolabileceğidir (Bircan ve diğ., 2008).

9. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Ege Bölgesi'nden kurutma aşamasında toplanan incir örneklerinden izole edilmiş 57 adet *Aspergillus* section *Flavi* üyesi küf türünün moleküler yöntemle identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde aflatoksin, siklopiazonik asit ve β -nitropropionik asit oluşturma özellikleri belirlenen izolatların arasından seçilen 5 izolatın incirde aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturmaya sıcaklık ve sürenin etkisi belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılmış olan moleküler metodoloji kuru incir örneklerinde özellikle toksin oluşumu açısından önem taşıyan küf türlerinden *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* varlığının belirlenmesinde kullanılabilir. Fakat bu metodoloji toksijenik ve atoksijenik izolatları birbirinden ayırmada yetersiz kalmaktadır. Toksijenik izolatların belirlenmesi toksin üretiminde rol oynayan genlerin hedeflenmesi gibi daha ileri çalışmaları gerektirmektedir. Bu çalışma moleküler teknikler kullanılarak incir örneklerinden izole edilen *A. section Flavi* türlerinin ITS bölgesi kullanılarak belirlendiği bilginiz dahilindeki ilk çalışmadır.

Çalışmada *A. section Flavi* üyelerinin *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. tamarii* küf türlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Tanımlanan küf türleri özellikle en toksijenik özellikteki mikotoksin olan aflatoksinlerin başlıca üreticisi olmaları ile önem taşımaktadır. Kuru incirde bu küf türlerinin bulunması aynı zamanda aflatoksin mevcut olabileceğinin de göstergesidir. Fakat doğada aynı küf türünün toksijenik özellikte olanları olduğu gibi olmayanları da mevcuttur. Toksijenik ve atoksijenik suş dağılımı coğrafik bölgelere ve gıda tipine göre farklılık göstermektedir. Bütün bölgelerde olduğu gibi Türkiye'de de kuru incirde hangi türün baskın olduğu ve türlerin toksijenite bilgisi özellikle mikotoksinlere yönelik hasat öncesi önleyici tedbirlerin alınması yönünden önem taşımaktadır. Ayrıca daha ileri çalışmalar yapılarak atoksijenite fenomenonunun anlaşılması etkili biyokontrol yöntemlerinin geliştirilmesi adına yararlı olacaktır.

Çalışmada 57 adet izolatın besiyerinde toksijenik özellikleri aflatoksin, siklopiazonik asit ve β -nitropropionik asit üretme potansiyellerinin analizi ile belirlenmiştir.

İzolatların % 96,5'i aflatoksin, % 93'ü siklopiazonik asit ve % 28'i ise β -nitropropionik asit üreticisi olarak belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde tüm izolatların kuru incir örneklerinden izole edilmiş olması ve yüksek toksijenik özellikte olması önemlidir. Bu durum kuru incirde aflatoksin, siklopiazonik asit ve β -nitropropionik asit toksinlerinin kontaminasyon riskine işaret etmektedir. Fakat söz konusu izolatların gıda üzerindeki davranışları besiyerindekinden çok daha farklı olmaktadır. Bununla beraber küflerin toksijenik potansiyellerinin tarımsal ürünlerdeki doğal mikotoksin kontaminasyonunu etkileyen önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir.

Sıcaklık, nem, depolama koşulları gibi çok sayıda faktör küflerin üründe gelişip toksin oluşturma özelliklerini belirlemektedir. Dolayısıyla kuru incirden izole edilen toksijenik küflerin hangi koşullarda gelişip söz konusu toksinleri ürettiğinin belirlenmesi mikotoksinlerin önleme çalışmaları için yararlı olacaktır.

A. flavus, *A. parasiticus* ve *A. tamarii* izolatlarının kuru incir'e aşılansak aflatoksin ve siklopiazonik asit üretimlerine sıcaklık ve sürenin etkisinin belirlendiği çalışmada Kuru incirde aflatoksin kontaminasyonunun sorumlu üreticisi *A. parasiticus* olarak belirlenmiştir. *A. flavus* izolatları daha zayıf toksijenik özellik göstermiştir. Aflatoksin kontaminasyonunun başlıca aflatoksin B₁ tarafından oluştuğu ve bu nedenle B₁'in standart olarak alınmasının ve takibinin doğru bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

Kuru incirde CPA üretiminden ise başlıca *A. flavus* türleri, daha az olarak da *A. tamarii* izolatu sorumlu olarak belirlenmiştir. Kuru incirde aflatoksinden daha yüksek miktarda CPA oluşmaktadır. Sonuç olarak üretim miktarları değişmekteyse de çalışmamızdaki *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatları kuru incirde aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşumundan sorumlu türlerdir. Ayrıca elde edilen veriler üründe toksin oluşumunun sıcaklık dalgalanmasından önemli derecede etkilendiğini göstermektedir.

Mikotoksin üretimini etkileyen çevresel faktörlerin başında sıcaklık ve bağıl nem gelmektedir. Bunlara ilave olarak su aktivitesi, nem, depolama süresi, haşereler veya kabuğun olup olmaması da küf gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine etkilidir. Fakat bu faktörlerin, aynı substrat üzerinde dahi olsa küf gelişim ve mikotoksin üretimi üzerine farklı sonuçlar doğurduğunu belirtmek gerekmektedir. Ayrıca

koşullar toksin üretimi için küf gelişiminde olduğundan çok daha sınırlayıcıdır ve aynı türün farklı mikotoksin üretimleri için farklılık gösterebileceği gibi aynı mikotoksini üreten farklı küf türleri içinde farklılık göstermektedir.

Gıda güvenliği açısından bakılacak olursa elde edilen veriler kurutma teknolojisinin geliştirilmesinde kullanılabilir. Kuru incirde yüksek su aktivitesinde 25-30°C'ler toksin oluşumunu arttırmaktadır. Ülkemizde geleneksel olarak güneşte kurutma yapılmakta fakat bu çalışmadaki verilere göre 35°C'nin üstünde kurutma teknolojisi kullanılarak hızlı bir şekilde kurutma yapılacak olursa, prosesin güvenilir olacağı düşünülmektedir. Fakat kurutmada su aktivitesi çok önemli yer tutmaktadır. Dolayısıyla ayrıca su aktivitesinin kuru incirde toksin oluşumuna etkisinin araştırılması özellikle uygun kurutma teknolojilerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Aksoy, U.**, 2001. Kuru incir üretiminde verim ve kaliteyi arttırmaya yönelik uygulamalar. *Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi Çiftçi Dergisi*, **1**.
- Aksoy, U., Can, H.Z., Hepaksoy, S. and Sahin, N.**, 2001. Fig Cultivation. *TARP Turkey agricultural research*, Izmir, Turkey.
- Aksoy, U., Sabır, E., Eltem, R., Kırac, S., Sarıgöl, N., Meyvacı, B., Ateş, M. ve Çakır, M.**, 2003. Kuru incirlerde Okratoksin A'nın potansiyel kontaminasyon riskinin araştırılması. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*, İstanbul, 18-19 Eylül, 41-46.
- Alghalibi, S.M.S. and Shater, A.M.**, 2004. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen Republic. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.*, **7**(2), 19-27.
- Amalaradjou, M.A.R., and Venkitanarayanan, K.**, 2008. Detection of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria* species in fruits and vegetables in *Mycotoxins in fruits and vegetables*, pp. 225-249, Eds. Barkai-Golan, R. and Paster, N., Elsevier, California, USA.
- Amra, H.A.**, 2009. Natural co-occurrence of aflatoxins and cyclopiazonic acid from corn grown in Egypt, *Toxicology Letters Abstracts*, **189**, 227.
- Anand, S. and Rati, E.R.**, 2006. An enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of *Aspergillus ochraceus* growth in coffee powder, chili powder and poultry feed. *Letters in Applied Microbiology*, **42**, 59-65.
- Anonim**, 2010a. Ege İhracatçılar Birliği, www.egebirlilik.org.tr, alındığı tarih: Nisan,2010.
- Anonim**, 2010b. Codex Committee on Contaminants on Foods (CCCF), Discussion paper on a maximum level for aflatoxins in dried figs prepared by Turkey. www.cclac.org, alındığı tarih: Ağustos, 2010.
- Anonim**, 2010c. Rapid Alert System for Food and Feed, The RASFF annual report, <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert>, alındığı tarih: Nisan, 2010.
- Antony, M., Shukla, Y. and Janardhanan, K.K.**, 2003. Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 211–214.
- AOAC**, 2000. Natural poisons: Method 970.44 Preparation of standards for aflatoxins, in *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists Inc., Virginia, USA.
- Aresta, A., Cioffi, N., Palmisano, F. and Zambonin, C.G.**, 2003. Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic and tenuazonic acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled

to high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 5232-5237.

Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R. and Holley, R.A., 2005. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research* **41**, 513-527.

Aşkın, O., Denizler, T. ve Köşker, Ö., 1977. Kuru incir ve ezemelerinde bulunan küflerin izolasyonu ve identifikasyonları üzerinde araştırmalar. *A. Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı*, **27**, 50-63.

Atehnkeng, J., Ojiambo, P.S., Donner, M., Ikotun, T., Sikora, R.A., Cotty, P.J. and Bandyopadhyay, R., 2008. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, **122**, 74-84.

Atoui, A., Mathieu, F. and Lebrihi, A., 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, **115**, 313-318.

Bamba, R. and Sumbali, G., 2005. Co-occurrence of aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid in sour lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during post-harvest pathogenesis by *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, **159**, 407-411.

Barkai-Golan, R., 2008. *Aspergillus* mycotoxins, In: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* pp-118-124, 137, 138, Eds, Barkai-Golan R., Paster N., Elsevier, California, USA.

Barros, G.G., Torres, A.M., Rodriguez, M.I. and Chulze, S.N., 2006. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 145-152.

Benlioğlu, S., Yıldız, A. ve Başpınar, N., 2008. Aydın ili'nden ihraç edilen kuru incirlerde fungal bulaşıklık, *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **5**(2), 3-8.

Bhatnagar, D. and Garcia, S., 2001. *Aspergillus* in *Guide to Foodborne Pathogens*, pp. 35-50, Eds. Labbe, R.G. & Garcia, S., Wiley Interscience, New York, USA.

Bircan, C., 2009. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 1996-2000.

Bircan, C., Barringer, S.A., Ulken, U. and Pehlivan, R., 2008. Increased aflatoxin contamination of dried figs in a drought year. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **25**(11), 1400-1408.

Bogdanov, M.B., Andreassen, O.A., Dedeoğlu, A., Ferrante, R.J. and Beal, M.F., 2001. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, **79**, 1246-1249.

Borjesson, T., Stenberg, B. and Schnürer, J., 2007. Near-infrared spectroscopy for estimation of ergosterol content in barley: A comparison between

- reflectance and transmittance techniques. *Cereal Chemistry*, **84**(3), 231-236.
- Bourda, H., Le Bars, J., Le Bars, P. and Dupuy, J.**, 1994. Time of *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin formation in ripening of figs. *Mycopathologia*, **127**, 29-33.
- Bradburn, N., Coker, R.D. and Blunden, G.**, 1994. The aetiology of turkey 'X' disease. *Phytochemistry*, **35**, 817.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L. and Cabanes, F.J.**, 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 139-144.
- Brandt, M.E., Padhye, A.A., Mayer, L.W. and Holloway, B.P.**, 1998. Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and Taqman automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*, *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 2057-2062.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J. and Nising, C.F.**, 2009. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem. Rev.* **109**, 3903–3990.
- Bryden, W.L., Suksupath, S., Taylor, D.J. and Prasongsidh, B.C.**, 2004. Cyclopiazonic acid: Food chain contaminant? in *Poisonous Plants and Related Toxins* pp. 134-139, Eds. Acamovic T., Stewart C.S. and Pennycott T.W., CAB International, Wallingford, U.K.
- Buchanan, J.R.; Sommer, N.F. and Fortlage, R.J.**, 1975. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in fig fruits. *Applied Microbiology*, **30**(2), 238-241.
- Burdock, G.A. and Flamm, W.G.**, 2000. Review article: Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. *International Journal of Toxicology*, **19**(3), 195-218.
- Burdock, G.A., Carabin, I.G. and Soni, M.G.**, 2001. Safety assesment of β -nitropropionic acid: a monograph in support of an acceptable daily intake in humans. *Food Chemistry*, **75**, 1-27.
- Bush, M.T.; Touster, O. and Brockman, J.E.**, 1951. The production of β -nitropropionic acid by a strain of *Aspergillus flavus*. *The Journal of Biological Chemistry*, **188**, 685-693.
- Cappa, F. and Cocconcelli, P.S.**, 2001. Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology*, **69**, 157-160.
- Cary, J.W., Bhatnagar, D. and Linz, J. E.**, 2000. Aflatoxins: Biological significance and regulation of biosynthesis. In *Microbial Foodborne Diseases Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*. Ed: Cary, J. W.; Bhatnagar, D.; Linz, J. E. Technomic Publishing Company, Pennsylvania, USA pp. 317-330.
- Castro, M.F.P., Bragagnolo, N., Freitas Leitaó, M.F., Velludo Molina, C. and Alves, B.A.**, 2002. Ergosterol determination by HPLC in corn grains with different levels of fungal contamination. *Brazilian Journal of Food Technology*, **4**, 49-55.

- Cemeroğlu, B. and Acar, J.,** 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. *Gıda Teknolojisi Derneği*, **6**.
- Chang, P.K., Horn, B.W. and Dorner, J.W.,** 2009. Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus flavus*, *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 176-182.
- Chang-Yen, I., and Bidasse, K.,** 1990. Improved spectrophotometric determination of cyclopiazonic acid, *Journal of AOAC International*, **73**, 257-259.
- Chen, W., Xing, D. and Chen, W.,** 2005. Rapid detection of *Aspergillus flavus* contamination in peanut with novel delayed luminescence spectra. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **81**, 1361-1365.
- Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Isarangkul, D. and Kittakoop, P.,** 2005. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? *J. Nat. Prod.*, **68**(7), 1103–1105.
- Cole, R.J. and Cox, R.H.,** 1981. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York, USA.
- Cotty, P.,** 1997. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* Section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research*, **101**, 698–704.
- Criseo, G., Bagnara, A. and Bisignano, G.,** 2001. Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *A. flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*, **33**, 291-295.
- Cullen, J.M. and Newberne, P.M.,** 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins, in *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*, pp. 3-21, Eds. D. L. Eaton & J. D. Groopman, Academic Press Inc., California, USA.
- Cvetnic, Z.,** 1994. Cyclopiazonic acid and aflatoxin production by cultures of *Aspergillus flavus* isolated from dried beans and maize, *Nahrung*, **38**, 21–25.
- Cvetnic, Z. and Pepeljnjak, S.,** 1998. Production of cyclopiazonic acid by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*, *Nahrung*, **42**(5), 321–323.
- Çamlıbel, L.,** 1995. Aflatoxins: past, present and future. IGEME Research and Developmental Presidency. Agriculture Administration, Ankara.
- Da Motta, S., and Valente Soares, L.M.,** 2001. Survey of Brazilian tomato products alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Additives and Contaminants*, **18**, 630-634.
- Davis, N.D.,** 1981. Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by *Aspergillus* species. *Journal of Food Protection*, **44**, 711-714.

- Davis, N.D., Iyer, S. K. and Diener, U.L.**, 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied Environmental Microbiology*, **53**(7), 1593-1595.
- De Santi, M., Sisti, M., Barbieri, E., Piccoli, G., Brandi, G. and Stocchi, V.**, 2010. A combined morphological and molecular approach for characterizing fungal microflora from a traditional Italian cheese (Fossa cheese). *International Dairy Journal*, **20**, 465-471.
- Desai, U.T. and Kotecha, P.M.**, 1995. Fig. In *Handbook of Fruit Science and Technology*, Eds. Salunke, D. K., Kadam, S. S., Marcel Dekker, Inc. NY. pp. 407-408.
- Deshpande, S.S.**, 2002. *Handbook of Food Toxicology*. Marcel Dekker, Inc. NY.
- Devegowda, G. and Murthy, T.N.K.**, 2005. Mycotoxins: effects on poultry performance and health, In *The Mycotoxin Blue Book*. Ed. D. Diaz. Nottingham University Press Nottingham United Kingdom. pp-31.
- Dewey, F.M. and Meyer, U.**, 2004. Rapid, quantitative tube immunoassays for on-site detection of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Penicillium* antigens in grape juice. *Analytica Chimica Acta*, **513**(1), 11-19.
- Dorner, J.W.**, 1983. Production of Cyclopiazonic Acid by *Aspergillus tamarii* Kita. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**(6), 1435-1437.
- Dorner, J.W.**, 2002. Recent advances in analytical methodology for cyclopiazonic acid, in *Mycotoxins and Food Safety*, pp. 107-116, Eds. DeVries, J.W. Trucksess, M.W. and Jackson, L.S., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Dorner, J.W., Cole, R.J. and Diener, U.L.**, 1984. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia*, **87**, 13-15.
- Dorner, J.W., Sobolev, V.S., Yu, W., and Chu, F.S.**, 2000. Immunochemical method for cyclopiazonic acid, in: *Mycotoxin Protocols*, pp. 71-80, Eds. Trucksess, M.W. and Pohland, A.E., Humana Press, Totowa, N.J.
- Dorner, J.W., Cole, R.J., Erlington, D.J., Suksupath, S., McDowell, G.H. and Bryden, W.L.**, 1994. Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **42**(7), 1516-1518.
- Doster, M.A. and Michailides, T.J.**, 1998. Production of bright greenish yellow fluorescence in figs infected by *Aspergillus* species in California Orchards. *Plant Disease*, **82**, 669-673.
- Doster, M.A., Michailides, T.J. and Morgan, D.P.**, 1996. *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from Californian orchards. *Plant Disease*, **80**, 484-489.
- Duenas, M., Perez-Alonso, J.J., Santos-Buelgaa, C. and Escribano-Bailona, T.**, 2008. Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Food Composition Analysis*, **21**, 107-115.
- Duran, R.M., Cary, J.W. and Calvo, A.M.**, 2007. Production of cyclopiazonic acid, aflatoxin, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA,

a gene necessary for sclerotial formation. *Applied Microbiological Biotechnology*, **73**, 1158–1168.

- Dyer, S.:K. and McCammon, S.**, 1994. Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *Journal of Applied Microbiology*, **76**(1), 75-78.
- Ebrahimzadeh, H., Niknam, V. and Maassoumi, A.A.**, 1999. Nitro compounds in *Astragalus* species from Iran. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**, 743-751.
- EC**, 2006. Commission regulation 1881/2006 of December 19, 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Official Journal of European Community*, **L 364**, 16.
- Edwards, S.G., O’Callaghan, J. and Dobson, A.D.W.**, 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*, **106**, 1005–1025.
- El-Banna, A.A., Pitt, J.I. and Leistner, L.**, 1987. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *System. Appl. Microbiol.*, **10**, 42–46.
- El-Shanawany, A.A., Mostafa, M.E. and Barakat, A.**, 2005. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. *Mycopathologia*, **159**, 281-289.
- Erdoğan, A., Gürses, M. ve Sert, S.**, 2003. Erzurum’da satışa sunulan köme (cevizli pestil sucuğu) ve kuru incirlerin aflatoksin içeriklerinin saptanması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **34**, 85-88.
- Fairchild, A.; Lee, M.S. and Maurer, J.J.**, 2006. PCR Basics, in *PCR Methods in Foods*, pp 1-19, Ed Maurer, J., Springer, New York, USA.
- FAO**, 2007. Food and Agriculture Organisation of the United Nations Statistical Databases. <http://faostat.fao.org>.
- Farber, P., Geisen, R. and Holzpfel, W.H.**, 1997. Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, 215-220.
- FDA**, 2009. U. S. Food and Drug Administration. Regulatory guidance for toxins and contaminants. <http://www.fda.gov> (alındığı tarih: Mayıs, 2010).
- Fernandez-Pinto, V., Patriarca, A., Locani, O., Vaamonde, G.**, 2001. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, **18**, 1017–1020.
- Flaishman, M.A., Rover, V. and Stover, E.**, 2008. The Fig: Botany, horticulture, and breeding. *Horticultural Review*, **34**, 113-197.
- Frisvad, J.C. and Samson, R.A.**, 2004. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. *Syst Appl Microbiol*, **27**, 672–680.
- Frisvad, J.C. and Thrane, U.**, 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone indices and UV-VIS spectra (diode-array detection). *Journal of Chromatography A*, **404**, 195–214.

- Frisvad, J., Thrane, U., Samson, R. and Pitt, J., 2006.** Important mycotoxins and the fungi which produce them. In *Advances in Food Mycology*, pp.3-31, Eds. Hocking, A., Pitt, J., Samson, R. and Thrane, U., Springer, New York, USA.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A. and Smedsgaard, J., 2004.** *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B₁, B₂ and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology*, **38**, 440–445.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P. and Samson, R.A., 2005.** Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-Omethylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, **28**, 442–453.
- Fungaro, M.H.P., Vissotto, P.C., Sartori, D., Vilas-Boas, L.A., Furlaneto, M.C. and Taniwaki, M.H., 2004.** A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*, **49**, 123-127.
- Gallagher, R.T., Richard, J.L., Stahr, H.M. and Cole, R.J., 1978.** Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, **66**, 31-36.
- Galvano, F.; Ritieni, A.; Piva, G. and Pietri, A., 2005.** Mycotoxins in the Human Food Chain In *The Mycotoxin Blue Book*. pp.191-192, Ed. D. Diaz., Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Gawrysiak-Witulska, M., Wawrzyniak, J., Ryniecki, A. and Perkowski, J., 2008.** Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method. *Journal of Stored Products Research*, **44**(4), 360-365.
- Georgianna, D.R. and Payne, G.A., 2009.** Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 113–125.
- Gilbert, M., Penel, A., Kosikowski, F.V., Henion, J.D., Maylin, G.A. and Lisk, D.J., 1977.** Electron affinity gas chromatographic determination of Beta-Nitropropionic acid as its pentafluorobenzyl derivative in cheeses and mold filtrates, *Journal of Food Science*, **42**(6), 1650-1653.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. and Battilani, P., 2007.** Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy, *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 330-338.
- Giridhar, P. and Reddy, S.M., 2001.** Incidence of mycotoxigenic fungi on raisins. *Adv. Plant. Sci.*, **14**, 291-291.
- Gonçalez, E., Nogueira, J.C.H., Fonseca, H., Felicio, J.D., Pino, F.A. and Corrêa, B., 2008.** Mycotoxigenic fungi in peanuts from different geographic regions in Brasil. *International Journal of Food Microbiology*, **123**, 184-190.

- Gonzalez-Salgado, A., Gonzales-Jaen, T., Vazquez, C. and Patino, B.,** 2008. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour, *Food Additives and Contaminants*, **25**(6), 758-764.
- Gordon, S.H., Jones, R.W., McClelland, J.F., Wicklow, D.T. and Greene, R.V.,** 1999. Transient infrared spectroscopy for detection of toxigenic fungi in corn: potential for on-line evaluation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **47**, 5267-5272.
- Goto, T., Ito, Y., Peterson, S.W. and Wicklow, D.T.,** 1997. Mycotoxin producing ability of *Aspergillus tamaraii*. *Mycotoxins*, **44**, 17-20.
- Goto, T., Shinshi, E., Tanaka, K. and Manabe, M.,** 1987. Analysis of cyclopiazonic acid by normal phase high-performance liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**, 2581-2582.
- Goto, T., Wicklow, D.T. and Ito, Y.,** 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaraii* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(11), 4036-4038.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. and Gettinby, G.,** 1996. The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxins by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains, *Mycopathologia*, **136**, 103-108.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. and Gettinby, G.,** 1997. Effects of temperature, water activity and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(3), 1048-1053.
- Grimm, C. and Geisen, R.,** 1998. A PCR-ELISA for the detection of potential fumonisin producing *Fusarium* species. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 456-462.
- Güler, F.K. and Heperkan, D.,** 2008. Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. *Analytica Chimica Acta*, **617**, 32-36.
- Gümüş T. ve Yılmaz İ.,** 2006. Mikotoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri, 9. Gıda Kongresi, Bolu, s.293-296, 24-26 Mayıs.
- Günel, N.,** 2008. Türk dünyasında incir kültürü, *International Periodical for the Languages, Literature and History of Turkish and Turkic*, **3-5**, 561-581.
- Günay, V.,** 2008. İncir çevresinde sosyal hayat, *International Periodical for the Languages, Literature and History of Turkish and Turkic*, **3-5**, 551-560.
- Güzeldağ, G.,** 2007. Polyporaceae türlerinde (*Ganoderma* spp. ve *Trametes* spp.) üretim ve biyoteknolojik optimizasyon olanaklarının araştırılması. *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Hahnau, S. and Weiler, E.W.,** 1991. Monoclonal antibodies for the enzyme immunoassay of the mycotoxin cyclopiazonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**(7), 1076-1080.

- Hayashi, Y. and Yoshizawa, T.,** 2005. Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method, *Food Chemistry*, **93**, 215-221.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. and Denning, D.W.,** 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**, 1677–1692.
- Henry, T., Iwen, P.C. and Hinrichs, S.H.,** 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol.*, **38**, 1510–1515.
- Heperkan, D. and Karbancioglu-Güler, F.,** 2009. Determination of *Aspergillus* section *Flavi* and their aflatoxin and cyclopiazonic acid production patterns in naturally dried figs. in *Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture*. Eds. M. A., David, F. Kendra, M. W., Trucksess, ACS Symposium Series (1031) 77-90.
- Heperkan, D.,** 2006. The importance of mycotoxins and a brief history of mycotoxin studies in Turkey, Special Issue “Mycotoxins: hidden hazards in food”, *ARI Bulletin of Istanbul Technical University*, Ed. D. Heperkan, **54**, 18-27.
- Hermansen, K, Frisvad, J.C., Emborg, C. and Hansen, J.,** 1984. Cyclopiazonic acid production by submerged cultures of *Penicillium* and *Aspergillus* strains. *FEMS Microbiology Letters*, **21**(2), 253-261.
- Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Ellis, J.J. and Stubblefield, R.D.,** 1966. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **30**, 795–805.
- Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., De Aguirre, L. and Morrison, C.J.,** 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. *Medical Mycology Supplement I*, **43**, 129-137.
- Hocking, A.D.,** 1997. Toxigenic *Aspergillus* species in *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, pp. 393-405, Eds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J., ASM Press, Washington, USA.
- Holzappel, C.W.,** 1968. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* westling. *Tetrahedron*, **24**, 2101-2119.
- Holzappel, C.W., Hutchison, R.D., Wilkins, D.C.,** 1970. The Isolation and Structure of two new indole derivatives from *Penicillium cyclopium* Westling, *Tetrahedron*, **26**, 5239-5246.
- Horn, B.W. and Dorner, J.W.,** 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied Environmental Microbiology*, **65**, 1444–1449.
- Horn, B.W.,** 2007. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review. *Food Additives and Contaminants*, **24**, 1088–1101.
- Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W., Powel, J.H. and Layton, R.C.,** 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *A. tamarii*. *Mycologia*, **88**, 574-587.

- Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Vicente, E. and Menezes, H.C.,** 2006. Fungi producing ochratoxin in dried fruits, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **571**, 181-188.
- Iamanaka, B.T., Castle de Menezes, H., Vicente, E., Leite, R.S.F. and Taniwaki, M.,** 2007. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control*, **18**, 454-457.
- Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Menezes, H.C., Vicente, E. and Fungaro, M.H.P.,** 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 1258-1263.
- IARC. International Agency for Research on Cancer.** 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph 56. Lyon International Agency for Research on Cancer. pp. 571.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T.,** 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*, *Mycological Research*, **105**(2), 233-239.
- Iwasaki, T. and Kosikowski, F.V.,** 1973. Production of β -Nitropropionic acid in foods, *Journal of Food Science*, **38**, 1162-1165.
- İşman, B.,** 2004. Aydın yöresinde yetiştirilen kuru incirlerdeki fungus florasına ultraviyole ışınlarının etkilerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Jamiez, J., Fente, C.A., Franco, J.M.,** 2003. Application of a modified culture medium for the simultaneous counting of molds and yeasts and detection of aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*, **66**, 311-318.
- Janick, J. and Paull, R.E.,** 2008. *Ficus carica* (fig), in *The Encyclopedia of Fruit and nuts*, pp. 493-503, Eds. Janick, J. and Paull, R.E., CAB International, London, UK.
- Jedlickova, L., Gadas, D., Havlova, P. and Havel, J.,** 2008. Determination of ergosterol levels in barley and malt varieties in the Czech Republic via HPLC. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **56**(11), 4092-4095.
- Juan, C., Zinedine, A., Molto', J.C., Idrissi, L. and Manes, J.,** 2007. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Sale' area, Morocco. *Food Control* **19**(9), 849-853.
- Karaca, H. and Nas, S.,** 2006. Aflatoxins, patulin and ergosterol contents of dried figs in Turkey, *Food Additives and Contaminants*, **23**(5), 502-508.
- Karapınar, M. ve Gönül, Ş.,** 1989. Kuru incirlerin küf florasında aflatoksijenik küfler. *Gıdalarda küfler ve Mikotoksinler Sempozyumu*, İstanbul, 12-13 Aralık.
- Karbancıoğlu Güler, H.F.,** 2007. İncirde okratoksin A ve fumonisin oluşumunun incelenmesi. *Doktora Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Karbancıoğlu-Güler, F. and Heperkan, D.,** 2009. Natural occurrence of fumonisin B₁ in dried figs as an unexpected hazard. *Food Chemical and Toxicology*, **47**, 289-292.
- Karthikeyan, M.; Sandoskumar, R.; Mathiyazhagan, S.; Mohankumar, M.; Valluvaparidasan V.; Kumar, S. and Velazhahan, R.** 2009. Genetic variability and aflatoxigenic potential of *Aspergillus flavus* isolates from maize. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, **42**(1), 83-91.
- Kıraç, S.,** 2006, Kuru incirlerden potansiyel okratoksijenik küflerin izolasyonu ve tanımlanması ile potansiyel okratoksijenik küflerin okratoksin A üretiminin belirlenmesi, *Doktora Tezi*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Klich, M.A.,** 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Netherlands Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Klich, M.A.,** 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, **8**(6), 713-722.
- Klich, M.A., Mullaney, E.J., Daly, C.B. and Cary, J.W.,** 2000. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**(5), 605-609.
- Krska, R. and Welzig, E.** 2006. Mycotoxin analysis: An overview of classical, rapid and emerging techniques In *The mycotoxin factbook food and feed topics* pp 233, Eds, Barug, D., Bhatnagar, D., van Egmond, H.P., van der Kamp, J.W., van Osenbruggen, W.A., Visconti A., Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands.
- Kuiper-Goodman, T.,** 2004. Risk assesment and risk management of mycotoxins in food in *Mycotoxins in food, detection and control*, pp 7, Eds. N. Magan, M. Olsen, Woodhead publishing limited, Cambridge, UK.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.,** 2004. MEGA 3.0: Integrated software of molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**(2), 150-163.
- Kumeda, Y., Asao, T., Takahashi, H. and Ichinoe, M.,** 2003. High prevalence of B and G aflatoxin-producing fungi in sugarcane field soil in Japan: heteroduplex panel analysis identifies a new genotype within *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus nomius*. *FEMS Microbiological Ecology* **45**, 229-238.
- Landlinger, C., Preuner, S., Willinger, B., Haberpursch, B., Racil, Z., Mayer, J. and Lion, T.,** 2008. Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**(4), 1063-1073.
- Lansden, J.A. and Davidson, J.I.,** 1983. Occurence of cyclopiazonic acid in peanuts. *Applied Environmental Microbiology*, **45**, 766-769.
- Lansden, J.A.,** 1986. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography, *Journal of AOAC*, **69**, 964-966.

- Lansky, E.P., Paavilainen, H.M., Pawlus, A.D. and Newman, R.A., 2008.** *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**(2), 195-213.
- Larsen, T.O., Gareis, M., Frisvad, J.C., 2002.** Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common *Penicillia* on cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6148-6152.
- Le Bars, J., 1979.** Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of the mycotoxin in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**(6), 1052-1055.
- Lee, L.S., Bennett, J.W., Cucullu, A.F. and Stanley, J.B., 1975.** Synthesis of versicolorin A by a mutant of *Aspergillus parasiticus* deficient in aflatoxin production. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **23**, 1132-1134.
- Lee, Y.J. and Hagler, W.M., 1991.** Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolated from contaminated maize. *Journal of Food Science*, **56**(3), 871-872.
- Lisker, N., Michaeli, R. and Frank, Z.R., 1993.** Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel, *Mycopathologia*, **122**, 177-183.
- Liu, X.J., Luo, X.Y. and Hu, W.J., 1992.** Studies on the epidemiology and ethiology of moldy sugarcane poisoning in China. *Biomedical and Environmental Sciences*, **5**, 161-177.
- Losito, I., Monaci, L., Aresta, A. and Zambonin, C.G., 2002.** LC-ion trap electrospray MS-MS for the determination of cyclopiazonic acid in milk samples. *Analyst*, **127**, 499-502.
- Luk, K.C., Kobbe, B. and Townsend, J.M., 1977.** Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* link. *Applied Environmental Microbiology*, **33**, 211-212.
- Lund, F., Filtenborg, O., Frisvad, J.C., 1995.** Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, **12**, 173-180.
- Maggon, K.K., Gupta, S.K. and Venkatasubramanian, T.A., 1977.** Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriological Review*, **41**(4), 822-855.
- Majak, W. and Bose, R.J., 1974.** Chromatographic methods for the isolation of miserotoxin and detection of aliphatic nitro compounds, *Phytochemistry*, **13**, 1005-1010.
- Majak, W. and Clark, L.J., 1980.** Metabolism of aliphatic nitro compounds in bovine Rumen fluid. *Canadian Journal of Animal Science*, **60**, 319-325.
- Majak, W. and McDiarmid, R.E. 1990.** Detection and quantitative determination of 3-nitropropionic acid in bovine urine, *Toxicology Letters*, **50**, 213-220.

- Manonmani, H.K., Anand, S., Chandrashekar, A. and Rati, E.R., 2005.** Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*, **40**, 2859-2864.
- Martin, A., Aranda, E., Benedite, M.J., 2005.** Identification of fungal and contaminants and determination of mycotoxigenic molds by micellar electrokinetic capillary chromatography in smoked paprika. *Journal of Food Protection*, **68**, 815-822.
- Martins, M.L. and Martins, H.M., 1999.** Natural and in vitro co-production of cyclopiazonic acid and aflatoxins. *Journal of Food Protection*, **62**(3), 292-294.
- Matsuda, T., and Sasaki, M., 1995.** Simple determination of cyclopiazonic acid, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **59**, 355-357.
- Mazza, G. and Miniati, E., 1993.** *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. CRC Press, Boca Raton.
- Meçik, N., 2007.** Kuru incirde aflatoksin varlığının belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Mızrak, D., Engin, B., Önder, F.O., Yener, B., Bektaş, M., Bıyıklı, Z., Dilman, R., Çınar, K., Karayalçın, K., Ersöz, S., Karayalçın, S., Özden, A., Yurdaydın, C., Yazıhan, N., Ataoğlu, H., Bozkaya, H. and Uzunaliemoğlu, Ö., 2009.** Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey, *Turkish Journal of Gastroenterology*, **20**(3), 192-197.
- Minto, R.E. and Townsend, C.A., 1997.** Enzymology and Molecular Biology of Aflatoxin Biosynthesis. *Chem. Rev.*, **97**, 2537-2555.
- Miraglia, M., Debegnach, F. and Berra, C., 2004.** Mycotoxins: detection and control, In *Pesticide, Veterinary and other residues in food*. Eds. David H., Watson. CRC Woodhead publishing, Cambridge, England. pp 642-643.
- Miyagawa, H., Umeda, M., Sato, T., Bandoh, S., Nakamura, S. and Goto, T. 2009.** Single-laboratory validation of a method for ergosterol determination in cereals. *Food Additives & Contaminants: Part A - Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, **26**(2), 201-206.
- Moldes-Anaya, A.S., Asp, T.N., Eriksen, G.S., Skaar, I. and Rundberget, T. 2009.** Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1216**(18), 3812-3818
- Monaci, L., Aresta, A., Palmisano, F., Visconti, A. and Zambonin, C.G., 2002.** Amino-bonded silica as stationary phase for liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in fungal extracts. *Journal of Chromatography A*, **955**(1), 79-86.
- Monaci, L., Vatinno, R. and De Benedetto, G.E., 2007.** Fast detection of cyclopiazonic acid in cheese using Fourier transform mid-infrared ATR spectroscopy. *European Food Research and Technology*, **225**(3-4), 585-588.

- Morton, S.G., Eadie, T. and Lewellyn, G.C.,** 1979. Aflatoxigenic Potential of Dried Figs, Apricots, Pineapples and Raisin. *Journal of Association Official Analytical Chemists*, **62**(4), 958-962.
- Moss, M.O.,** 1998. Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology and Symposium Supplement*, **84**, 62-76.
- Mphande, F.A., Siame, B.A. and Taylor, J.E.,** 2004. Fungi, Aflatoxins and Cyclopiazonic acid Associated with Peanut Retailing in Botswana. *Journal of Food Protection*, **67**(1), 96-102.
- Muir, A.D. and Majak, W.,** 1984. Quantitative determination of 3-Nitropropionic acid and 3-Nitropropanol in plasma by HPLC, *Toxicology Letters*, **20**, 133-136.
- Munimbazi, C. and Bullerman, L.B.,** 1996. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. *Journal of Food Protection*, **59**(8), 869-875.
- Munimbazi, C., Saxena, J., Tsai, W.Y.J. and Bullerman, L.B.,** 1997. Inhibition of production of cyclopiazonic acid and ochratoxin A by the fungicide Iprodione. *Journal of Food Protection*, **60**, 849-852.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. and Bryant, C.M.,** 2006. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, **71**, 51-65.
- Naewbanij, M., Seib, P.A., Burroughs, R., Seitz, L.M. and Chung, D.S.,** 1984. Determination of ergosterol using thin-layer chromatography and ultraviolet spectroscopy. *Cereal Chemistry*. **61**(5), 385-388.
- Nicholson, P. and Centre, J.I.** 2004. Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants in *Mycotoxins in Food Detection and Control*, pp. 111-129, Eds. Magan, N. and Olsen, M., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Niessen, L.,** 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, **119**, 38-46.
- Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. and Maassoumi, A.A.,** 2003. Toxic nitro compounds in *Astragalus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, 557-562.
- Norred, W.P., Cole, R.J., Dorner, J.W., and Lansden, J.A.,** 1987. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat, *Journal of AOAC*, **70**, 121-123.
- Norred, W.P., Porter, J.K., Dorner, J.W., and Cole, R.J.,** 1988. Occurrence of the mycotoxin cyclopiazonic acid in meat after oral administration to chickens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 113-116.
- Northolt, M.D., Van Egmond, H.P. and Paulsch, W.E.,** 1977. Differences in *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxins production in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, **40**, 778-781.
- Oliveira, C. A. F., Sebastiao, L. S., Fagundes, H., Rosim, R. E. and Fernandes, A. M.,** 2008. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants: Part B - Surveillance Communications*. **1**(2), 147-152ç

- Oliveira, C.A., Rosmaninho, J. and Rosim, R.,** 2006. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, **23**(2), 196-201.
- Orth, R.,** 1977. Mycotoxins of *Aspergillus oryzae* strains for use in food industry as starters and enzyme producing molds, *Ann. Nutr. Alim.*, **31**, 617-624.
- Özay, G. and Alperden, I.,** 1991. Aflatoxin and Ochratoxin A contamination in dried figs (*Ficus carina* L.) from the 1988 crop, *Mycotoxin Research*, **7**, 85-91.
- Özden, Ç.,** 2008. Kuru incir, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi, Ankara.
- Öztekin, S., Zorlugenc, B. and Zorlugenc, F.K.,** 2006. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering.*, **75**, 396–399.
- Park, D.L.,** 2002. Effect of processing on Aflatoxin. In: *Mycotoxins and Food Safety*, pp. 175, Eds. J.W. DeVries, M.W. Trucksess and L.S. Jackson. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, USA.
- Paterson, R.R.M.,** 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, **41**, 1467-1474.
- Penel, A.J. and Kosikowski, F.V.,** 1990. Beta-Nitropropionic acid production by *Aspergillus oryzae* in selected high protein and carbohydrate-rich foods, *Journal of Food Protection*, **53**(4), 321-323.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic A. and Pavlovic, M.,** 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of World Health Organization*, **77**, 754-766.
- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. and Logrieco, A.,** 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 680–685.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. and Samson, R.A.,** 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, **59**(1), 53-66.
- Piga, A., Pinna, I., Özer, K.B., Agabbio, M. and Aksoy, U.,** 2004. Hot air dehydration of figs (*Ficus carica* L.): drying kinetics and quality loss. *International Journal of Food Science and Technology*, **39**(7), 793-799.
- Pildain, M.B., Vaamonde, G. and Cabral, D.,** 2004. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, **93**, 31–40.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. and Samson, R.A.,** 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**, 725-735.

- Pitt, J.I.** 2004. Fungal ecology and the occurrence of mycotoxins, In *Mycotoxins and Phycotoxins*. pp.33-36, Eds. Njapau, H., Trujillo, S., Van Egmond, H.P., Park, D.L. Wageningen Academic Publishers, Netherlands.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D.**, 1997. *Aspergillus flavus* Link. In: *Fungi and Food Spoilage*. 2nd Ed. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- Pitt, J.I., Cruickshank, R.H., Leistner, L.**, 1986. *Penicillium commune*, *P. camembertii*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology*, **3**, 363-371.
- Prasongsidh, B.C., Kailasapathy, K., Skurray, G.R., and Bryden, W.L.**, 1998. Analysis of cyclopiazonic acid in milk by capillary electrophoresis, *Food Chemistry*, **61**, 515-519.
- Prasongsidh, B.C., Kailasapathy, K., Sturgess, R., Skurray, G.R., and Bryden, W.L.**, 1999a. Influence of manufacturing and storing of ice cream on cyclopiazonic acid. *Milchwissenschaft*, **54**, 141-144.
- Prasongsidh, B.C., Sturgess, R., Skurray, G.R. and Bryden, W.L.**, 1999b. Partition behaviour of cyclopiazonic acid in cream and butter. *Milchwissenschaft*, **54**, 272-274.
- Purchase, I.F.**, 1971. The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **18**, 114-123.
- Pushvinder, R. and Desai, S.**, 2006. Variability among isolates of *Aspergillus flavus* from groundnut for aflatoxin and cyclopiazonic acid production. *Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **5**(4), 1458-1463.
- Rao, B.L., and Husain, A.**, 1985. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing poisoning in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia*, **89**, 177-180.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazerooni-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H. and Rezaee, M.**, 2006. A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: populations patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, **161**, 183-192.
- Reding, C.L.C., Harrison, M.A. and Kvien, C.K.**, 1993. *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin synthesis on Florunner peanuts grown in gypsum-supplemented soil. *Journal of Food Protection*, **56**(7), 593-594, 611.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F. and Lebrihi, A.**, 2010. *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, In press.
- Richard, J. L.**, 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *International Journal of Food Microbiology*, **119**(1-2), 3-10.
- Riley, R.T. and Petska, J.**, 2005. Mycotoxins: metabolism, mechanisms and biochemical markers in *The Mycotoxin Blue Book*, pp-280-282, Ed. D. Diaz, Nottingham University Press, Nottingham, UK.

- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z. and Lima, N.,** 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 187-193.
- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N. and Venancio, A.,** 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, pp. 527-534, Ed. Mendez-Vilas, A.
- Romero, S.M., Comerio, R.M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G. and Pinto, F.V.,** 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, **104**, 43-49.
- Ross, P.F., Rice, L.G., Casper, H.H., Crenshaw, J.D. and Richards, L.J.,** 1991. Novel occurrence of cyclopiazonic acid in sunflower seeds. *Vet. Hum. Toxicol.*, **33**, 284-285.
- Roussos, Z., Zaoula, N. and Salih, G.,** 2006. Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: toxigenic potential of *Aspergillus* strains. *Molec. Nutr. Food Res.*, **50**, 500-506.
- Rundberget, T. and Wilkins, A.L.,** 2002. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **964**, 189-197.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Lund, F., Filtenborg, O. and Frisvad, J.C.,** 2002. *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.
- Sanchez-Hervas, M., Gil, J. V., Bisbal, F., Ramon, D. and Martinez-Culebras, P.V.,** 2008. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, **125**, 336-340.
- Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H. and Fungaro, M.H.P.,** 2006. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, **157**, 350-354.
- Saxena, J., Munimbazi, C. and Bullerman, L.B.,** 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *International Journal of Food Microbiology*, **71**(1), 29-34,
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N. and Geisen, R.,** 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, **135**, 231-237.
- Scott, P.M.,** 1981. Toxins of *Penicillium* species used in cheese manufacture. *Journal Food Protection*, **44**, 702-710.
- Scott, P.M.,** 2004. Other mycotoxins in *Mycotoxins in Food, Detection and Control*, pp. 406-440, Eds. Magan, N. & Olsen, M., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

- Scudamore, K.A.**, 2004. The control of mycotoxins during secondary processing. In *Mycotoxins in Food. Detection and Control*. Eds N. Magan, and M. Olsen, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, pp 224-243.
- Scudamore, K.A.**, 2005. Principles and applications of mycotoxin analysis in *The Mycotoxin Blue Book*, pp. 157-187, Ed. Diaz, D., Nottingham University Press, Nottingham, U.K.
- Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A. and Salomon R.**, 1996. Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. *Applied Environmental Microbiology*, **62**, 3270–3273.
- Shaw, P.D. and De Angelo, A.B.**, 1969. Role of ammonium ion in the biosynthesis of beta-nitropropionic acid. *Journal of Bacteriology*, **99**, 463–468.
- Shaw, P.D. and Wang, N.**, 1964. Biosynthesis Of Nitro Compounds I.: Nitrogen and carbon requirements for the biosynthesis of β -Nitropropionic acid by *Penicillium atrovenetum*. *Journal of Bacteriology*, **88**(6), 1629–1635.
- Shibamoto, T. and Bjeldanes, L.F.**, 1993. Fungal toxins occur in foods In *Introduction to Food Toxicology*. pp. 103-109, Ed. S: L. Taylor. Academic press Inc., California, USA.
- Shotwell, Q.L. and Hesseltine, C.W.**, 1981. Use of bright greenish-yellow fluorescence as a presumptive test aflatoxins in corn. *Cereal Chemistry*, **58**, 124-127.
- Sobolev, V.S., Horn, B.W., Dorner, J.W. and Cole, R.J.**, 1998. Liquid chromatographic determination of major secondary metabolites produced by *Aspergillus* species from section *Flavi*. *Journal of AOAC International*, **81**, 57-60.
- Somashekar, D., Rati, E.R., Anand, S. and Chandrashekar, A.**, 2004. Isolation, enumeration and PCR characterization of aflatoxigenic fungi from food and feed samples in India. *Food Microbiology*, **21**, 809-813.
- Somuncuoğlu, Ş.**, 2007. Kuru incirlerde siklopiazonik asit varlığının ve miktarının belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Spanjer, M.C., Rensen, P.M. and Scholten, J.M.**, 2008. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives and Contaminants*, **25**(4), 472-489.
- Steiner, W.E., Rieker, R.H. and Battaglia, R.**, 1988. Aflatoxin contamination in dried figs: distribution and association with fluorescence, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 88-91.
- Stroka, J.; Anklam, E.; Jörissen, U. and Gilbert, J.**, 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study, *Journal of AOAC International*, **83**(2), 320-340.
- Sugita, C., Makimura, K., Uchida, K., Yamaguchi, H. and Nagai, A.**, 2004 PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major

- pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Medical Mycology*, **42**, 433-437.
- Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W.**, 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 141-158.
- Szabo, A., Papp, A. and Nagymajtenyi, L.**, 2005. Effects of 3-Nitropropionic acid in rats: General toxicity and functional neurotoxicity. *Arh Hig Rada Toksikol.*, **56**, 297-302
- Şanlı, Y., Yavuz, H. ve Akar, F.**, 1990. Kuru İncir Örneklerinde. Mikotoksin Kirlilikleri. *A. Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, **37**(2), 293-308.
- Şenyuva, H.Z., Gilbert, J., Ozcan, S. and Ulken, U.**, 2005. Survey for co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxin B₁ in dried figs in Turkey by using a single laboratory-validated alkaline extraction method for ochratoxin A. *Journal of Food Protection*, **68**, 1512-1515.
- Tarin, A., Rosell, M.G. and Guardino, X.**, 2004. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins. Aflatoxins and ochratoxin A. *Journal of Chromatography A*, **1047**, 235-240.
- TGK**, 2008. Türk Gıda Kodeksi, Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğ, *Resmi Gazete*, No:2008/26, 17.08.2008.
- TGK**, 2009. Türk Gıda Kodeksi, Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğde değişiklik yapılması hakkında tebliğ, *Resmi Gazete*, No:2009/22, 16.02.2009.
- Tous, J. and Ferguson, L.**, 1996. Mediterranean fruits. In *Progress in New Crops*, Ed. Janick, J., ASHS press, Arlington, VA. pp. 416-430.
- Tran-Dinh, N.; Pitt, J.I. and Carter, D.A.**, 1999. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*, **103**(11), 1485-1490.
- Trucksess, M.W. and Scott, P.M.**, 2007. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. *Food Additives and Contaminants*, 1-12.
- Trucksess, M.W. and Wood, G.E.**, 1994. Recent methods of analysis in food and feeds in *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. pp. 409-431, Eds. D. L. Eaton & J. D. Groopman, Academic Press Inc., California, USA.
- Trucksess, M.W., Mislivec, P.B., Young, K., Bruce, V.R., and Page, S.W.**, 1987. Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from dried beans, corn meal, macaroni, and pecans. *Journal of AOAC*, **70**, 123-126.
- Tsai, G. and Yu, S.**, 1999. Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Food Microbiology*, **50**(3), 181-189.
- Tuğ, Y.**, 2002. Kuru incir raporu, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Araştırma Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı, Ankara.
- TUİK**, 2010. Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri, www.tuik.gov.tr, alındığı tarih: Mayıs, 2010.

- Tunail, N.**, 2000. Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, Sreenath. and Piletsky, S.A.**, 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, **632**(2), 168-180.
- Urano, T., Trucksess, M.W., Matusik, J. and Dorner, J.W.** 1992. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts, *Journal of AOAC International*, **75**, 319-322.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., and Pinto, V.F.**, 2006. Effect of water activity and temperature on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* in peanuts, in *Advances in Food Mycology*, pp. 225-35, Eds. Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., and Thrane, U., Springer, New York.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Comerio, R. and Degrossi, C.**, 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. **88**, 79-84.
- Van Egmond, H.P. and Jonker, M.A.**, 2008 Regulation and Limits for Mycotoxins in Fruits and Vegetables, in *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, pp-45-72, Eds. Barkai-Golan, R. & Paster, N., Elsevier, California, USA.
- Var, I., Evliya, B., Zorlugenç, B. ve Duman, A.D.**, 2001. Kuru incirlerde küf izolasyonu ve tanımlanması ve aflatoksin belirlenmesi, *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **16**, 61-66.
- Veberic, R, Colarica, M. and Stampara, F.**, 2008. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food Chemistry*, **106**, 153-57.
- Vinokurova, N.G., Ivanushkina, N.E., Khmelnitskaya, I.I. and Arinbasarov, M.U.**, 2007. Synthesis of α -cyclopiazonic acid by fungi the genus of *Aspergillus*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **43**(4), 435-438.
- Wang, L. and Stoner, G.D.**, 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, **269**(2), 281-290.
- Wang, Y. and Yu, R.**, 1998. Detection of toxigenic *Aspergillus* spp. in rice and corn by ELISA. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, **36**(5), 512-520.
- Wei, D.L., Chang, S.C., Lin, S.C., Doong, M.L. and Jong, S.C.**, 1994. Production of 3-Nitropropionic acid by *Arthrinium* species, *Current Microbiology*, **28**, 1-5.
- Weidenbörner, W.**, 2001. Aflatoxins In *Encyclopedia of Food Mycotoxins*, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Wicklow, D.T. and Cole, R.J.**, 1982. Tremorgenic indole metabolites and aflatoxins in sclerotia of *Aspergillus flavus*: an evolutionary perspective. *Canadian Journal of Botanical*, **60**, 525-528.

- Wilson, B.J.**, 1966. Toxins other than aflatoxins produced by *Aspergillus flavus*. *Bacteriological Review*, **30**(2), 478-484.
- Wilson, D.M., Sydenham, E.W., Lombare, G.A., Trucksess, M.W., Abramson, D. and Bennett, G.A.**, 1998. Mycotoxin analytical techniques in *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, pp. 135-182, Eds. Sinha, K. K. & Bhatnagar, D., Marcel Dekker Inc, New York, USA.
- Yang, Z., Shim, W., Kim, J.**, 2004. Detection of aflatoxin producing molds in Korean fermented foods and grains by multiplex PCR. *Journal of Food Protection*, **67**, 2622-2626.
- Yorgancı, A.**, 2003, İncir Üretiminde Temiz Erkek incir (ilek) Meyvesi Elde Edilmesi Üzerinde Araştırmalar. *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yu, W. and Chu, F.S.**, 1998. Improved direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for cyclopiazonic acid in corn, peanuts, and mixed feed, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1012-1017.
- Zachova, I., Vytrasova, J., Pejchalova, M., Cervenka, L. and Tavcar-Kalcher, G.**, 2003. Detection of aflatoxigenic fungi in feed using the PCR method. *Folia Microbiologica*, **48**(6), 817-821.
- Zambonin, C.G., Monaci, L., and Aresta, A.**, 2001. Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, **75**, 249-254.
- Zinedine, A. and Manes, J.** 2009. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, **20**, 334- 344.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Juan, C., Mojemmi, B., Molto, J.C. and Bouklouze, A.**, 2007, Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat-Sale' area, Morocco. *Food Additives and Contaminants*, **24**, 285-291.

EKLER

EK A : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde toplam aflatoksin üretimi çizelgesi

EK B : İzolatların kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişiminin üç boyutlu grafikleri

EK C : İzolatların kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde siklopiazonik asit değişiminin üç boyutlu grafikleri

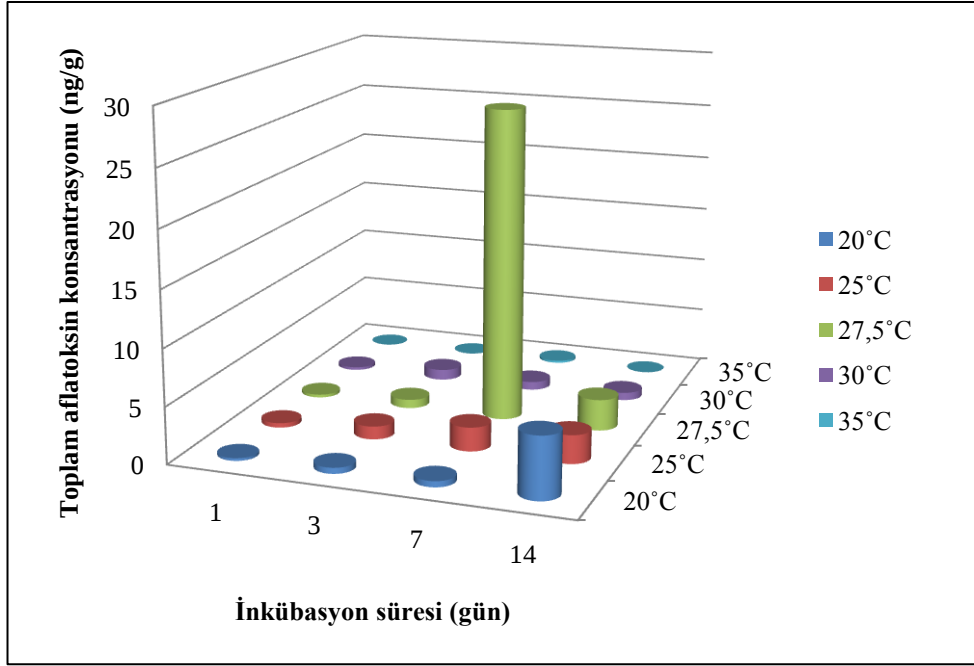
EK A

Çizelge A.1 : Kuru incirde izolatların farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde toplam aflatoksin üretimi.

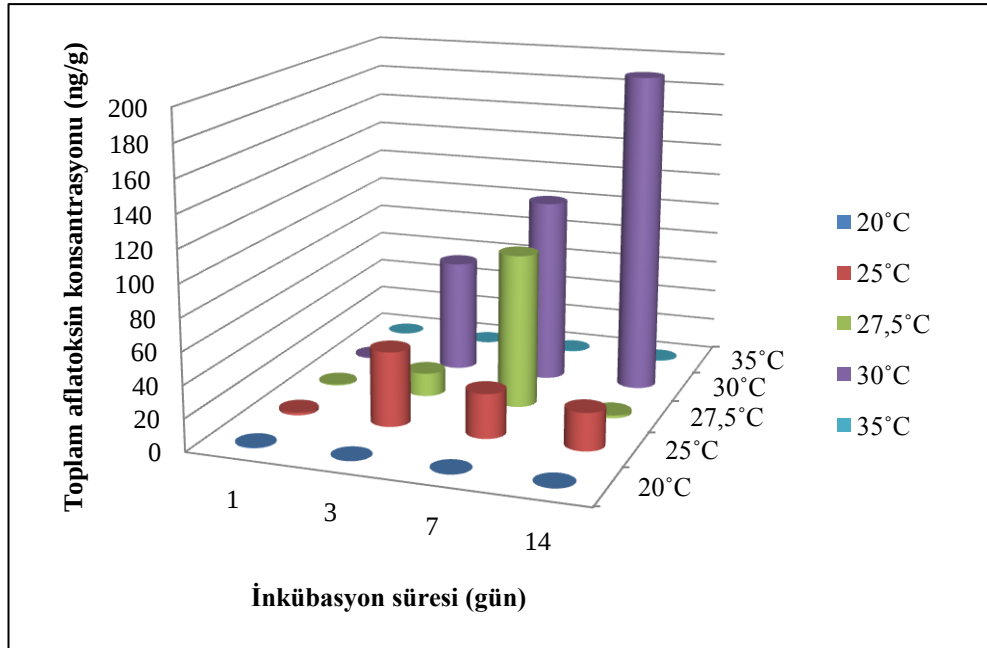
Küf	Süre (gün)	Toplam Aflatoksin Konsantrasyonu (ng/g)					
		20°C	25°C	27,5°C	30°C	35°C	40°C
AF1	1	0,2334±0,0018	0,4067±0,0025	0,2606±0,0065	0,253±0,0047	nd	nd
	3	0,5238±0,005	1,1569±0,0104	0,7708±0,0017	0,9457±0,0083	nd	nd
	7	0,5256±0,0058	2,1241±0,0002	27,6764±0,2746	0,7404±0,0093	0,1946±0,0033	nd
	14	5,4682±0,0027	2,5345±0,0047	2,779±0,0124	0,6874±0,0054	nd	nd
AF2	1	0,4805±0,0046	1,7368±0,0185	0,6797±0,0004	0,71±0,011	nd	nd
	3	nd	46,4494±0,1776	14,6173±0,0771	70,2008±0,9461	nd	nd
	7	nd	27,6352±0,3297	95,6928±0,2024	114,8316±0,2444	0,4254±0,0016	nd
	14	nd	23,3606±0,3398	1,7486±0,0127	197,996±0,0281	0,2408±0,0018	nd
AP1	1	nd	3,0815±0,0128	1,5397±0,0056	2,239±0,0016	nd	nd
	3	nd	809,4546±1,2812	64,0333±0,1365	954,3103±0,135	nd	nd
	7	nd	762,1126±1,1659	44,9259±0,6683	793,2557±0,3842	0,3136±0,0017	0,6989±0,0107
	14	nd	812,6977±1,3184	632,5966±0,757	896,4215±1,0273	0,0956±0,001	0,522±0,0045
AP2	1	nd	0,3562±0,0045	0,3039±0,0029	0,1875±0,0035	0,2547±0,0023	nd
	3	1,247±0,0098	1216,8914±1,5229	6,3142±0,0192	1081,27±1,8316	nd	nd
	7	0,7716±0,0069	1231,5758±3,6383	2,1524±0,0474	984,8382±1,2997	0,1472±0,0086	0,8118±0,0008
	14	0,6005±0,0023	1175,1169±1,3695	211,7283±0,0879	707,0454±1,4103	0,1213±0,002	0,5117±0,009

nd: Mikotoksin üretimi belirlenmemiştir.

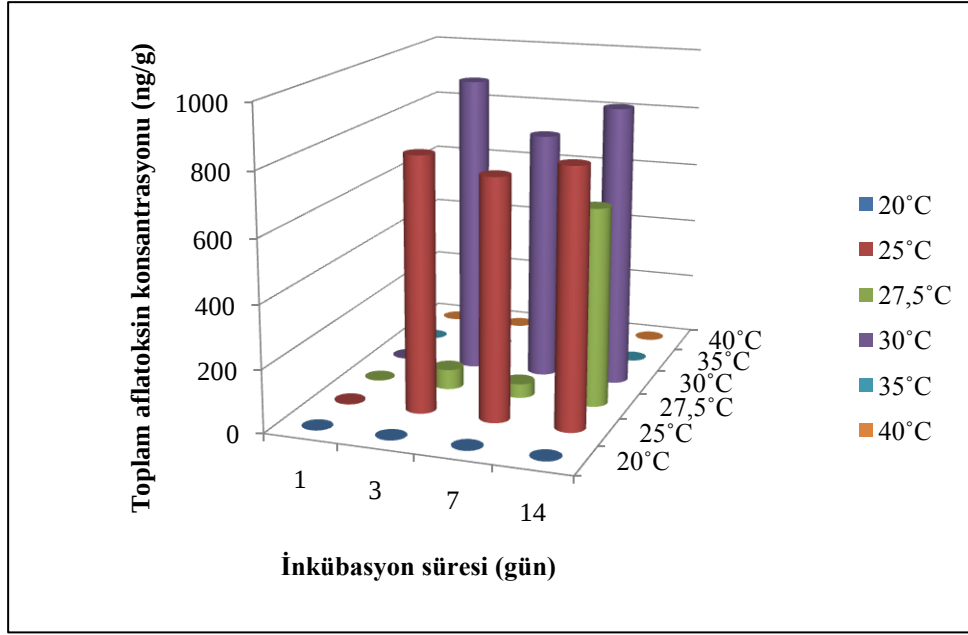
EK B



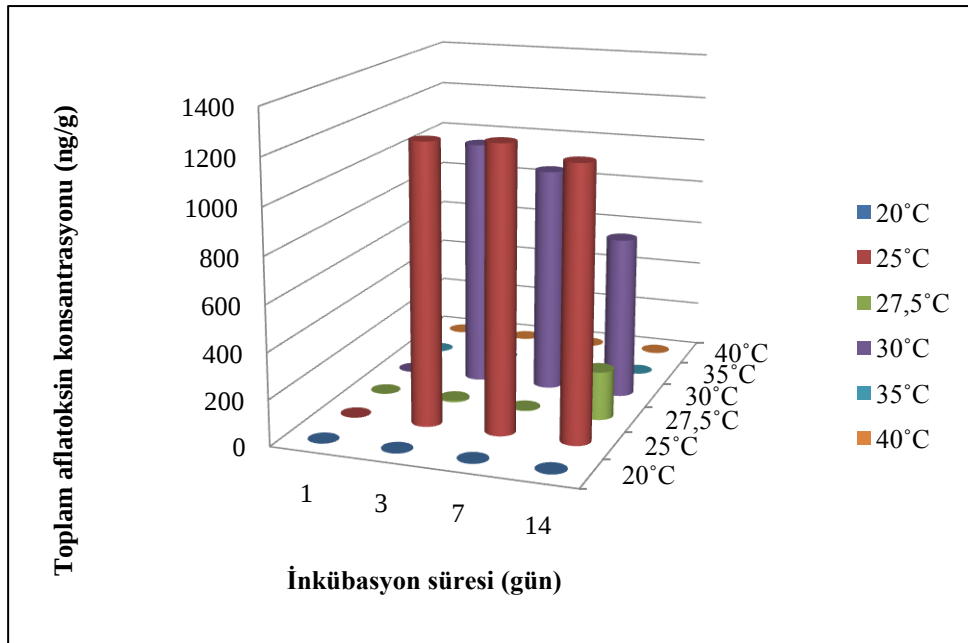
Şekil B.1 : AF1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.



Şekil B.2 : AF2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.

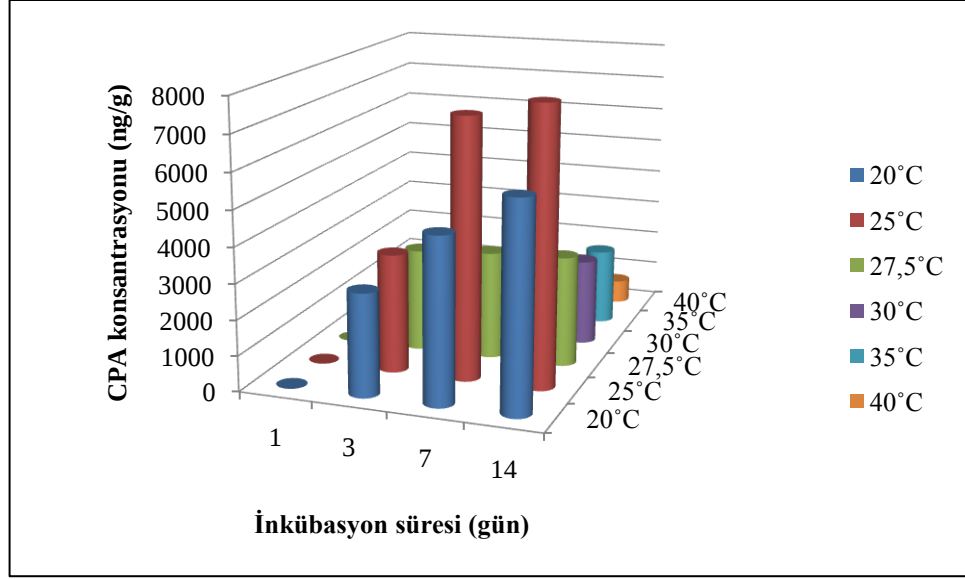


Şekil B.3 : AP1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.

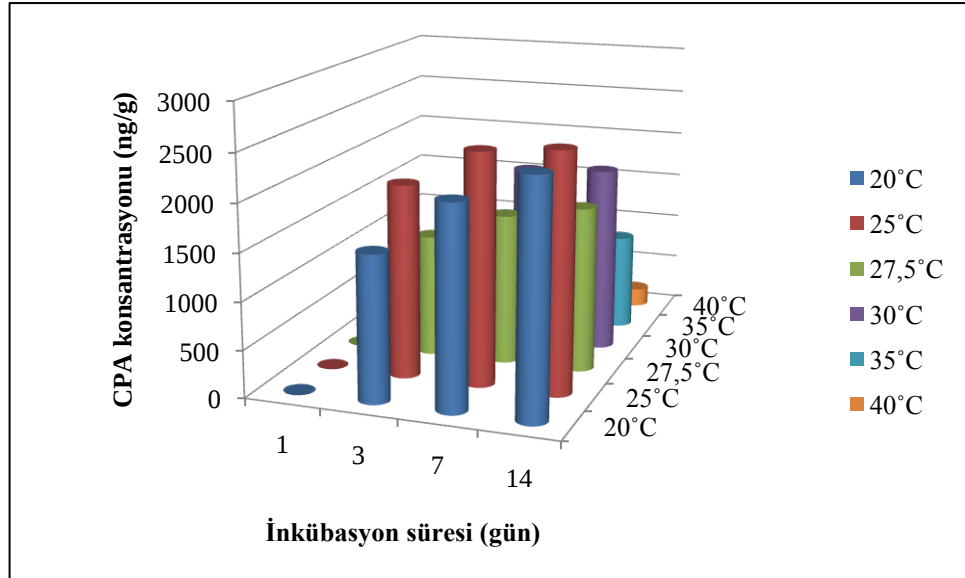


Şekil B.4 : AP2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde toplam aflatoksin değişim grafiği.

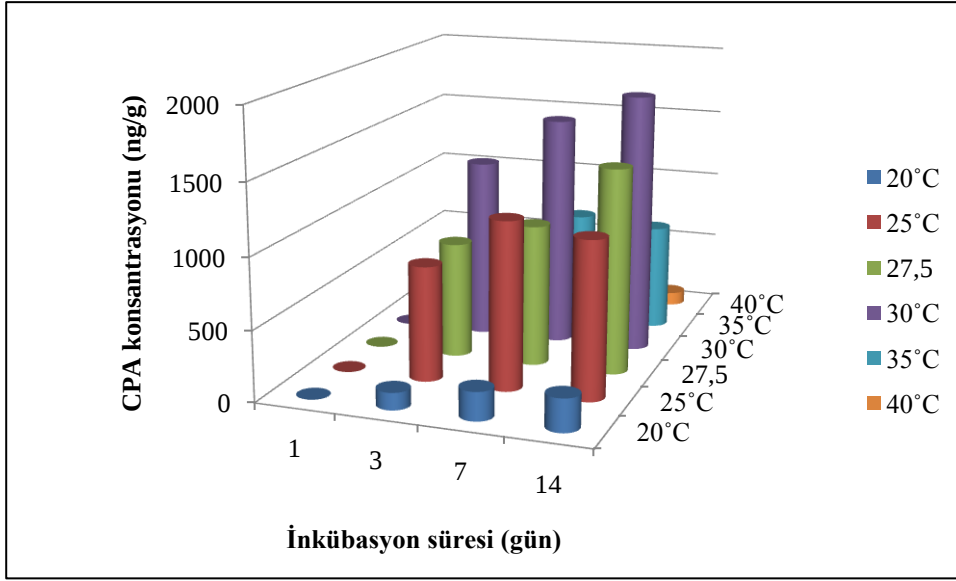
EK C



Şekil C.1 : AF1'in kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde siklopiazonik asit değişim grafiği.



Şekil C.2 : AF2'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde siklopiazonik asit değişim grafiği.



Şekil C.3 : AT'nin kuru incirde farklı sıcaklık ve sürelerde siklopiazonik asit değişim grafiği.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Hatice İmge OKTAY

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul - 20/07/1978

Lisans Üniversitesi: İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 1995-2000

Yüksek Lisans Üniversitesi: İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2003-2005

Yayın Listesi:

- **Oktay, İ.**, Heperkan, D., 2005: *Listeria* ve *Salmonella* Tayininde ISO Yönteminin VIDAS Otomatik Sistemi ile Karşılaştırılması, *Dünya Gıda Dergisi*, **11**, 74-81.
- **Oktay, İ.**, Heperkan, D., 2006: Evaluation of ISO Method and VIDAS Automated System for Identifying *Listeria* nad *Salmonella* in Selected Foods, *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **14**(2), 133-145.
- **Oktay, H.İ.**, Heperkan, D., 2006: Hizli Test Yontemi VIDAS ile Bazı Gıda Maddelerinde *Listeria* ve *Salmonella* Aranması. *IX. Gıda Kongresi*, 24-26 Mayıs, 2006 Bolu, Türkiye.
- **Oktay, H.İ.**, Heperkan, D., 2006: Microbiological Profile of Selected Foods Using Mini-Vidas and Conventional Methods: Special Attention to *Listeria* and *Salmonella*. *The 20th International ICFMH Symposium*, 29 August-02 September, 2006 Bologna, Italy.
- **Oktay, İ.**, 2007: *Salmonella* ve *Listeria* tayininde VIDAS sistemi ile klasik yontemin karsilastirilmasi. *Workshop of Rapid Methods in Food Microbiology*, 28-30 May, 2007 İstanbul, Turkey.
- **Oktay, H.İ.**, Heperkan, D., 2008: Contaminating microbial flora in commercially available baked potato, cheese and butter alone used as ingredients in Istanbul. *The 21th International ICFMH Symposium*, 01-04 September, 2008 Aberdeen, Scotland.
- **Oktay, I.**, Yelboga, E., Karaguler, N., Heperkan, D., 2008: Rapid identification of unknown foodborne bacterium by 16s rRNA cloning method. *24th UW River Falls Food Microbiology Symposium and Rapid Methods in Food Microbiology Workshop*, 19-22 October, 2008 River Falls, USA.
- **Oktay, H.İ.**, Heperkan, D., 2009: Cyclopiazonic acid versus aflatoxins among *Aspergillus* section *flavi* members. *ISM (International Society for Mycotoxicology) Conference*, 9-11 Sempember, 2009 Tulln, Austria.
- **Oktay, I.**, Heperkan, D., Yelboga, E., Karaguler, N., 2009: What does polyphasic approach tell us? Special attention to *Aspergillus* section *flavi*. *ISM (International Society for Mycotoxicology) Conference*, 9-11 Sempember, 2009 Tulln, Austria.

- Güler, F. K., **Oktay, H. İ.**, 2010: Gıdalarda Mikrobiyal Bozulma İndikatörleri' In:Gıda Mikrobiyolojisi, pp. 398-403, Ed. Osman Erkmen, Elif Yayınevi, Ankara.
- **Oktay, I.**, Karbancıoğlu-Güler, F., Daşkaya, C., Heperkan, D., 2010: Contamination of *Listeria monocytogenes* in Turkish Cheese and Their Health Effects. *Health Bridges Across The Bosphorus 3 (HBAB 3,)* 13-17 May, 2010 Essen, Germany.
- Heperkan, D., Karbancıoğlu Güler, F., **Oktay, H. İ.**, 2010 Keynote conference. The role of natural mycoflora on assesment of mycotoxin production in dried figs, pp 78-79, *VI Latin American Congress of Mycotoxicology and II International Symposium on Algal and Fungal Toxins for Industry*, 27 June-1 July, 2010 Yucatan, Mexico.