

T.C.  
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**BAZI TAHİL UNLARINDA MİKOTOKSİNLERİN VE MİKOTOKSİJENİK  
KÜFLERİN VARLIĞI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

**DOKTORA TEZİ**

**Kadriye TÜRKEŞSİZ**

**Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı  
Gıda Mühendisliği Programı**

**Temmuz, 2020**

T.C.  
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**BAZI TAHİL UNLARINDA MİKOTOKSİNLERİN VE MİKOTOKSİJENİK  
KÜFLERİN VARLIĞI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

**DOKTORA TEZİ**

**Kadriye TÜRKEŞSİZ  
(Y1113.640010)**

**Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı  
Gıda Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kâmil BOSTAN**

**Temmuz, 2020**

## **YEMİN METNİ**

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘Bazı Tahıl Unlarında Mikotoksinlerin ve Mikotoksijenik Küflerin Varlığı zerine Araştırmalar’’ adlı çalışmamın bütün süreçlerinde bilimsel ahlak ve etik geleneklere aykırı düşecek bir davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yaparak yararlanmış olduğumu belirtir ve onurumla beyan ederim.

**Kadriye TÜRKEŞSİZ**

## **ÖNSÖZ**

Başta, değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kâmil BOSTAN'a, bilimsel katkıları, tenkitleri ve yönlendirmeleri için Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın Prof. Dr. Güner ARKUN ve Prof. Dr. Ali AYDIN'a, bölüm hocalarımız Prof. Dr. Şükrü KARATAŞ ve Prof. Dr. Zeynep Dilek HEPERKAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarım, Dr. Murat AY'a, Dr. İlkay YILMAZ'a, Dr. İsmail Hakkı TEKİNER'e Dr. Murat DOĞAN'a, Yasemin SARAÇ'a, Musa GÜNGÖR'e, Selçuk ALGINGİL'e ve Esma AYBAKAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince ve hayatımın tüm safhalarında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme tüm içtenliklerimle teşekkür ederim.

Varlığımı borçlu olduğum aziz milletime ve Türk kadınının bu günlere gelmesini sağlayan Mustafa Kemal ATATÜRK'e şükranlarımı sunarım.

**Temmuz, 2020**

**Kadriye TÜRKESSİZ**

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 Mikotoksinlerin tanımı ve özellikleri .....	3
2.2 Aflatoksin .....	6
2.3 Okratoksin A .....	9
2.4 Deoksinivalenol.....	12
2.5 Zearalenon .....	14
2.6 Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri.....	16
2.7 Tahıl ve tahıl ürünlerinde küf ve mikotoksin varlığı ile ilgili araştırmalar .....	19
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>27</b>
3.1 Gereç .....	27
3.1.1 Un ve kepek örneklerinin temini.....	27
3.1.2 Alet-ekipmanlar .....	27
3.1.3 Analizlerde kullanılan besiyeri, çözelti ve kimyasallar .....	28
3.2 Yöntem .....	29
3.2.1 Örneklerde küf ve maya sayımı .....	29
3.2.2 Örneklerden küflerin izolasyonu.....	29
3.2.3 Kültürlerin muhafazası.....	29
3.2.4 İzole edilen küflerin klasik teknikler ile tanımlanması .....	29
3.2.5 İzole edilen kültürlerin moleküler teknikler ile tanımlanması .....	31
3.2.5.1 DNA izolasyonu.....	32
3.2.5.2 Polimer zincir reaksiyonu amplifikasyon protokolü .....	32
3.2.5.3 Agaroz jel elektroforezi.....	33
3.2.6 Mikotoksinlerin LC-MS/MS ile belirlenmesi .....	34
3.2.6.1 Standart toksinlerin konsantrasyonlarının hazırlanması .....	34
3.2.6.2 Matris etkili kalibrasyon .....	34
3.2.6.3 Doğrulama parametreleri .....	35
3.2.6.4 LC-MS/MS parametreleri .....	36
3.2.6.5 Örnek hazırlama .....	38
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>39</b>
4.1 Örneklerde küf ve maya sayımı .....	39
4.2 İncelenen izolatların klasik teknikler ile tanımlanması .....	39
4.3 İncelenen izolatların moleküler teknikler ile tanımlanması .....	40

4.3.1 İncelenen gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu .....	42
4.3.2 PZR ürünlerinin dizi analizi .....	44
4.4 Örneklerdeki aflatoksin miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi .....	44
4.4.1 Doğrulama parametreleri .....	44
4.4.2 Aflatoksin standartına ait kalibrasyon grafiği .....	45
4.4.3 Aflatoksin standartına ait kromatogramlar .....	46
4.4.4 Örneklerdeki aflatoksin miktarı .....	49
4.5 Örneklerdeki okratoksin A miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi.....	49
4.5.1 Doğrulama parametreleri .....	49
4.5.2 Okratoksin A standartına ait kalibrasyon grafiği .....	50
4.5.3 Okratoksin A standartına ait kromatogramlar .....	50
4.5.4 Örneklerdeki okratoksin A miktarı .....	51
4.6 Örneklerdeki deoksinivalenol miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi .....	51
4.6.1 Doğrulama parametreleri .....	51
4.6.2 Deoksinivalenol standartına ait kalibrasyon grafiği.....	52
4.6.3 Deoksinivalenol standartına ait kromatogramlar .....	52
4.6.4 Örneklerdeki deoksinivalenol miktarı.....	53
4.7 Örneklerdeki zearalenonun miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi .....	54
4.7.1 Doğrulama parametreleri .....	54
4.7.2 Zearalenon standartına ait kalibrasyon grafiği.....	54
4.7.3 Zearalenon standartına ait kromatogramlar .....	54
4.7.4 Örneklerdeki zearalenon miktarı .....	55
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>67</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>78</b>

## KISALTMALAR

<b>AFLAB1</b>	: Aflatoksin B1
<b>AFLAB2</b>	: Aflatoksin B2
<b>AFLAG1</b>	: Aflatoksin G1
<b>AFLAG2</b>	: Aflatoksin G2
<b>AOAC</b>	: Analitik Kimyacılar Birliği
<b>DON</b>	: Deoksinivalenol
<b>FAO</b>	: Gıda ve Tarım Örgütü
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi
<b>IARC</b>	: Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
<b>Kob</b>	: Koloni oluşturan birim
<b>LC-MS/MS</b>	: Sıvı Kromatografi/Tandem Kütle Spektrometresi
<b>LOD</b>	: Tespit Limiti
<b>LOQ</b>	: Tayin Limiti
<b>Maks</b>	: Maksimum
<b>Min</b>	: Minumum
<b>OTA</b>	: Okratoksin A
<b>Ppb</b>	: Milyarda Bir Birim ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
<b>Ppm</b>	: Milyonda Bir Birim ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
<b>PZR</b>	: Polimer Zincir Reaksiyonu
<b>TGK</b>	: Türk Gıda Kodeksi
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ZEA</b>	: Zearalanon

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 2.1: Bazı küf türleri ve bu türlerin oluşturduğu mikotoksinler.....	3
Çizelge 2.2: Bazı bitkisel ürünlerde yaygın bulunan mikotoksinler.....	5
Çizelge 2.3: Mikotoksin üretimi için optimum sıcaklık ve su aktivitesi .....	6
Çizelge 2.4: Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012) 'ne göre tahıllarda belirlenen maksimum aflatoksin limitleri .....	9
Çizelge 2.5: Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012) 'ne göre tahıllarda belirlenen maksimum okratoksin A limitleri .....	12
Çizelge 2.6: Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012) 'ne göre tahıllarda belirlenen maksimum deoksinivalenol limitleri .....	14
Çizelge 2.7: Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012) 'ne göre tahıllarda belirlenen maksimum zearalenon limitleri .....	16
Çizelge 2.8: Kanserojenik potansiyeline göre sınıflandırılan bazı mikotoksinler.....	17
Çizelge 3.1: Örneklerin İstanbul ilindeki dağılımı .....	27
Çizelge 3.2: Çalışmada kullanılan primerler .....	31
Çizelge 3.3: ITS1/ITS4 primerleri için reaksiyon koşulları .....	32
Çizelge 3.4: AoLC35-12L/AoLC35-12R primerleri için reaksiyon koşulları.....	33
Çizelge 3.5: Çalışmada kullanılan PZR içerikleri .....	33
Çizelge 3.6: Stok konsantrasyonlar (ppb).....	34
Çizelge 3.7: Matris etkili kalibrasyon hacimleri (µl) .....	35
Çizelge 3.8: Matris etkili kalibrasyon konsantrasyonları (ppb).....	35
Çizelge 3.9: Hareketli faz .....	36
Çizelge 3.10: Gradient parametreleri.....	37
Çizelge 3.11: Kütle parametreleri.....	37
Çizelge 4.1: Örneklerdeki küf ve maya sayıları (kob/g).....	39
Çizelge 4.2: Tahıl unu ve kepek örneklerinden izole edilen fungusların cins düzeyinde dağılımı (adet) .....	40
Çizelge 4.3: Örneklerde tespit edilen OTA düzeyleri ve örneklerden elde edilen potansiyel okratoksijenik türler .....	41
Çizelge 4.4: İncelenen izolatların NCBI gen bankasındaki en yakın temsilcileri .....	44
Çizelge 4.5: Aflatoksin için elde edilen doğrulama parametreleri .....	44
Çizelge 4.6: Pozitif örneklerdeki aflatoksin miktarları (µg/kg) .....	49
Çizelge 4.7: Okratoksin A için elde edilen doğrulama parametreleri .....	49
Çizelge 4.8: Pozitif örneklerdeki okratoksin A miktarları (µg/kg) .....	51
Çizelge 4.9: Deoksinivalenol için elde edilen doğrulama parametreleri.....	51
Çizelge 4.10: Pozitif örneklerdeki deoksinivalenol miktarları (µg/kg).....	53
Çizelge 4.11: Zearalenonun için elde edilen doğrulama parametreleri .....	54
Çizelge 4.12: Pozitif örneklerdeki zearalenon miktarları (µg/kg).....	55



## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Aflatoksinlerin kimyasal yapıları .....	8
Şekil 2.2: Okratoksinlerin kimyasal yapıları .....	10
Şekil 2.3: Trikotosenlerin yapısı .....	13
Şekil 2.4: Trikotosen .....	13
Şekil 2.5: Zearalenonun kimyasal yapısı .....	15
Şekil 2.6: Zearalenon .....	15
Şekil 3.1: İncelenen izolatların MEA ortamında makroskopik ve mikroskopik görüntüleri .....	30
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan ITS1 ve ITS4 primerlerinin ribozomal DNA üzerindeki şematik görüntüsü .....	31
Şekil 4.1: ITS primerine ait saflaştırılmış PZR ürünü (M: 1 kb marker) .....	42
Şekil 4.2: AoLC35-12L/AoLC35-12R primerine ait saflaştırılmış PZR ürünü (M: 1 kb marker) .....	43
Şekil 4.3: Aflatoksin B1'e ait kalibrasyon grafiği .....	45
Şekil 4.4: Aflatoksin B2'ye ait kalibrasyon grafiği .....	45
Şekil 4.5: Aflatoksin G1'e ait kalibrasyon grafiği .....	46
Şekil 4.6: Aflatoksin G2'ye ait kalibrasyon grafiği .....	46
Şekil 4.7: Aflatoksin B1'e ait kalibrasyon kromatogramı .....	47
Şekil 4.8: Aflatoksin B2'ye ait kalibrasyon kromatogramı .....	47
Şekil 4.9: Aflatoksin G1'e ait kalibrasyon kromatogramı .....	48
Şekil 4.10: Aflatoksin G2'ye ait kalibrasyon kromatogramı .....	48
Şekil 4.11: Okratoksin A'ya ait kalibrasyon grafiği .....	50
Şekil 4.12: Okratoksin A'ya ait kalibrasyon kromatogramı .....	50
Şekil 4.13: Deoksinivalenol'e ait kalibrasyon grafiği .....	52
Şekil 4.14: Deoksinivalenol'e ait kalibrasyon kromatogramı .....	52
Şekil 4.15: Zearalenon'a ait kalibrasyon grafiği .....	54
Şekil 4.16: Zearalenon'a ait kalibrasyon kromatogramı .....	55

## BAZI TAHIL UNLARINDA MİKOTOKSİNLERİN VE MİKOTOKSİJENİK KÜFLERİN VARLIĞI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

### ÖZET

Bu çalışmada İstanbul'daki çeşitli fırın ve marketlerden temin edilen un örneklerinde ve kepekte mikotoksin varlığının tespit edilmesi ve mikotoksijenik küflerin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla 25 tane tam buğday unu, 29 tane buğday unu, 30 tane çavdar unu ve 28 tane kepek olmak üzere toplam 112 örnek incelenmiş ve 174 tane izolat elde edilmiştir. İzolatlar geleneksel yöntemler ile incelenerek 22 farklı cins küf ve maya belirlenmiştir. Küflerin morfolojik özellikleri dikkate alınarak tür seviyesinde tanımlanmıştır. Geleneksel yöntemlerle belirlenen 29 temsilî okratoksijenik küf ITS ve AoLC (poliketid sentaz gen bölgesi) ile Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmaları yapılmış ve *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius* olarak tanımlanmıştır.

İncelenen un örnekleri ve kepekte aflatoksin (B1, B2, G1, G2), okratoksin A, deoksinivalenol ve zearalenon miktarları likit kromatografisi tandem kütle spektrofotometrisi (LC-MS/MS) ile saptanmıştır. Örneklerin dokuzunda (%8) 0,17-5,95 µg/kg arasında aflatoksin, 23'ünde (%20,5) 0,05-27,64 µg/kg arasında okratoksin A, 41'inde (%36,6) 0,06-70,04 µg/kg arasında deoksinivalenol ve 15'inde (%13,4) 0,04-3,04 µg/kg seviyeleri arasında zearalenon tespit edilmiştir. Analiz edilen örneklerin birinde aflatoksin (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) düzeyi (5,95 µg/kg) ve 3'ünde okratoksin A düzeyi (3,06, 21,72, 27,64 µg/kg) Türk Gıda Kodeksi sınır değerlerinin (3 µg/kg) üzerinde saptanmıştır.

Elde edilen bulgulara göre İstanbul'da tüketime sunulan tahıl unlarında ve kepekte küf seviyeleri kabul edilebilir sınır değerler arasında olduğu sonucuna varılmıştır. İncelemelerde örneklerin dördü harici diğer tüm tahıl unlarında ve kepekte yasal sınırların altında mikotoksin kontaminasyonu olduğu belirlenmiştir. Gıda üretim yapan işletmelerde gıda güvenliğinin sağlanmasında ve tüketicilerde oluşabilecek sağlık risklerinin önlenmesinde iyi tarım uygulamaları (GAP) ve HACCP gibi sistemlerle üretimin her aşamasında denetimler sıklıkla yapılarak gerekli kontrollerin uygulanması toplum sağlığının korunmasında büyük önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Tahıl unu, Küf, Mikotoksin, LC-MS/MS, PZR*

## INVESTIGATION ON THE EXISTENCE OF MYCOTOXINES AND MYCOTOXYGENIC MOLD IN SOME CEREAL FLOURS

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the presence of mycotoxins in flour samples and bran obtained from various bakeries and markets in Istanbul and to identify mycotogenic molds. For this purpose, a total of 112 including 25 whole wheat flour, 29 wheat flour, 30 rye flour and 28 bran were examined and 174 isolates were obtained. Isolates were examined by traditional methods and 22 different mold and yeast were determined. Molds are identified at the species level by taking into account the morphological features. Polymer Chain Reaction (PCR) studies were performed with 29 representative ochratoxygenic mold ITS and AoLC (polyketide synthase gene region) determined by traditional methods and identified as *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius*.

Flour samples examined and the amounts of aflatoxin (B1, B2, G1, G2), ochratoxin A, deoxynvalenol and zearalenone were determined by liquid chromatography tandem mass spectrophotometry (LC-MS / MS). In nine (8%) of the samples, aflatoxin between 0.17-5.95 µg/kg, in 23 (20,5%) of 0.05-27.64 µg/kg of ocratoxin A, in 41 (36,6%) deoxinivalenol between 0.06-70.04 µg/kg and zearalenone between 0.04-3.04 µg/kg in 15 (13,4%). Turkish Food Codex limit of aflatoxin (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) level (5.95 µg/kg) in one of the analyzed samples and ocratoxin A level (3.06, 21.72, 27.64 µg/kg) in 3 values above (3 µg/kg).

According to the findings, it was concluded that the mold levels in cereal flour and bran offered for consumption in Istanbul are among the acceptable limit values. Myotoxin contamination in all other cereal flour and bran below the legal limits was determined in the examinations except for four of the samples. In ensuring food safety in food production enterprises and in preventing health risks that may occur in consumers, audits are carried out frequently at every stage production with systems such as good agricultural practices (GAP) and HACCP, and the implementation of necessary controls is of great importance in protection public health.

**Keywords:** *Grain flour, Mold, Mycotoxin, LC-MS / MS, PZR*

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tahıllar; yetiştirme, üretim ve kullanım alanlarının genişliği açısından kültür bitkileri arasında ilk sırada yer almaktadır. Tahıl cinslerinin çok çeşitte tür içermesi ve ekotip zenginliği sebebiyle çok geniş alanda adapte olma yetenekleri, ekim alanlarının artmasında ve dolayısıyla yüksek üretim miktarlarında önemli bir faktör olmaktadır. Tahıllar, insanlar tarafından geçmişten günümüze tüketilen başlıca gıda hammaddeleridir (Altan, 1986). Tahıllar; diğer kültür bitkileri arasında insan beslenmesi açısından önemli bir yere sahip olmasıyla ön plana çıkmaktadır (Kınacı ve ark., 2011).

Tahıllar, içerdiği diyet lifleri, proteinler, mineraller, vitaminler ve antioksidanlardan beslenmenin önemli bir parçasıdır. Tahıllar; beta glukan, arabinoksilan, dirençli nişasta gibi diyet lifi içerir. Ayrıca antioksidan fonksiyonu gösteren fenolik maddeler ve fitoöstrojenler içermektedir. Tahılların kanser ve kardiyovasküler hastalıkları önlediği, kan basıncını, kolesterolü, yağ emilim hızını azalttığı ve kalp-damar hastalığı riskini azaltan birçok fonksiyonel bileşen içerdiği bildirilmektedir. Tahılların bu yararlı özelliklerin hakkında bilgilerin açığa çıkmasıyla birlikte fırıncılık ürünleri, diyetetik ürünler, bebek mamalarında, kahvaltılık ürünlerde kullanımıyla insan beslenmesinde yaygınlaşmaktadır (Chaturvedi ve ark., 2011).

Mikotoksinler, bazı filamentli mantarlar (küfler) tarafından üretilen toksik sekonder metabolitlerdir. Bu metabolitler düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir (genellikle 1000 Dalton'dan az). Besin zincirimize bitkisel bazlı besinlerin mikotoksinlerle kontamine olmasıyla ya da gıda üzerinde toksijenik küflerin büyümesinden dolayı girebilmektedirler. Mikotoksinler mısır, tahıl, soya fasülyesi, sorgum, yer fıstığı gibi diğer gıda ve yem bitkilerinde tarlada, olgunlaşma esnasında ve nakliye sırasında birekebilmektedir. Mikotoksinle kontamine olmuş gıda veya yemin tüketilmesiyle insanda ve hayvanlarda akut veya kronik toksisiteye neden olmaktadır. Mikotoksinle kontamine olmuş gıda ve yemlerin doğrudan tüketiminden kaynaklanan olumsuz etkilere ilişkin

kaygıların yanı sıra, potansiyel mikotoksin kalıntıları veya metabolitleri içeren et, süt ve yumurta gibi hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinin tüketilmesiyle ilgili halk sağlığı endişesi de vardır. Üç fungal cins, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* üyeleri, başlıca mikotoksin üreticileridir. 300'den fazla mikotoksin tanımlanmış, bunlardan 6'sı (aflatoksin, trikotesen, zearalanon, fumonisin, okratoksin ve patulin) gıdalarda yaygın olarak bulunurlar ve dünya çapında öngürülemeyen ve devam eden gıda güvenliği sorunlarına neden olmaktadır (Alshannaq ve Yu, 2017).

Tahıllar gerek tarla küfleri gerekse depo küfleri ile kontamine durumdadırlar. Küfler koşullar uygun olduğunda tahıl üzerinde gelişip ürünlerin bozulmasına ve ürettikleri toksinlerle tüketici sağlığı açısından zararlı hale gelmesine neden olabilmektedirler. Küf kontaminasyonu yüzeysel olduğundan kepek kısmı uzaklaştırılmamış unlardan yapılan ürünlerde de küf gelişim ve mikotoksin oluşma olasılığı yüksektir. Geçmiş yıllarda tahıl ve tahıl ürünlerinde küf mikroflorası ve mikotoksin düzeyleri hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak son zamanlarda tüketimi giderek artan kepek oranı yüksek unlarda ve bu unlardan yapılan ürünlerde küf ve mikotoksin çalışmaları yetersizdir.

Bu çalışma tam buğday unu, buğday unu, çavdar unu ve kepekte mevcut küf mikroflorasını tanımlamak, mikotoksijenik olanları geleneksel ve moleküler yöntemler kullanılarak saptamak aynı zamanda bulunması muhtemel mikotoksinlerden aflatoksin (B1, B2, G1, G2), okratoksin A, deoksinivalenol ve zearalanon düzeylerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Mikotoksinlerin tanımı ve özellikleri

Doğada yaygın olan küflerin gelişmesi için uygun olduğu durumlarda (sıcaklık, nem, vb.) tarımsal ürünlerde gelişerek ve bu ürünlerin kullanımıyla elde edilen gıda ve yemlerde çeşitli toksik maddeler oluşturmaktadırlar (Van Egmond, 1989). Küflerin ikincil metabolitleri sonucu olarak sentezlenen toksik maddeler mikotoksin olarak adlandırılır. Mikotoksin kelimesi Yunanca'da mantar anlamına gelen 'mykes' ile Latince'de zehir anlamına gelen 'toxicum' kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Mikotoksinli ürünlerin tüketiminden kaynaklanan insanda ve mikotoksin içeren yem tüketimine bağlı olarak hayvan sağlığı sorunlarına 'mikotoksikozis' olarak adlandırılır (Anonim, 2015).

**Çizelge 2.1:** Bazı küf türleri ve bu türlerin oluşturduğu mikotoksinler

<b>Küf Türleri</b>	<b>Mikotoksinler</b>
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Aflatoksin B1, B2 (M1, M2)
<i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Aflatoksin G1, G2
<i>A. flavus</i> , <i>P. commune</i>	Cyclopiazonic acid
<i>A. ochraceus</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin A
<i>P. expansum</i> , <i>A. clavatus</i>	Patulin
<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Deoxynivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>	T-2 toxin
<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i>	Diacetoxyscirpenol
<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenon
<i>F. moniliforme</i> , <i>F. verticillioides</i>	Fumonisin
<i>Acremonium coenophialum</i>	Ergopeptine alkaloids
<i>A. lolii</i>	Lolitrems alkaloids
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
<i>Pithomyces chartarum</i>	Sporidesmin

**Kaynak:** Taydaş, 2006

Günümüzde 300'e kadar mikotoksin varlığı tespit edilmiştir ve bu toksinlerin 350 küf türü tarafından üretildiği belirlenmiştir. Bir küf türü birden fazla mikotoksin sentezleyebilirken, bir mikotoksin birden fazla küf türü tarafından oluşturulabilmektedir. Dünyada yaygın olarak görülen ve mikotoksin (Çizelge 2.1) ürettiği bilinen *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Rhizopus* küf türleri olarak yer almaktadırlar (Taydaş, 2006).

Küf ve diğer mikroorganizmaların birincil metabolitleri; büyümeleri için gerekli olan metabolitlerdir. Mikotoksinler ve uçucu organik maddeler ikincil metabolitler olarak sentezlenmektedir. İkincil metabolitler; küfün logaritmik gelişme fazının sonunda üretilmeye başlanır ve üreten organizma metabolizması veya gelişimi üzerine önemli bir etkisi yoktur (Karadeniz ve Ekşi, 2002; Bozoğlu, F. 2003). Uçucu organik maddeler, ketonlar, aldehitler, alkoller ve çoklu modifiye ederek oluşan aromatik ve alifatik yapılarıdır. Çalışmalar, uçucu organik maddelerin bileşiminin büyüme ve ortam koşullarına bakılmaksızın aynı kaldığını göstermektedir. Bu tür maddeler gıda ve gelişme ortamlarında küf kokusu olarak adlandırdığımız kokuya sebep olmaktadır (Bozoğlu, 2003). Küflerin ikincil metabolitleri sentezi; poliketit, terpenoid ve temel amino asitleri kullanımı yoluyla gerçekleşir ve mikotoksinler poliketit yoluyla oluşmaktadır (Smith, 2001; Karadeniz ve Ekşi, 2002). Mikotoksinlere kimyasal açıdan bakıldığında büyük bir kısmının doymamış halka (aromatik), az bir kısmının ise açık zincirli (alifatik) yapıda olduğu görülmektedir. Bakteriyel toksinlerden farklı fiziksel özelliklere ve kimyasal yapıya (piranlar, antrakinolar, kumarinler, makrolidler, steroidler, siklik polipeptidler) sahiptir ve düşük molekül ağırlığı (çoğunlukla <700 Da) gösterirler. Bu özelliklerden dolayı farklı matrislerin belirlenmesi için farklı analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Sherif ve ark., 2009).

Mikotoksin kontaminasyonu mahsül bitki büyürken, hasat sonrası, depolanması, gıda ürünlerine işlenmesi, paketlenmesi, dağıtılması sırasında ortaya çıkabilmektedir (Pereira ve ark., 2014; Bhatnagar ve ark., 2006). Genel olarak uygun olmayan yüksek sıcaklıkta depolanan ve yüksek nem içeriğine sahip tüm bitkisel (Çizelge 2.2) mahsüller küflenmeye ve mikotoksin kontaminasyonuna maruz kalabilmektedir (Klich, 2003). Mikotoksinlerin çoğu, gıda pişirme, kaynatma, fırınlama, kızartma ve pastörizasyon dahil olmak üzere gıda işlemleri

sırasında kimyasal ve termal olarak kararlıdır (Marin ve ark., 2013; Kaushik, 2015).

**Çizelge 2.2:** Bazı bitkisel ürünlerde yaygın bulunan mikotoksinler

Tarımsal ürün	Mikotoksin kirliliği	
	Tarlada	Depoda
Arpa	DON, NIV, ZEA, HT-2, T2	OTA, AFLA, SİTR
Mısır	DON, FUM, ZEA	ZEA, AFLA
Buğday	DON, NIV, ZEA, ERGOT	OTA, AFLA, SİTR
Sorgum	-	AFLA
Çavdar	ERGOT	OTA
Yulaf	DON, NIV, HT-2, T2	OTA, SİTR
Pamuk Tohumu Küşpesi	AFLA, TENUA	AFLA
Yerfıstığı Küşpesi	AFLA, ZEA	AFLA, OTA, SİTR
Soya Küşpesi	-	AFLA
Çayır otu	ZEA, DON, ERGOT	-
Mısır silajı	AFLA	ROQ, PAT, ZEA, PR
Saman	-	ZEA, SAT

**Kaynak:** Pettersson, 2004

AFLA: Aflatoksin, DON: Deoksinivalenol, NIV: Nivalenol, ERGOT; Ergotamin, T-2 ve HT-2: T-2 ve HT-2 toksinleri, ZEA: Zearalenon, OTA: Okratoksin A, SİTR: Sitrinin, TENUA: Tenuazoik asit, PR: PR Toksin, ROQ: Roquefortin, PAT: Patulin.

Tahıllarda mikotoksin bulaşmasını etkileyen faktörler; depolama sırasındaki tahılların durumu, özellikle nem ve sıcaklık (Çizelge 2.3) gibi koşullar depolanan tahılın güvenliğini belirlemek için kritik faktörlerdir. Depolanan tahıllarda küf gelişimini ve mikotoksin biyosentezini destekleyen ana faktörler; yüksek tanecik nemi (%16-30), yüksek tanecik sıcaklığı (25-32°C) ve yüksek hava nemi (RH) (%80-100) arasındadır (Shanahan ve ark., 2003). Mikotoksin



oluşumunu etkileyen diğer faktörler; bitkisel ürün ve gıdanın türü, ürünün pH'ı, ürüne uygulanan hasat işlemleri, olgunluğu, saklama koşulları, çevrede diğer rekabetçi mikroorganizmaların varlığı, yetersiz gübreleme ve kuraklık (mahsul koruma sistemlerinin zarar görmesi sonucu küflerin kolonize olması daha kolaydır), ayrıca bitkilere uygulanan mekanik işlemler ve böcekler koruyucu yapıyı bozabilmektedir (Tunail, 2000; Bozoğlu, 2003; Akdeniz ve ark.,2013).

**Çizelge 2.3:** Mikotoksin üretimi için optimum sıcaklık ve su aktivitesi

Mikotoksin	Sıcaklık (°C)	Su aktivitesi (aw)
AFLA	33	0.99
OTA	25-30	0.98
FUM	15-30	0.9-0.995
ZEA	25	0.96
DON	26-30	0.995
SİTR	20-30	0.75-0.85

**Kaynak:** Milani, 2013

## 2.2 Aflatoksin

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* küfleri tarafından üretilirler. Aflatoksin kelimesinin *Aspergillus flavus*'un ilk harflerinden türetilmiştir (A ve Fla) ve toksin kelimesine eklenmiştir (Öksüztepe ve Erkan 2016). Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsine ait 3 farklı bölümüne ait küf türü tarafından üretilir; *Flavi* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus parvisclerotigenus*, *Aspergillus minisclerotigenes*, *Aspergillus arachidicola*, *Aspergillus togoensis*), *Nidulantes* (*Emericella astellata*, *Emericella venezuelensis*, *Emericella olivicola*) ve *Ochraceorosei* (*Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus rambellii*) (Koçube ve ark., 2013).

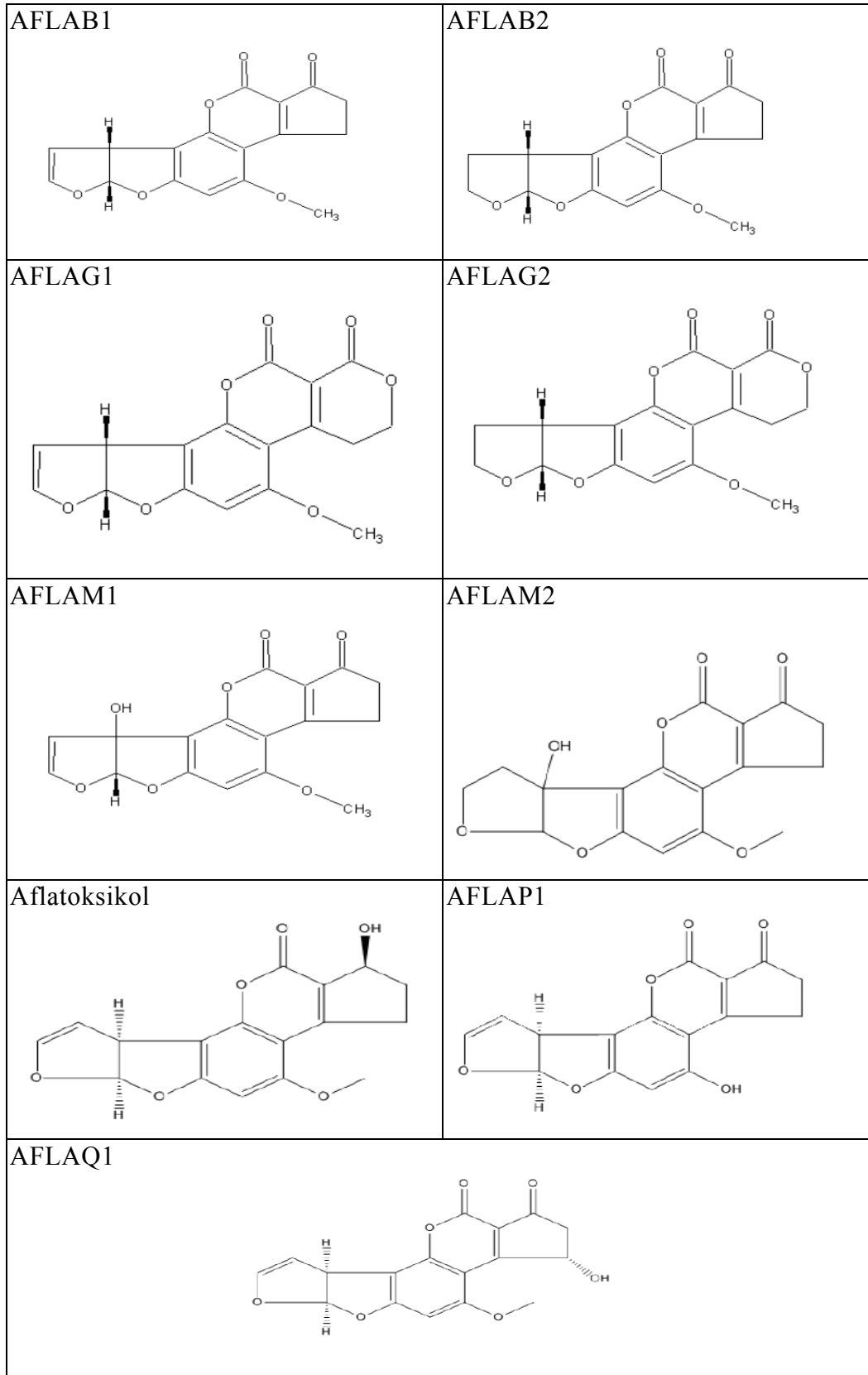
Aflatoksinler (Şekil 2.1) dört ana fraksiyona sahiptir. Bunlar; B1, B2, G1 ve G2'dir. Aflatoksin M1 ve M2 iki önemli aflatoksin olup AFLAB1 ve B2'nin hidroksi türevleridir (Özkaya ve ark., 2003; Klaassen,1996). Bunlar dışında

özellikle memelilerde, ana metabolitlerin biyotransformasyonu sonucu oluşan Aflatoksin P1 (AFLAP1), Q1 (AFLAQ1), B2a (AFLAB2a) ve G2a (AFLAG2a) olarak adlandırılan aflatoksinler de belirlenmiştir (Dwayne ve Thrasher, 2011; Klaassen ve Amdur, 2013).

Aflatoksinler; beyaz kristal formda, kloroform, metanol ve dimetil sülfoksit gibi kısmen polar çözücüler içinde çözünür olan ve 1 ile 20 µg/ ml oranında suda çözünür bileşiklerdir. Ultra viyole ışığı altında floresans üretebilmelerine rağmen AFLAB1 ve AFLAG1 derivatize edilerek floresans özellikleri geliştirilebilmektedir (Desphande, 2002). AFLAB1 ve AFLAB2 mavi floresans üretirken, AFLAG1 ve AFLAG2 yeşil floresans üretir. AFLAM1, AFLAM2, AFLAB2A ve AFLAG2A ise çok az miktarda floresans özellik göstermektedirler (Helferich ve Winter, 2000).

*Aspergillus* türlerinin çoğu mikotoksin üretebilmektedir, tahıllarda hastalık oluşturarak tahıl tanesinin kalitesinin bozulmasına neden olurlar. *Aspergillus* türleri hasat öncesi mısır, yer fıstığı ve pamuk gibi bitkisel ürünlerde kök ve koçan çürüklüğüne neden olurken özellikle hasat sonrası ve depolama süresince de etkili olurlar (Scheidegger ve Payne, 2003; Duran ve ark., 2009). Buğday, arpa, yulaf gibi tahıllar başta olmak üzere, mercimek, bezelye gibi baklagiller, badem, yer fıstığı, fındık, bazı yağlı tohumlar (pamuk, susam, kolza), baharatlar (kırmızı toz biber, karabiber, pul biber) ve kuru meyveler (incir, kayısı, üzüm) aflatoksin bakımından riskli gıdalardır (Öksüztepe ve Erkan, 2016).

Aflatoksinler mikotoksinler arasından en güçlü biyolojik karsinojen maddeler olduğu bilinmektedir. Ayrıca canlılarda mutajenik, teratojenik ve toksijenik etkili metabolitler olduğu tespit edilmiştir (Günşen ve Büyükyörük, 2003; Gürses ve ark., 2004). International Agency for Research on Cancer (IARC), AFLAB1'i öncelikle karaciğeri hedef alan, grup I karsinojen olarak sınıflandırmıştır (Cheraghali ve ark., 2007; Heperkan ve ark., 2012).



Şekil 2.1: Aflatoxinlerin kimyasal yapıları

Kaynak: Anonim, 2012c

Aflatoksin ile bulaşı tahıl ve tahıl ürünleri için Türk Gıda Kodeksi (TGK) tarafından maksimum limit değerleri belirlenmiştir ve bu limitler Çizelge 2.4 'de belirtilmektedir.

**Çizelge 2.4:** Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012)'ne göre tahıllarda belirlenen maksimum aflatoksin limitleri

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)	
	B1	B1+B2+G1+G2
Aflatoksin		
Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.11, 2.1.14 ve 2.1.16'de belirtilenler hariç)	2,0	4,0
Mısır ve pirinç (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0

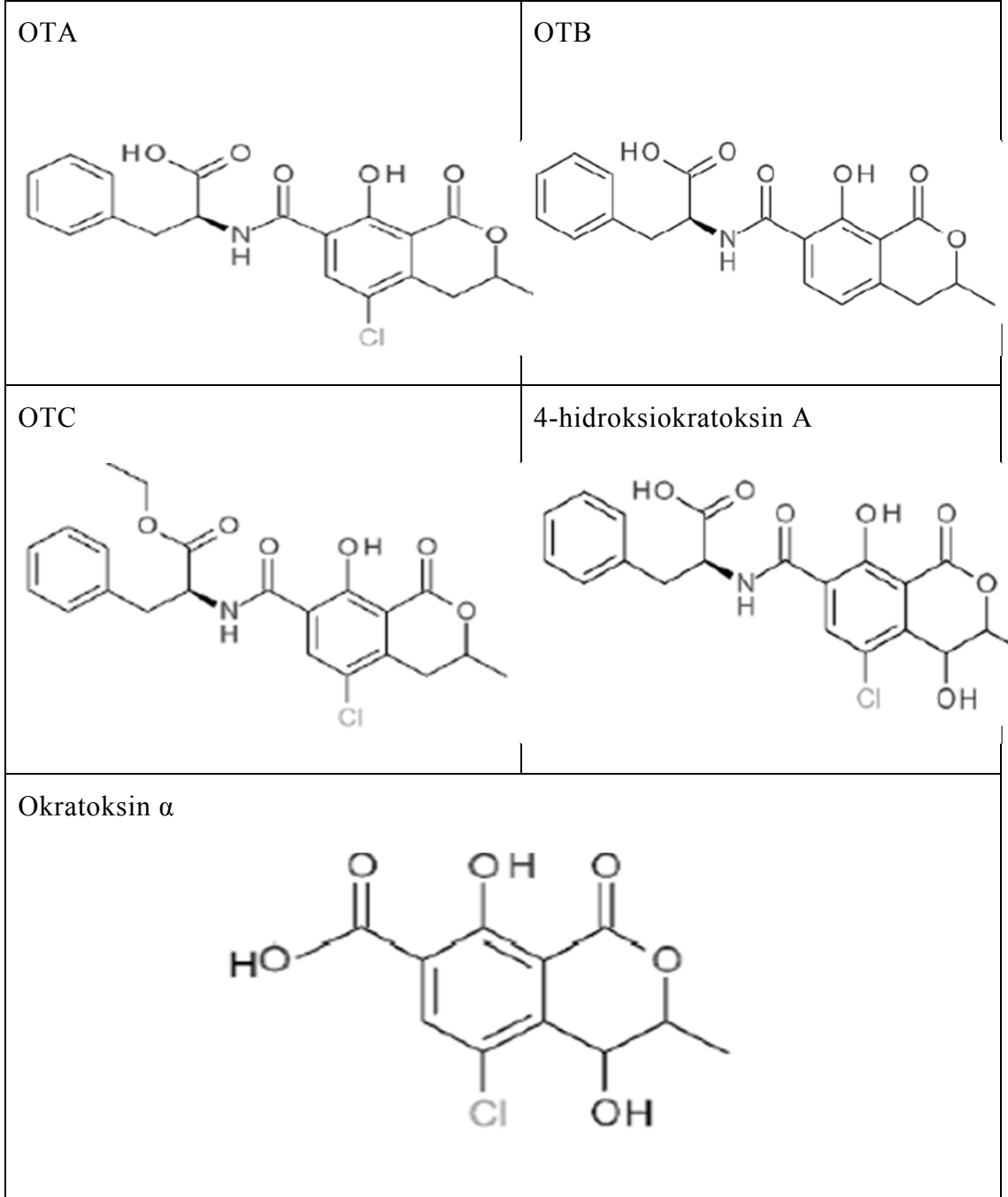
**Kaynak:** TGK, 2012

### 2.3 Okratoksin A

Okratoksin A *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* da dahil olmak üzere siyah *Aspergilluslar* tarafından oluşturulan mikotoksindir (Nguyen ve Ryu, 2014). Van der Merve ve arkadaşları tarafından tespit edilen bir mikotoksin olan okratoksin A adını okratoksin ürettiği tespit edilen ilk tür olan *Aspergillus ochraceus*'tan almıştır (Brera ve ark., 2014). OTA üretme yeteneğine sahip olan *Penicillium* türleri ise *Penicillium verrucosum* ve *Penicillium nordicum*'dur (Heperkan ve ark., 2009; Coverelli ve ark., 2012). *Aspergillus ochraceus* (*A. alutaceus*), *A. melleus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotorium*, *A. albertensis*, *A. wentii*, *A. auricomus*, *A. niger var. niger*, *A. sulphureus*, (*A. fresenii*) küf türleri diğer okratoksinleri üretebilmektedir (Girgin ve ark., 2001).

Okratoksinler (Şekil 2.2); OTA'nın metil ve etil esterlerinden oluşan okratoksin C (OTC), 4-hidroksiokratoksin A (4-OH-OTA), okratoksin B (OTB) ve okratoksin B'nin metil ve etil esterleri ile okratoksin  $\alpha$ 'dan ibarettir (Şekil 2.2). Okratoksin  $\alpha$  hariç, okratoksinler 7-karboksi grubu boyunca bir amid bağı ile L-

$\beta$ -fenilalanine bağlanmış bir pentaketit türevidir olan dihidroksikumarin yapısındadır (Bräse ve ark., 2009; Anlı ve Alkış, 2010).



Şekil 2.2: Okratoksinlerin kimyasal yapıları

**Kaynak:** (Özkaya ve Temiz, 2003)

Okratoksin A organik çözücülerde yüksek çözünürlüğe sahiptir ancak suda az çözünür. Metanol çözüldüğünde 333 nm'de emiciliği vardır ve 467 nm'de floresan emisyonu üretmektedir. Okratoksin A geniş asidik özelliğe sahiptir,

pKa değeri fenilalanin grubunun karboksi grubu için 4.2–4.4 ve isokumarin yapısının fenolik hidroksi grubu için 7.0–7.3 arasındadır (Anlı ve Alkış, 2010).

Okratoksin A, gıdaların, yemlerin ve içeceklerin sık sık kontaminasyonuna sebep olan zararlı bir mikotoksindir (Bisogno ve ark., 2007). Dünyadaki birçok gıda; kahve, tahıllar, işlenmiş gıdalar, bira, üzüm, şarap, kakao, fındık ve kuru meyveler okratoksin A açısından risk altında bulunmaktadır. Aynı zamanda okratoksin A varlığı tespit edilen diğer gıdalar ise; domuz eti ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, yumurta, meyve ve sebzeler ile meyve ve sebze ürünleri; pekmez, sirke, domates, havuç ve elma gibi meyve sularıdır (Palumbo ve ark., 2007; Barkai-Golan ve Paster, 2008; Sørensen ve ark., 2010).

Okratoksin A IARC tarafından muhtemel insan kanserojenlerinde sınıflandırılmaktadır (kategori 2B). Hayvanlar üzerinde yapılan tüm çalışmalarda, okratoksin A ile böbrek hastalığı arasında yakın bir ilişki vardır. OTA anne sütü de dâhil olmak üzere insan serumundaki kan hücrelerinde ve hayvan dokularında bulunduğu tespit edilmektedir. OTA domuz nefropatisinden de sorumludur. Bu hastalık Danimarka'da tespit edilen domuz nefropatisi için endemiktir. Kuş ölümlerine de sebep olduğu gösterilmiştir (Rocha ve ark., 2014). Ayrıca Balkanların (Hırvatistan, Bosna Hersek, Sırbistan, Romanya, Bulgaristan) kırsalında yaşayan insanlarda tipik olan Balkan Endemik Nefropatisi olarak belirtilen (BEN), böbrek hastalığıyla ilişkilidir. OTA'nın hedef organı böbreklerdir ve böbrekler için potansiyel bir nefrotoksindir (Marin ve ark., 2013). Çalışmalarda farklı hayvan üzerinde çeşitli toksik etkileri belirlenmiştir. Bunlar; immunosüpresyon, terotojeniteye ve hepato-toksisiteye sebep olduğu bildirilmektedir (Bisogno ve ark., 2007).

OTA ile bulaşı tahıl ve tahıl ürünleri için TGK tarafından maksimum limit değerleri belirlenmiştir ve bu limitler Çizelge 2.5 'de belirtilmektedir.

**Çizelge 2.5:** Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012) 'ne göre tahıllarda belirlenen maksimum okratoksin A limitleri

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)
<b>Okratoksin A</b>	
İşlenmemiş tahıllar	5,0
İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (Doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil) (2.2.9., 2.2.10. ve 2.2.13. satırında belirtilenler hariç)	3,0
Buğday gluteni (Tüketiciye doğrudan satılmayan)	8,0

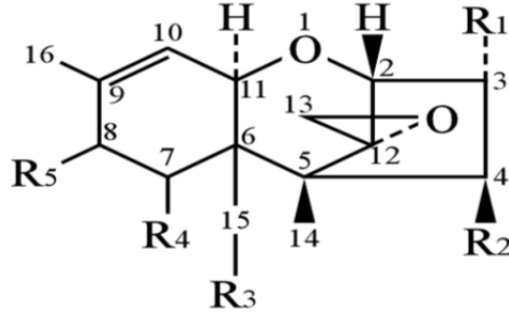
Kaynak: TGK, 2012

#### 2.4 Deoksinivalenol

Deoksinivalenol (DON) trikotesenler olarak adlandırılan grubun içinde yer alan ve *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum* dahil olmak üzere çok sayıda *Fusarium* türü tarafından üretilen bir mikotoksindir (Čonková ve ark., 2003). Trikotesenler (Şekil 2.3) 12,13-epoksitrikotes-9-en halkasına dayanan kimyasal yapılarına göre A, B, C ve D olarak dört gruba ayrılmaktadırlar. Tip A ve B trikotesenler C-8 pozisyonunda keto grup içerip içermediklerine göre birbirinden ayrılmaktadırlar. C-8'de oksijen olmayan fonksiyonel diasetoksisirpenol içeren Tip A grubu, C-8'de esterlenmiş hidroksil grubuna sahip T-2 toksini ile temsil edilmektedir. B grubu trikotesenleri C-8'de keto grubuna sahiptir ve NIV ve DON ile temsil edilmektedir. C tipi ilave bir epoksit grubu ile karakterize edilmektedir. D tipi makrosiklik trikotesenden oluşmaktadır (Şekil 2.4) ve *Stachybotrys* ve *Trichotecium* üyeleri tarafından üretilirler (Girgin ve ark., 2001; Desjardins, 2006).

DON buğdayda, arpa, çavdar, yulaf, mısır ve aspir tanelerinde yaygın olarak bulunan B tipi trikotesen olarak ilk 1950'lerde Japonya'nın kırsal bölgelerinde 'Kırmızı küf zehirlenmesi' olarak rapor edilmiştir. Kanada'da 1971-1981 yılların sonlarında ve ABD'nin kuzeyindeki geniş buğday alanlarının bu toksin ile kontamine olduğu ve ilk kez deoksinivalenol adının kullanıldığı görülmektedir. Çeşitli araştırmalar sonucunda, *F. culmorum* ve *F. graminearum*

türlerinin ürettiği DON'un mısırdaki Gibberella koçan çürüklüğü ve başak yanıklığı hastalığına neden olduğu bildirilmektedir (Vesonder ve Hesseltine, 1980; Udagawa, 1988; Miller ve ark., 2001).



Şekil 2.3: Trikotesenlerin yapısı

**Kaynak:** Desjardins, 2006

Triketesen	Oksijenasyon ve esterifikasyon pozisyonu				
	C-3	C-4	C-7	C-8	C-15
Deoksinivalenol	OH	H	OH	=O	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	=O	OH
T-2 toksin	OH	OAc	H	Olsoval	OAc

OAc: Asetil ester, Olsoval; isovalerat ester  
Triketesen

Şekil 2.4: Triketesen

**Kaynak:** Desjardins, 2006

DON ağırlıklı olarak buğday, arpa, mısır gibi tahıllarda ve daha az sıklıkla yulaf, pirinç, çavdar, sorgum ve tritikalede bulunur. Aynı zamanda Avrupa ve Kuzey Amerikada'ki bazı işlenmiş gıda ürünlerinde de rastlanılmaktadır. Ayrıca malt ve bira gibi arpa ürünlerinde de bulunduğu tespit edilmiştir (Hussein ve Brasel, 2001; Creppy, 2002).

Tahıl ürünlerinde yapılan araştırmalar *Fusarium* mikotoksinlerinin insan ve hayvan beslenmesinde ortak bir kirletici olduğunu göstermektedir. DON çiftlik hayvanlarında yem alımında azalma, kilo alımında azalma ve kusmaya neden



olmaktadır (EFSA, 2004). İnsanlar tarafından yüksek konsantrasyonlarda DON içeren gıdalar tüketildiğinde bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, baş ağrısı, baş dönmesi ve ateş gözlemlendiği bildirilmektedir (Scientific Committee on Food 2002).

DON ile bulaşı tahıl ve tahıl ürünleri için TGK tarafından maksimum limit değerleri belirlenmiştir ve bu limitler Çizelge 2.6 'da belirtilmektedir.

**Çizelge 2.6:** Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012)'ne göre tahıllarda belirlenen maksimum deoksinivalenol limitleri

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)
<b>Deoksinivalenol</b>	
İşlenmemiş tahıllar (durum buğdayı, yulaf ve mısır hariç)	1250
İşlenmemiş durum buğdayı ve yulaf	1750
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	1750
Tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym (doğrudan insan tüketimine sunulan)	750
Makarna	750
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar	500

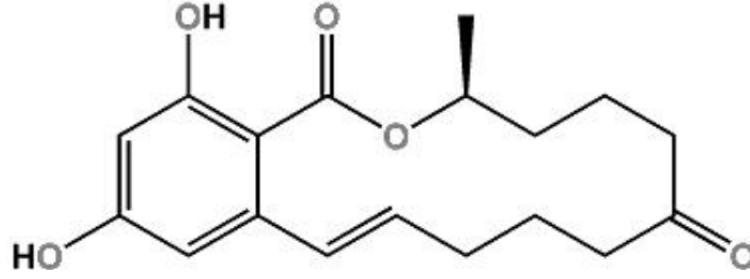
**Kaynak:** TGK, 2012

## 2.5 Zearalenon

Zearalenon (ZEA) *Fusarium* türü küfler, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. cerealis*, *F. crookwellence* ve *F. semitectum* tarafından sentezlenen steroidal olmayan östrojen bir mikotoksindir. *Fusarium* türleri özellikle tahıllarda başlıca bulaşanlar arasında olmakla beraber toprak kaynaklı olup sıcak iklimin görüldüğü ülkelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Topal, 1993; Bennet ve Klich, 2003; Zinedine ve ark., 2007).

Zearalenonlar (Şekil 2.5 ve 2.6) rezosiklik asit lakton yapıları üzerinde hidroksil gruplarının varlığı, redüksiyon durumu ve asetillenmelerine göre farklılaşmaktadırlar (Tunail, 2000; Desjardins, 2006;). Kristal yapıda, beyaz ve

kokusuzdur. Suda çözünmeyip kloroform, dietilete, diklorometan, etil asetat, alkol ve sulu alkali çözücülerde çözünmektedir (Josephs ve ark., 2004).



Şekil 2.5: Zearalenonun kimyasal yapısı

**Kaynak:** Desjardins, 2006

Zearalenon	Karbon pozisyonları					
	C-4	C-5	C-7-C-8	C-11	C-12	C-14
Zearalenon	OH	H	C=C	H	=O	H
$\alpha$ ve $\beta$ -zearalenon	OH	H	C=C	H	OH	H
11-Hidroksizearalenon	OH	H	C=C	OH	OH	H
14-Hidroksizearalenon	OH	H	C=C	H	=O	OH
4-Asetilzearalenon	OAc	H	C=C	H	=O	H
5-Formilzearalenon	OH	CHO	C=C	H	=O	H

Zearalenon

Şekil 2.6: Zearalenon

**Kaynak:** Desjardins, 2006

Mısır, öğütülmüş arpa ve buğday gibi tahıllarının özellikle *F. gramineorum* kontamine olması sonucu ZEA oluşmaktadır. Yapılan araştırmalar mısır ve mısır bazlı hayvan yemlerinde yüksek konsantrasyonlarda ZEA varlığı tespit edilmektedir (Kuiper-Goodman ve ark., 1987). ZEA ile bulaşı tahıl kaynaklı yemlerin tüketilmesiyle domuzlarda genital sorunlara neden olduğu tespit edilmektedir (Massart ve Saggese, 2010). Yüksek miktarda ZEA içeren

yemlerle beslenen hayvanlarda protein sentezi ve bağışıklık sistemi baskılanmakta, karaciğer ve dalakta çeşitli zararlar oluşmaktadır. Bunlara ek olarak ZEA steroid sentezini baskılayarak, oosit fenomenini durdurarak ve embriyonik gelişmeyi baskılayarak hayvanlarda çeşitli sorunlara neden olmaktadır (Döll ve Dänicke, 2011). Embriyonik gelişmede baskılama DNA, RNA ve protein gibi hücrel moleküllerin inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır (Desjardins, 2006; Bräse ve ark., 2009).

ZEA ile bulaşı gıdalar arasında çeşitli tipteki tahıl ve tahıl ürünü için TGK tarafından maksimum limit değerleri belirlenmiştir ve bu limitler Çizelge 2.7’de belirtilmektedir.

**Çizelge 2.7:** Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (28502/2012)’ne göre tahıllarda belirlenen maksimum zearalenon limitleri

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

**Kaynak:** TGK, 2012

## 2.6 Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri

Mikotoksinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri; alınan toksinin türüne ve miktarına bağlı olarak hem akut hem de kronik toksisiteye sebep olabilmektedir. Akut mikotoksikoz ölümle sonuçlanırken, kronik mikotoksikoz

ölümle sonuçlanan çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Mikotoksin alımının neden olduğu sağlık sorunları; kanserojen (Çizelge 2.8), terotejen, tremorjen, dermatitik, hepatotoksik, hemoraljik, nefrotoksik ve nörotoksik vb. mikotoksikoz hastalığının türü, belirtileri ve etkileri genel olarak alınan mikotoksin türü, alınan gün ve miktarı, birden fazla mikotoksin varlığı, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı ve cinsi, fiziksel ve beslenme durumuna bağlı olarak değişebilmektedir (Steyn ve Stander 1999; Köppen ve ark., 2010). Mikotoksinle kontamine olmuş gıdaların sindirim sisteminde alınan toksin, sindirim kanalından ve bağırsaklardan kana geçer ve kan yoluyla doku ve organlara ulaşmaktadır (Anonim, 2015).

**Çizelge 2.8:** Kanserojenik potansiyeline göre sınıflandırılan bazı mikotoksinler

Mikotoksin	Grup	Yıl
AFLAB1	1	2012
SİTR	3	1987
Luteoksikrin	3	1987
OTA	2B	1993
Penisilikasit	3	1987
Sterigmatosistin	2B	1987
FUMB1, FUMB2, Fusarin C	2B	1993
ZEA, DON, NİV ve Fusarenone X	3	1993

Grup 1: İnsanlarda kansere neden olan;  
 Grup 2B: İnsanlarda olası kanserojenik,  
 Grup 3: İnsanlarda kanserojen etkeni olmayan.

**Kaynak:** IARC, 2016

Aflatoksinler insan dahil tüm omurgalı canlılarda karsinojen, mutajen, teratojen, hepatotoksik ve bağışıklık istemini baskılayıcı özelliğe sahiptir. Diğer mikotoksinler içerisinde en toksik bileşiklerdir. Toksisite sıralaması AFLAB1>AFLAM2>AFLAG1>AFLAB2>AFLAM2≠AFLAG2 şeklindedir (Deshpande, 2002; Bräse ve ark., 2009). Uluslararası kanser araştırma ajansı tarafından AFLAB1 karsinojen madde (grup 1), AFLAB2 ve AFLAM1 ise

muhtemel karsinojen madde (grup 2B) olarak sınıflandırılmaktadır (IARC, 1993). Aflatoksinlerin yüksek miktarda alınmasıyla akut aflatoksikozise sebep olmaktadır. Hayvanlarda akut aflatoksikozisde vücudun en çok etkilenen organı karaciğerdir. Akut aflatoksikozisde seyreden belirtiler; iştah azalması, ağırlık kaybı, nörolojik anormallikler, mukoz membranlarında sarılık, kasılma ve ölüm görülmektedir (Bullerman, 1979; Cullen ve Newberne, 1994; Tunail, 2000; Williams ve ark., 2004).

Okratoksin A'nın yemde bulunması, kontamine yemin tüketilmesiyle hayvanın karaciğerinde, damar içinde, yağ ve kas dokularında birikerek besin zinciri yoluyla insanlara bulaşmasına neden olmaktadır (Perši ve ark., 2014). Farelerde ve sığırcılarda böbrek tümörü oluşumuna, insanlarda idrar yolu tümörleriyle ilişkili olduğu bulunmaktadır (Brera ve ark., 2014). Bu hastalık, böbrek, pelvis, mesane ve üreteral tümörlerde yüksek OTA seviyeleri tübulointerstisyel nefrit ile karakterizedir (Perši ve ark., 2014). OTA'nın hedef organı böbrekdir ve potansiyel nefrotoksin olarak tanımlanmaktadır. İnsanlarda nefropati için bir tetikleyici unsur olarak tanımlanmaktadır ve üst idrar yolunda meydana gelen ürotriyal kanserler ile ilişkilidir. Hayvanlarda testis kanseri OTA alımı ile ilişkilidir ve eğer alımın artmasıyla kanserinde arttığı tespit edilmektedir. OTA'nın genotoksik, teratojenik, kanserojenik ve immünotoksik etkileri de rapor edilmektedir. Okratoksin A'nın kronik etkisi daha yaygın görülmektedir (Miran ve ark., 2013).

Trikotesenli yemlerin tüketimiyle birlikte hayvanın cinsine bağlı olarak akut ve kronik seyreden hastalıklara sebep olmaktadır. Akut olarak mide-bağırsak sisteminin etkilenmesiyle kusma, ishal, karın ağrısı, baş ağrısı, sersemlik ve ateş gibi belirtiler kısa zamanda ortaya çıkmaktadır. İlerleyen süreçlerde bağırsaktaki hemorhajiye bağlı olarak kanlı ishal, iştahsızlık, zayıflama, deride yaralar, hemorharji, gaga çevresinde yaralar, süt ve yumurta üretiminde azalma olduğu tespit edilmektedir (Pestka ve Smolinski, 2005). Yem katkısı olarak kullanılan buğdaylarda belirli düzeylerde deoksinivalenol içerdiği belirlenmiştir. Domuzlarda DON ile kontamine yemlerin tüketilmesiyle birlikte kusma ve besin reddine yol açan sitotoksik bir trikotesendir (Hart ve Braselton, 1983).

Hayvanlarda yemlerle birlikte ZEA yüksek miktarda alınmasıyla yavru atma, kısırılık, vaginal akıntı, vaginit, düvelerde meme bezinde büyüme, ishal ve süt veriminde azalma olduğu tespit edilmektedir (D'Mello ve Macdonald, 1997; Fink-Gremmels, 2008; Wagacha ve Muthomi, 2008). ZEA ve metabolitlerinin karaciğer, böbrek ve bağışıklık sistemine toksik etki göstermektedir (Abbès ve ark., 2006). Bunlara ek olarak lipit peroksidasyonuna ve hücre ölümüne sebep olduğu, DNA ve protein sentezini engelleyerek genotoksik etkiler gösterebilmektedir. Böbrekte fagolizozomal duyarlılığına sebep olabileceği de rapor edilmektedir (Gao ve ark., 2013).

## **2.7 Tahıl ve tahıl ürünlerinde küf ve mikotoksin varlığı ile ilgili araştırmalar**

Dünyadaki mikotoksinlerle ilgili ilk çalışmalar tahıllar üzerinde yapılmıştır. Araştırmalarda 1900'lü yılların başlarında küflerin ürettiği penisilinlerin keşfedilmesinden sonra, araştırmacılar antibiyotik konusundaki çalışmalarını arttırmışlardır (Çelik, 2008). Küf metabolitlerinin mikotoksin ve antibiyotik olarak sınıflandırılması, toksisiteleri veya hastalık tedavilerindeki faydalı etkileri ile değerlendirilmektedir. Başlangıçta antibiyotik olarak kabul edilen bazı küf metabolitleri (sitrinin gibi) daha sonra toksik maddeler olarak kabul edilmiş ve toksinler olarak sınıflandırılmaktadır (Peraica ve ark., 1999).

Bilinen ilk mikotoksikozis Orta Çağ'ın Avrupa'sında 'Kutsal Ateş'denilen Ergotizm olup, *Claviceps purpurea* ile bulaşı olmuş tahılların tüketilmesinden kaynaklanan ve organlarda çeşitli nekroz ve kangrenlere neden olmaktadır (Duru ve Özgüneş, 1984). 1942 ile 1944 arasında Rusya'nın Orenburg bölgesinde binlerce kişinin ölümüyle sonuçlanan mikotoksikozis olayı 'Alimentary Toxic Aleukia, ATA'' beslenmeyle ilgili toksik etkiler nedeniyle kandaki lökosit sayısının düşmesi sonucu oluşan lösemi olarak tarihe geçmiştir. Savaş sebebiyle tarlada hasat edilmeden bırakılan (kışlatılan) mahsüllerin büyük yıkıma neden olduğu anlaşılmıştır (Prickett ve ark., 2000). 1960'lı yıllarda İngiltere'de başlayan 'Hindi X Hastalığı' olayı bu konudaki görüşlerin değişmesine sebep olmuştur. Bu olay, hindi yemlerinde protein kaynağı olarak kullanılan, Brezilya'dan ithal edilen yer fıstığında belirlenen toksinin neden olduğu ve yüz binlerce hindinin ölümü ile sonuçlanmıştır. Çalışmalar, bu toksinin *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mikroorganizmaları

tarafından oluşturulan bir metabolit olduğunu göstermektedir. Daha sonra bu toksine küfün adı nedeniyle aflatoksin olarak adlandırılmaktadır (Stoloff, 1980; Applebaum ve Marth, 1982). Ülkemizde mikotoksin sorunu ilk olarak 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen fındıkların limitlerin üzerinde aflatoksin miktarı tespit edilmesiyle geri çevrilmesiyle gözlemlenmiştir. Aflatoksin varlığı üzerine çeşitli gıdalarda; antep fıstığı, kuru incir, buğday, un ve süt ve ürünlerinde çalışmalar yapılmıştır (Artık, 2007).

Türkiye coğrafi yapısı gereği birçok tarımsal ürünü üreten ve ihracat yapan ülkedir. İhraç edilen ürünler fındık, antep fıstığı, incir, kırmızı toz/pul biber, kayısı olup bu ürünlerde dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almaktadır. Dünyada mikrobiyal kökenli zehirlenmelerde kaybın önemli bir kısmını bakteri dışındaki diğer biyolojik etkenlerden ileri geldiği bildirilmektedir (Anklam ve Battaglia, 2001). Ayrıca tüm dünyada tarımsal ürünlerde küf gelişmesi ve mikotoksin oluşumuna bağlı olarak ürünlerin %25'inin kaybı söz konusudur (Veldman, 2004). Bu sebeple Avrupa Birliği'nde geliştirilen hızlı alarm sistemi (EU-RASSF Portal, 2019) ile her yıl gıda ve yemlerde izin verilen en yüksek limit değerlerin üzerinde mikotoksin içeren gıdalarla ilgili açıklama yapılmaktadır (EU RASFF Portal,2019).

Tahıllarda yapılan çeşitli araştırmalar ile küf kontaminasyonun düzeyi bildirilmektedir. Aydın ve ark. (2009)'nın yılında yaptıkları çalışmada 142 tane beyaz un örneklerinin fungal yükleri araştırılmıştır. Çalışmada örneklerde  $7,4 \times 10^1 - 1 \times 10^4$  kob/g arasında küf sayısı tespit edilmiştir. Potus ve ark. (1989)'nın araştırmalarında 263 tane beyaz un örneklerinde küf varlığı analiz edilmiştir. Örneklerde  $1 \times 10^1 - 3 \times 10^4$  kob/g arasında küf sayısı saptanmıştır. Karagözlü ve ark. (2000)'nin inceledikleri 20 tane mısır ununda  $2 \times 10^1 - 3 \times 10^4$  kob/g arasında küf sayısı tespit etmişlerdir. Arda ve Aydın'ın 2011 yılındaki araştırmalarında 3 farklı yufka üretim tesislerinden temin edilen 9 tane un örneğini küf düzeyi bakımından incelemişlerdir. Araştırmada örneklerde en yüksek  $4,4 \times 10^4$  kob/g ve ortalama  $6,8 \times 10^3$  kob/g seviyesinde küf sayısı tespit etmişlerdir.

Tahıl ve tahıl ürünlerinin okratoksijenik küf ve OTA üretimi için oldukça uygun substratlar olduğu düşünülmekte ve düşük kaliteli tahıllarda daha yüksek derecede mikotoksin kirliliği olduğu bildirilmektedir (González-Osnaya ve ark.,

2007). OTA tarım ürünlerinde bulaşma ilk olarak 1969'da mısırdaki tespit edilmiştir (Shotwell ve ark., 1969). OTA çoğunlukla mısır, buğday, yulaf, pirinç ve arpa, kuru meyveler, şarap, bira, bebek maması ve çeşitli gıda ürünlerinde bulunmaktadır. Tarımsal ürünlere ek olarak, insan kanı, idrar ve anne sütü gibi biyolojik örneklerde de tespit edilmiştir (Nguyen ve Ryu, 2014).

Bulgaristan, Romanya ve Tuna nehri kıyı kırsal bölgelerinde görülen Balkan Endemik Nefropatisi (kronik böbrek hastalığı) ile ilişkili OTA'nın, bu ülkelerde incelenen tahıl örneklerinde (n = 765) OTA kontaminasyon sıklığı %3,1 olarak bulunmuş ve OTA konsantrasyonu 11.8 µg/kg'a ulaşan seviyelerde tespit edilmiştir. Yugoslavya'da yapılan çalışmada mısır örneklerinde (n = 191) OTA içeren pozitif örneklerin sayısı %26 ortalama konsantrasyonu 0.49 µg/kg iken bazı örneklerde toksin konsantrasyonunun 5.1 µg/kg'a ulaştığı bildirilmiştir (Tunail, 2000).

Karagözlü ve Karapınar (2000) tarafından yapılan bir çalışmada buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi ve müsli içeren toplam 100 gıda örneğinde OTA taraması yapılmış ve fungal yükleri belirlenmiştir. İncelenen örneklerin 4 tanesinde; 1 adet aşurelik buğday (0.27 µg/kg), 2 adet mısır (1.79 µg/kg ve 9.84 µg/kg) ve 1 adet yulaf ezmesi (4.19 µg/kg) farklı konsantrasyonlarda OTA ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Puntarić ve ark. (2001)'nin Slovakya'da tahıllarda yaptıkları çalışmalarında 92 tane buğday örneklerinin %75,8'inde 0,02–160 µg/kg miktarları arasında ve 51 tane mısır örneğinin %33,3'ünde 0,02–40 µg/kg seviyelerinde OTA tespit etmişlerdir.

Cengiz ve ark. (2007)'nin Bursa'daki çeşitli market, fırın ve Türk Silahlı Kuvvetleri'nin farklı birliklerinden alınan 58 un numunesi (34 buğday, 14 tam buğday, 10 mısır) OTA açısından incelenmiştir. Buğday unu, tam buğday unu ve mısır unu numunelerinde belirlenen ortalama OTA miktarları sırasıyla 6,89, 9,3 ve 6,39 µg/kg'dır.

Özturan ve ark. (2007)'nin Erzurum yöresinde tüketilen buğday unlarının OTA içeriği açısından incelendiği çalışmalarında 50 örneğin 45'inde (%90) OTA bulunmuştur. Okratoksin A içeriği pozitif örneklerin 5 tanesinde 0,625-3 µg/kg değerleri arasındadır. Bu değerler Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir



sınırların (3 µg/kg) altında olduğu belirtilmiştir. Pozitif örneklerin 6'sında OTA miktarı yasal kabul edilebilir sınır 3 µg/kg'dan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Şeviktürk ve Gönülalan (2007) tarafından Kayseri bölgesinde yapılan bir çalışmada, farklı depolardan çeşitli tahıl ürünlerinde (25 tane buğday unu, 25 tane pirinç ve 25 tane bulgur) OTA kontaminasyonunu araştırmışlardır. Buğday unu en yüksek değer  $1011,84 \pm 0,08$  g/kg, en düşük değer  $14,66 \pm 0,09$  g/kg ve ortalama OTA değeri 360,93 g/kg olarak saptanmıştır. Pirinç numunelerinde en yüksek ve en düşük değerler sırasıyla  $381,93 \pm 0,08$  g/kg ile  $153,76 \pm 0,06$  g/kg olup, ortalama 241,07 g/kg olarak bulunmuştur. Bulgur numunelerinde ise en yüksek OTA değeri  $548,80 \pm 0,06$  g/kg, en düşük  $158,53 \pm 0,07$  g/kg ve ortalama 384,10 g/kg olarak tespit edilmiştir. İncelenen numunelerde OTA seviyesinin 145,66-1011,84 g/kg arasında olduğu belirlenmiştir.

Baydar ve ark. (2005)'nin Ankara'da yapılan çalışmalarında tüketime sunulan 25 adet tahıl örneklerinde (tohum, baklagiller, tahıl unu ve nişasta) OTA varlığını araştırmışlardır. Örneklerin sadece 3'ünde 3,45, 3,69 ve 4,07 µg/kg miktarlarında OTA bulunduğunu tespit etmişlerdir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada mısır, buğday, pirinç ve arpa örneklerinde sırasıyla %4,7 (ortalama 0,1), %64,2 (ortalama 0,43 µg/kg), %87,5 (ortalama 0,16 µg/kg) ve %57,7 (ortalama 0,1 µg/kg) OTA belirlenmiştir. İspanya'da yapılan bir başka çalışmada buğday ve yulaf örnekleri incelemişlerdir. Buğday örneklerinin %29,72'sinde (ortalama 1,1 µg/kg) ve yulaf örneklerinin %20'sinde (ortalama 0,3 µg/kg) OTA tespit edilmiştir (Vidal ve ark., 2013).

Adana'da süpermarketler ve küçük dükkanlardan satın alınan 24 kahvaltılık gevrek, 24 tahıl bazlı bebek maması ve 35 bira dahil olmak üzere, 83 tane tahıl bazlı örneklerin, immünoaffinite kolonu (IAC) kullanılarak HPLC-FD yöntemiyle OTA varlığı araştırılmıştır. OTA miktarları kahvaltılık gevreklerinin %38'inde (0,172-1,84 ng/ml), tahıl bazlı bebek mamalarının %17'sinde (0,122-0,374 ng/ml) ve bira örneklerinin %14'ünde (0,012-0,045 ng/ml) tespit edilmiştir. İncelenen tüm tahıl bazlı ürünlerde Avrupa Komisyonu Tüzüğü tarafından önerilen sınırdan daha düşük konsantrasyonlarda OTA içerdiğini belirtmişlerdir (Özden ve ark., 2012).

Çin'in Jiangsu eyaletinin başkenti Nanjing'de 65 tane tahıl örneği araştırılmıştır. Okratoksin A kontaminasyonu açısından pozitif örneklerin ulaştıkları miktarları sırasıyla; buğdayda 4,248 ng/g, mısırdaki 7,3660 ng/g, pirinçte 3,382 ng/g'dır. Kontaminasyon sıklıkları sırasıyla %36,36, %26,08 ve %15,0 olarak bulunmuştur (Zhang ve ark., 2011).

İspanya ve Portekiz'den temin edilen 83 tane organik ve organik olmayan tahıl ürünleri (pirinç, buğday, arpa, çavdar, yulaf ve mısır) OTA varlığı açısından incelenmiştir. Örneklerin %22'sinde (n=18) konsantrasyonları 0,2 ile 27,10 µg/kg arasında değişen OTA içerdiği saptanmıştır. Kontamine olmuş örneklerin %72'si organik tahıl ve %28'i organik olmayan tahıl örnekleridir (Juan ve ark., 2008).

Hindistan'da 50 buğday örneği OTA açısından araştırılmıştır. Örneklerin 29'u (%58) 1,36 ile 21,17 µg/kg arasında değişen miktarlarda OTA ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin 13 tanesi (%26) Avrupa Birliği tarafından belirlenen sınırı (5 µg/kg) aştığı belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012).

İran'da yapılan çalışmada 25 farklı un fabrikasından yaz ve kış mevsimlerinde temin edilen toplam 200 tane buğday unu örneği aflatoksin kontaminasyonu açısından araştırılmıştır. Kış mevsiminde temin edilen 100 tane un örneğinde ortalama 0,99 ng/g, yaz mevsiminde temin edilen 100 un örneğinde ortalama 0,82 ng/g toplam aflatoksin içerdiği tespit edilmiştir. Un örneklerindeki toplam aflatoksin seviyesi İran Standartları Enstitüsü tarafından belirlenen sınırdan daha düşük seviyede bulunmuştur. (Taheri ve ark., 2012).

Fas'da yapılan bir çalışmada 80 tane durum buğdayı DON ve ZEA açısından incelenmiştir. Çalışmada 80 örneğin 4'ünde 121- 1480 µg/kg arasındaki seviyelerde DON kontaminasyonu tespit edilmiştir. Tüm kontamine numuneler Avrupa Birliği tarafından belirlenen maksimum sınırın altındadır. Zearalenon tayin sınırlarının üzerinde tespit edilememiştir (Blesa ve ark., 2014).

İtalya'da yapılan bir çalışmada 2006-2007 yıllarında mısır örneklerinde aflatoksin, DON ve ZEA açısından incelenmiştir. Çalışmada 2006 yılındaki incelenen toplam 47 örneğin tümünde aflatoksine rastlanmamıştır. Örneklerin tümünde 197-3980 µg/kg düzeyleri arasında DON saptanmıştır. Örneklerin %30'unda 83 µg/kg'a ulaşan düzeylerde ZEA saptanmıştır. Araştırmanın 2007

yılında incelenen toplam 36 tane mısır örneğinin tümünde 820 µg/kg'a ulaşan miktarlarda aflatoksin tespit edilmiştir. Örneklerin %89'unda 14 µg/kg'a ulaşan seviyelerde DON miktarı belirlenmiştir. Örneklerin tümünde 3-27 µg/kg arasında değişen seviyelerde ZEA içerdiği bulunmuştur. (Covarelli ve ark., 2011).

İspanya'nın kuzey bölgesi Navarra'da yapılan bir çalışmada 2007-2008 hasatlarından toplanan 123 arpa örneği aflatoksin, OTA ve ZEA mikotoksinleri açısından incelenmiştir. Örneklerin tümünde aflatoksine rastlanmıştır. Toplam aflatoksin 0,75 µg/kg'a ulaşan düzeylerde tespit edilmiştir. Örneklerin %58'inde maksimum 3,53 µg/kg'a ulaşan düzeyde OTA tespit edilmiştir. Arpa örneklerin %39'unda maksimum 18,53 µg/kg'a ulaşan seviyelerde ZEA kontaminasyonu belirlenmiştir. (Ibáñez-Vea ve ark., 2012)

İspanya'nın farklı bölgelerinde bulunan süpermarketler, mağazalar ve perakendeciler dâhil olmak üzere çeşitli markalarda temin edilen 182 tane tahıl bazlı ve glutensiz ürünler DON ve ZEA mikotoksinleri yönünden analiz edilmiştir. Buğday bazlı 119 tane ürün incelenmiştir. Örneklerin %79,8'inde DON kontaminasyonuna rastlanmış ve maksimum 83,2 µg/kg'a ulaşan düzeylerde ölçülmüştür. Buğday bazlı örneklerde ZEA varlığı tespit edilememiştir. İncelenen 23 tane pirinç bazlı örneklerin %13'ünde DON tespit edilmiş ve maksimum 5,5 µg/kg'a ulaşan düzeyde ölçülmüştür. Örneklerin hiçbirinde ZEA varlığı tespit edilememiştir. Araştırmada mısır bazlı 17 örnek analiz edilmiştir. Örneklerin %29,4'ünde maksimum 22,1 µg/kg'a ulaşan miktarlarda DON bulunmuştur. Mısır örneklerinde ZEA düzeyi tespit limitlerin altında (<LOQ) olarak bulunmuştur. Çalışmada spelt bazlı 8 örnek incelenmiştir. Örneklerin %62,5'i maksimum 56,8 µg/kg'a ulaşan miktarlarda DON kontaminasyonuna rastlanmıştır. Spelt bazlı örneklerin %25'inde maksimum 17,7 µg/kg'a ulaşan miktarlarda ZEA bulunmuştur. Araştırmada yulaf bazlı 8 örnek incelenmiştir ve örneklerin hiçbirinde DON ve ZEA tespit edilememiştir. Çalışmada soya bazlı 4 örnek analiz edilmiştir. Örneklerin %25'i maksimum 34,8 µg/kg'a ulaşan miktarlarda DON'a rastlanmıştır ve örneklerin hiçbirinde ZEA varlığı tespit edilememiştir. Araştırmada topyoka bazlı 3 örnek incelenmiştir. Örneklerin %33,3'ü maksimum 18,3 µg/kg'a ulaşan seviyelerde

DON bulunmuştur ve örneklerin hiçbirinde ZEA varlığı tespit edilememiştir. (Rodríguez-Carrasco ve ark., 2014).

Litvanya'nın merkezi bölgelerinde ticari alanlardan 2006-2007 dönemi hasat zamanlarında kışlık ve baharlık toplam 125 tane buğday, arpa ve çavdar numuneleri ELISA metodu ile DON ve ZEA mikotoksinleri yönünden incelenmiştir. Araştırmada 2006 yılındaki kışlık toplam 32 örnekte (tespit sınır değeri-(100 µg/kg) 223 µg/kg, baharlık 32 örnekte 100-231 µg/kg arası, 2007 kışlık 28 örnekte 146,3-171,3 µg/kg arası, 2007 baharlık 33 örnekte 138-445 µg/kg arası düzeylerde DON varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada 2006 kışlık 32 örnekte (tespit sınır değeri-10 µg/kg) 28,1 µg/kg, 2006 baharlık 32 örnekte 10-45,8 µg/kg arası, 2007 kışlık 28 örnekte 17,8-24,5 µg/kg arası, 2007 baharlık 33 örnekte 20-26,3 µg/kg arası miktarlarda ZEA saptanmıştır (Mankevičienė ve ark., 2011).

Romanya'nın güneyindeki 4 farklı bölgeden 2014 hasat mevsimi boyunca 31 tane bütün işlenmemiş buğday ve 35 tane beyaz buğday unu dahil olmak üzere toplam 66 tane buğday örnekleri DON ve ZEA varlığını araştırmak amacıyla analiz edilmiştir. Araştırmada 31 buğday örneğinin 8'inde 110-1787 µg/kg DON, 4'ünde 327-1135 µg/kg düzeyleri arasında ZEA saptanmıştır. Çalışmada 35 buğday unu örneklerinin 1'inde 190 µg/kg DON, 2'sinde 51-73 µg/kg miktarlarında ZEA tespit edilmiştir (Stanciu ve ark., 2017).

Mikotoksin varlığına genel bir bakış sağlamak amacıyla İtalya'da bulunan marketlerden temin edilen 27 durum buğdayı makarnası ve 2 bebek maması olmak üzere toplam 29 örnek incelenmiştir. Örneklerin tamamında 20,89-247,27 µg/kg düzeyleri arasında DON, örneklerin %93,3'ünde 16,84-19,94 µg/kg seviyeleri arasında ZEA tespit edilmiştir. İncelenen örneklerin tümünde AFLAB1 ve OTA'ya rastlanmamıştır (Tolosa ve ark., 2017).

Tahıl depolarındaki mikotoksin varlığını değerlendirmek amacıyla İran'da 34 buğday örneği incelenmiştir. Örneklerin 4'ünde AFLAB1 2,1-32,3 µg/kg, AFLAB2 bir örnekte 1,8 µg/kg, AFLAG2 5 örnekte 0,2-1,1 µg/kg miktarlarında tespit edilmiştir. Örneklerin hiçbirinde AFLAG1'e rastlanmamıştır. İncelenen örneklerin 3'ünde 1,9-41,5 µg/kg arası miktarlarda OTA, 8'inde 1,2-1746,5

$\mu\text{g/kg}$  seviyeleri arasında DON, 5'inde 0,7-64,8  $\mu\text{g/kg}$  düzeylerinde ZEA rastlanmıştır (Sadhasivam ve ark., 2017).

Ontario çiftliklerinde 2008-2009 yılları arasında toplanan 100 tane tahıl numunesi (25 kışlık buğday, 15 baharlık buğday, 15 mısır, 10 yulaf, 20 arpa, 15 çavdar) mikotoksin (DON ve ZEA) kontaminasyonu açısından incelenmiştir. Araştırmada 25 tane kışlık buğdayın hepsinde 1,044-982 ng/g arası miktarlarda DON, 8 tanesinde 25-145 ng/g seviyeleri arasında ZEA tespit edilmiştir. İncelenen 15 baharlık buğdayın hepsinde 1,207-122 ng/g düzeyleri arasında DON, 10 tanesinde 38-293 ng/g miktarları arasında ZEA bulunmuştur. Çalışmada incelen mısır örneklerinin 14'ünde 1,041-989 ng/g arasında miktarlarda DON, 9'unda 61-783 ng/g seviyeleri arasında ZEA saptanmıştır. Araştırmada analiz edilen yulaf örneklerin 6'sında 22-71 ng/g arasında DON tespit edilmiş olup örneklerin hiçbirinde ZEA rastlanmamıştır. Çalışmada incelenen arpa örneklerin tümünde 1,071-973 ng/g düzeylerinde DON tespit edilmiş olup örneklerin hiçbirinde ZEA rastlanmamıştır. Çavdar örneklerin hepsinde 87-500 ng/g seviyeleri arasında DON, 5 tanesinde 25-39 ng/g miktarları arasında ZEA saptanmıştır (Martos ve ark, 2010).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereç

##### 3.1.1 Un ve kepek örneklerinin temini

Muhtemel mikotoksijenik küf yönünden incelemek amacıyla çeşitli un ve kepek örnekleri 2015 yılının Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım aylarında İstanbul ilindeki farklı fırın ve marketlerden tedarik edilmiştir. Çalışmada birer kg'lık steril ambalajlarda temin edilen örnekler (25 tam buğday unu, 29 buğday unu, 30 çavdar unu ve 28 kepek) 7 gün içinde analize alınmış ve bu süreçte +4 °C'de saklanmıştır.

**Çizelge 3.1:** Örneklerin İstanbul ilindeki dağılımı

İstanbul	İlçe	Örnek
Avrupa	Bahçelievler, Bakırköy, Bağcılar, Avcılar, Şirinevler, Fatih, Kağıthane, Beyoğlu, Şişli	85
Anadolu	Kadıköy, Ataşehir, Ümraniye	27

##### 3.1.2 Alet-ekipmanlar

- Genel laboratuvar alet ve malzemeleri
- Su Banyosu (Membert 22 LT/ Bavyera/Güney Almanya)
- Saf Su Cihazı (Sartorius stedim biotech arium pro UV/Almanya)
- Otoklav (Hiclave HV-50L/Japonya)
- İnkübatör (Binder BD260/Almanya)
- Terazı (AND GF-6100/Japonya)
- LC-MS/MS (Agilent 6460 QQQ/ABD)
- Stomacher (Aes Chemunex/ABD)
- Tüp karıştırıcı (Vortex Mixer Stuart SA8/Çin)

- Ultraviole transilluminatör (Essential V6/Uvitec/İngiltere)
- Otomatik Pipet
- Enjektör
- Enjektör filtresi (0,45 µm)

### **3.1.3 Analizlerde kullanılan besiyeri, çözelti ve kimyasallar**

- Saf su
- Ultrasaf su
- NaCl (Merck 1.06404.1000/Almanya)
- Glycerol (Merck 1.04091.0500/Almanya)
- YGC (Merck 1.16000.0500/Almanya)
- MEA (Merck 1.05398/Almanya)
- Tris-acetate-EDTA (TAE) (Sigma-Aldrich T9650/Almanya)
- Saf AFLAB1 Standardı (Sigma-Aldrich 1162-65-8/Almanya)
- Saf AFLAB2 Standardı (Sigma-Aldrich 7220-81-7/Almanya)
- Saf AFLAG1 Standardı (Sigma-Aldrich 1165-39-5/Almanya)
- Saf AFLAG2 Standardı (Sigma-Aldrich 7241-98-7/Almanya)
- Saf OTA Standardı (Sigma-Aldrich 303-47-9/Almanya)
- Saf DON Standardı (Sigma-Aldrich 51481-10-8/Almanya)
- Saf ZEA Standardı (Sigma-Aldrich 17924-92-4/Almanya)
- Asetonitril (Sigma-Aldrich 21004 75-05-8/Almanya)
- Metanol (Merck 1098229 67-561/Almanya)
- Amonyum format (Sigma-Aldrich 516961 540-69-2/Almanya)
- Formik asit (Sigma-Aldrich 69507664-18-6/Almanya)
- Asetik asit (Sigma-Aldrich 695092 64-19-7/Almanya)

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Örneklerde küf ve maya sayımı**

Örneklerden 10 g alınarak aseptik koşullar altında 90 ml steril peptonlu (ISO LAB 204) su içine aktarılmıştır. Homojenizasyon için stomocher (Aes Chemunex)'da 2 dakika kadar orta hızda tutulmuştur. Homojenizasyon işleminden sonra içlerinde 9'ar ml steril peptonlu su bulunan tüplere seri halinde 1 ml örnek eklenerek  $10^{-7}$  basamağına kadar seyreltmeler hazırlanmıştır. Steril kabinde seyreltmelerden çift paralel olacak şekilde içinde Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) besiyeri bulunan petri kutularına yayma ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler 25 °C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonra petride oluşan kolonilerin sayımı yapılmıştır (ISO 7954, 1987; Midura ve Bryant, 2001).

### **3.2.2 Örneklerden küflerin izolasyonu**

YGC ortamında gelişen küf kolonilerinden MEA (Malt Ekstrakt Agar) besiyeri bulunan petrilere pasaj yapılmıştır. 25°C'de 5–7 gün inkübasyondan sonra gelişen kolonilerin morfolojik özellikleri tespit edilmiştir (Samson ve ark., 2004).

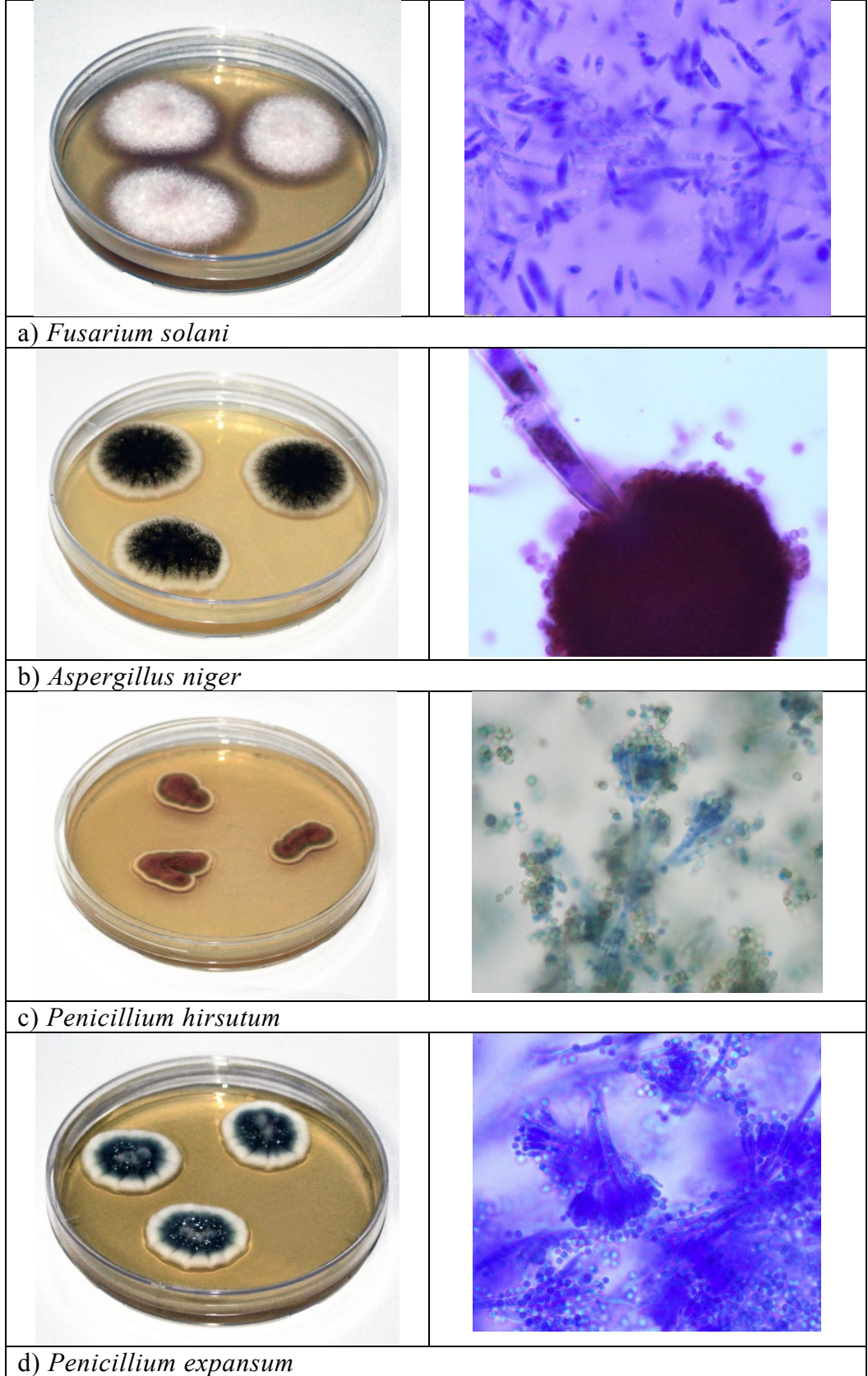
### **3.2.3 Kültürlerin muhafazası**

İzolasyonu gerçekleştiren kültürlerin makroskopik ve mikroskopik olarak incelemek ve cins düzeyinde tanımlanmak amacıyla 4°C'de muhafaza edilmiştir (Samson ve ark., 2004).

### **3.2.4 İzole edilen küflerin klasik teknikler ile tanımlanması**

Küf izolatlarının cins düzeyindeki identifikasyonu için MEA ortamına üç nokta halinde inoküle edilmiş ve 25 °C'de beş gün inkübe edilmiştir. Küf izolatların makroskopik olarak Canon D700 (18-55 mm mercek) fotoğraf makinesi ile resimlenerek, koloni yapısı, çapı, alttan, üstten rengi, sporlanma, eksuda ve pigment oluşumu dikkate alınarak tanımlama yapılmıştır. İnkübasyon sonunda her örnek laktofenol blue ortamında preparat hazırlanmıştır. Işık mikroskopunda incelenmiştir. Işık mikroskobu ile incelenen izolatların (Şekil 3.1), Olympus DP21 dijital kamera ile görüntüsü alınarak konidi, konidioforların şekli, uzunluğu, genişliği, renkleri, konidilerinin çıkış şekli dikkate alınarak tanımlama yapılmıştır (Barnett ve Hunter 1998; Hasenekoğlu, 1991; Pitt, 2000; Klich, 2002; Samson ve ark., 2010).





**Şekil 3.1:** İncelenen izolatların MEA ortamında makroskobik ve mikroskobik görüntüleri

### 3.2.5 İzole edilen kültürlerin moleküler teknikler ile tanımlanması

Küf türlerinin klasik yöntemlerle tanımlanmasında farklı besiyerlerinin kullanılması, morfolojik ve fenotip çalışmalarının uzun zaman alması, bu çalışmalarda ileri uzmanlık deneyimi gerektirmesi sebebiyle nitelikli eleman ihtiyacı ve işgücü kaybını da birlikte getirmektedir. Bu sebeple son zamanlarda Deoksiribonükleik asidi (DNA)'nın ilgili gen bölgelerini hedef alan PZR'a dayalı yöntemler daha çok tercih edilen bir alternatif olmaktadır (Samson ve Varga, 2007).

Klasik yöntemle identifikasyonu tamamlanan izolatların kesinleştirilmesi amacıyla, moleküler yöntemle izolatların genomik DNA'ları izole edilerek, PZR ile genomik DNA'nın korunmuş bölgesi olan yaklaşık 500-600 baz çifti arasında olan evrensel ITS bölgeleri çoğaltılmıştır. ITS (Çizelge 3.1) primerlerinin üretimi için Sentromer DNA Teknolojileri Firmasından hizmet alımı yapılmıştır. ITS1 ve ITS4'ün ribozomal DNA üzerindeki görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.



**Şekil 3.2:** Çalışmada kullanılan ITS1 ve ITS4 primerlerinin ribozomal DNA üzerindeki şematik görüntüsü

**Kaynak:** Edwards ve ark., 2002

Okratoksin A üretme potansiyeli olan *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsleri için okratoksin A üreten korunmuş gen bölgeleri için dizayn edilen AoLC35-12L/AoLC35-12R primerlerin (Çizelge 3.1) üretimi için Sentromer DNA Teknolojileri Firmasından hizmet alımı yapılmıştır.

**Çizelge 3.2:** Çalışmada kullanılan primerler

Primer Adı	Primer dizisi (5'-3')	Baz sayısı	Bağlanma sıcaklığı °C	Kaynak
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	61.0	White ve ark., 1990
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATAT GC	20	55.3	White ve ark., 1990
AoLC35-12L	GCCAGACCATCGACACTGC ATGCTC	25	68	Dao ve ark., 2005
AoLC35-12R	CGACTGGCGTTCCAGTACC ATGAGCC	26	70	Dao ve ark., 2005

### 3.2.5.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu parçalama tamponu kullanılarak uygulanmıştır. Stok izolatlar MEA ortamına üç nokta yöntemi ile inoküle edilerek 25 °C'de 7 gün boyunca inkube edilmiştir. Hücre peleti üzerine 500 ml lizis bufer (400 mM Tris EDTA pH: 8,0 60 mM EDTA pH:8,0 150 mM NaCl %1 sodyumdode sülfat) ilave edilerek 65°C 10 dk su banyosunda bekletilmiştir. 150 µl potasyum asetat (pH:4,8 60 µl 5 M potasyum asetat, 11,5 ml glisial asetik asit, 28,5 ml distile su) ilave edilmiştir. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantı yeni bir tüpe geçirilerek eşit hacimde izopropanol eklenmiştir. 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. 300 µl %70'lik etanol ile presipitasyon yapılmıştır. Süpernatant boşaltılarak etanolü havada uçurulmuştur. Pellet 25 µl 1X Tris EDTA ile çözülmüştür. DNA örnekleri -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Liu ve ark., 1997).

### 3.2.5.2 Polimer zincir reaksiyonu amplikasyon protokolü

Küf izolatların 18 S ve 28 S rDNA (ribozomal DNA) bölgesini çoğaltmak amacıyla dizayn edilmiş ITS1-5.8S-ITS4 primerleri kullanılarak yaklaşık 600 baz çifti (bp) büyüklüğünde DNA bölgesi (Çizelge 3.2) çoğaltılmıştır.

Okratoksinjenik küflerin poliketid sentaz gen bölgesini çoğaltmak amacıyla dizayn edilmiş AoLC35-12L/AoLC35-12R primerleri kullanılarak yaklaşık 600 baz çifti büyüklüğünde mikotoksin biyosentezinde yer alan yapısal ve düzenleyici gen bölgesi (Çizelge 3.3) çoğaltılmıştır.

**Çizelge 3.3:** ITS1/ITS4 primerleri için reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre	Tekrar sayısı
95 °C	3 dakika	-
95 °C	1 dakika	35
58 °C	1 dakika	35
72 °C	80 saniye	35
72 °C	10 dakika	-
4 °C	∞	-

**Kaynak:** Samson ve ark., 2010

**Çizelge 3.4:** AoLC35-12L/AoLC35-12R primerleri için reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre	Tekrar sayısı
95 °C	5 dakika	-
95 °C	20 saniye	35
55 °C	30 saniye	35
72 °C	45 saniye	35
72 °C	5 dakika	-
4 °C	∞	-

**Kaynak:** Dao ve ark., 2005

**Çizelge 3.5:** Çalışmada kullanılan PZR içerikleri

İçerik	Konsantrasyon	Son konsantrasyon	Alınan Miktar
10x Buffer (KCl)	10x	1x	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.2mM	1.5 µl
dNTP mix	2 mM (herbiri)	0.06 mM	0,6 µl
Primer-F	10 µM	0.25 µM	0.5 µl
Primer-R	10 µM	0.25 µM	0.5 µl
Taq Polimeraz	5 U/ µl	2.5 U	0.5 µl
Kalıp DNA	-	-	1 µl
dH <sub>2</sub> O	-	-	13.4 µl
Toplam hacim	-	-	20 µl

### 3.2.5.3 Agaroz jel elektroforezi

1 gr agaroz üzerine 100 ml 1XTAE tamponu ilave edilmiştir. Karışım mikrodalga fırınında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50°C' ye soğutulan agaroz jel kasete dökülerek tarak yerleştirilmiştir. 15-20 dakika beklenerek jelin donması sağlanmıştır. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılarak ve içerisinde 1XTAE bulunan elektroforez tankın içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura DNA marker yüklenmiştir. Diğer çukurlara her bir örnek için 2 µl 5X yükleme tamponu ve 5 µl genomik DNA ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez düzeneği 110 volta

ayarlanarak örnekler 60 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel 500 ml distile su 19 µl etidium bromür içeren solüsyonda 20 dakika bekletilmiştir. Jel ultraviyole transilluminatörde incelenmiştir.

### 3.2.6 Mikotoksinlerin LC-MS/MS ile belirlenmesi

#### 3.2.6.1 Standart toksinlerin konsantrasyonlarının hazırlanması

Saf standartlardan asetonitril-su (50:50) karışımını kullanarak Çizelge 3.5’de verilen konsantrasyonlarda (ppb) standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu standart çözeltiler daha sonra matris etkili kalibrasyon standartlarını (Çizelge 3.6 ve 3.7) oluşturmak için kullanılmıştır.

**Çizelge 3.6:** Stok konsantrasyonlar (ppb)

Stok No	AFLAB1	AFLAB2	AFLAG1	AFLAG2	OTA	DON	ZEA
1	20	20	20	20	20	2000	200
2	10	10	10	10	10	1000	100
3	5	5	5	5	5	500	50
4	1	1	1	1	1	100	10

#### 3.2.6.2 Matris etkili kalibrasyon

Homojen edilmiş blank (boş) numuneden 25 gr tartılmıştır. Üzerine 50 ml ekstraksiyon (%80 metanol+ %20 asetikasit) çözeltisi eklenerek ve 30 dakika karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika santrifüj edildikten sonra berrak sıvı 0,45 µm enjektör filtresinden geçirilmiştir. Filtre edilmiş berrak sıvı 1/1 oranında seyreltme sıvısı (%20 metanol + %2 asetikasit) ile seyreltilmiştir. Mikotoksin kalıntısı içermeyen örnekden (blank) elde edilen örnek ekstraktı içerisine belirlenen konsantrasyonlarda standart karışım ilave edilerek cihaza 10 µl enjeksiyon yapılmıştır (AOAC, 2005; European Commission, 2006).

**Çizelge 3.7:** Matris etkili kalibrasyon hacimleri ( $\mu\text{l}$ )

Seviye	Stok 4 ( $\mu\text{l}$ )	Stok 3 ( $\mu\text{l}$ )	Stok 2 ( $\mu\text{l}$ )	Stok 1 ( $\mu\text{l}$ )	Blank Matris ( $\mu\text{l}$ )	Asetonitril/su ( $\mu\text{l}$ )	Son Hacim ( $\mu\text{l}$ )
1	50	-	-	-	900	50	1000
2	-	25	-	-	900	75	1000
3	-	-	25	-	900	75	1000
4	-	-	50	-	900	50	1000
5	-	-	-	75	900	25	1000
6	-	-	-	50	900	50	1000

**Çizelge 3.8:** Matris etkili kalibrasyon konsantrasyonları (ppb)

Analit	Seviye 1	Seviye 2	Seviye 3	Seviye 4	Seviye 5	Seviye 6
AFLAB1	0,05	0,125	0,25	0,5	0,75	1
AFLAB2	0,05	0,125	0,25	0,5	0,75	1
AFLAG1	0,05	0,125	0,25	0,5	0,75	1
AFLAG2	0,05	0,125	0,25	0,5	0,75	1
OTA	0,05	0,125	0,25	0,5	0,75	1
DON	5	12,5	25	50	75	100
ZEA	0,5	1,25	2,5	5	7,5	10

### 3.2.6.3 Doğrulama parametreleri

Çoklu mikotoksin analitik yöntemi boş numune kullanılarak yöntem valide edilmiştir. Değerlendirilen doğrulama parametreleri doğrusalılık, geri kazanım, tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), tekrarlama bilirlilik (gün içi hassasiyet; RSDr), tekrar üretilebilirliktir (gün içi hassasiyet; RSDR). Geri kazanım, her seviye için farklı günlerde 6 kez tekrarlanarak farklı seviyelerdeki blank numunede gerçekleştirilmiştir.

LC-MS/MS cihazında 0,05-100 ppb arasında, 1000  $\mu\text{l}$  hacimde 6 farklı konsantrasyonda matriks etkili kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

### 3.2.6.4 LC-MS/MS parametreleri

Mikotoksin analizleri Agilent 6460 QQQ LC/MS/MS model cihazında yapılmıştır. LC-MS/MS parametreleri aşağıda sıralanmıştır;

- Hareketli Faz A: Metanol, %0,1'lik formikasit, 2 Mm amonyum format
- Hareketli Faz B: Su, %0,1'lik formikasit,2 Mm amonyum format
- Kolon: Shim-pack XR-ODS II 3,0 mm I.D. x 75 mm
- Enjeksiyon hacmi: 10 µl
- Akış: 0,5 ml/dk.
- Kolon fırını: 45 °C
- İyonizasyon modu: ESI
- Polarite: Pozitif ve negatif
- Gaz sıcaklığı: 300 °C
- Gaz akışı: 11 l/dk
- Nbulizasyon Basıncı: 40 psi
- Sheath Gas Temperature: 400 °C
- Sheath Gas Flow:11 l/min
- Kapiler (Pozitif): 3000 V
- Kapiler (Negatif): 3500 V
- Çalışma modu: MRM

**Çizelge 3.9:** Hareketli faz

Süre (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış (ml/dk)
0.0	15	85	0.5
1.5	20	80	0.5
5.5	20	80	0.5
6.5	80	20	0.5
6.51	98	2	0.5
9.9	20	80	0.5
10	20	80	0.5

**Çizelge 3.10:** Gradient parametreleri

	<b>Süre (dk)</b>	<b>Modül</b>	<b>Ortak</b>	<b>Değer</b>
1	1,5	Pompa	Pompa B Kontrolör	85
2	5,5	Pompa	Pompa B Kontrolör	80
3	6,5	Pompa	Pompa B Kontrolör	80
4	6,51	Pompa	Pompa B Kontrolör	20
5	9,9	Kontrolör	Durum	2
6	10	Kontrolör	Dur	

**Çizelge 3.11:** Kütle parametreleri

<b>Bileşik Adı</b>	<b>Öncü İyon</b>	<b>Ürün İyon</b>	<b>Fragman voltajı</b>	<b>Patlama enerjisi</b>	<b>Pol</b>
OTA	404	358	100	10	Pos
OTA	404	239	100	20	Pos
DON	355.1	294.9	80	0	Neg
DON	355.1	59.1	80	6	Neg
DON	355.1	264.9	80	6	Neg
AFLAG2	331	312.9	120	24	Pos
AFLAG2	331	245	120	30	Pos
AFLAG1	329	242.9	120	26	Pos
AFLAG1	329	200	120	38	Pos
ZEA	317	174.9	130	12	Neg
ZEA	317	130.9	130	20	Neg
AFLAB2	315	287	140	24	Pos
AFLAB2	315	258.9	140	30	Pos
AFLAB1	313	285	130	22	Pos
AFLAB1	313	240.9	130	38	Pos



### **3.2.6.5 Örnek hazırlama**

Homojen edilmiş numuneden 25 gr tartılmıştır. Üzerine 50 ml ekstraksiyon (%80 metanol+ %20 asetik asit) çözeltisi eklenerek ve 30 dakika karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika santrifüj edildikten sonra berrak sıvı 0,45 µm enjektör filtresinden geçirilmiştir. Filtre edilmiş berrak sıvı 1/1 oranında seyreltme sıvısı (%20 metanol + %2 asetik asit) ile seyreltilmiş ve cihaza 10 µl enjeksiyon edilmiştir (European Commission, 2006). Toksinlerin alıkonma sürelerine göre elde edilen kromatogramlar bir arada değerlendirilerek kalitatif ve kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir ve pikin kimliği teşhis edilmiştir (Anonim, 2006).

## 4. BULGULAR

### 4.1 Örneklerde küf ve maya sayımı

İncelenen tam buğday ununda  $1 \times 10^1$ - $4,2 \times 10^3$  kob/g, buğday ununda  $3 \times 10^1$ - $8,7 \times 10^3$  kob/g, çavdar ununda  $1,3 \times 10^2$ - $4,3 \times 10^3$  kob/g, kepekte  $5 \times 10^1$ - $6 \times 10^3$  kob/g arasında küf ve maya saptanmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1:** Örneklerdeki küf ve maya sayıları (kob/g)

Örnek	Örnek sayısı	En az	En çok	Ortalama
Tam buğday unu	25	$1 \times 10^1$	$4,2 \times 10^3$	$8,75 \times 10^2$
Buğday unu	29	$3 \times 10^1$	$8,7 \times 10^3$	$1,03 \times 10^3$
Çavdar unu	30	$1,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	$1,11 \times 10^3$
Kepek	28	$5 \times 10^1$	$6 \times 10^3$	$1,25 \times 10^3$
Toplam	112	$1 \times 10^1$	$8,7 \times 10^3$	$1,06 \times 10^3$

### 4.2 İncelenen izolatların klasik teknikler ile tanımlanması

İncelenen örneklerde toplam 174 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatların klasik teknikler ile incelenmesi sonucu 22 farklı küf ve maya cinsi belirlenmiştir. İzolatların cins düzeyinde dağılımı Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2:** Tahıl unu ve kepek örneklerinden izole edilen fungusların cins düzeyinde dağılımı (adet)

Cins	Tam unu	buğday	Buğday unu	Çavdar unu	Kepek	Toplam
<i>Absidia</i>	1				2	3
<i>Acremonium</i>			1	1		2
<i>Alternaria</i>	1				1	2
<i>Aspergillus</i>	15		8	11	6	40
<i>Byssochlamys</i>				1		1
<i>Candida</i>				2	1	3
<i>Cladosporium</i>	1		1	1	1	4
<i>Cryptococcus</i>				2	1	3
<i>Fusarium</i>	3		3	3	4	13
<i>Geomyces</i>					1	1
<i>Hanseniaspora</i>			1		1	2
<i>Mucor</i>	1			2		3
<i>Neosartorya</i>			2	2	1	5
<i>Paecilomyces</i>					1	1
<i>Penicillium</i>	14		16	20	10	60
<i>Pichia</i>	2		1		4	7
<i>Rhizomucor</i>			2	1	2	5
<i>Rhizopus</i>	2		2	2	2	8
<i>Rhodotorula</i>			3			3
<i>Schizosaccharomyces</i>	1		1			2
<i>Syncephalastrum</i>				1	4	5
<i>Trichoderma</i>					1	1

### 4.3 İncelenen izolatların moleküler teknikler ile tanımlanması

LC-MS/MS yöntemiyle OTA düzeyleri tespit edilen örneklerden izole edilen ve klasik yöntemlerle teşhis edilen *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait temsili 29 izolatlar moleküler identifikasyonu yapılmak üzere seçilmiştir. PZR yöntemine dayalı moleküler verilerle onaylandıktan sonra gruplar (Çizelge 4.3) tanımlanmıştır.

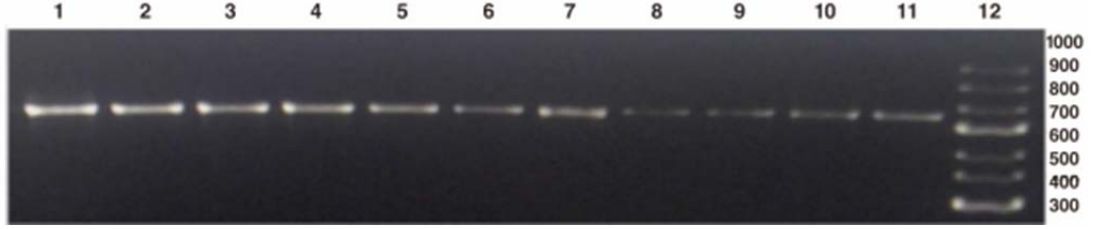
**Çizelge 4.3:** Örneklerde tespit edilen OTA düzeyleri ve örneklerden elde edilen potansiyel okratoksijenik türler

Örnek No	OTA (µg/kg)	Maksimum Limit (µg/kg)	Fungal Türler
6 ÇU	0,24	3,0	<i>Aspergillus ochraceus</i>
14 ÇU	0,49		<i>Penicillium verrucosum</i>
15 TBU	0,35		<i>Aspergillus ochraceus</i>
16 ÇU	0,36		<i>Penicillium verrucosum</i>
18 ÇU	3,06		<i>Aspergillus ochraceus</i>
19 TBU	1,07		<i>Aspergillus ochraceus</i>
21 KPK	0,50		<i>Aspergillus niger</i>
22 KPK	27,64		<i>Aspergillus niger</i>
23 TBU	0,48		<i>Aspergillus ochraceus</i>
24 ÇU	0,45		<i>Aspergillus niger</i>
31 ÇU	0,24		<i>Aspergillus carbonarius</i>
36 KPK	0,09		<i>Aspergillus ochraceus</i>
39 TBU	1,30		<i>Aspergillus niger</i>
42 TBU	0,47		<i>Penicillium verrucosum</i>
45 BU	TE		<i>Aspergillus niger</i>
50 BU	TE		<i>Aspergillus ochraceus</i>
57 BU	0,18		<i>Penicillium verrucosum</i>
61 ÇU	0,24		<i>Aspergillus ochraceus</i>
71 KPK	TE		<i>Penicillium verrucosum</i>
72 BU	TE		<i>Penicillium verrucosum</i>
78 KPK	0,24		<i>Penicillium verrucosum</i>
85 BU	0,05		<i>Aspergillus niger</i>
88 BU	0,08		<i>Penicillium verrucosum</i>
102 ÇU	0,50		<i>Penicillium verrucosum</i>
103 KPK	0,16		<i>Penicillium verrucosum</i>
109 TBU	21,72		<i>Penicillium verrucosum</i>
110 KPK	0,43		<i>Aspergillus niger</i>
113 TBU	0,38		<i>Penicillium verrucosum</i>

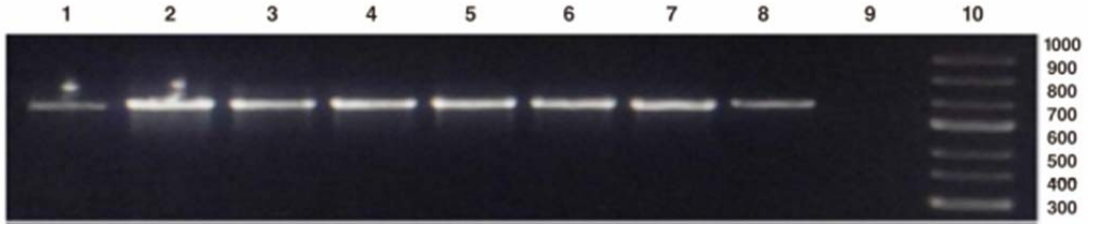
TBU: Tam buğday unu; KPK: Kepek; ÇAV: Çavdar unu; BU: Buğday unu; TE: Tespit edilemedi

#### 4.3.1 İncelenen gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu

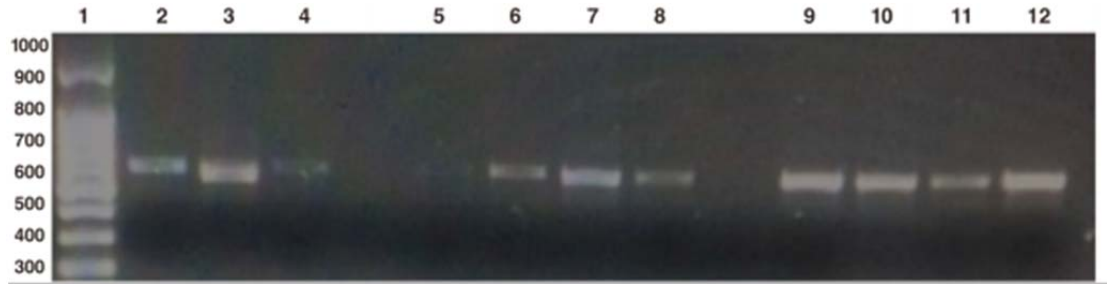
ITS primer çifti kullanılarak 600 baz pair boyutunda PZR ürünü (Şekil 4.1) amplifiye edilmiştir.



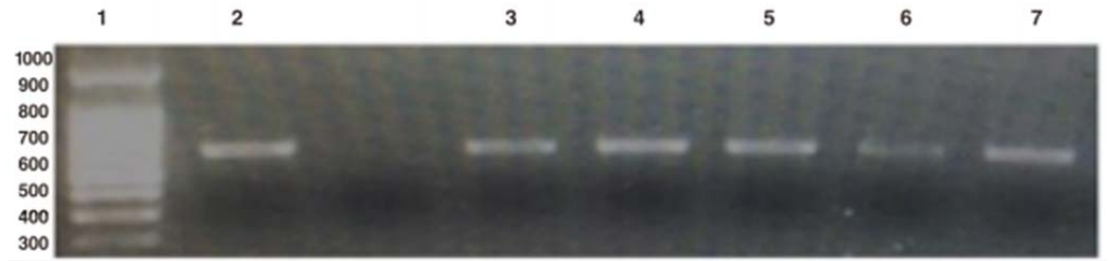
(A)



(B)



(C)



(D)

**Şekil 4.1:** ITS primerine ait saflaştırılmış PZR ürünü (M: 1 kb marker)

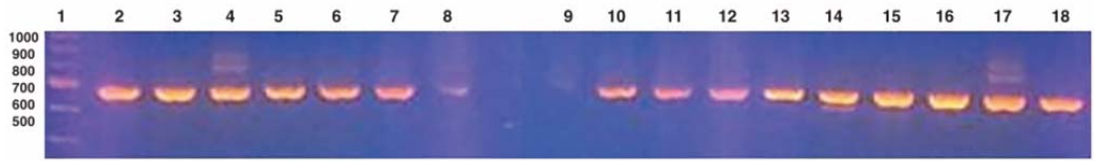
((A) Şerit: 1:6, 2:14, 3:15, 4:16-1, 5:18-1, 6:19, 7:21, 8:22-2, 9:23-2, 10: pozitif referans 1, 11: pozitif referans 2, 12: marker)

((B) Şerit: 1:24-6, 2:31, 3:36, 4:39, 5:42, 6:45, 7: pozitif referans 1, 8: pozitif referans 2, 9: negatif kontrol, 10: marker)

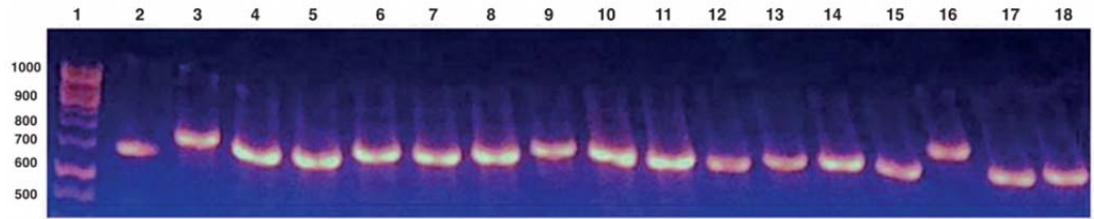
((C) Şerit: 1: marker, 2:50-1, 3:57, 4:61, 5:71-2, 6:72-1, 7:72-2, 8:78, 9:85, 10:88, 11: pozitif referans 1, 12: pozitif referans 2)

((D) Şerit: 1: marker, 2:103, 3:109, 4:110, 5:113-2, 6: pozitif referans 1, 7: pozitif referans 2)

AoLC35-12L/AoLC35-12R primer çifti kullanılarak 600 baz pair boyutunda PZR ürünü (Şekil 4.2) amplifiye edilmiştir.



(A)



(B)

**Şekil 4.2:** AoLC35-12L/AoLC35-12R primerine ait saflaştırılmış PZR ürünü (M: 1 kb marker)

((A) Şerit: 1: marker, 2:6, 3:14, 4:15, 5:16-1, 6:18-1, 7:19, 8:21, 9:22-2, 10:23-2, 11:24-6, 12:31, 13:36, 14:39, 15:42, 16:45, 17: pozitif referans 1, 18: pozitif referans 2)

((B) Şerit: 1: marker, 2:50-1, 3:57, 4:61, 5:71-2, 6:72-1, 7:72-2, 8:78, 9:85, 10:88, 11:102, 12:103, 13:109, 14:109, 15:110, 16:113-2, 17: pozitif referans 1, 18: pozitif referans 2)

### 4.3.2 PZR ürünlerinin dizi analizi

Pozitif referans 1 ve 2 izolatlarının ITS gen bölgelerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi bilgileri Blast programıyla değerlendirilerek pozitif referans izolatların NCBI gen bankasındaki benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4:** İncelenen izolatların NCBI gen bankasındaki en yakın temsilcileri

İzolat No	Dizi analizi için seçilen primer	Elde edilen dizinin uzunluğu	NCBI gen bankasındaki en yakın karşılığı
Pozitif referans 1	ITS	637	%99 MH109325.1 <i>Aspergillus niger</i>
Pozitif referans 2	ITS	629	%100 MG675233.1 <i>Aspergillus niger</i>

### 4.4 Örneklerdeki aflatoksin miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi

#### 4.4.1 Doğrulama parametreleri

Aflatoksin standart karışımının blank numuneye uygulanması sonucu elde edilen doğrulama parametreleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5:** Aflatoksin için elde edilen doğrulama parametreleri

Mikotoksin	Konsantrasyon (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	% R	%RSD	R <sup>2</sup>
AFLAB1	1	0,10	0,33	96,61	6,52	0,990
AFLAB2	1	0,10	0,34	102,56	5,79	0,992
AFLAG1	1	0,09	0,31	105,89	4,24	0,997
AFLAG2	1	0,09	0,30	102,15	4,04	0,990

LOD: Tespit limiti

LOQ: Tayin limiti

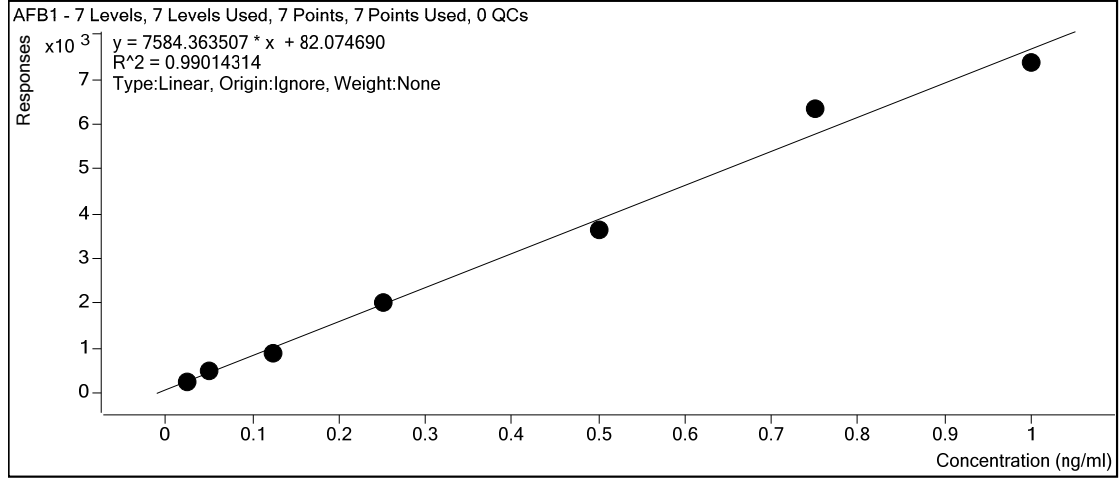
RSD: Tekrarlanabilirlik

R: Geri kazanım

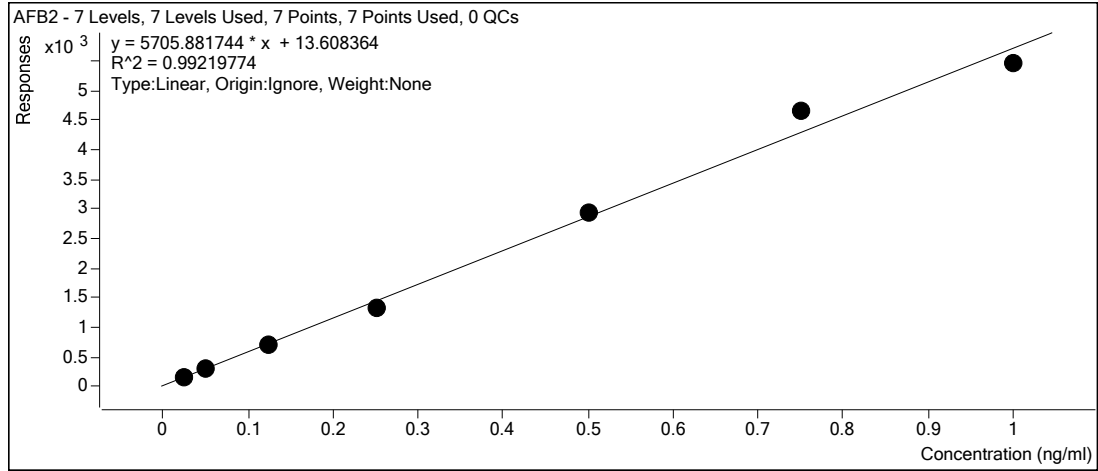
R<sup>2</sup>: Korelasyon katsayısı

#### 4.4.2 Aflatoksin standartına ait kalibrasyon grafiği

Aflatoksin standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu her bir aflatoksin için kalibrasyon grafiği (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6) elde edilmiştir.

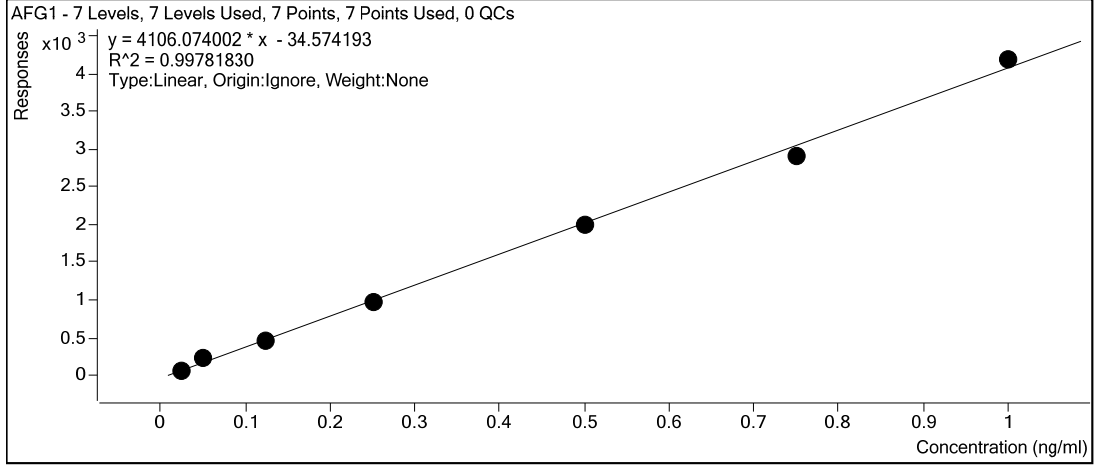


Şekil 4.3: Aflatoksin B1'e ait kalibrasyon grafiği

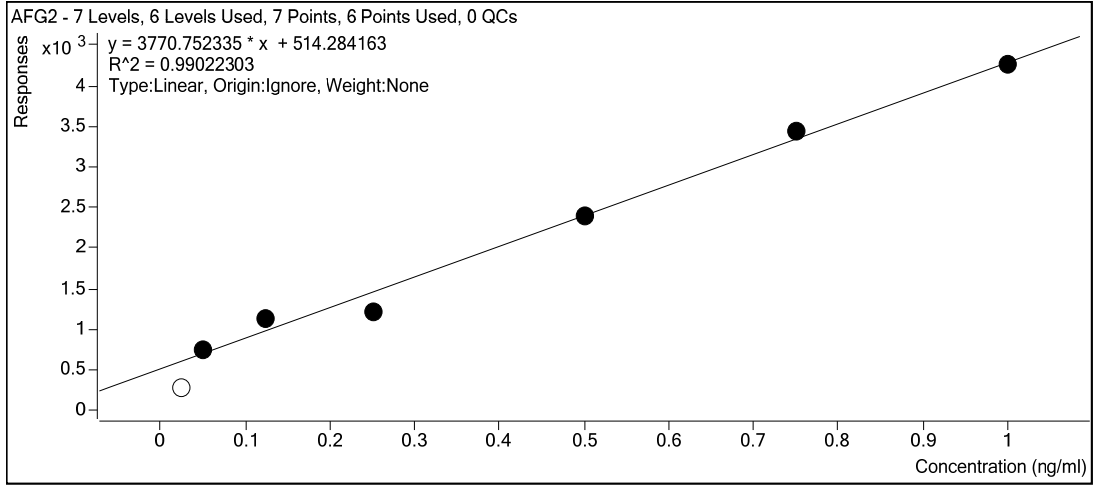


Şekil 4.4: Aflatoksin B2'ye ait kalibrasyon grafiği





**Şekil 4.5:** Aflatoxin G1'e ait kalibrasyon grafiği

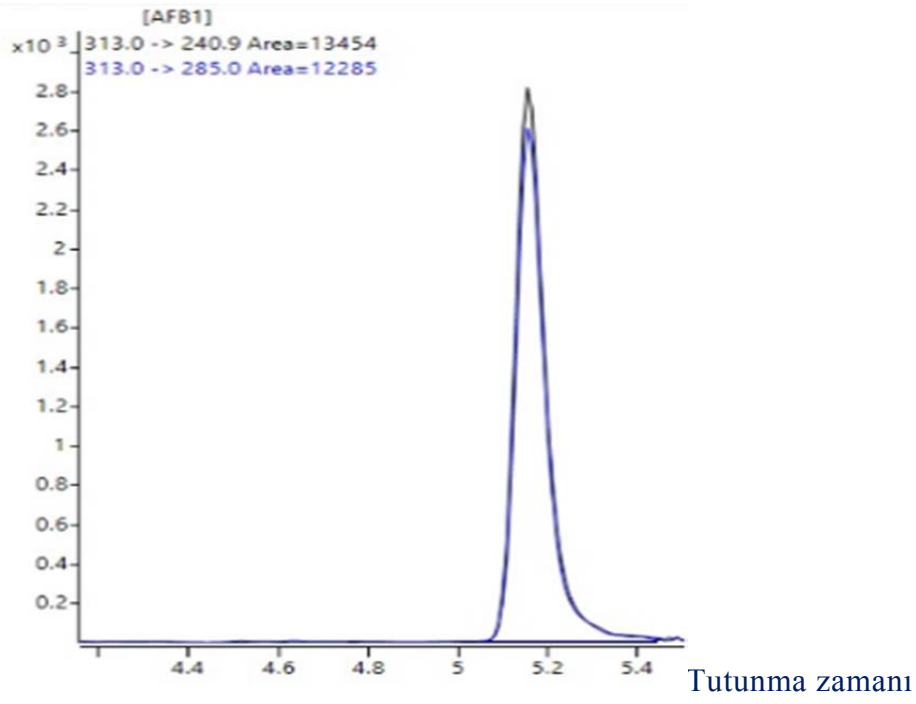


**Şekil 4.6:** Aflatoxin G2'ye ait kalibrasyon grafiği

#### 4.4.3 Aflatoxin standartına ait kromatogramlar

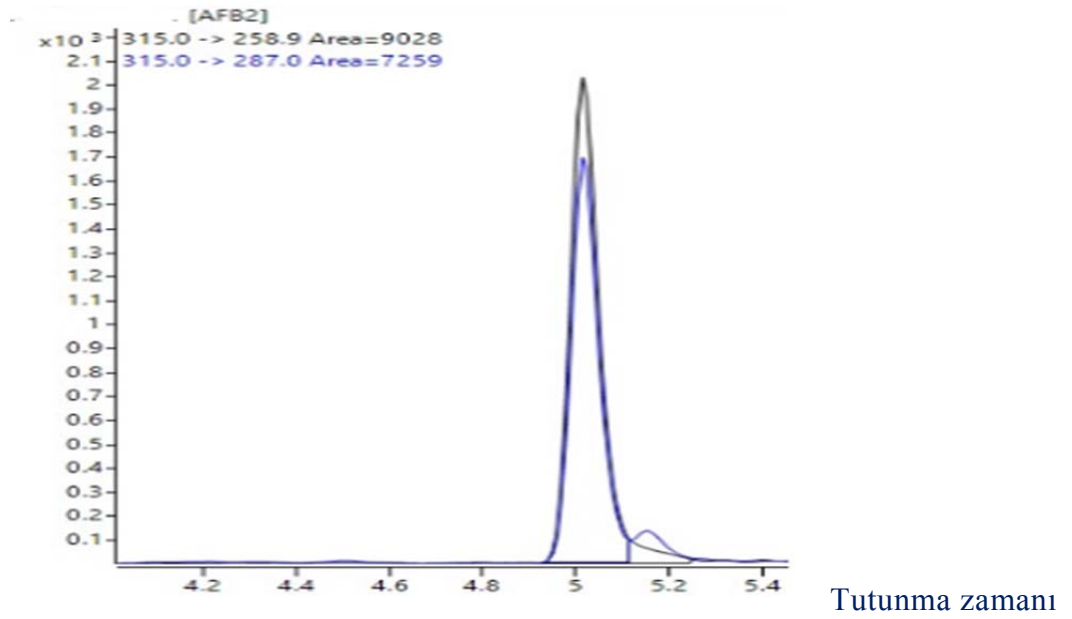
Aflatoxin standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu her bir aflatoxin için kalibrasyon kromatogramları (Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10) elde edilmiştir.

Hassasiyet



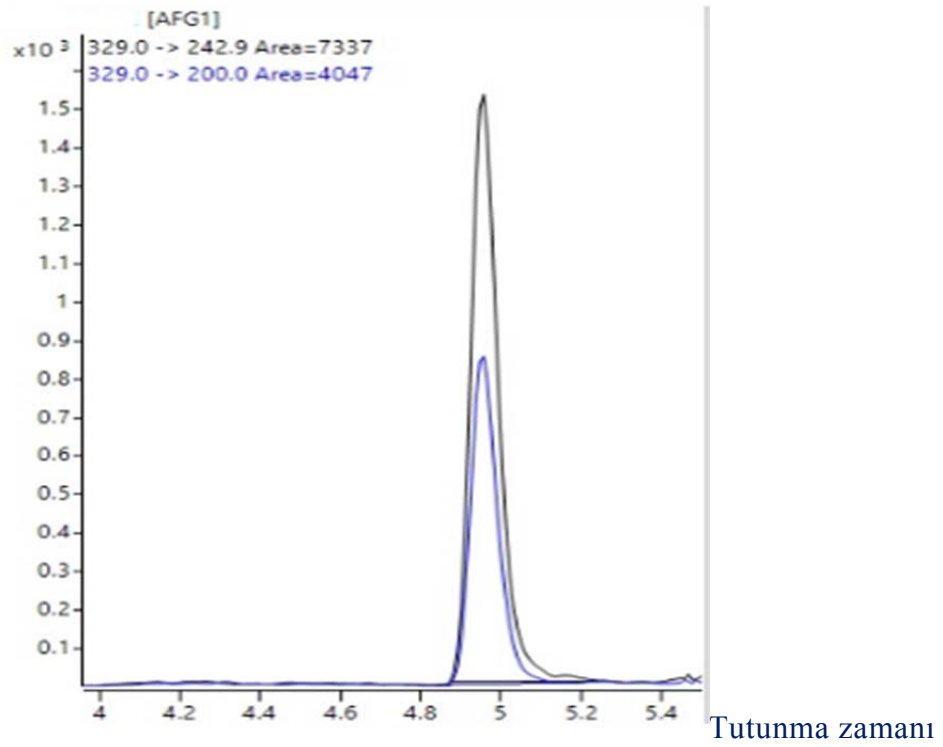
Şekil 4.7: Aflatoxin B1'e ait kalibrasyon kromatogramı

Hassasiyet



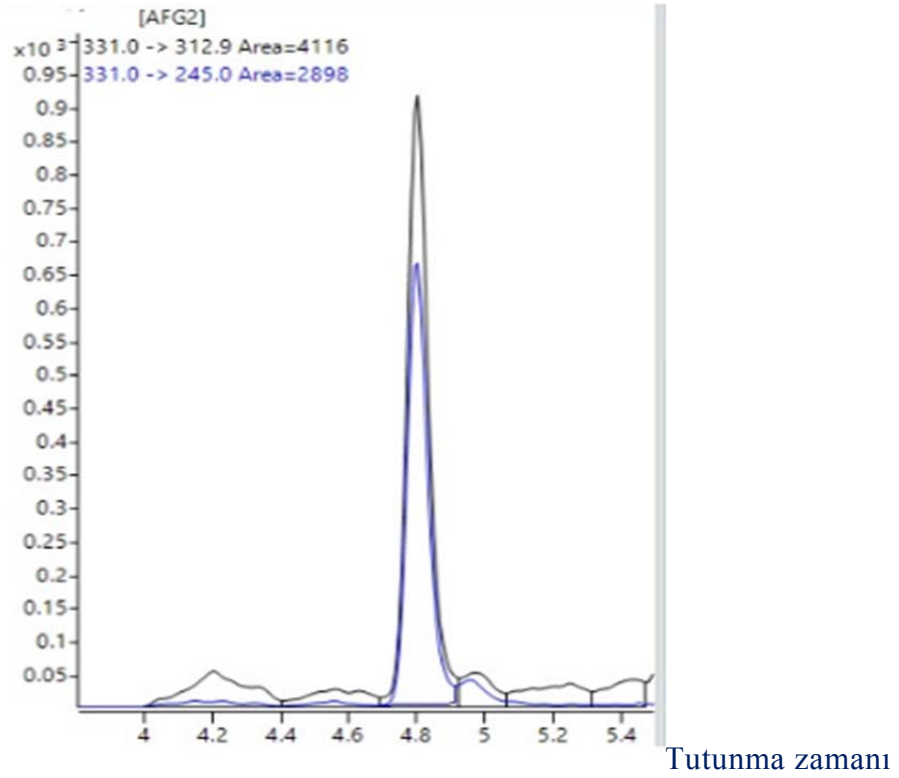
Şekil 4.8: Aflatoxin B2'ye ait kalibrasyon kromatogramı

Hassasiyet



Şekil 4.9: Aflatoxin G1'e ait kalibrasyon kromatogramı

Hassasiyet



Şekil 4.10: Aflatoxin G2'ye ait kalibrasyon kromatogramı

#### 4.4.4 Örneklerdeki aflatoksin miktarı

Örneklerden elde edilen ekstraktın LC-MS/MS cihazında analiz edilmesi sonucu toksin miktarı  $\mu\text{g}/\text{kg}$  cinsinden hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda örneklerdeki aflatoksin miktarı Çizelge 4.6’da verilmiştir.

**Çizelge 4.6:** Pozitif örneklerdeki aflatoksin miktarları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Örnek	AFLAB1	AFLAB1+B2+G1+G2	Maksimum Limit
TBU-111	TE	0,53	4
KPK-67	TE	0,32	
KPK-71	TE	0,23	
ÇAV-7	TE	0,32	
ÇAV-20	TE	2,17	
ÇAV-40	TE	0,95	
ÇAV-96	0,17	2,74	
ÇAV-106	TE	5,95	
ÇAV-108	TE	1,13	

TBU: Tam buğday unu; KPK: Kepek; ÇAV: Çavdar unu; TE: Tespit edilemedi

#### 4.5 Örneklerdeki okratoksin A miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi

##### 4.5.1 Doğrulama parametreleri

Standart okratoksin A karışımının blank numuneye uygulanması sonucu elde edilen doğrulama parametreleri Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7:** Okratoksin A için elde edilen doğrulama parametreleri

Mikotoksin	Konsantrasyon ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% R	% R <sup>2</sup>	RSD
Okratoksin A	0,05	0,09	0,30	86,12	9,06	0,996

LOD: Tespit limiti

LOQ: Tayin limiti

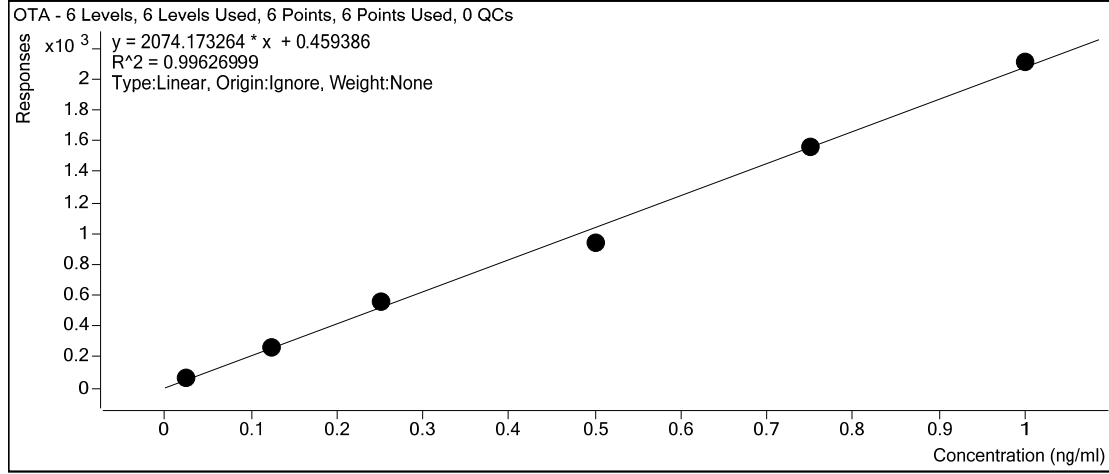
RSD: Tekrarlanabilirlik

R: Geri kazanım

R<sup>2</sup>: Korelasyon katsayısı

#### 4.5.2 Okratoksin A standartına ait kalibrasyon grafiği

Okratoksin A standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu okratoksin A için kalibrasyon grafiği (Şekil 4.11) elde edilmiştir.

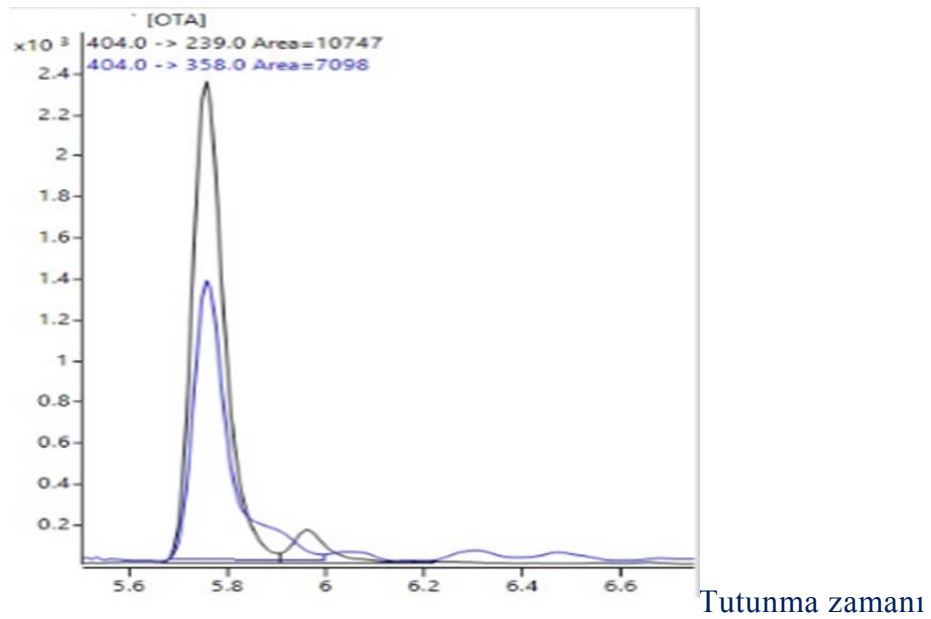


Şekil 4.11: Okratoksin A'ya ait kalibrasyon grafiği

#### 4.5.3 Okratoksin A standartına ait kromatogramlar

Okratoksin A standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu okratoksin A için kalibrasyon kromatogramı (Şekil 4.12) elde edilmiştir.

Hassasiyet



Şekil 4.12: Okratoksin A'ya ait kalibrasyon kromatogramı

#### 4.5.4 Örneklerdeki okratoksin A miktarı

Örneklerden elde edilen ekstraktın LC-MS/MS cihazında analiz edilmesi sonucu toksin miktarı  $\mu\text{g}/\text{kg}$  cinsinden hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda örneklerdeki okratoksin A miktarları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

**Çizelge 4.8:** Pozitif örneklerdeki okratoksin A miktarları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Örnek	OTA	Örnek	OTA	Maksimum Limit
KPK-21	0,5	TBU-15	0,35	3
KPK-22	27,64	TBU-19	1,07	
KPK-36	0,09	TBU-23	0,48	
KPK-78	0,24	TBU-39	1,30	
KPK-103	0,16	TBU-42	0,47	
KPK-110	0,43	TBU-109	21,72	
ÇAV-6	0,24	TBU-113	0,38	
ÇAV-14	0,49	BU-57	0,18	
ÇAV-16	0,36	BU-85	0,05	
ÇAV-18	3,06	BU-88	0,08	
ÇAV-24	0,45			
ÇAV-31	0,24			
ÇAV-61	0,24			
ÇAV-102	0,50			

TBU: Tam buğday unu; KPK: Kepek; ÇAV: Çavdar unu; BU: Buğday unu; TE: Tespit edilemedi

#### 4.6 Örneklerdeki deoksinivalenol miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi

##### 4.6.1 Doğrulama parametreleri

Standart deoksinivalenol karışımının blank numuneye uygulanması sonucu elde edilen doğrulama parametreleri Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

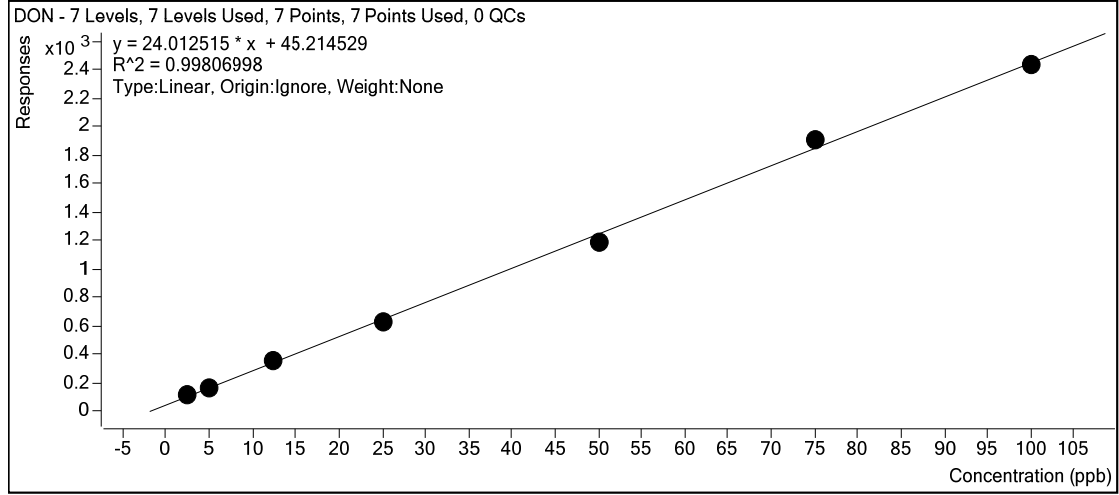
**Çizelge 4.9:** Deoksinivalenol için elde edilen doğrulama parametreleri

Mikotoksin	Konsantrasyon ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	%R	%RSD	R <sup>2</sup>
Deoksinivalenol	5	2,22	7,40	98,73	3,19	0,998

LOD: Limit of detection (Tespit limiti)  
LOQ: Limit of quantitation (Tayin limiti)  
RSD: Tekrarlanabilirlik  
R: Geri kazanım  
R<sup>2</sup>: Korelasyon katsayısı

#### 4.6.2 Deoksinivalenol standartına ait kalibrasyon grafiği

Deoksinivalenol standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu deoksinivalenol için kalibrasyon grafiği (Şekil 4.13) elde edilmiştir.

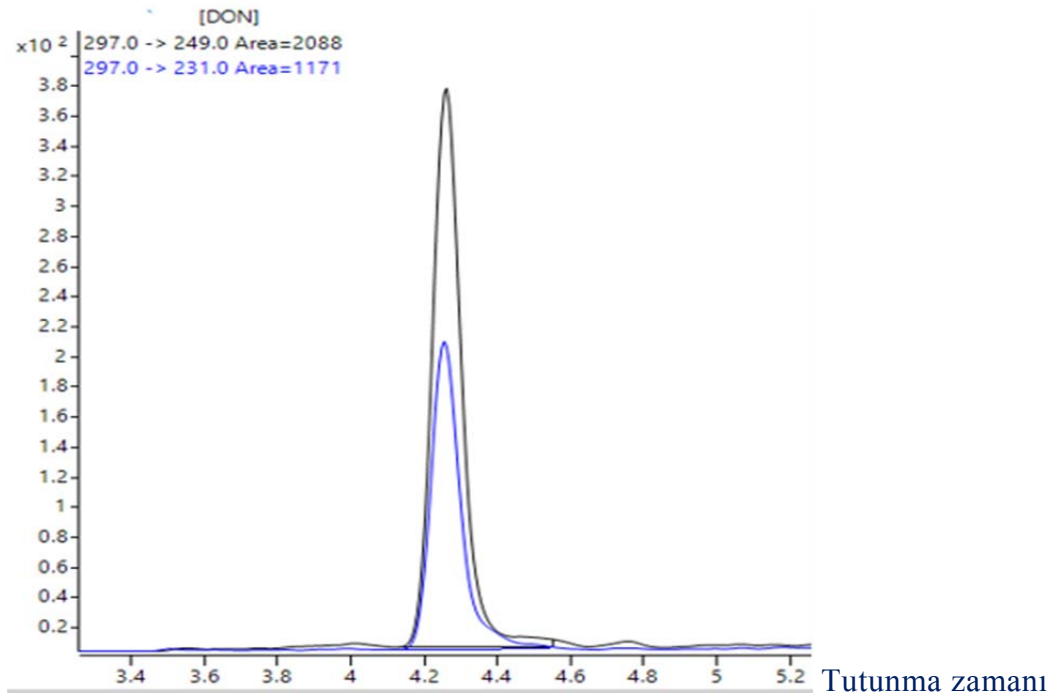


Şekil 4.13: Deoksinivalenol'e ait kalibrasyon grafiği

#### 4.6.3 Deoksinivalenol standartına ait kromatogramlar

Deoksinivalenol standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu deoksinivalenol için kalibrasyon kromatogramı (Şekil 4.14) elde edilmiştir.

Hassasiyet



Şekil 4.14: Deoksinivalenol'e ait kalibrasyon kromatogramı

#### 4.6.4 Örneklerdeki deoksinivalenol miktarı

Örneklerden elde edilen ekstraktın LC-MS/MS cihazında analiz edilmesi sonucu toksin miktarı  $\mu\text{g}/\text{kg}$  cinsinden hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda örneklerdeki deoksinivalenol miktarı Çizelge 4.10'da verilmiştir.

**Çizelge 4.10:** Pozitif örneklerdeki deoksinivalenol miktarları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Örnek	DON	Örnek	DON	Maksimum Limit
KPK-21	0,08	TBU-15	25,86	750
KPK-33	17,64	TBU-23	5,27	
KPK-36	0,06	TBU-25	70,04	
KPK-62	14,4	TBU-32	11,26	
KPK-71	10,36	TBU-35	0,08	
KPK-78	0,14	TBU-39	5,6	
KPK-81	0,21	TBU-42	0,07	
KPK-94	0,11	BU-44	0,06	
KPK-95	11,64	BU-46	0,11	
KPK-103	0,08	BU-54	12,38	
KPK-112	0,06	BU-55	10,51	

**Çizelge 4.10: devamı** Pozitif örneklerdeki deoksinivalenol miktarları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Örnek	DON	Örnek	DON	Maksimum Limit
ÇAV-14	14,1	BU-56	12,29	750
ÇAV-31	25	BU-57	0,2	
ÇAV-34	0,07	BU-60	0,09	
ÇAV-73	0,07	BU-64	10,81	
ÇAV-92	0,09	BU-68	0,17	
		BU-77	0,21	
		BU-79	10,97	
		BU-80	0,1	
		BU-82	19,58	
		BU-84	11,92	
		BU-85	0,21	
		BU-88	0,13	
		BU-89	10,64	
		BU-91	0,12	



TBU: Tam buğday unu; KPK: Kepek; ÇAV: Çavdar unu; BU: Buğday unu; TE: Tespit edilemedi

#### 4.7 Örneklerdeki zearalenonun miktarının LC-MS/MS ile belirlenmesi

##### 4.7.1 Doğrulama parametreleri

Standart zearalenonun karışımının blank numuneye uygulanması sonucu elde edilen doğrulama parametreleri Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.11:** Zearalenonun için elde edilen doğrulama parametreleri

Mikotoksin	Konsantrasyon (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	%R	%RSD	R <sup>2</sup>
Zearalenon	0,5	0,51	1,70	104,02	2,61	0,997

LOD: Tespit limiti

LOQ: Tayin limiti

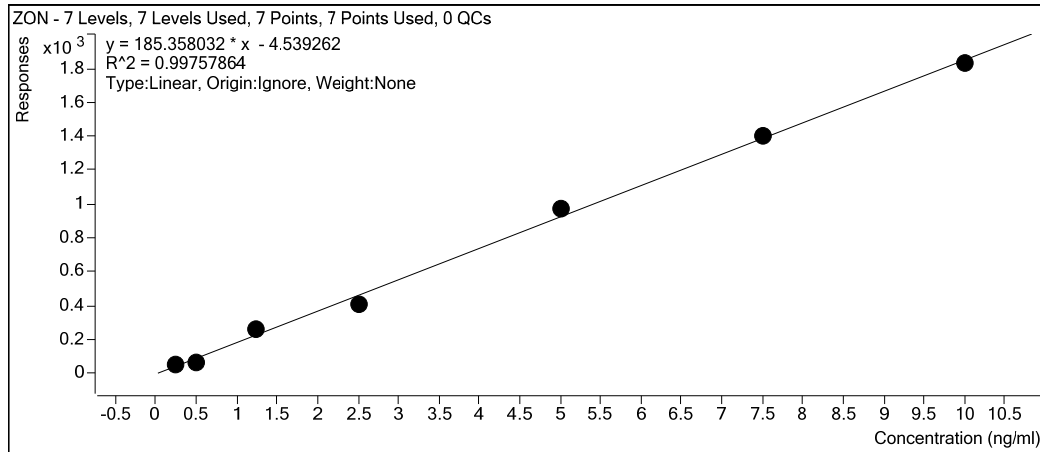
RSD: Tekrarlanabilirlik

R: Geri kazanım

R<sup>2</sup>: Korelasyon katsayısı

##### 4.7.2 Zearalenon standartına ait kalibrasyon grafiği

Zearalenon standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu zearalenon için kalibrasyon grafiği (Şekil 4.15) elde edilmiştir.

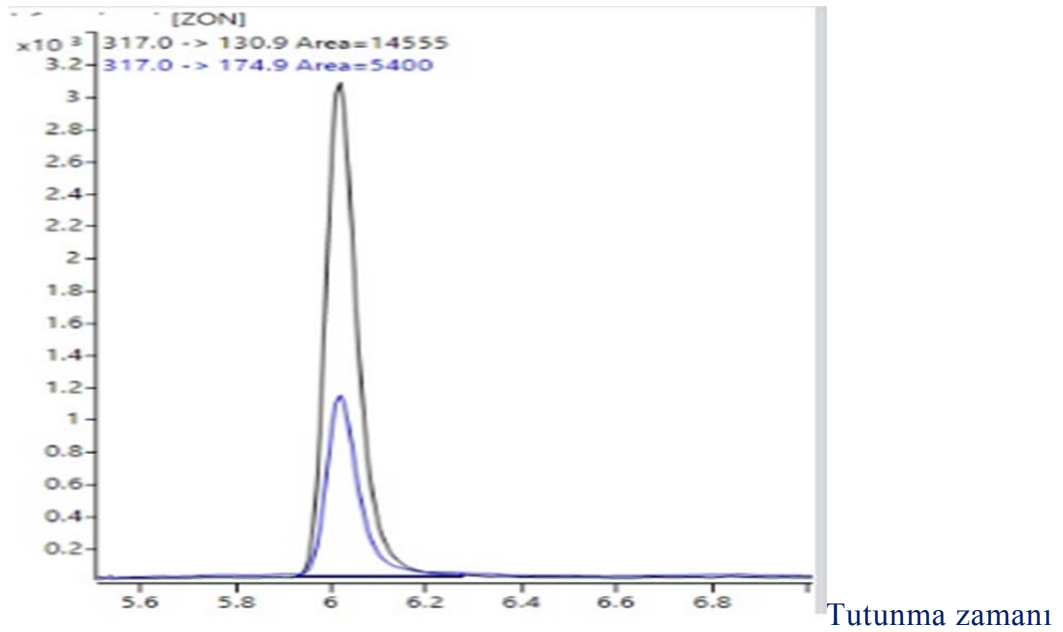


**Şekil 4.15:** Zearalenon’a ait kalibrasyon grafiği

##### 4.7.3 Zearalenon standartına ait kromatogramlar

Zearalenon standartına ait 6 farklı konsantrasyon kullanılması sonucu zearalenon için kalibrasyon kromatogramı (Şekil 4.16) elde edilmiştir.

## Hassasiyet



Şekil 4.16: Zearalenon'a ait kalibrasyon kromatogramı

### 4.7.4 Örneklerdeki zearalenon miktarı

Örneklerden elde edilen ekstraktın LC-MS/MS cihazında analiz edilmesi sonucu toksin miktarı  $\mu\text{g}/\text{kg}$  cinsinden hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda örneklerdeki zearalenon miktarı Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12: Pozitif örneklerdeki zearalenon miktarları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Örnek	ZEA	Örnek	ZEA	Maksimum Limit
KPK-33	2,78	TBU-17	0,04	75
ÇAV-20	0,34	TBU-49	0,6	
ÇAV-40	0,48	TBU-74	2,44	
ÇAV-61	0,11	BU-47	0,43	
ÇAV-102	0,14	BU-59	0,38	
ÇAV-106	0,18	BU-64	1,74	
		BU-79	3,04	
		BU-84	2,61	
		BU-89	2,4	

TBU: Tam buğday unu; KPK: Kepek; ÇAV: Çavdar unu; BU: Buğday unu; TE:  
Tespit edilemedi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğada yaygın olarak bulunan küfler, bitkisel ürünlere ve çeşitli gıdalara direkt veya dolaylı olarak bulaşmaktadır. Tahıl kaynaklı gıdalarda oluşan küf kontaminasyonu; tarlada, hasat, depolama, ürünün işlenmesi ve nakliye aşamalarında oluşabilmektedir (Özturan ve ark., 2007). Gıdalara küf kontaminasyonu sonucu ürünlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapıları değişebilmektedir. Küfler uygun şartlarda çoğaldıklarında gıdaların nitelik ve nicelik özelliklerini kaybederek ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca küflerin sekonder metaboliti olan toksinleri insan sağlığı için tehlike oluşturmaktadır (Erdoğan ve ark., 2003; Andersen ve Thrane, 2006).

Tahıllar ülkemizde binlerce yıldır yetiştirilmekte ve kırsal bölgelerde yaşamın önemli bir parçasıdır. Ülkemizde tahıl ve tahıldan elde edilen ürünler günlük beslenmenin %50'sini oluşturmaktadır (Köksal, 1974; Aydın ve ark., 2009). Tahıllar hasat, taşıma, depolama ve işleme aşamalarında yaygın olarak küf gelişimiyle karşılaşmakta ve küfler tarafından üretilen mikotoksin kontaminasyon riski taşımaktadır (Miraglia ve Brera, 2000; Magan ve ark., 2011). Bu sebeple örneklerde tespit edilen düşük seviyelerde mikotoksin kontaminasyonu önemli bir problem olmaktadır (Baydar ve ark., 2005). Son yıllarda çeşitli araştırmalarla tahılların sağlığa olumlu etkilerinin açığa çıkmasıyla birlikte tüketiciler farklı tahıl kaynağına dayanan ürünleri talep etmektedir. Bu sebeple fırınlarda çok çeşitli (ekmek, simit, kekle, pastalar, dolgulu unlu mamüller) ürünler üretilmektedir. Her ürününün farklı bileşiminin ve farklı üretim tekniğinin olması HACCP sisteminin unlu mamüller sektöründeki uygulanabilirliğini zorlaştırmakta ve önemli sorunlara neden olmaktadır. Bu sorunların kontrol altına alınması için üretim aşamalarında kritik kontrol noktaları belirlenmiştir. Bu noktalardan birisi de tahıl ürünlerinin önemli ham maddesi olan unlardır. Unlu mamüllerde kullanılan unun özelliği ürünün özelliklerini ve kalitesini etkilemektedir. Bu sebeple tercih edilecek unun gerekli kalite niteliklerine ve gıda güvenliği açısından bazı özellikleri

taşıması gerekmektedir. Tahıl unlarında en sık rastlanılan tehlike küf gelişimidir (Ergönül, 2007).

Tahıl ve tahıl ürünlerinin mikrobiyal hijyenini değerlendirilmesi ve kontrol altına alınması amacıyla birçok araştırma yapılmıştır ve Türk Gıda Kodeksi tarafından maksimum sınır değerler belirlenmiştir. Potus ve ark. (1989)'nın araştırmasında incelenen 263 tane beyaz unda  $1 \times 10^1 - 3 \times 10^3$  kob/g arasında küf kontaminasyonu tespit etmişlerdir. Karagözlü ve ark. (2000)'nin çalışmalarında 20 tane mısır ununda  $2 \times 10^1 - 3 \times 10^3$  kob/g aralığında küf varlığı belirlemişleridir. Bir diğer araştırmada 142 tane beyaz un örneğinde  $7,4 \times 10^1 - 1 \times 10^3$  kob/g arasında küf varlığı tespit edilmiştir (Aydın ve ark., 2009). Çalışmamızda incelenen tam buğday ununda  $1 \times 10^1 - 4,2 \times 10^3$  kob/g, beyaz unda  $3 \times 10^1 - 8,7 \times 10^3$  kob/g, çavdar ununda  $1,3 \times 10^2 - 4,3 \times 10^3$  kob/g, kepekte  $5 \times 10^1 - 6 \times 10^3$  kob/g arasında küf kontaminasyonu belirlenmiştir ve benzer çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Potus ve ark., 1989; Karagözlü ve ark., 2000; Aydın ve ark., 2009). TKG'nin "Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği"ne göre tahıl unları için izin verilen maksimum küf sınır değeri  $10^4$  kob/g'dır. Analiz edilen örnekler yasal limitlerle kıyaslandığında maksimum sınır değerinin altında küf varlığı içerdiği tespit edilmiştir.

Gıdalarda gelişen bazı küf türleri tarafından üretilen mikotoksinler; düşük molekül ağırlığına sahip olup, insanlar ve hayvanlar için toksik sekonder metabolitlerdir. Mikotoksinlerin oluşması, bulaşan küfün cinsine ve gıdanın işleme-depolama koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Doolotkeldieva, 2010). Mikotoksinlerle ilgili sorunların çeşitliliği ürünlerin cinsine, ekolojik bölgelere ve ülkelere bağlı olarak değişmektedir. Bu sebeple pek çok ülke, mikotoksin ve küf ile ilgili sorunlarını belirlemekte ve elde edilen bilgilere göre çözüm üretmek amacıyla araştırmalar yapmaktadır. Bu amaçla Türkiye'nin 34 farklı ilinden temin edilen 73 farklı gıda çeşidinden olmak üzere 2000 civarında ürün incelenmiştir. Araştırmada 162 farklı küfden oluşan farklı cins ve türde 1977 izolat elde edilmiştir. İzolatlar arasından potansiyel mikotoksijenik 40 farklı küf cinsi ve 31 farklı mikotoksin standartına göre tarama gerçekleştirilmiştir. Elde edilen küflerin Türkiye mikroflorasına ait dağılımı %65 *Penicillium*, %19 *Aspergillus*, %11 *Deuteromyces*, %2 *Fusarium*, %2 *Zygomycetes*, %1 *Basidiomycetes* olarak belirlenmiştir. İncelenen küflerin 441'inde (%32,5)

mikotoksin üretebilme yeteneğine sahip oldukları, %65'i toksik olmayan küfler ve %2,5'i de şüpheli pozitif küfler olarak tespit etmişlerdir (Topal, 2003). Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada tarımsal ürünlerde mikotoksijenik küfler ve mikotoksinlerin varlığı araştırılmıştır. Araştırmada *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait 251 tür belirlenmiş olup bunların arasında en sık karşılaşılan tür *A. niger* olarak tespit edilmiştir (Gürsoy ve Biçiçi, 2004).

Çalışmamızda 112 tane örnekten elde edilen 174 tane izolatin geleneksel yöntemlerle tanımlanmasında 22 farklı cins belirlenmiştir. İncelenen örneklerden elde edilen küfler arasında en baskın cinsin *Penicillium* (60 tane), *Aspergillus* (40 tane) ve *Fusarium* (13 tane) cinsi küflerin takip ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Çalışmada incelenen buğday ununda: *Penicillium* (16 tane), *Aspergillus* (8 tane), çavdar ununda: *Penicillium* (20 tane), *Aspergillus* (11 tane), tam buğday ununda: *Penicillium* (14 tane), *Aspergillus* (15 tane), kepekte: *Penicillium* (10 tane), *Aspergillus* (6 tane) dağılımları bulunmuştur ve diğer tahıl kaynaklı çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Topal, 2003; Gürsoy ve Biçiçi, 2004; Doolotkeldieva, 2010; Öziç, 2011; Reddy ve Salleh, 2011).

Küflerin morfolojik tanımlanmasında araştırmacının değerlendirme ve tecrübesinden yüksek oranda etkilenmesine, mikotoksijenik listesinin uzamasına ve gerçek dışı veriler oluşmasına neden olmaktadır. Bu sebeple moleküler identifikasyonun kullanılması morfolojik identifikasyonda yanlış verilerin oluşmasını engelleyebilmektedir (Atkins ve Clark, 2004; Samson ve ark., 2010). PZR gibi moleküler yaklaşımlar, mikotoksijenik küflerin belirlenmesi için geleneksel yöntemlere iyi alternatifler olarak hizmet edebilmektedir. Mikotoksin biyosentez yollarında yer alan türe özgü genlerin ve/veya yapısal veya düzenleyici genlerin sayısını eş zamanlı olarak artıran multipleks PZR analizleri, çeşitli gıdalarda ve yemlerde mikotoksijenik küflerin belirlenmesinde başarıyla uygulanmaktadır (Rodrigues ve ark., 2009; Kim ve ark., 2011). Çalışmamızda okratoksin A ile kontamine örneklerden izole edilen ve klasik yöntemlerle belirlenen 29 temsili mikotoksijenik küf; ITS ve AoLC gen bölgelerinin PZR çalışmaları ile moleküler olarak identifiye edilmiştir. Ele alınan gen bölgeleri hem *Aspergillus* hem de *Penicillium* cinsleri için kullanılmıştır. ITS bölgeleri (Şekil 4.1), filamentöz mantarlarında filogenetik ve

popülasyon çalışmalarını yürütmek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte önemli mikotoksijenik türleri tanımlamak için *Aspergillus* veya *Fusarium* gibi spesifik PZR deneyleri geliştirmek için de kullanılmaktadır (Henry ve ark., 2000; González-Jaén ve ark.,2004). Geleneksel yöntemle belirlenen mikotoksijenik küflerin PZR ile karakterize etmek için, okratoksin A biyosentezinde yer alan yapısal ve düzenleyici genlere yönelik primer *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinden ekstrakte edilen DNA'lar kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, potansiyel mikotoksin üretme yeteneğine sahip izolatların DNA'sından çoğaltılan spesifik fragmanların varlığını açıkça göstermektedir (Şekil 4.2). Çeşitli araştırmacıların okratoksijenik küflerle ilgili çalışmalarında PZR analizine ait elde edilen veriler çalışmamızdaki verilerle paralellik göstermektedir (Dao ve ark., 2005; Sadhasivam ve ark., 2017). Araştırmacıların bir çalışmasında OTA üreten türler (*A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* ve *A. steynii*)'e özgü PCR deneyleri, rDNA'nın çoklu kopya ITS bölgelerine dayanılarak geliştirilmiştir. Test aşamalarında kullanılan primerler STEYF/STEYR, WESTF/WESTR, OCRAF/OCRAR'dır. Analizler farklı köken ve kültür koleksiyonlarından geniş bir izolat örneğinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgularda fragmanların varlığı test edilen izolatlarda OTA'nın biyosentezinde rol oynayan genlerin varlığını göstermektedir (Gil-Serna ve ark., 2009). Bir başka çalışmada okratoksijenik küflerin saptanması için bir PZR yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla gıda ürünlerinde rapor edilen 11 tane okratoksijenik suş arasından 75 tane küf test edilmiştir. Çalışmada test edilen çeşitli türlerde F1OT/R1OT, F2OT/R2OT ve F3OT/R4OT primerlere ait fragmanlar belirlenmiştir (Luque ve ark., 2013). Çeşitli araştırmacılar OTA'nın biyosentezinde yer alan bir genin karakterizasyonu için PZR deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada *A. westerdijkiae* NRRL 3174'te poliketid sentaz geninin belirli bir bölgesinden dizayn edilen Aoks1 primer test edilmiştir Referans okratoksijenik küfte PZR analizlerinden elde edilen fragmanların varlığı OTA'nın biyosentezinde ilgili genin rol oynadığını düşündürmektedir (Bacha ve ark., 2009). Tayland'da yapılan bir çalışmada kahve örneklerinden izole edilen toksik olmayan ve okratoksijenik suşları tanımlamak için OTA sentaz geni olan poliketid sentaz (pks) kullanılarak kalitatif polimeraz zincir reaksiyonunda test edilmiştir. Poliketid sentaz geninin 141 baz pairlik bir kısmını büyütmek için OTAF/OTAR primer çifti kullanılmıştır. İncelenen

okratoksijenik *A. carbonarius* suşunda fragmanların varlığı tespit edilmiştir (Potipun ve ark., 2018). Moslem ve ark. (2010)'nın çalışmasında kahve çekirdeklerinden izole edilen on tane mantar izolatu morfolojik olarak *A. niger*, *A. ochraceus* ve *A. carbonarius* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada primer çifti (OCRA1/OCRA2) kullanılarak yaklaşık 400 baz pairlik fragman *A. ochraceus* izolatlarından elde edilmiştir. Mısır'da toplam yüz tane yem numunesi okratoksijenik küfler bakımından incelenmiştir. Yem numunelerinde *A. flavus*, *A. ochraceus* ve *A. niger* türleri içeren 106 tane izolat elde edilmiştir. İzolatlarda okratoksijenik küflerin saptanması için OCRA1/OCRA2 primerleri kullanılarak PZR analizleri uygulanmıştır. Okratoksijenik *A. ochraceus* izolatlarından elde edilen genomik DNA'dan yaklaşık 400 baz pairlik fragman elde edilmiştir ancak *A. niger*'den elde edilen DNA'dan ürün gözlenmemiştir. Polimer zincir reaksiyon analizleri okratoksine özgü genleri (pks) hedefleyerek okratoksijenik küflerin spesifik tespiti için Aopks1/Aopks2 primer çifti kullanılarak uygulandığında 3 tane *A. ochraceus* ve 2 tane *A. niger* izolatlarından yaklaşık 549 baz pairlik fragman üretilmiştir (El-Hamaky ve ark., 2016).

Mikotoksinlerin analizinde, ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (ELISA) (Oruç, 2005) ve radio-immunassay (RIA) yöntemi kullanılmaktadır. Kalitatif olarak örneklerde var ya da yok şeklinde belirlemek ultraviyole lambası altında görsel olarak da belirlenebilmektedir (Smith ve Moss, 1985). Geleneksel yöntemlerde yaygın olarak, mikotoksin analizleri, bir katı faz ekstraksiyon / immünoafinite kolonunda temizlemeden sonra HPLC aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Krska ve ark., 2001; Gilbert ve Anklam, 2002). Bu yöntemler, sınırlı sayıda hedef analit dahil olmak üzere yalnızca tek bir mikotoksin sınıfının belirlenmesini sağlamaktadır ve yoğun emek gerektiren numune hazırlama nedeniyle analizin maliyetini ve süresini artırmaktadır. Mikotoksin tespitinin hassasiyetini arttırmak ve analizlerin maliyetini düşürmek için, tek bir ekstraksiyonda farklı matris tiplerinde rutin analizler ile mümkün olduğunca çok sayıda mikotoksin belirlenmesi tercih edilmektedir. Ayrıca, çeşitli gıdalarda birkaç mikotoksinin



birlikte bulunması sebebiyle çoklu mikotoksin belirleme yöntemleri gerekmektedir (Soleimany ve ark., 2011). Buğday tane matrisinin karmaşıklığı ve mikotoksinlerin çok çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri, birlikte oluşan toksinler için seçici ve hassas tespit tekniklerini gerektirmektedir. Sıvı kromatografi / kütle spektrometrisi (LC / MS) ve özellikle tandem kütle spektrometresi (LC / MS / MS), son yıllarda mikotoksin analizi için çok popüler hale gelmektedir (Wang ve ark., 2016).

Tarımsal ürünler için okratoksin A en önemli mikotoksinler arasındadır. Okratoksin A uygun çevre koşullarında *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından tarımsal ürünlerin üretimi ve depolanması sırasında oluşmaktadır (Bankole ve Adebajo, 2003). Son yıllarda yapılan araştırmalarda buğday, mısır, pirinç ve arpa gibi tahıl ve tahıl ürünlerinde okratoksijenik küfler tarafından kontamine edildiği bildirilmiştir (Gümüş ve ark., 2004; El-Hamaky ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016). OTA'nın moleküler yapısı fenilalanine bağlı bir dihidrozokumarin halkası içerir (Gallo ve ark., 2014). Mantar poliketid sentezlerin son zamanlarda hem *Penicillium* hem de *Aspergillus* türlerinde OTA biyosentezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Gallo ve ark., 2009). Vücutta bulunan okratoksin A'nın büyük bir kısmı tahıl ve tahıl kaynaklı ürünlerden kaynaklanmaktadır. Karagözlü ve Karapınar (2000) tarafından yapılan bir çalışmada buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi ve müsli içeren toplam 100 gıda örneğinde okratoksin A seviyesi araştırılmıştır. İncelenen örneklerin 4 tanesinde; 1 tane aşurelik buğday (0.27 µg/kg), 2 tane mısır (1.79 µg/kg ve 9.84 µg/kg) ve 1 tane yulaf ezmesi (4.19 µg/kg) örneklerinin farklı seviyelerde okratoksin A içerdiği tespit edilmiştir. Cengiz ve ark. (2007)'i Bursa'daki çeşitli market, fırın ve Türk Silahlı Kuvvetleri'nin farklı birliklerinden alınan 58 un örneğini (34 buğday, 14 tam buğday, 10 mısır) okratoksin A açısından analiz etmişlerdir. Buğday unu, tam buğday unu ve mısır unu örneklerinde belirlenen okratoksin A miktarları sırasıyla 6,89 + 0,46 µg/kg, 9,3 + 1,33 µg/kg ve 6,39 + 1,10 µg/kg'dır. İspanya ve Portekiz'den temin edilen 83 tane organik ve organik olmayan tahıl ürünleri (pirinç, buğday, arpa, çavdar, yulaf ve mısır) okratoksin A düzeyi araştırılmıştır. Örneklerin %22'sinde (n=18) 0,2 ile 27,10 µg/kg miktarları arasında okratoksin A içerdiği saptanmıştır. Kontamine olmuş örneklerin %72'si organik tahıl ve %28'i

organik olmayan tahıl örnekleridir (Juan ve ark., 2008). Hindistan'da 50 buğday örneği okratoksin A açısından araştırılmıştır. Örneklerin 29'unda 1,36 ile 21,17 µg/kg seviyeleri arasında okratoksin A içerdiği saptanmıştır. Örneklerin 13 tanesi Avrupa Birliği tarafından belirlenen sınırı (5 µg/kg) aştığı tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2012). Toplam 811 tane bitki bazlı bunların 456 tanesi tahıl ve tahıl ürünlerini içeren çalışmada örnekler okratoksin A yönünden incelenmiştir. Tahıl ve tahıl ürünlerin %37,5'i ortalama 0,77 mikrogram/kg düzeyinde okratoksin A içerdiği belirlenmiştir (Jiao ve ark., 1994). Çalışmamızda incelediğimiz 112 tane un örneğinin 24'ünde 0,09-27,64 µg/kg seviyeleri arasında okratoksin A varlığı tespit edilmiştir. Bu örneklerin 3 tanesinde (çavdar unu 3.06 µg/kg, tam buğday unu 21,72 µg/kg, kepek 27,64 µg/kg) TGK göre maksimum limit değerlerinin (3 µg/kg) üzerinde okratoksin A kontaminasyonu belirlenmiştir. Analiz edilen un örneklerinde mikotoksin varlığı-yokluğu ile mikotoksijenik küf varlığı-yokluğu arasında kesin bir eşleşme bulunmayan durumlar belirlenmiştir. Örneklerden izole edilen izolatlarda mikotoksijenik küf varlığı tespit edilirken aynı örnekte okratoksin A tespit edilememiştir (Çizelge 4.3). Örneklerde okratoksin A'nın oluşmaması mikotoksijenik küfün gelişimi için uygun çevre şartlarının bulunmamasına işaret etmektedir. Çeşitli araştırmalarda tahıl ve tahıl ürünlerinde okratoksin A belirlemede benzer sonuçlar ile karşılaşmışlardır (Karagöz ve Karapınar, 2000).

Tahıllarda ve tahıl unlarında oluşan mikotoksin kaynaklı risklerin tespit edilmesi ve önlemlerin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. İran'da yapılan araştırmada kış ve yaz mevsimlerinde temin edilen toplam 200 tane buğday un örneği incelenmiştir. Araştırmada kış mevsiminde temin edilen 100 tane buğday ununda ortalama 0,99 ng/g, yaz mevsiminde temin edilen 100 tane buğday ununda ortalama 0,82 ng/g toplam aflatoksin içerdiği belirlenmiştir. Un örneklerindeki toplam aflatoksin düzeyi İran Standartları Enstitüsü tarafından belirlenen sınırdan daha düşük seviyede tespit edilmiştir (Taheri ve ark., 2012). Baydar ve ark. (2005) çalışmalarında 25 adet öğütülmüş örnekte (tohum, bakliyat, tahıl unu ve nişasta) aflatoksin düzeyi HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Toplam aflatoksin seviyesi 0,03-3,16 µg/kg aralığında ölçülmüştür. Örneklerin 16'sında AFB1 0,03-1,61 µg/kg, 15'inde AFB2 0,03-0,18 µg/kg, 18'inde AFG1 0,03-2,79 µg/kg, 19'unda AFG2 0,03-0,15 µg/kg

düzeyleri arasında belirlemişlerdir. Özturan ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada 50 buğday örneği ELISA metodu kullanılarak toplam aflatoksin düzeyi araştırılmıştır. Örneklerin 37 tanesinde toplam aflatoksin seviyesi ölçülebilir sınır değerinden (1,75 µg/kg) daha fazla bulunmuş ve örneklerin 9'unda yasal sınırların (4 µg/kg) üzerinde olduğu belirlenmiştir. Aydın ve ark. 2008 yılında Trakya'da yaptıkları araştırmalarında 100 buğday örneğinin 45'inde 0,05-14,01 µg/kg düzeyleri arasında aflatoksin içerdiği tespit edilmiştir. Örneklerin 2 tanesinde TGK maksimum limit değerinin (4 µg/kg) üzerinde bulunmuştur. Çalışmamızda incelediğimiz 112 tane örneğin 10'unda aflatoksin varlığı belirlenmiştir. AFB1 için sadece 1 örnekte 0,17 µg/kg miktarında belirlenmiştir. Örneklerin tümünde AFB2 ve AFG1 için ölçülebilir değerinin altında belirlenmiştir. Örneklerin 9'unda AFG2 düzeyi 0,23-5,95 µg/kg aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Örneklerin sadece 1 tanesinde (çavdar unu) aflatoksin B1+B2+G1+G2 düzeyi (5,95 µg/kg) yasal sınırların (4 µg/kg) üzerinde olduğu saptanmıştır. Adı geçen çalışmalarda bildirilen miktarlar çalışmamızda tespit ettiğimiz miktarlardan daha yüksek bulunmuştur.

Tahıl ürünleri araştırmaları, *Fusarium* mikotoksinlerinin insan ve hayvan beslenmesinde ortak bir kirletici olduğunu göstermiştir ve genellikle düşük konsantrasyonda ortaya çıkmaktadırlar. Deoksinivalenol tahıllarda yaygın olarak rastlanılan B grubu trikotesendir. Bu mikotoksini üreten başlıca küfler *F. graminearum* ve *F. culmorum*'dur (Bretz ve ark., 2006). *F. graminearum*'un gelişme koşulları için optimum sıcaklık 24-26 °C ve minimum su aktivitesi 0,90'dır. Bu küf türü DON'un yanısıra NIV ve ZON da oluşturabilmektedir (Sweeney ve Dobson, 1998). Deoksinivalenol çiftlik hayvanlarında yem alımında azalma, kilo alımında azalma ve kusmaya neden olmaktadır (Edwards, 2009). Blesa ve ark. (2014)'nın çalışmalarında 80 tane durum buğdayını DON açısından araştırmışlardır. Araştırmada 80 örneğin 4'ünde 121-1480 µg/kg arasında miktarlarda DON belirlenmiştir. Romanya'da 2014 hasat mevsimi boyunca 31 tane bütün işlenmemiş buğday ve 35 tane beyaz buğday unu örnekleri deoksinivalenol varlığını tespit etmek için gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 8 buğday örneğinde 110-1787 µg/kg ve 35 buğday unu örneklerinin 1 tanesinde 190 µg/kg seviyelerinde DON tespit edilmiştir (Stanciu ve ark., 2017). Covarelli ve ark. (2011)'nin İtalya'da yaptıkları çalışmada 2006-2007

yıllarında mısır örneklerini DON açısından incelemişlerdir. Araştırmada 2006 yılındaki incelenen toplam 47 örneğin tümünde 197-3980 µg/kg seviyeleri arasında DON belirlenmiştir. Çalışmanın 2007 yılında analiz edilen toplam 36 tane mısır örneğinin %89'unda 14 µg/kg'a ulaşan düzeylerde DON saptanmıştır. İran'da yapılan bir araştırmada 34 buğday örneği mikotoksin varlığını değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Analiz edilen 34 buğday örneğinin 8'inde 1,2-1746,5 ppb düzeyleri arasında DON'e rastlanmıştır (Sadhasivam ve ark., 2017). Çalışmamızda incelediğimiz 112 tane örneğin 41 (%36,6)'inde DON varlığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Örneklerdeki DON 0,06-70,04 µg/kg düzeyleri arasında bulunmuştur. Çeşitli araştırmalarda tespit edilen DON düzeyi çalışmamızdaki örneklerden elde edilen verilerden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Örneklerde tespit edilen DON miktarları TGK göre maksimum limit değerlerinin (750 µg/kg) altındadır. Çalışmamızda DON kontaminasyonuna rastlanılan örneklerde aynı zamanda ZON varlığı da tespit edilmiştir [Tablo 5 ve 6].

Zearalenon ve metabolitlerini içeren zearalenonlar ( $\alpha$ -zearalenol ve  $\beta$ -zearalenol) östrojenik etkili mikotoksinlerdir. Zearalenonlar mısırdan yaygın olarak bulunur, ancak arpa, yulaf, buğday, pirinç, sorgum ve soya fasülyesi de *F. graminearum* ile kontaminasyona yatkındır (EFSA, 2011). Litvanya'da yapılan çalışmada 2006-2007 hasat dönemlerinde elde edilen kışlık ve baharlık toplam 125 tane buğday, arpa ve çavdar örneklerinde çeşitli mikotoksinlerin varlığı araştırılmıştır. Araştırmada 2006 kışlık 32 örnekte (tespit sınır değeri-10 µg/kg) 28,1 µg/kg, 2006 baharlık 32 örnekte 10-45,8 µg/kg arası, 2007 kışlık 28 örnekte 17,8-24,5 µg/kg arası, 2007 baharlık 33 örnekte 20-26,3 µg/kg düzeyleri arasındaki miktarlarda zearalenon tespit edilmiştir (Mankevičienė ve ark., 2011). Covarelli ve ark. (2011)'de yapılan çalışmalarında 2006-2007 yıllarında mısır örneklerinde zearalenon varlığı araştırılmıştır. Araştırmada 2006 yılındaki toplam 47 örneğin %30'unda 83 µg/kg'a ulaşan seviyelerde zearalenon tespit edilmiştir. Çalışmanın 2007 yılında incelenen 36 mısır örneklerinin tümünde 3-27 µg/kg düzeyleri arasındaki miktarlarda zearalenon içerdiği belirlenmiştir. Romanya'nın güneyindeki 4 farklı bölgeden temin edilen 31 tane bütün işlenmemiş buğday ve 35 tane beyaz buğday unu dahil olmak üzere toplam 66 tane buğday örneklerinde zearalenon varlığı araştırılmıştır. Araştırmada 31

buğday örneğinin 4'ünde 327-1135 µg/kg düzeyleri arasında zearalenon saptanmıştır. Çalışmada 35 buğday unu örneklerinin 2'sinde 51-73 µg/kg miktarlarında zearalenon tespit edilmiştir (Stanciu ve ark., 2017). Sadhasivam ve ark. (2017) tahıl depolarındaki zearalenon varlığını belirlemek amacıyla 34 buğday örneğini incelemişleridir. Örneklerin 5'inde 0,7-64,8 µg/kg seviyeleri arasında zearalenon tespit edilmiştir. Çalışmamızda incelediğimiz 112 farklı un örneklerinin 15'inde zearalenon varlığı saptanmıştır. Örneklerdeki zearalenon miktarları 0,04-3,04 µg/kg değerleri arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Çalışmamızda örneklerde tespit edilen zearalenon seviyeleri adı geçen çalışmalarda bildirilen miktarlardan daha düşük miktarlarda bulunmuştur ve bu miktarlar TGK göre maksimum limit değerlerinin (75 µg/kg) altındadır.

Elde edilen bulgulara göre aşağıdaki sonuçlara varılmıştır;

- İncelenen örneklerde toksijenik küflerin varlığı ve tespit edilen mikotoksin düzeyleri, tahıl unlarında ve farklı gıdalar arasında mikotoksin farkındalık yaratma programlarında ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Mikotoksijenik küflerin neden olduğu gıdalarda ve yemlerde toksikolojik riski doğru bir şekilde değerlendirmek için moleküler ve biyokimyasal yöntemlerin bir kombinasyonu gereklidir. Moleküler tekniğin uygulanmasının toksikolojik küflerin insan ve hayvan sağlığına zararlı etkileri riskinin azaltılmasına yardımcı olmak için hızlı, oldukça spesifik bir yöntem olduğu görülmektedir.
- Bu çalışmada gıdalarda mikotoksin üretim potansiyeline sahip küflerin kapsamlı bir şekilde belirlenmesiyle gerek bu küflerin bulaşmasının engellenmesi gerekse bulaştıktan sonra mikotoksin üretimini minimize etmeye yönelik uygulamalar için gerekli stratejileri oluşturmaya yönelik önemli bilgiler sağlamaktadır.
- Küf ve mikotoksinlerle kontamine tahıl ve tahıl ürünlerinde, bulaşının hasat öncesi, hasat sırası ve hasat sonrası aşamalarda önlenmesi risk yönetim çalışmalarında kaçınılmaz uygulamalardır. Bu uygulamaların sağlanmasında HACCP ve Engeller Teknolojisi Sistemini esas alan kontaminasyonu kontrol işlemleri tüketici sağlığını ve gıda güvenliğini sağlamak üzere temel bir zorunluluk olarak görülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abbès, S., Salah-Abbès, J. B., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., Oueslati, R.,** (2006): *Preventive role of phyllosilicate clay on the immunological and biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice*. International immunopharmacology, 6(8), 1251-1258.
- Akdeniz, A. S., Özden, S., Alpertunga, B.,** (2013): *Ochratoxin A in dried grapes and grape-derived products in Turkey*. Food Additives & Contaminants: Part B, 6(4), 265-269.
- Altan, A.,** (1986): Tahıl İşleme Teknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi, Adana.
- Alshannaq, A., Yu, J. H.,** (2017): *Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food*. International journal of environmental research and public health, 14(6), 632.
- Anklam, E., Battaglia, R.,** (2001): *Food analysis and consumer protection*. Trends in Food Science & Technology, 12(5-6), 197-202.
- Anli, E., Alkis, İ. M.,** (2010): *Ochratoxin A and brewing technology: a review*. Journal of the Institute of Brewing, 116(1), 23-32.
- Anonim,** (2012c): The *Aspergillus* Web Site.
- Anonim,** (2006): Commission of the European Communities (2006) Commission Regulation (EC) No 776/2006 of 23 May 2006 amending Annex VII to Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council as regards Community reference laboratories. Official Journal of the European Union L136, pp 3-8
- Anonim,** (2015): *Mycotoxins, Ochratoxin A*. Chapter 5: 39-71.
- AOAC International,** (2005): Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edn. AOAC International, Gaithersburg, USA.
- Applebaum, R. S., Marth, E. H.,** (1982): *Inactivation of aflatoxin M1 in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase*. Journal of food protection, 45(6), 557-560.
- Arda, Ş., Aydın, A.,** (2011): *Hammadde Kalitesi ile Bazı Hijyen Parametrelerinin Yufkanın Mikrobiyolojik Kalitesi Arasındaki İlişki Üzerine Bir Araştırma*. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 37(2), 135-147.
- Artık, N.,** (2007): *Gıda Mikotoksinleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi*. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı, Gıda Serisi, (6).
- Atkins, S. D., Clark, I. M.,** (2004): *Fungal molecular diagnostics: a mini review*. J Appl Genet, 45(1), 3-15.
- Aydin, A., Gunsen, U., Demirel, S.,** (2008): *Total aflatoxin, aflatoxin B1 and ochratoxin A levels in Turkish wheat flour*. Journal of Food and Drug Analysis, 16(2).

- Aydın, A., Paulsen, P., Smulders, F. J. M.,** (2009): *The physico-chemical and microbiological properties of wheat flour in Thrace*. Turk J Agric For 33.2009: 445-454.
- Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T., Lebrihi, A.** (2009): *Aspergillus westerdijkiae polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A*. Fungal Genetics and Biology, 46(1), 77-84.
- Bankole, S. A., Adebajo, A.,** (2003): *Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it*. African journal of Biotechnology, 2(9), 254-263.
- Barkai-Golan, R., Paster, N.,** (2008): *Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part I*. World Mycotoxin Journal, 1(2), 147-159.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B.,** (1998): *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota. The American Phytopathological Society, 200.
- Baydar, T., Engin, A. B., Girgin, G., Aydın, S., Sahin, G.,** (2005): *Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey*. Annals of agricultural and environmental medicine, 12(2), 193-197.
- Bennett, J. W., Klich, M.,** (2003): *Mycotoxins*. Clin Microbiol Rev, 16(497.516).
- Bisogno, F., Mascoti, L., Sanchez, C., Garibotto, F., Giannini, F., Kurina-Sanz, M., Enriz, R.,** (2007): *Structure– antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives*. Journal of agricultural and food chemistry, 55(26), 10635-10640.
- Bhatnagar, D., Cary, J. W., Ehrlich, K., Yu, J., Cleveland, T. E.,** (2006): *Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and Aspergillus flavus development*. Mycopathologia, 162(3), 155.
- Blesa, J., Moltó, J. C., El Akhdari, S., Mañes, J., Zinedine, A.,** (2014): *Simultaneous determination of Fusarium mycotoxins in wheat grain from Morocco by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*. Food Control, 46, 1-5.
- Bozoğlu, F.,** (2003): *Mikotoksinlerin oluşum mekanizması*. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003; İstanbul, 17-22.
- Bräse, S., Encinas, A., Keck, J., Nising, C. F.,** (2009): *Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites*. Chemical reviews, 109(9), 3903-3990.
- Brera, C., Pannunzi, E., Guarino, C., Debegnach, F., Gregori, E., De Santis, B.,** (2014): *Ochratoxin A determination in cured ham by high performance liquid chromatography fluorescence detection and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: a comparative study*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37(14), 2036-2045.
- Bretz, M., Beyer M., Cramer, B., Knecht, A., Humpf, H. U.,** (2006): *Thermal degradation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol*, J Agric Food Chem, 54(17), 6445-51.
- Bullerman, L. B.,** (1979): *Significance of mycotoxins to food safety and human health*. Journal of Food Protection, 42(1), 65-86.
- Cengiz, M., Oruç, H. H., Uzunoğlu, İ., Sonal, S.,** (2007): *Ochratoxin A levels in different types of bread and flour (farklı tip ekmek ve unlarda*

- okaratoksin A düzeyleri*). Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 26(1-2), 7-10.
- Chaturvedi, N., Sharma, P., Shukla, K., Singh, R., Yadav, S.,** (2011): *Cereals nutraceuticals, health ennoblement and diseases obviation: a comprehensive review*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(7), 6-12.
- Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-Abadi, S., Hashemi, T.,** (2007): *Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts*. Food and Chemical Toxicology, 45(5), 812-816.
- Covarelli, L., Beccari, G., Salvi, S.,** (2011): *Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy*. Food and Chemical Toxicology, 49(9), 2365-2369.
- Covarelli, L., Beccari, G., Marini, A., Tosi, L.,** (2012): *A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area*. Food Control, 26(2), 347-356.
- Creppy, E. E.,** (2002): *Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe*. Toxicology letters, 127(1-3), 19-28.
- Cullen, J. M., Newberne, P. M.,** (1994): *Acute hepatotoxicity of aflatoxins*. In The toxicology of aflatoxins (pp. 3-26). Academic Press.
- Čonková, E., Laciakova, A., Kováč, G., Seidel, H.,** (2003): *Fusarial toxins and their role in animal diseases*. The veterinary journal, 165(3), 214-220.
- Çelik, C.,** (2008): *Adana'da bazı marketlerde satışa sunulan çekirdeksiz kuru üzümelerde okratoksin A varlığının HPLC yöntemi ile araştırılması*. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye.
- Dao, H. P., Mathieu, F., Lebrihi, A.,** (2005): *Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method*. International Journal of Food Microbiology, 104(1), 61-67.
- Deshpande, S. S.,** (2002): *Handbook of food toxicology*. CRC Press.
- Desjardins, A. E.,** (2006): *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. American Phytopathological Society (APS Press).
- D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C.,** (1997): *Mycotoxins*, A. Feed Sci. Technol, 69, 155-166.
- Doolotkeldieva, T.D.,** (2010): *Microbiological control of flour-manufacture: dissemination of mycotoxins producing fungi in cereal products*, Microbiology Insights, 3, 1-15.
- Döll, S., Dänicke, S.,** (2011): *The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding*. Preventive veterinary medicine, 102(2), 132-145.
- Duran, R. M., Cary, J. W., Calvo, A. M.,** (2009): *The role of veA in Aspergillus flavus infection of peanut, corn and cotton*.
- Duru, S., Özgüneş, H.,** (1984): *Mikotoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Açısından Önemi*. GIDA, 9(6).
- Dwayne, J., Thraser, D.,** (2011): *Poison of the month. Aflatoxins and aflatoxicosis*.



- Edwards, S. G., O'callaghan, J., Dobson, A. D.,** (2002): *PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi*. Mycological Research, 106(9), 1005-1025.
- Edwards, S. G.,** (2009): *Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional wheat*. Food Additives and Contaminants, 26(4), 496-506.
- EFSA, S.,** (2004): *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed*. EFSA J, 73, 1-42.
- EFSA,** (2011): *Panel on Contaminants in the Food Chain Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food*. EFSA Journal, 9(6), 2197.
- El-Hamaky, A. M., Hassan, A. A., El Yazeed, H. A., Refai, M. K.** (2016): *Prevalence and Detection of Toxigenic A. flavus, A. niger and A. ochraceus by traditional and molecular biology methods in feeds*. International Journal of Current Research, 8(1), 25621-25633.
- Ergönül, B.,** (2007): *Ekmek üretiminde kritik kontrol ve kalite kontrol noktalarının belirlenmesi*, Dünya Gıda, 10, 26-30.
- European Commission,** (2006): *Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs*. Off J Eur Union, 70, 12-34.
- EU RASFF Portal,** 2019: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff/window/portal/?event=notificationsList&StartRow=1>
- Fink-Gremmels, J.,** (2008): *The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows*. The Veterinary Journal, 176(1), 84-92.
- Gallo, A., Knox, B. P., Bruno, K. S., Solfrizzo, M., Baker, S. E., Perrone, G.,** (2014): *Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in Aspergillus carbonarius*. International journal of food microbiology, 179, 10-17.
- Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A. D., Mulè, G.,** (2009): *Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius*. International journal of food microbiology, 129(1), 8-15.
- Gao, F., Jiang, L. P., Chen, M., Geng, C. Y., Yang, G., Ji, F., Liu, X. F.,** (2013): *Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell line*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 755(1), 6-10.
- Gilbert, J., Anklam, E.,** (2002): *Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs*. Trac-Trend Anal. Chem, 21, 468-486. [CrossRef]
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T., Patiño, B.** (2009): *Discrimination of the main Ochratoxin A-producing species in Aspergillus section Circumdati by specific PCR assays*. International journal of food microbiology, 136(1), 83-87.
- Girgin, G., Başaran, N., Şahin, G.,** (2001): *Mycotoxins in turkey and the world*. Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology, 58(3), 97-118.

- González-Jaén, M. T., Mirete, S., Patiño, B., López-Errasquín, E., Vazquez, C.,** (2004): *Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of Fusarium verticillioides*. European Journal of Plant Pathology, 110(5-6), 525-532.
- González-Osnaya, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Mañes, J.,** (2007): *Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread*. International journal of food microbiology, 118(1), 87-91.
- Gumus, T., Arici, M., Demirci, M.,** (2004): *A survey of barley, malt and beer contamination with ochratoxin A in Turkey*. Journal of the Institute of Brewing, 110(2), 146-149.
- Günşen, U., Büyükyörük, İ.,** (2003): *Piyasadan temin edilen taze kaşar peynirlerinin bakteriyolojik kaliteleri ile aflatoksin M1 düzeylerinin belirlenmesi*. Turk J Vet. Anim Sci, 27, 821-825.
- Gürses, M., Erdoğan, A., Çetin, B.,** (2004): *Occurrence of Aflatoxin M1 in some cheese types sold in Erzurum, Turkey*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28(3), 527-530.
- Gürsoy, N., Biçici, M.,** (2004): *A review on current situation of toxigenic fungi and mycotoxins formation in Turkey*. In An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe (pp. 237-246). Springer, Dordrecht.
- Hart, L. P., Braselton Jr, W. E.,** (1983): *Distribution of vomitoxin in dry milled fractions of wheat infected with Gibberella zeae*. Journal of agricultural and food chemistry, 31(3), 657-659.
- Hasenekoglu, I.,** (1991): *Toprak mikrofungusları*. Atatürk Üniv. Yay, 7(689).
- Helferich, W., Winter, C. K.,** (2000): *Food toxicology*. CRC press.
- Henry, T., Iwen, P. C., Hinrichs, S. H.,** (2000): *Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2*. Journal of Clinical Microbiology, 38(4), 1510-1515.
- Heperkan, D., Dazkır, G. S., Kansu, D. Z., Karbancıoğlu, Güler, F.,** (2009): *Influence of temperature on citrinin accumulation by Penicillium citrinum and Penicillium verrucosum in black table olives*. Toxin Reviews, 28(2-3), 180-186.
- Heperkan, D., Moretti, A., Dikmen, C. D., Logrieco, A. F.,** (2012): *Toxigenic fungi and mycotoxin associated with figs in the Mediterranean area*. Phytopathologia Mediterranea, 119-130.
- Hussein, H. S., Brasel, J. M.,** (2001): *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology, 167(2), 101-134.
- Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E., Lizarraga, E., De Cerain, A. L.,** (2012): *Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain*. Food chemistry, 132(1), 35-42.
- Ibáñez-Vea, M., Martínez, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., de Cerain, A. L.,** (2011): *Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market*. Food Control, 22(12), 1949-1955.
- International Agency for Research on Cancer.,** (2016): *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: list of classifications, volumes 1-116*. International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon, France.

- ISO 7954**, (1987): Microbiology general-guidance for enumeration of yeasts and moulds-colony count technique at 25° C.
- Jiao, Y., Blaas, W., Rühl, C., Weber, R.**, (1994): *Ochratoxin A in foodstuffs (vegetables, cereals, cereal products and beer)*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau (Germany).
- Josephs, R. D., Krska, R., MacDonald, S., Wilson, P., Pettersson, H.**, (2004): *Production of a calibrant certified reference material for determination of the estrogenic mycotoxin zearalenone*. Analytical and bioanalytical chemistry, 378(5), 1182-1189.
- Juan, C., Moltó, J. C., Lino, C. M., Mañes, J.**, (2008): *Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal*. Food chemistry, 107(1), 525-530.
- Karadeniz, F., Ekşi, A.**, (2002): *Gıdalarda mikotoksin oluşumu ve azaltılması*. Dünya Gıda Dergisi, 4, 104-105.
- Karagözlü, N., Karapınar, M.**, (2000): *Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin A ve Fungal Kontaminasyon*. Turk J Biol 24 561–572.
- Kaushik, G.**, (2015): *Effect of processing on mycotoxin content in grains*. Critical reviews in food science and nutrition, 55(12), 1672-1683.
- Kınacı, E. K. G., Alp, M. B. A., Kutlu, İ.** *Serin İklim Tahılları Üretimine Artırılması Olanakları*.  
[http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/582ac40970f9885\\_ek.pdf](http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/582ac40970f9885_ek.pdf)
- Kim, D. M., Chung, S. H., Chun, H. S.**, (2011): *Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic fungi in meju, a Korean fermented soybean food starter*. Food microbiology, 28(7), 1402-1408.
- Klaassen, C. D., Amdur, M. O.**, (Eds.) (2013): *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons (Vol. 1236, p. 189)*. New York: McGraw-Hill.
- Klich, M.**, (2002): *Identification of common Aspergillus species (p. 116)*. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures.
- Klich M.**, (2003): *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Reviews, 16, 497-516.
- Kočube, Š., Varga, J., Sigeti, Đ., Baranji, N., Šuri, K., Tot, B., Mešterhazi, A.**, (2013): *Aspergillus species as mycotoxin producers in agricultural products in central Europe*. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, (124), 13-25.
- Köksal, O.**, (1974): *National nutrition-health and food consumption survey of Turkey*. Unicef, Ankara.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I.**, (2010): *Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations*. Applied microbiology and biotechnology, 86(6), 1595-1612.
- Krska, R., Baumgartner, S., Josephs, R.**, (2001): *The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals*. Fresenius' J. Anal. Chem, 371, 285–299. [CrossRef]
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P., Watanabe, H.**, (1987): *Risk assessment of the mycotoxin zearalenone*. Regulatory toxicology and pharmacology, 7(3), 253-306.

- Kumar, R., Ansari, K. M., Saxena, N., Dwivedi, P. D., Jain, S. K., Das, M.,** (2012): *Detection of ochratoxin A in wheat samples in different regions of India*. Food control, 26(1), 63-67.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pedersen, J.,** (1997): *Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction*. British Journal of Dermatology, 137(3), 351-355.
- Luque, M. I., Córdoba, J. J., Rodríguez, A., Núñez, F., Andrade, M. J.** (2013): *Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products*. Food control, 29(1), 270-278.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D.,** (2011): *Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest*. Plant Pathol. 2011: 1, 150–163. [CrossRef].
- Mankevičienė, A., Butkutė, B., Gaurilčikienė, I., Dabkevičius, Z., Supronienė, S.,** (2011): *Risk assessment of Fusarium mycotoxins in Lithuanian small cereal grains*. Food Control, 22(6), 970-976.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V.,** (2013): *Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment*. Food and chemical toxicology, 60, 218-237.
- Martos, P., Thompson, W., Diaz, G.,** (2010): *Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. World Mycotoxin Journal, 3(3), 205-223.
- Massart, F., Saggese, G.,** (2010): *Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development*. International journal of andrology, 33(2), 369-376.
- Midura, T. F., Bryant, R. G.,** (2001): *Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis*. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. Washington (DC): American Public Health Association.
- Milani, J. M.,** (2013): *Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review*. Veterinarni Medicina, 58(8).
- Miraglia, M., Brera, C.,** (2000): *Mycotoxins in grains and related products*. In "Food Analysis by HPLC". 2nd ed. pp. 2000:493-522. Leo. M. L. Nollet ed. Marcel Dekker Inc. New York, U. S. A.
- Miran, B., Atiş, E., Bektaş, Z., Salalı, E., Cankurt, M.,** (2013): *An analysis of international raisin trade: A gravity model approach* (No. 424-2016-27084).
- Miller, J. D., ApSimon, J. W., Blackwell, B. A., Greenhalgh, R., Taylor, A.,** (2001): *Deoxynivalenol: A 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance*. Fusarium–Paul E. Nelson Memorial Symposium (Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D., Bryden WL, Burgess, LW, eds.).
- Moslem, M. A., Mashraqi, A., Abd-Elsalam, K. A., Bahkali, A. H., Elnagaer, M. A.** (2010): *Molecular detection of ochratoxigenic Aspergillus species isolated from coffee beans in Saudi Arabia*. Genetics and Molecular Research, 9(4), 2292-2299.
- Nguyen, K. T. N., Ryu, D.,** (2014): *Concentration of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States*. Food Control, 40, 140-144.

- Oruç, H. H.**, (2005): *Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri*, Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med, 24(1-2-3-4): 105-110.
- Ozden, S., Akdeniz, A. S., Alpertunga, B.**, (2012): *Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey*. Food Control, 25(1), 69-74.
- Öksüztepe, G., Erkan, S.**, (2016): *Mikotoksinler ve Halk Sağlığı Açısından Önemi*. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 5(2), 190-195.
- Öziç, R.**, (2011): *Çeşitli tahıl unlarındaki mikotoksijenik fungusların tanımlanarak temel mikotoksin potansiyellerinin araştırılması*.
- Özkaya, Ş., Temiz, A.**, (2003): *Aflatoksinler: kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları*. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(01), 1-2.
- Özturan, K., Ünsal, C., Karakaya, Y., Atasever, M., Ceylan, Z. G., Atasever, M. A., Demirkaya, A. K.**, (2007): *Erzurum'da Tüketime Sunulan Buğday Unlarının Toplam Aflatoksin, Aflatoksin. B1 ve Okratoksin A Yönünden İncelenmesi*. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 2(4), 172-176.
- Palumbo, J. D., O'Keeffe, T. L., Mahoney, N. E.**, (2007): *Inhibition of ochratoxin A production and growth of Aspergillus species by phenolic antioxidant compounds*. Mycopathologia, 164(5), 241-248.
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., Pavlović, M.**, (1999): *Toxic effects of mycotoxins in humans*. Bulletin of the World Health Organization, 77(9), 754-766.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., Cunha, S. C.**, (2014): *Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis*. Trends in Food Science & Technology, 36(2), 96-136.
- Perši, N., Pleadin, J., Kovačević, D., Scortichini, G., Milone, S.**, (2014): *Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs*. Meat science, 96(1), 203-210.
- Pestka, J. J., Smolinski, A. T.**, (2005): *Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 8(1), 39-69.
- Pettersson, H.**, (2004): *Controlling mycotoxins in animal feed*. Mycotoxins in food: Detection and control, 262-304.
- Pitt, J. I.**, (2000): *A laboratory guide to common Penicillium species*. 197 pp. Food Science Australia, NSW, Australia.
- Potipun, J., Ruaylarb, W., Nilthong, R., Owatworakit, A.** (2018): *Quantification of Ochratoxin A-Producing Fungi in Coffee Products Using Quantitative PCR*.
- Potus, J., Suchet, P.**, (1989): *Les problemes de microbiologie en meunerie*. Industries des Cereales 58: 27-33.
- Prickett, A. J., MacDonald, S., Wildey, K. B.**, (2000): *Survey of mycotoxins in stored grain from the 1999 harvest in the UK*. HGCA Project report.
- Puntarić, D., Bošnjir, J., Šmit, Z., Škes, I., Baklaić, Z.**, (2001): *Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy*. Croat. Med. J, 42, 175-180.
- Reddy, K. R. N., Salleh, B.**, (2011): *Co-occurrence of moulds and mycotoxins in corn grains used for animal feeds in Malaysia*. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10(5), 668-673.

- da Rocha, M. E. B., Freire, F. D. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., Rondina, D.,** (2014): *Mycotoxins and their effects on human and animal health*. Food Control, 36(1), 159-165.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., 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(2), 187-193.
- Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J. C., Berrada, H., Mañes, J.,** (2014): *A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC–MS/MS*. Food chemistry, 146, 212-219.
- Sadhasivam, S., Britzi, M., Zakin, V., Kostyukovsky, M., Trostanetsky, A., Quinn, E., Sionov, E.,** (2017): *Rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain*. Toxins, 9(10), 302.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C.,** (2004): *Introduction to food- and airborne fungi (No. Ed. 7)*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Samson, R. A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., Andersen, B.,** (2010): *Food and indoor fungi*. CBS laboratory manual series 2. Utrecht: CBS-Fungal Biodiversity Centre.
- Samson, R. A., Varga, J.,** (Eds.) (2007): *Aspergillus systematics in the genomic era (No. 59)*. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Scheidegger, K. A., Payne, G. A.,** (2003): *Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of Aspergillus flavus from pathogenicity to functional genomics*. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 22(2-3), 423-459.
- Scientific Committee on Food.,** (2002): *Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol in European Commission Health & Consumer Protection Directorate—General Directorate C—Scientific Opinions C2—Management of scientific committees; Scientific co-operation and networks, 1-12*.
- Sevikturk, M., Gonulalan, Z.,** (2007): *The quantities of ochratoxin A of some cereal products consumed in Kayseri*. J Health Sci, 16, 86-90.
- Shanahan, J. F., Brown, W. M., Blunt, T. D., Croissant, R. L.,** (2003): *Aflatoxins*. Service in action; no. 0.306.
- Sherif, S. O., Salama, E. E., Abdel-Wahhab, M. A.,** (2009): *Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment*. International journal of hygiene and environmental health, 212(4), 347-368.
- Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Goulden, M. L.,** (1969): *Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample*. Applied microbiology, 17(5), 765.
- Smith, J. E., Moss, M. O.,** (1985): *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. John Wiley and Sons. New York. 146 p.
- Soleimany, F., Jinap, S., Rahmani, A., Khatib, A.,** (2011): *Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system*. Food Addit. Contam, 28, 494–501. [CrossRef] [PubMed]

- Sørensen, L. M., Mogensen, J., Nielsen, K. F.,** (2010): *Simultaneous determination of ochratoxin A, mycophenolic acid and fumonisin B 2 in meat products*. Analytical and bioanalytical chemistry, 398(3), 1535-1542.
- Stanciu, O., Juan, C., Miere, D., Loghin, F., Mañes, J.,** (2017): *Occurrence and co-occurrence of Fusarium mycotoxins in wheat grains and wheat flour from Romania*. Food Control, 73, 147-155.
- Steyn, P. S., Stander, M. A.,** (1999): *Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins and fumonisins*. General and Applied Toxicology. 2nd Edition. United Kingdom: Macmillan Reference Ltd, 2145-76.
- Stoloff, L.,** (1980): *Aflatoxin M in perspective*. Journal of Food protection, 43(3), 226-230.
- Sweeney, M. J., Dobson, A. D. W.,** (1998): *Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species*, Int J Food Microbiol, 43, 141-158.
- Taheri, N., Semnani, S., Roshandel, G., Namjoo, M., Keshavarzian, H., Chogan, A. G., Joshaghani, H.,** (2012): *Aflatoxin contamination in wheat flour samples from Golestan Province, Northeast of Iran*. Iranian journal of public health, 41(9), 42.
- Taydaş, E.,** (2006): *Aflatoksinlerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri*. 2006, <http://www.ordutarim.gov.tr/subeler/kontrol/aflatoksin/insan%20sag%20etkisi.htm>
- Tolosa, J., Graziani, G., Gaspari, A., Chianese, D., Ferrer, E., Mañes, J., Ritieni, A.,** (2017): *Multi-mycotoxin analysis in durum wheat pasta by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry*. Toxins, 9(2), 59.
- Topal, S.,** (1993): *Gıdalarda küf kontaminasyon riskleri ve önlemleri*. Tübitak Marmara Yay Kocaeli, 124, 174-187.
- Topal, Ş.,** (2003): *Türkiye'nin tarımsal ürün ve bölgelerine göre dominant mikroflora dağılımları ve mikotoksin profilleri*, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1, 7-21.
- Tunail, N.,** (2000): *Funguslar ve Mikotoksinler*, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara, 522, 03.
- Tunail, N.,** (2000): *Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar*, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Udagawa, S.,** (1988): *Mycotoxicoses: The present problems and prevention of mycotoxins*. Asian Medical Journal, 31(11), 599-604.
- Van Egmond, H. P.,** (1989): *Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis*. Food Additives & Contaminants, 6(2), 139-188.
- Veldman, B.,** (2004, February): *Mycotoxins in the animal production chain*. In Meeting the Mycotoxin Menace (pp. 275-280). Wageningen Academic Pub.

- Vesonder, R. F., Hesseltine, C. W.,** (1980): *Vomitoxin: natural occurrence on cereal grains and significance as a refusal and emetic factor to swine.*
- Vidal, A., Marín, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V.,** (2013): *Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market.* Food and Chemical Toxicology, 53, 133-138.
- Wagacha, J. M., Muthomi, J. W.,** (2008): *Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies.* International journal of food microbiology, 124(1), 1-12.
- Wang, M., Jiang, N., Xian, H., Wei, D. Z., Shi, L., Feng, X.Y. A.,** (2016): *Single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.* J. Chromatogr, 1429, 22–29. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Liu, Y.,** (2016): *Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms.* Toxins, 8(3), 83.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J.,** (1990): *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.* PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., Aggarwal, D.,** (2004): *Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions.* The American journal of clinical nutrition, 80(5), 1106-1122.
- World Health Organization & International Agency for Research on Cancer.,** (1993): *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.* IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 56.
- Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X., Zhang, H.,** (2011): *Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China.* Food Control, 22(11), 1723-1728.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C., Manes, J.,** (2007): *Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin.* Food and chemical toxicology, 45(1), 1-18.



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı-Soyadı:** Kadriye TÜRKEŞSİZ  
**Doğum Tarihi ve Yeri:** 20 Ocak 1986; Afyonkarahisar  
**E-posta:** kadriye\_86@hotmail.com

### **ÖĞRENİM DURUMU:**

**Doktora:** 2011-2020, İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 34295-İstanbul-TÜRKİYE.

**Lisans:** 2005-2010 Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 32260-Isparta-TÜRKİYE.

Lisans derecesini Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği dalında 2010 yılında almıştır. İstanbul Aydın Üniversitesi 2011 yılında Gıda Mühendisliği Doktora programına başlamıştır. İyi seviyede İngilizce bilen Kadriye TÜRKEŞSİZ, gıda sektöründe üretim ve kalite mühendisi, sorumlu yönetici ve iş güvenliği uzmanlığı gibi çeşitli pozisyonlarda çalışmıştır.

### **SERTİFİKALAR:**

**C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı (2013 Mayıs)**  
**ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi**  
**ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi**