

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA VE YEM ANALİZLERİNDE KULLANILAN BAZI ANALİTİK
MİKOTOKSİN STANDARTLARININ ÜRETİMİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ

Hüseyin KARAKAYA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat YILMAZTEKİN

ARALIK 2022

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA VE YEM ANALİZLERİNDE KULLANILAN BAZI ANALİTİK
MİKOTOKSİN STANDARTLARININ ÜRETİMİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ

**Hüseyin KARAKAYA
(23617200101)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat YILMAZTEKİN

ARALIK 2022

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen; bilgi ve tecrübeleriyle çalışma boyunca beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Murat YILMAZTEKİN'e,

Analizlerin yürütülmesinde tecrübe ve birikimleriyle yol gösteren Prof. Dr. Bülent KABAK, Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Yasin ALTAY'a,

Laboratuvar imkanlarını benden esirgemeyerek çalışmalarımı kolaylaştıran Doç. Dr. İncilay GÖKBULUT ve Sn. Hikmet Tuğrul TEKELİ'ye,

Referans küf kültürlerinin temininde verdikleri büyük destekten ötürü Prof. Dr. Mustafa GÜRSES, Doç. Dr. Emre YÖRÜK, Doç. Dr. Hakan KARACA'ya,

Çalışma kapsamında kullanılan gıda numunelerinin tedarik sürecinde yardımcı olan Adana İl Kontrol Laboratuvarı, Aydın İncir Araştırma Enstitüsü ve Aydın Ticaret Borsası Laboratuvarı ile Sn. Yaşar DAĞTEKİN, Sn. Ali YAVUZ ve Sn. Osman AKIN'a,

Bu çalışmanın yürütülebilmesi için 1200978 proje numarası ile maddi olanak sağlayan TÜBİTAK'a,

Yine çalışmanın yürütülebilmesinde FDK-2020-2137 proje numarası (lisansüstü tez projesi) ve FDP-2021-2456 proje numarası (dış kaynaklı) ile maddi destek veren İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine,

Hayata her daim umutla bakma sebebim olan ve bana mücadele gücü veren annem Sevgül KARAKAYA, babam Mestan KARAKAYA ve kardeşim Tuncer KARAKAYA'ya

en içten duygularıyla teşekkür ederim.
Hüseyin KARAKAYA

ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum "Gıda ve Yem Analizlerinde Kullanılan Bazı Analitik Mikotoksin Standartlarının Üretimi Üzerine Araştırmalar" başlıklı bu çalışmasının bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakça da yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Hüseyin KARAKAYA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Arka Planı	1
1.2 Sorunun Tanımlanması	2
1.3 Amaç ve Kapsam	2
1.4 Öngörülen Yaygın Etki.....	3
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1 Mikotoksinler.....	5
2.1.1 Aflatoksinler	8
2.1.2 Okratoksin A	10
2.1.3 Deoksinivalenol	12
2.1.4 Zearalenon	13
2.2 Funguslarda Mikotoksin Üretimi.....	14
2.2.1 Mikotoksin üretiminin nedenleri	14
2.2.2 Mikotoksin oluşumu üzerine etkili faktörler	15
2.3 Mikotoksin Zararının Ekonomik Boyutu.....	16
2.4 Türkiye'deki Mikotoksin Tehlikesine İlişkin Görünüm	18
2.4.1 Yerli ürünlerde mikotoksin bulunuşu	18
2.4.2 Toplum sağlığı açısından mikotoksinler	21
2.5 Yasal Düzenlemeler ve Mikotoksin Analizleri.....	23
2.6 Sinopsis: Mikotoksin Araştırmalarının Dünü, Bugünü ve Yarını	24
2.6.1 Geçmişten günümüze mikotoksinler	24
2.6.2 Geleceğe yönelik beklentiler	25
2.6.3 Muhtemel fırsatlar	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1 Materyal.....	31
3.1.1 Gıda örnekleri	31
3.1.2 Besiyerleri.....	32
3.1.3 Kimyasallar.....	34
3.1.4 Affinite kolon ve tampon çözeltiler.....	34
3.1.5 Referans küf suşları	35
3.2 Küf İzolasyonu.....	35
3.2.1 Doğrudan yapıştırma yöntemi	35
3.2.2 Dilüsyon-yayma yöntemi	36
3.2.3 İnkübasyon ve izolasyon	37
3.3 Tanımlama	37
3.3.1 Gelişim ortamında morfolojik değerlendirme	37
3.3.2 Mikroskopik morfolojinin incelenmesi	37
3.3.3 Seçici-ayırt edici besi ortamında tanımlama	39
3.2.4 Moleküler dizileme ve filogenetik analizler	40
3.2.4.1 DNA izolasyonu ve PCR.....	40

3.2.4.2 Sanger dizileme ve tanımlama.....	41
3.2.4.3 Filogenetik analizler	41
3.4 Mikotoksin Analizleri	42
3.4.1 Aşılama kültürünün hazırlanması ve inokülasyon	42
3.4.2 Ekstraksiyon	43
3.4.2.1 Aflatoksin ekstraksiyonu	43
3.4.2.2 Okratoksin A ekstraksiyonu	44
3.4.2.3 Deoksinivalenol ekstraksiyonu.....	44
3.4.2.4 Zearalenon ekstraksiyonu	45
3.4.3 HPLC analizleri	46
3.4.3.1 Aflatoksin analizi.....	46
3.4.3.2 Okratoksin A analizi	46
3.4.3.3 Deoksinivalenol analizi	47
3.4.3.4 Zearalenon analizi	47
3.4.3.5 Metot validasyonu	47
3.5 Optimizasyon Çalışması ve Üretim	48
3.5.1 Mikotoksin üretiminin optimizasyonu	48
3.5.2 Optimize koşullarda aflatoksin üretimi	49
3.5.3 Optimize koşullarda zearalenon üretimi.....	49
3.6 Saflaştırma ve Doğrulama	50
3.6.1 Aflatoksinlerin ekstraksiyonu.....	50
3.6.2 Zearalenon ekstraksiyonu	50
3.6.3 Saflaştırma işlemi	51
3.6.4 Saflık değerlerinin belirlenmesi	51
3.6.5 Doğrulama analizleri	51
3.7 İstatistiksel Analizler	52
3.8 Güvenlik Tedbirleri	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	54
4.1 İzolasyon Sonuçları	54
4.2 İzolatların Tanımlanması	56
4.2.1 Gelişim ortamında koloni morfolojisine ilişkin bulgular	56
4.2.1.1 <i>Aspergillus</i> spp. şüpheli izolatların makroskopik morfolojisi	56
4.2.1.2 <i>Penicillium</i> spp. şüpheli izolatların makroskopik morfolojisi	59
4.2.1.3 <i>Fusarium</i> spp. şüpheli izolatların makroskopik morfolojisi	60
4.2.1.4 Makroskopik morfolojiye ilişkin genel değerlendirme	61
4.2.2 Mikroskopik morfolojiye ilişkin bulgular	64
4.2.2.1 <i>Aspergillus</i> spp. şüpheli izolatların mikroskopik incelemesi.....	64
4.2.2.2 <i>Penicillium</i> spp. şüpheli izolatların mikroskopik incelemesi	66
4.2.2.3 <i>Fusarium</i> spp. şüpheli izolatların mikroskopik incelemesi	68
4.2.2.4 Mikroskopik incelemeye ilişkin genel değerlendirme.....	71
4.2.3 Seçici-ayırt edici besi ortamında gelişim özellikleri	73
4.2.3.1 <i>Aspergillus</i> sc. Flavi üyelerinin spesifik besi ortamlarında incelenmesi.....	73
4.2.3.2 <i>Penicillium</i> türlerinin spesifik besi ortamlarında incelenmesi	77
4.2.3.3 <i>Fusarium</i> türlerinin spesifik besi ortamlarında incelenmesi	78
4.2.4 Moleküler analiz sonuçları	79
4.2.4.1 ITS dizi sonuçlarının değerlendirmesi.....	79
4.2.4.2 İzolatların filogenetik ilişkisi.....	80
4.3 Metot Performans Kriterleri	83
4.3.1 Aflatoksin metot validasyonu	83
4.3.2 Okratoksin A metot validasyonu	85

4.3.3 Deoksinivalenol metot validasyonu	85
4.3.4 Zearalenon metot validasyonu.....	85
4.4 Mikotoksijenik İzolatların Tespiti	86
4.4.1 Aflatoksijenik izolatların belirlenmesi	86
4.4.2 Okratoksijenik izolatların tespiti	88
4.4.3 Deoksinivalenol ve zearalenon üreticisi izolatların tespiti	89
4.5 Mikotoksin Üretiminin Optimizasyonu	89
4.5.1 Aflatoksin üretiminin optimizasyonu	89
4.5.1.1 Aflatoksin B ₁ üretimi üzerine istatistiksel değerlendirmeler.....	91
4.5.1.2 Aflatoksin B ₂ üretimi üzerine istatistiksel değerlendirmeler.....	94
4.5.1.3 Aflatoksin üretiminde optimum koşullar.....	96
4.5.1.4 Gelişim koşullarının aflatoksin üretimi üzerine etkisi.....	97
4.5.2 Zearalenon üretiminin optimizasyonu	103
4.5.2.1 Zearalenon üretimi üzerine istatistiksel değerlendirmeler.....	103
4.5.2.2 Gelişim koşullarının zearalenon üretimi üzerine etkisi	106
4.6 Mikotoksin Üretimi	110
4.6.1 Optimum koşullarda aflatoksin üretimi.....	110
4.6.2 Yüksek hacimli aflatoksin üretimi.....	112
4.6.3 Optimum koşullarda zearalenon üretimi	115
4.6.4 Yüksek hacimli zearalenon üretimi	116
4.7 Mikotoksin Saflaştırması ve Doğrulama	118
4.7.1 Yarı-preparatif sistemde aflatoksinlerin ayrıştırılması	118
4.7.2 Yarı-preparatif sistemde zearalenonun ayrıştırılması.....	121
4.7.3 Fraksiyonların doğrulanması	122
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	124
KAYNAKLAR.....	128
EKLER	144
ÖZGEÇMİŞ	150

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 :	2011-2020 yılları arasında toplam mikotoksin (Tm) ve aflatoksin (Af) bildirimlerinde en fazla bildirim alan 5 menşei ülke.....	20
Çizelge 2.2 :	Bazı analitik mikotoksin standartlarının güncel piyasa fiyatları.....	28
Çizelge 3.1 :	İzolasyonda kullanılan gıda örnekleri ve üretim yerleri.....	31
Çizelge 3.2 :	Mikotoksin üretiminin optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişken limitleri.....	48
Çizelge 4.1 :	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ve <i>Fusarium</i> türlerine ait olabileceği değerlendirilen bazı izolatlar ile referans kültürlerin PDA ve MEA besiyeri üzerindeki gelişim özellikleri.....	62
Çizelge 4.2 :	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ve <i>Fusarium</i> türlerine ait olabileceği değerlendirilen bazı izolatlar ile referans kültürlerin mikroskopik morfolojileri.....	71
Çizelge 4.3 :	Bazı <i>Aspergillus</i> izolatlarının seçici-ayırıcı edici besi ortamındaki gelişim özellikleri ve aflatoksin üretme yeteneklerinin kontrolü.....	76
Çizelge 4.4 :	Çalışmada elde edilen izolatların moleküler tanımlama sonuçları ve bu izolatlara kaynak teşkil eden gıda örnekleri.....	80
Çizelge 4.5 :	Aflatoksin analizlerinde kullanılan kalibrasyon grafiklerine ait R ² değerleri.....	83
Çizelge 4.6 :	Farklı bulaş seviyelerinde aflatoksinlerin geri kazanım oranları.....	84
Çizelge 4.7 :	Aflatoksin tespit (LOD) ve ölçüm (LOQ) sınır değerleri.....	84
Çizelge 4.8 :	OTA, DON ve ZEA mikotoksinleri için belirlenen geri kazanım oranları.....	86
Çizelge 4.9 :	Gelişim ortamında tespit edilen aflatoksin miktarları.....	87
Çizelge 4.10 :	Yanıt yüzey yönteminde üç bağımsız değişken esas alınarak hazırlanan deneysel tasarım ve elde edilen aflatoksin miktarları.....	90
Çizelge 4.11 :	İstatistiksel modellemeye göre optimize koşullarda elde edilmesi beklenen aflatoksin miktarları.....	97
Çizelge 4.12 :	Yanıt yüzey yönteminde üç bağımsız değişken esas alınarak hazırlanan deneysel tasarım ve elde edilen zearalenon miktarları...	103
Çizelge 4.13 :	Optimum koşullarda beklenen ve gerçekleşen aflatoksin üretim miktarları.....	110
Çizelge 4.14 :	Farklı besiyeri hacimleri kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen aflatoksin miktarları.....	112
Çizelge 4.15 :	Farklı besiyeri hacimleri kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen ZEA miktarları.....	117
Çizelge 4.16 :	Çoklu görüntüleme modunda mikotoksin analizleri için kullanılan LC-TQ/MS parametreleri.....	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 :	Ergot zehirlenmesi sonucu uzuvlarını kaybeden insanların betimlendiği The Beggars (Dilenciler) tablosu.....	6
Şekil 2.2 :	Aflatoksin, OTA, DON ve ZEA mikotoksinlerinin sağlık üzerine etkileri.....	7
Şekil 2.3 :	Bazı aflatoksin çeşitlerinin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.4 :	OTA mikotoksininin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.5 :	DON mikotoksininin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.6 :	ZEA mikotoksininin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.7 :	2011-2020 yılları arasında bildirim sayılarının menşei ülkelere göre dağılımı.	18
Şekil 2.8 :	2011-2020 yılları arasında Türkiye menşei ürünlerde ürün grubu (a) ve tehlike tipine (b) göre RASFF bildirimlerinin dağılımı.....	19
Şekil 2.9 :	2011-2020 yılları arası Türkiye menşei ürünlerde tespit edilen mikotoksin çeşitleri ve verilen bildirim tiplerinin dağılımı.....	20
Şekil 2.10 :	2030 yılı için 3 farklı iklim senaryosunda mısırdaki tahmini AFB ₁ kontaminasyonunu (µg/kg) gösteren Ukrayna haritası.....	26
Şekil 2.11 :	2079 yılı için 3 farklı sıcaklık senaryosunda mısırdaki tahmini AFB ₁ kontaminasyon riskini gösteren Avrupa haritası.....	27
Şekil 3.1 :	Yüzey dezenfeksiyonu ile yapıştırma yöntemi.....	35
Şekil 3.2 :	Örneklere yüzey dezenfeksiyonu uygulamadan gerçekleştirilen izolasyon işlemi.....	36
Şekil 3.3 :	Yapışkan bant uygulamasıyla besiyerinden küf örneği alma işlemi...	38
Şekil 3.4 :	Blok agar yöntemi ile bazı izolatlardan örnekleme işlemi.....	39
Şekil 3.5 :	Küf kültürlerine ait spor solüsyonlarının hazırlanması.....	43
Şekil 3.6 :	Besiyeri matriksinden OTA'nın ekstraksiyonu.....	44
Şekil 3.7 :	Biyolojik tehlike uyarı etiketi.....	53
Şekil 4.1 :	Örneklerde yüzey dezenfeksiyonu uygulamasının oluşturduğu fark..	55
Şekil 4.2 :	Küf yükü yoğun olan farklı yer fıstığı örneklerinde (a ve b) dilüsyon işlemiyle izolasyon.....	55
Şekil 4.3 :	Elde edilen bazı küf izolatlarının PDA besi ortamındaki görüntüleri.....	56
Şekil 4.4 :	MAM-200682 <i>A. flavus</i> ve NRRL 2999 <i>A. parasiticus</i> 'un PDA besiyeri üzerindeki görünümü.....	57
Şekil 4.5 :	Bazı <i>A. sc. Flavi</i> üyelerinde görülen halkasal koloni genişlemesi....	59
Şekil 4.6 :	<i>Penicillium</i> şüphelisi A1-2 kodlu izolatın MEA üzerindeki görünümü.....	60
Şekil 4.7 :	PDA besi ortamında B1-D6 ve UK2-1 kodlu izolat görünümünün karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.8 :	Biseriate <i>Aspergillus</i> türlerine ait temsili morfolojik yapı.....	65
Şekil 4.9 :	Bazı <i>Aspergillus</i> spp. şüphelisi izolatları ait mikroskop görüntüleri	66
Şekil 4.10 :	Tervetisilat dallanma gösteren <i>Penicillium</i> türlerine ait temsili morfolojik yapı.....	67
Şekil 4.11 :	Bazı <i>Penicillium</i> spp. şüphelisi izolatları ait mikroskop görüntüleri.	68
Şekil 4.12 :	<i>Fusarium</i> türlerine ait temsili morfolojik yapı.....	69
Şekil 4.13 :	B1-D1 izolatının mikroskopik görüntüsü.....	70
Şekil 4.14 :	Çalışma kapsamında izole edilen bazı küf türlerine ait mikroskop görüntüleri.....	72

Şekil 4.15 :	Bazı küf kültürlerinin AFPA besi ortamında oluşturdukları görünümeler.....	74
Şekil 4.16 :	CMA besiyerinde geliştirilmiş bazı küf kültürlerinin aydınlıkta ve UV ışık altında görüntüleri.....	75
Şekil 4.17 :	CMA besi ortamında geliştirilmiş bazı küf kültürlerinin amonyum hidroksit buharı ile muamelesi sonucu elde edilen görüntüler.....	76
Şekil 4.18 :	KÇ2-2 kodlu izolatin CYA besiyerinde oluşturduğu gutasyon damlacıkları.....	77
Şekil 4.19 :	Bazı küf kültürlerinin MGA besiyerinde gelişim görüntüleri.....	78
Şekil 4.20 :	<i>Aspergillus</i> referans kültürleri ve izolatlarının rDNA ITS bölgeleri baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.....	81
Şekil 4.21 :	<i>Penicillium</i> izolatlarının rDNA ITS bölgeleri baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.....	82
Şekil 4.22 :	<i>Fusarium</i> referans kültürleri ve izolatlarının rDNA ITS bölgeleri baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.....	82
Şekil 4.23 :	Aflatoksin üretim modellerine ilişkin Box-Cox grafikleri.....	91
Şekil 4.24 :	AFB ₁ üretiminde artıkların normal % olasılık dağılımı.....	92
Şekil 4.25 :	AFB ₁ üretiminde içsel Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin değerleri.....	93
Şekil 4.26 :	Tahmin edilen ve gerçekleşen AFB ₁ üretimleri arasındaki ilişki.....	93
Şekil 4.27 :	AFB ₂ üretiminde artıkların normal % olasılık dağılımı.....	95
Şekil 4.28 :	AFB ₂ üretiminde içsel Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin değerleri.....	95
Şekil 4.29 :	Tahmin edilen ve gerçekleşen AFB ₂ üretimleri arasındaki ilişki.....	96
Şekil 4.30 :	AFB ₁ üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri.....	98
Şekil 4.31 :	AFB ₂ üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri.....	100
Şekil 4.32 :	Zearalenon üretim modeline ilişkin Box-Cox grafikleri.....	104
Şekil 4.33 :	ZEA üretiminde artıkların normal % olasılık dağılımı.....	105
Şekil 4.34 :	ZEA üretiminde içsel Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin değerleri.....	105
Şekil 4.35 :	Tahmin edilen ve gerçekleşen ZEA üretimleri arasındaki ilişki.....	106
Şekil 4.36 :	ZEA üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri.....	108
Şekil 4.37 :	Optimize koşullar altında besiyerindeki aflatoksin birikiminin süreye bağlı değişimi.....	111
Şekil 4.38 :	Büyük hacimli erlen (a) ve biyoreaktör (b) ortamında aflatoksin üretimleri.....	114
Şekil 4.39 :	İnkübasyon süresi ve pH'ya bağlı ZEA miktarındaki değişim.....	116
Şekil 4.40 :	Büyük hacimli erlen (a) ve biyoreaktör (b) ortamında ZEA üretimleri.....	118
Şekil 4.41 :	AFB ₁ (mavi) ve AFB ₂ (kırmızı) fraksiyonlarının yarı-preparatif sistemde besiyeri ekstraktlarından ayrıştırılması.....	119
Şekil 4.42 :	Boş mobil faz (a), AFB ₁ (b) ve AFB ₂ (c) çözeltilerine ait HPLC kromatogramları.....	120
Şekil 4.43 :	ZEA (kırmızı) fraksiyonunun yarı-preparatif sistemde besiyeri ekstraktından ayrıştırılması.....	121
Şekil 4.44 :	Boş mobil faz (a) ve ZEA (b) çözeltilerine ait HPLC kromatogramları.....	122

Şekil 5.1 :	Çalışma sonucu ortaya çıkan ürün prototipleri.....	126
Şekil A.1 :	Aflatoksin analizine (Kobracell ile türevlendirmeli) ait kromatogram ve kalibrasyon eğrileri.....	144
Şekil A.2 :	Aflatoksin analizine (türevlendirmesiz) ait kromatogram ve kalibrasyon eğrileri.....	145
Şekil A.3 :	OTA standart çözeltisine (50 ng/mL) ait kromatogram görüntüsü (a) ve kalibrasyon eğrisi (b).....	146
Şekil A.4 :	DON standart çözeltisine (1000 ng/mL) ait kromatogram görüntüsü (a) ve kalibrasyon eğrisi (b).....	146
Şekil A.5 :	ZEA standart çözeltisine (500 ng/mL) ait kromatogram görüntüsü (a) ve kalibrasyon eğrisi (b).....	147
Şekil B.1 :	AFB ₁ (a), AFB ₂ (b) ve ZEA (c) için ANOVA analiz sonuçları.....	148
Şekil C.1 :	AFB ₁ (a), AFB ₂ (b) ve ZEA (c) fraksiyonlarına ait LC-MS/MS kromatogramları.....	149

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

ACN	: Asetonitril
AF	: Aflatoksin
AFPA	: <i>Aspergillus flavus/parasiticus</i> agar
CMA	: Coconut Milk Agar (Hindistan cevizi sütü agar)
CYA	: Czapek's Yeast Extract Agar (Czapek maya ekstraktı agar)
DON	: Deoksinivalenol
EC	: European Commission (Avrupa Komisyonu)
FLD	: Floresans dedektör
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	: The International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
ITS	: Internal Transcribed Spacer (Dahili kopyalanmış aralayıcı)
İAK	: İmmüno Affinite Kolon
LC-TQ/MS	: Sıvı Kromatografisi Üçlü Kuadropol Kütle Spektrometresi
LOD	: Limit of Detection (Tespit limiti)
LOQ	: Limit of Quantification (Ölçüm limiti)
LPM	: Laktofenol pamuk mavisi
Me	: Metanol
MEA	: Malt Ekstrakt Agar
MGA	: Malachite Green Agar (Malahit yeşili agar)
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
OTA	: Okratoksin A
PBS	: Phosphate Buffer Solution (Fosfat tampon çözeltisi)
PDA	: Patates Dekstroz Agar
ppb	: Part per billion (Milyarda birlik kısım)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RASFF	: Rapid Alert System for Food and Feed (Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi)
RSD	: Relative Standart Deviation (Bağıl standart sapma)
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
YES	: Yeast Extract-Sucrose Agar (Maya ekstraktı-sükroz agar)
YYY	: Yanıt Yüzeyi Yöntemi
ZEA	: Zearalenon

ÖZET

Doktora Tezi

GIDA VE YEM ANALİZLERİNDE KULLANILAN BAZI ANALİTİK MİKOTOKSİN STANDARTLARININ ÜRETİMİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

HÜSEYİN KARAKAYA

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

152+XII sayfa

2022

Danışman: Prof. Dr. Murat YILMAZTEKİN

Bu çalışmada, küf izolatları kullanılarak aflatoksin, okratoksin A (OTA), deoksinivalenol (DON) ve zearalenon (ZEA) mikotoksinlerinden en az bir tanesinin yüksek saflıkta ($\geq 90\%$) üretilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak, Türkiye pazarından temin edilen gıda örneklerinden toplam 126 adet küf izolatu elde edilmiştir. Makroskopik ve mikroskopik gözlemler yapılarak *Aspergillus*, *Penicillium* ya da *Fusarium* sp.'ye ait olabilecek izolatlar belirlenmiştir. Seçili izolatların tür tanımlamaları, Internal Transcribed Spacer (ITS1-4) bölgelerine ait dizi sonuçlarının NCBI veritabanı ile karşılaştırılması şeklinde yapılmıştır. Potansiyel mikotoksijenik izolatlar sıvı besi ortamında geliştirilmiş ve ortamdaki mikotoksin miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kullanılarak belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre IK5-D2 *A. flavus* (AFB₁ ve AFB₂ üreticisi) ve B1-D1 *F. culmorum* (ZEA üreticisi) izolatlarının yüksek miktarlarda mikotoksin üretebildiği tespit edilmiştir. Belirtilen mikotoksinlerin üretim miktarlarının arttırılması için üç bağımsız değişkenle (pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi) Box-Behnken deneme dizaynı oluşturulmuştur. Sonuçlar, Yanıt Yüzey Yöntemi'ne göre değerlendirilmiş ve süreç matematiksel olarak modellenmiştir. Optimize edilmiş koşullarda üretilen AFB₁, AFB₂ ve ZEA miktarları sırasıyla 27244.5 ng/mL, 681.8 ng/mL ve 6645.9 ng/mL olarak bulunmuştur. Deneysel sonuçların matematiksel modellerden elde edilen tahminler ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Besi ortamından ekstraksiyonla alınan mikotoksinler yarı-preparatif kromatografi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Asetonitril çözeltisi şeklinde hazırlanan mikotoksin fraksiyonlarının saflık oranları AFB₁, AFB₂ ve ZEA için sırasıyla %90.3, %99.6 ve %95.4 olarak bulunmuştur. Besiyerinden geri kazanım oranları ise sırasıyla %73.2, %82.8 ve %91.0 olarak hesaplanmıştır. Yüksek saflıkta üretimi gerçekleştirilen mikotoksin çözeltilerinin toksikolojik çalışmalarda ya da gıda ve yem analizlerinde analitik standart madde olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, Analitik standart madde, Mikotoksin, Yanıt Yüzeyi Yöntemi, Zearalenon

ABSTRACT

PhD. Thesis

RESEARCH ON THE PRODUCTION OF SOME ANALYTICAL MYCOTOXIN STANDARDS USED IN FOOD AND FEED ANALYSIS

Hüseyin KARAKAYA

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Food Engineering

152+XII pages

2022

Supervisor: Prof. Dr. Murat YILMAZTEKİN

In this study, it was aimed to produce at least one of aflatoxin, ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) mycotoxins at high purity ($\geq 90\%$) using mold isolates. Firstly, a total of 126 mold isolates were obtained from food samples supplied from the Turkish market. The isolates that may belong to *Aspergillus*, *Penicillium* or *Fusarium* sp. were determined by making macroscopic and microscopic observations. Species identification of selected isolates was made by comparing the sequence results of the Internal Transcribed Spacer (ITS1-4) regions with the NCBI database. Potentially mycotoxigenic isolates were grown in broth medium and mycotoxin amounts were determined using High Performance Liquid Chromatography. According to the analysis results, it was determined that IK5-D2 *A. flavus* (AFB₁ and AFB₂ producer) and B1-D1 *F. culmorum* (ZEA producer) isolates were able to produce high amounts of mycotoxins. A Box-Behnken experimental design was created with three independent variables (pH, temperature and incubation time) to increase the production amount of the specified mycotoxins. The results were evaluated according to Response Surface Methodology and the process was mathematically modeled. The amounts of AFB₁, AFB₂ and ZEA produced under optimized conditions were found as 27244.5 ng/mL, 681.8 ng/mL and 6645.9 ng/mL, respectively. It has been determined that the experimental results were compatible with the predictions obtained from mathematical models. Mycotoxins extracted from the medium were purified using semi-preparative chromatographic method. The purity ratios of the mycotoxin fractions which prepared in acetonitrile solution were 90.3%, 99.6% and 95.4% for AFB₁, AFB₂ and ZEA, respectively. Recovery rates from the medium were calculated as 73.2%, 82.8% and 91.0%, respectively. It is thought that mycotoxin solutions produced at high purity have the potential to be evaluated in toxicological studies or as analytical standard material in food and feed analysis.

Keywords: Aflatoxin, Analytical standard material, Mycotoxin, Response Surface Methodology, Zearalenone

1. GİRİŞ

1.1 Çalışmanın Arka Planı

Tarih, sadece savaşlarla değil aynı zamanda toplumda derin izler bırakan hastalık ve salgınlarla doludur (Artvinli, 2020). Ergot zehirlenmesi, veba, kolera, İspanyol gribi ve son dönemde karşılaşılan Covid-19 gibi hastalıklar yıkıcı etkileriyle sosyal yaşamı etkileyen önemli salgınlar olarak hafızalara kazınmıştır (Haarmann ve diğ., 2009; Artvinli, 2020). Geçmişten gelen acı tecrübeler, halk sağlığının korunmasını tüm toplumlar için vazgeçilmez bir unsur haline getirmiştir. Gıda kaynaklı hastalıklar, toplum sağlığı için tehdit oluşturan en ciddi sorunlardan bir tanesidir. Sanayileşme, seri üretim ve dağıtım, ticaretin küreselleşmesi ve seyahatlerin kolaylaşmasına bağlı olarak son yıllarda gıda kaynaklı hastalıklarda bir artış olduğu düşünülmektedir (Sharif ve Al-Malki, 2010). Dünya genelinde her yıl yaklaşık 600 milyon insanın kontamine gıdalar yüzünden rahatsızlandığı ve bunlardan 420 bininin hayatını kaybettiği bildirilmektedir (Guerra ve diğ., 2016).

Gıda güvenliği için tehlike oluşturan kontaminantlardan biri de mikotoksinlerdir (Gruber-Dorninger ve diğ., 2017). Mikotoksinler, bazı küf türleri tarafından üretilen ikincil metabolit bileşiklerdir. Karsinojenik, teratojenik, immünotoksik, hepatoksik, nefrotoksik, nörotoksik veya östrojenik etkileriyle insanlar ve hayvanlarda akut veya kronik zehirlenmelere neden olmaktadır (Cinar ve Onbaşı, 2020). Şu ana kadar 400'ün üzerinde mikotoksin çeşidi tanımlanmış olup; yapısal olarak geniş bir çeşitlilik göstermektedirler (Lee ve Ryu, 2015). Gıdalarda karşılaşılan başlıca mikotoksin çeşitleri arasında aflatoksinler (AF), okratoksin A (OTA), deoksinivalenol (DON) ve zearalenon (ZEA) sayılabilir (Gruber-Dorninger ve diğ., 2017). Özellikle kuru meyveler, sert kabuklu meyveler, baharatlar ve tahıl ürünleri mikotoksin oluşumunun sık gözlemlendiği gıda grupları arasında yer almaktadır (Turner ve diğ., 2015). Türkiye kuru incir, kuru kayısı, kuru üzüm ve fındık başta olmak üzere pek çok kuru ve/veya sert kabuklu meyvenin üretimi ve ticaretinde dünyada lider konumdadır. Bu nedenle mikotoksin oluşumu Türkiye'yi yakından ilgilendiren bir sorundur. Avrupa Birliği Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi (RASFF) kayıtları da Türkiye menşeli ürünlerde ciddi bir mikotoksin sorunu olduğuna işaret etmektedir (Karakaya ve Yilmaztekin, 2022).

Gıda ve yemlerde bulunabilecek mikotoksin üst limitleri yasal mevzuatlarla belirlenmiş olup (EC, 2006a; TGK, 2011); yetkili kurum ve kuruluşlar tarafından mikotoksin analizleri gerçekleştirilmektedir. Türkiye'de mikotoksin analizi gerçekleştiren çok sayıda akredite laboratuvar bulunmaktadır (Yeşilören ve Karataş, 2019). Tüm akredite laboratuvarlar mikotoksinlerin tespit ve ölçümünde doğru ve güvenilir sonuçlar almak için yüksek saflıkta standart madde kullanımına ihtiyaç duymaktadırlar (Ngulla, 2019). Mikotoksin standardına olan gereksinim yalnızca piyasa denetim analizleriyle sınırlı değildir. Nitekim, Türkiye mikotoksinler üzerine en fazla bilimsel çalışma yürütülen ve bu konuda başı çeken ülkelerden biridir (Zyoud, 2019). Hem ticari hem de akademik bağlamda analitik mikotoksin standartlarının Türkiye'de oldukça yoğun kullanıldığı değerlendirilmektedir.

1.2 Sorunun Tanımlanması

Türkiye menşeli gıda ürünlerinde uzun yıllardır süregelen en büyük sorun mikotoksin oluşumudur (Yorulmaz ve Bircan, 2010; Karakaya ve Yilmaztekin, 2022). Yerel tarım ürünlerinde mikotoksijenik küf türlerine ve mikotoksin oluşumuna sık rastlanılmasına rağmen ne yazık ki yurt içinde yüksek saflıkta mikotoksin üretimi yapılmamaktadır. Dünyada da bu standart maddelerin üretimini gerçekleştiren çok az sayıda firma bulunmaktadır ve bu nedenle mikotoksin standartları oldukça yüksek bedellerle piyasaya arz edilmektedir. Tarım ürünleri ticaretinde söz sahibi ülkemizin analizlerde kullanılacak analitik mikotoksin standartlarının temininde tamamen dışa bağımlı olması ülkeden döviz çıkışına ve ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır.

1.3 Amaç ve Kapsam

Gerek mikotoksijenik küf türlerinin yaygın bulunuşu gerekse mevcut teknolojik altyapı düşünüldüğünde Türkiye'nin analitik mikotoksin standartlarını üretebilecek iç kaynaklara sahip olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, yerli küf izolatları kullanılarak aflatoksin (AF), okratoksin A (OTA), deoksinivalenol (DON) ve zearalenon (ZEA) mikotoksinlerinden en az bir tanesinin yüksek saflıkta ($\geq 90\%$) üretimi amaçlanmıştır.

Çalışmanın izolasyon, tanımlama, optimizasyon, üretim ve saflaştırma-doğrulama olmak üzere beş ana aşama halinde yürütülmesi planlanmıştır. İlk aşamada Türkiye pazarından temin edilen gıda ürünlerinden küf izolatlarının eldesi hedeflenmiştir. Daha

sonra makroskobik ve mikroskobik gözlemlerle olası mikotoksijenik küf izolatlarının belirlenmesi ve moleküler tekniklerden faydalanılarak tür tanımlamalarının yapılması planlanmıştır. Ardından, izolatlar arasında hedef mikotoksinleri verimli şekilde üretebilecek suşların belirlenmesi hedeflenmiştir. Optimizasyon aşamasında, istatistiksel yaklaşımlardan faydalanılarak mikotoksin üretiminin modellenmesi ve verimin maksimum düzeye çıkarılması planlanmıştır. Optimize koşullarda mikotoksin üretimleri gerçekleştirilerek modelin doğruluğunun test edilmesi hedeflenmiştir. Son olarak, üretilen mikotoksinlerin yüksek saflıkta eldesi ve nihai ürünün LC-MS/MS ile doğrulanması planlanmıştır.

1.4 Öngörülen Yaygın Etki

Çalışmanın başarıyla sonuçlandırılmasının bilim, ekonomi, eğitim, halk sağlığı ve ulusal güvenlik alanlarında olumlu yansımaları olması beklenmektedir. Ulusal ve uluslararası patent veritabanları incelendiğinde AF, OTA ve DON analitik standardı üretimine yönelik bir kayda rastlanmamıştır. ZEA içinse mutant kültürlerin kullanıldığı fermentör üretimi üzerine patent kaydı bulunmakla birlikte ürünün ekstraksiyonu, saflaştırması veya yüksek saflıkta eldesine yönelik bir tescil bulunmamaktadır (Anonim, 2022a). Kullanılacak izolatlar, optimizasyon ve saflaştırma basamakları tamamen çalışmaya özgü olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle, araştırma sonunda ortaya çıkacak süreç ve ürünlerin tescillenmesi ve ticarileştirilmesinin önünde bir engel bulunmamaktadır.

Mikotoksinlerin yüksek saflıkta ($\geq 90\%$) eldesi endüstriyel üretime geçiş için önemli bir adım olarak görülmektedir. Araştırma çıktılarının teknoloji transferi veya ortak girişim yoluyla yatırımcı firmalarla paylaşılabilmesi ve ürünün ticarileştirilebileceği düşünülmektedir. Bu sayede katma değeri yüksek, yenilikçi bir ürünün ülke ekonomisine kazandırılması hedeflenmektedir. Analitik standartların yoğun kullanımı ve yüksek maliyeti dikkate alındığında yerli üretimin mikotoksin ithalatını ve dolayısıyla ülkeden döviz çıkışını azaltılabileceği değerlendirilmektedir.

Mikotoksinler halk sağlığı için yüksek risk oluşturan doğal kontaminantlardır. Yüksek analiz maliyetlerine bağlı ekonomik çekincelerin yıllık toplam analiz ve araştırma sayısını olumsuz etkileyebileceği değerlendirilmektedir. Kolay temin edilebilir hammadde kullanımı ve çok fazla kur riski barındırmamasının yerli üretime fiyat avantajı sağlayacağı öngörülmektedir. Buna bağlı olarak analiz maliyetlerinde bir düşüş sağlanabileceği;

kurumların aynı bütçe ile daha fazla analiz ve bilimsel araştırma gerçekleştirebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, yurt içinde üretim sayesinde gümrük ve nakliye gibi lojistik süreçlerinde bürokratik engellerin en aza indirgenmesi ve araştırmacıların bu maddelere erişiminin kolaylaşması beklenmektedir.

Mikotoksinle bulaşık gıda maddeleri tekrar tüketime uygun hale getirilemediğinden yakılarak imha edilmektedir. Mevcut çalışmada, mikotoksijenik küf eldesi için mikotoksinle bulaşık gıdalar da değerlendirilecektir. İmhası beklenen ürünlerden yüksek katma değerli ürünlere giden bu süreçte, çalışmanın sürdürülebilirlik açısından gelecek araştırmalar için de bir rol model oluşturabileceği değerlendirilmektedir.

Mikotoksijenik suşlar yüksek biyolojik tehlike arz ettiğinden uluslararası ticareti katı kurallar ile sınırlandırılmıştır. Çalışmada mikotoksin üretme kapasitesi yüksek yerli izolatların eldesi planlanmıştır. Bu izolatların, özellikle biyolojik tehditler konusunda yürütülecek çalışmalarda yabancı kültür koleksiyonlarına olan bağımlılığı azaltmaya yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Yüksek Öğretim Kurumu 2017 yılında Kimyasal, Biyolojik, Radyolojik ve Nükleer (KBRN) araştırma grubu oluşturarak bu konuda yapılacak çalışmalara ve uzman personel yetiştirilmesine ağırlık verilmesini kararlaştırmıştır (Anonim, 2020a). Bazı mikotoksin çeşitleri de biyolojik tehdit kapsamında değerlendirildiğinden, mevcut araştırmanın biyolojik tehditlerle çalışma yetkinliğine sahip uzman personel yetiştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, ürünün ticarileşmesiyle birlikte üretim ve ar-ge alanlarında çalıştırılmak üzere alanında yetkin personel istihdamı da sağlanabileceği öngörülmektedir. Bu bakımdan, araştırmanın II. KBRN Çalıştay'ında ortaya konan hedeflerle uyumlu olduğu değerlendirilmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Mikotoksinler

Mikroorganizmalar tarafından doğrudan faydalanılmayan ancak genellikle gelişim sürecinde organizmanın içerisinde bulunduğu ortama bıraktığı maddeler ikincil metabolit bileşikler olarak adlandırılır (CAST, 2003). Funguslar, antibiyotik ve farmasötik nitelikteki bileşikler de dahil olmak üzere etkileyici sayıda ikincil metabolit üretirler (Magan ve Aldred, 2007). Ancak bu metabolitlerden bazıları insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkilere sahiptir (Karami-Osboo ve diğ., 2020). Küfler tarafından üretilen toksik etkili ikincil metabolit bileşiklere mikotoksin; bu bileşiklerden kaynaklanan zehirlenmelere ise mikotoksikoz adı verilmektedir (Streit ve diğ., 2012). Mikotoksin kelimesi, Yunanca fungus anlamına gelen "mykes" ve Latince'de zehir anlamına gelen "toxicum" kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır (Agriopoulou ve diğ., 2020). Kimyasal yapı ve toksikolojik etkileri bakımından oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip olduklarından mikotoksinleri genel bir tanım altında toplamak oldukça güçtür. Tüm mikotoksinleri kapsayan en temel ifade filamentli funguslar tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler olmasıdır (Zain, 2011). Mikotoksin üreticisi olduğu bilinen pek çok küf türü bulunsada en önemli olanları *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* ve *Alternaria* cinsleri içerisinde yer almaktadır (Açu ve Ocak, 2019; Battilani ve diğ., 2020; Haque ve diğ., 2020). Bir mikotoksin çeşidi birden fazla küf türü tarafından üretilbildiği gibi; tek bir küf türünün de birden fazla mikotoksin çeşidini üretebildiği bilinmektedir (Agriopoulou ve diğ., 2020).

Mikotoksin zehirlenmelerine ilişkin ilk kayıtlar antik çağlara dek uzanmaktadır (Pitt ve Miller, 2017). Bilinen en eski mikotoksikoz vakası bir bitki paraziti olan *Claviceps purpurea*'nın neden olduğu ergot zehirlenmesidir (CAST, 2003; Haque ve diğ., 2020). Ergot oluşumu, M.Ö. 600 yılına ait Asur tabletlerinde "tahıl başağındaki zararlı püstül" şeklinde tanımlanmıştır (Haarmann ve diğ., 2009). Tarihin çeşitli dönemlerinde mikotoksin kaynaklı toplu zehirlenmeler yaşanmaya devam etmiştir (Pitt ve Miller, 2017). Salgınlar toplumun tüm kesimlerini etkilendiğinden yaşanan trajediye ilişkin izler dönemin sanat eserlerine de yansımıştır (Şekil 2.1). Bu salgınlar her ne kadar toplumsal hafızada yer edinse de mikotoksinlerin varlığı yakın zamana kadar bilim dünyası için "kara kuğu" olmuştur (Pitt ve Miller, 2017). Mikotoksinlerin tam anlamıyla bilim dünyasının dikkatini üzerine çekmesi 1960 yılında gerçekleşmiştir (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). İngiltere'de

meydana gelen salgında 4 ay gibi kısa bir sürede 100 000'in üzerinde hindi ölümü yaşanmıştır (Smith ve diğ., 2019). Başlangıçta doğası ve etiyolojisi bilinmediğinden bu hastalığa Hindi-X adı verilmiştir (Pickova ve diğ., 2021). Daha sonradan yapılan çalışmalarda hastalığın kaynağının Brezilya menşeli yer fıstığı içeren yemler olduğu; ölümlerin ise fıstıkta bulunan ve daha sonradan aflatoksin adı verilecek olan mikotoksinlerden ileri geldiği tespit edilmiştir. Bu keşif aynı zamanda modern mikotoksikolojinin de başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Smith ve diğ., 2019).

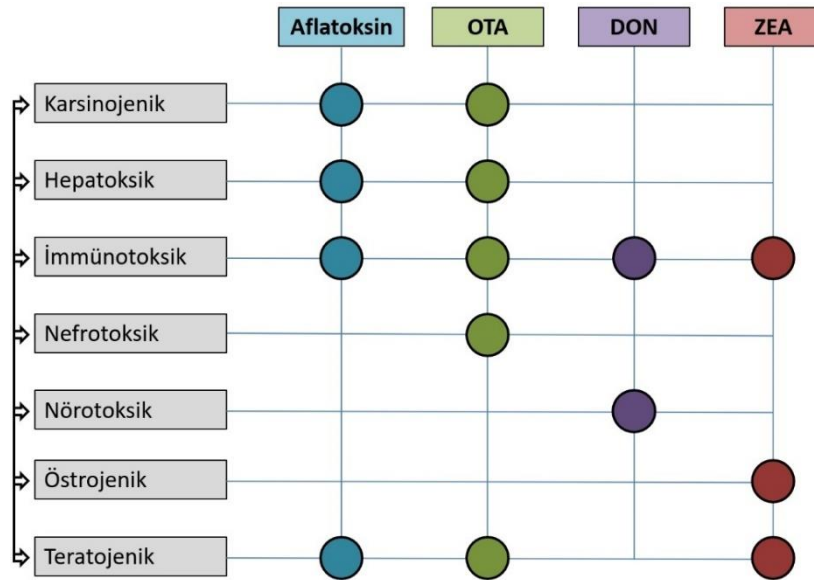


Şekil 2.1 : Ergot zehirlenmesi sonucu uzuvlarını kaybeden insanların betimlendiği The Beggars (Dilenciler) tablosu (Pieter Bruegel, 1568) (Telif hakkı: Reunion des Musees Nationaux, Louvre, Paris, Fransa).

Mikotoksin zehirlenmeleri ciltten emilim veya soluma yoluyla gerçekleşebilse de çoğunlukla oral maruziyet şeklinde gerçekleşmektedir (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Mikotoksinler yüksek sıcaklıkta bile stabil olduklarından çoğu zaman klasik ısıl işlem uygulamalarıyla yok edilememektedir. Dolayısıyla bu kararlı yapı genellikle insan ve hayvan tüketimine sunulacak son ürünün de kontamine olmasına yol açmaktadır (Ryu ve diğ., 2008). Ek olarak, taşıma (carry over) adı verilen yolla da toksin maruziyeti meydana gelebilmektedir. Taşıma, bulaşık yemle beslenmiş hayvanlardan elde edilen ürünlerin (et, süt, yumurta) tüketilmesiyle gerçekleşmektedir (Völkel ve diğ., 2011; Öksüztepe ve Erkan, 2016).

Mikotoksin zehirlenmeleri akut ya da kronik şekilde seyredebilmektedir (Ates ve diğ., 2013). Bu bileşikler kimyasal yapı bakımından oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip olduklarından toksikolojik etkileri de birbirlerinden farklıdır (Şekil 2.2). Aflatoksin gibi

bazı mikotoksinlerin yüksek dozda alımı akut ölümle sonuçlanmaktadır (Tan, 2020). Kronik mikotoksin maruziyetinde karsinojenik ve teratojenik etkilerin yanı sıra farklı doku ve organ sistemlerinde hasara yol açan toksik etkiler gözlenebilmektedir (Cinar ve Onbaşı, 2020). Bazı mikotoksin tipleri ise östrojenik etki göstererek hormonal sisteme ve üreme sistemine zarar verebilmektedir (Alshannaq ve Yu, 2017; Pauka ve diğ., 2018). Mikotoksikoz semptomlarının ortaya çıkışı maruz kalınan mikotoksin çeşidine, miktarına ve maruz kalma periyoduna bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca kişinin yaş, cinsiyet ve genel sağlık durumu zehirlenme şiddetini etkilerken; genetik, beslenme düzeni ve diğer toksik bileşiklerle etkileşimler gibi çoğu henüz tam aydınlatılamamış sinerjistik etkili faktörler de zehirlenmenin şiddetini arttırabilmektedir (Bennett ve Klich, 2003; Liew ve Mohd-Redzwan, 2018).

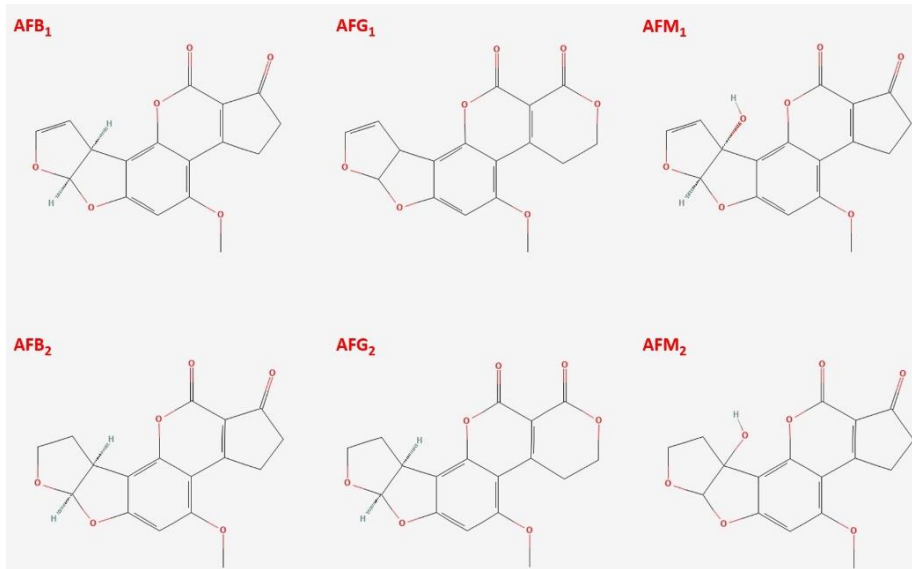


Şekil 2.2 : Aflatoksin, OTA, DON ve ZEA mikotoksinlerinin sağlık üzerine etkileri (Cinar ve Onbaşı, 2020).

1960 yılındaki aflatoksin salgını mikotoksikoz etiyolojisi ve önleyici tedbirlere dair bilimsel araştırmalarda yeni bir dönem başlatmıştır (Mohd-Redzwan ve diğ., 2013). O günden bugüne geniş bir yapısal çeşitliliğe sahip yaklaşık 400 kadar mikotoksin tanımlanmıştır. Ancak bunlar arasında gıdalarda yaygın bulunuşu, oluşum miktarı ve toksisitesi bakımından önemli görülen mikotoksin sayısı sınırlıdır (Lee ve Ryu, 2015). Halk sağlığı için tehdit oluşturan başlıca mikotoksin grupları aflatoksinler, okratoksinler, trikotesenler (özellikle deoksinivalenol), zearalenon ve fumonisinlerdir. Adı geçen mikotoksinler *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait bazı küf türleri tarafından üretilmektedir (Lee ve Ryu, 2015; Gruber-Dorninger ve diğ., 2017; Karami-Osboo ve diğ., 2020; Battilani ve diğ., 2020).

2.1.1 Aflatoksinler

Aflatoksinler *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* türleri tarafından üretilen son derece toksik bir mikotoksin grubudur (Mohd-Redzwan ve diğ., 2013; Kumar ve diğ., 2017). Kimyasal açıdan furanokumarin yapısında olup doğada 20'den fazla aflatoksin türevi bileşik bulunmaktadır (Şekil 2.3). İnsanlar ve besi hayvanları üzerinde yarattığı tehlike bakımından bunlar arasında en önemlileri B₁, B₂, G₁ ve G₂ tipleridir (Raduly ve diğ., 2020). Aflatoksin çeşitlerinin gösterdikleri toksisiteye göre sıralaması AFB₁>AFG₁>AFB₂>AFG₂ şeklindedir (Kumar ve diğ., 2017; Agriopoulou ve diğ., 2020). *A. flavus* türleri yalnızca B tipi aflatoksinleri sentezlerken; *A. parasiticus* ve *A. nomius* türleri hem B hem de G tipi aflatoksinleri üretebilmektedirler (Alshannaq ve Yu, 2017). İsimlendirmeleri UV ışık altında gösterdikleri floresans ışımaya göre (B: mavi/blue ve G: yeşil/green) yapılmıştır (Zain, 2011; Agriopoulou ve diğ., 2020). Bunlara ek olarak bir de M tipi aflatoksinler bulunmaktadır. AFM₁ ve AFM₂ hayvansal metabolizmada B grubu aflatoksinlerin dönüşümü sonucu oluşmaktadır (Kumar ve diğ., 2017). AFB₁, kontamine yemle beslenmiş hayvanların karaciğerinde AFM₁ formuna dönüştürülmekte ve süt bezleri vasıtasıyla süte salgılanmaktadır (Raduly ve diğ., 2020). Bu nedenle isimlendirmede süten (milk) ileri gelen M harfiyle temsil edilmektedir. Yemden alınan AFB₁'in, AFM₁ formunda süte taşınma oranının %0.3-6.2 arasında değiştiği ifade edilmektedir (Marchese ve diğ., 2018). Aflatoksin oluşumuna pek çok gıda ve yem maddesinde rastlanabilmektedir. En sık tespit edildiği ürünler fındık, fıstık, mısır, pirinç, baharatlar ve kuru meyvelerdir (Mahato ve diğ., 2019).



Şekil 2.3 : Bazı aflatoksin çeşitlerinin kimyasal yapısı (NCBI, 2022).

Gösterdiği yüksek toksisiteyle küresel bir tehdit oluşturması nedeniyle mikotoksin araştırmaları en fazla aflatoksinler üzerine yoğunlaşmıştır (Mohd-Redzwan ve diğ., 2013). Bu bileşiklerin karsinojenik, teratojenik, hepatotoksik, mutajenik ve immünosupresif etkileri bulunmaktadır (Alshannaq ve Yu, 2017). Aflatoksin çeşitleri içerisinde en tehlikeli olan ve üzerinde en fazla çalışılanı AFB₁ tipidir (Marchese ve diğ., 2018; Raduly ve diğ., 2020). AFB₁ karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi ile metabolize edilir ve oluşan aflatoksin epoksit yapısı DNA üzerinde guanine yapışarak karsinojen etki gösterir (Raduly ve diğ., 2020). Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC), epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen veriler ışığında AFB₁'i insanlar için karsinojen (Grup I); AFM₁'i ise olası karsinojen madde (Grup 2B) olarak sınıflandırmaktadır (Alshannaq ve Yu, 2017; Marchese ve diğ., 2018).

Aflatoksikozdan en fazla etkilenen organ karaciğerdir (Alshannaq ve Yu, 2017). Kısa süreler içerisinde yüksek miktarda aflatoksinin sindirim yoluyla alınması akut iç kanama, karaciğer yetmezliği ve hatta ölüme sonuçlanabilmektedir (Ketney ve diğ., 2017). İlk keşfedildiği Hindi-X salgını (1960) yatıştırılana kadar geçen süreçte yaklaşık 200 000 hindinin öldüğü tahmin edilmektedir (Pickova ve diğ., 2021). Aflatoksinlerin keşfinden sonra da pek çok aflatoksikoz vakası kaydedilmiştir. 1970 yılında Hindistan'da görülen zehirlenmelerde en az 97 kişinin hayatını kaybettiği bildirilmektedir (Kensler ve diğ., 2011). Yine Hindistan'da yaşanan bir başka salgında (1974) ise aflatoksin kaynaklı akut hepatite bağlı olarak 106 insanın hayatını kaybettiği değerlendirilmektedir (Kensler ve diğ., 2011; Kumar ve diğ., 2017). 1981 yılında Kenya'da görülen 20 aflatoksikoz vakasından 12'si (%60) ölümle sonuçlanmıştır. Son yıllarda karşılaşılan en büyük akut mikotoksin zehirlenmesi ise 2004 yılında yine Kenya'da yaşanmıştır. Aflatoksinle bulaşık mısırdan kaynaklanan toplu zehirlenmelerde tespit edilen 317 vakadan 125 tanesi (%39.4) ölümle sonuçlanmıştır (Tan, 2020). Bahsi geçen son üç salgında tespit edilen kontaminasyon düzeyleri dikkate alındığında 20 µg/kg vücut ağırlığı/gün'lük dozun yetişkin bireylerde ölüme yol açabileceği değerlendirilmektedir (Wild ve Gong, 2010). Son aflatoksikoz salgını 2016 gerçekleşmiş ve bildirilen 68 vakadan 20'si (%29.4) ölümle neticelenmiştir. Tanzanya'da yürütülen bir araştırmada aflatoksikoza bağlı hepatoselüler karsinom vakalarının (3334 vaka) %95'inin ölümle sonuçlandığı ve buradaki kaybın 96 686 DALY'e¹ (engelliliğe ayarlanmış yaşam yılı) eşdeğer olduğu hesaplanmıştır (Chilaka ve

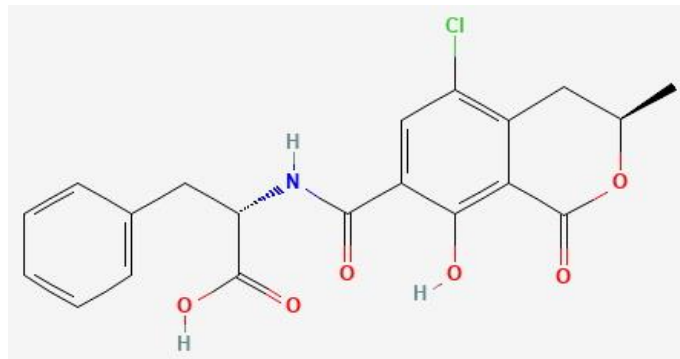
¹ DALY (Disability Adjusted Life Years): Engelliliğe ayarlanmış yaşam yılı hastalık, sakatlık veya erken ölüm nedeniyle kaybedilen yılların toplamı olarak ifade edilen genel hastalık yükünün bir ölçüsüdür.

diğ., 2022). Nijerya'da ise yer fıstığı ve mısırdaki görülen aflatoksin kontaminasyonu ile ilişkili 7761 karaciğer kanseri vakasındaki toplam kaybın 100 965 DALY'e eşdeğer olduğu sonucuna varılmıştır (Gbashi ve diğ., 2018).

Aflatoksin kontaminasyonunu bu denli tehlikeli kılan noktalardan biri de teknolojik işlemlere gösterdiği dirençtir. Gıda işleme teknikleri mikotoksin düzeyini düşürse bile yeterli redüksiyon sağlayamamaktadır (Agriopoulou ve diğ., 2020). Aflatoksinlerin termal stabiliteleri yüksek olup ısı işlemlere karşı oldukça dayanıklıdır. Parçalanma sıcaklığı 237-306 °C arasında değişiklik gösterirken kısmen parçalanma için 150 °C'nin üzerinde sıcaklık uygulamasına ihtiyaç duyulmaktadır (Kabak, 2009). Pirincin normal atmosfer basıncı altında pişirilmesiyle AFB₁ miktarında ortalama %34 redüksiyon gerçekleştiği saptanmıştır. Antep fıstıklarının kavrulması sonucu AFB₁ içeriğinde (uygulanan sıcaklık ve süreye bağlı olarak) %17-63 arası düşüş olduğu ifade edilmektedir (Ryu ve diğ., 2008). Nem içeriği yüksek gıdalarda aflatoksinlerin nispeten daha kolay dekompoze olduğu belirtilmektedir (Kabak, 2009).

2.1.2 Okratoksin A

Okratoksinler, temelde A, B ve C olmak üzere üç çeşitten oluşan bir mikotoksin grubudur (Leitão, 2019). Bunlar arasında OTA yaygın bulunuş ve gösterdiği toksisite bakımından mikotoksinler içerisinde önemli bir yere sahiptir (Zhang ve diğ., 2016). Aflatoksinlerden sonra gıdalarda en çok karşılaşılan ikinci mikotoksin çeşididir. Yapısal olarak pentaketid dihidrokumarine bağlı fenilalanin amino asidinden oluşur (Şekil 2.4) (Farbo ve diğ., 2014). İsmi ilk olarak keşfedildiği küf türü olan *A. ochraceus*'tan almaktadır (Agriopoulou ve diğ., 2020). OTA üretme yeteneğine sahip diğer başlıca küf türleri *A. carbonarius*, *A. niger* (küçük bir kısmı), *P. verrucosum* ve *P. nordicum*'dur (Geremew ve diğ., 2016; Zhang ve diğ., 2016).



Şekil 2.4 : OTA mikotoksininin kimyasal yapısı (NCBI, 2022).

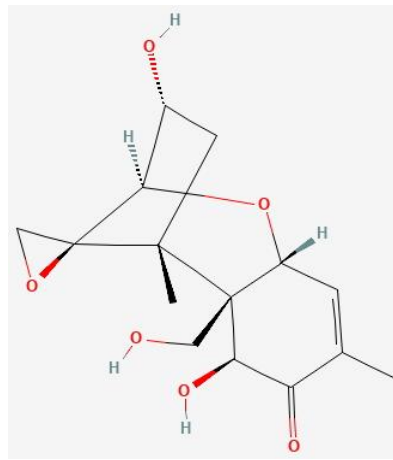
Ilımandan tropiğe değişen aralıktaki iklim koşulları OTA oluşumu için elverişli bir ortam hazırlamaktadır (Cabañes ve diğ., 2010). İnsanlarda okratoksin maruziyetinin en temel kaynağı tahıl bazlı ürünlerdir. Son çalışmalar, toplam OTA alımında tahıl ürünlerinin payının %58'e kadar çıkabildiğini göstermektedir (Khalesi ve Khatib, 2011). Çikolata, kahve, kuru meyveler, üzüm ve şarap OTA varlığına rastlanan başlıca ürünler arasında yer almaktadır (Cabañes ve diğ., 2010). OTA'nın proteinlere, özellikle de serum albuminine yüksek affinitesi vardır. Bu nedenle hayvansal doku ve organlarda birikme yapar (Heussner ve Bingle, 2015). Dolayısıyla kontamine yemle beslenen hayvanlardan elde edilmiş süt ve yumurtada da OTA bulunabilmektedir (Köszegi ve Poór, 2016). Son yapılan çalışmalar şişelenmiş su, gıda renklendiricileri ve bitkisel orijinli gıda katkı maddelerinde dahi OTA varlığına rastlanıldığını göstermektedir. Bu nedenle OTA maruziyetinden kaçınmak neredeyse imkânsız gibi gözükmektedir (Leitão, 2019).

OTA, okratoksin grubu mikotoksinlerin en toksik üyesidir. Canlılar üzerinde nefrotoksik, hepatotoksik, immünotoksik ve teratojenik etkileri bulunmaktadır. Toksikolojik çalışmalarda, mikotoksinin bağırsaktan emilerek kapı toplar damarı vasıtasıyla dolaşım sistemine girdiği bildirilmektedir (Zhang ve diğ., 2016). Zehirlenmeler genellikle şiddetli böbrek hasarı ile karakterize edilmektedir (Heussner ve Bingle, 2015). Balkan endemik nefropatisi (BEN) ve insan üriner sistem tümörlerinin OTA maruziyetiyle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak aradaki nedensel ilişki hala ihtilaflı bir konu olup; karsinogenisite mekanizması açıkça ortaya konulmuş değildir. Hayvan testleri ise OTA'nın karsinojen etkisi olduğuna işaret etmektedir ve bu nedenle IARC tarafından insanlar için olası karsinojen madde (Grup 2B) olarak sınıflandırılmaktadır (Sabuncuoğlu ve diğ., 2015; Geremew ve diğ., 2016).

OTA'nın ısıl stabilitesi özellikle kahve endüstrisini yakından ilgilendirmektedir (Kabak, 2009). Yeşil çekirdeklerin çeşitliliği, nem içeriği, kirlilik derecesi, kavurma sıcaklığı ve süresi işlenmiş üründe kalan OTA miktarı üzerine etkili faktörlerdendir (Ryu ve diğ., 2008). Yüksek kavurma sıcaklıklarında (250 °C) OTA'nın kısmi izomerizasyonla diastereomerlerine dönüştüğü bildirilmektedir (Kabak, 2009). Oluşan 14-(R)-OTA, 14-dekarboksi-OTA ve OTA- α amid gibi türev bileşikler OTA'ya göre nispeten daha az toksik özellik sergilerler (Karlovsky ve diğ., 2016). Ancak yine de bazı parçalanma ürünlerinin ana bileşik kadar toksik olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle ısıl işlem uygulanmış ürünlerde OTA varlığına rastlanmaması mikotoksin riskinin bertaraf edildiği anlamına gelmemektedir (Kabak, 2009).

2.1.3 Deoksinivalenol

Trikotesenler, kimyasal açıdan en büyük çeşitliliğe sahip mikotoksin grubudur. Bu grup içerisinde en yaygın görülen mikotoksin çeşidi ise deoksinivalenoldür (Alshannaq ve Yu, 2017). Güçlü emetik etkisi nedeniyle vomitoksin olarak da adlandırılmaktadır. Yapısında bulundurduğu 3 serbest hidroksil grubu DON'un toksik özellik kazanmasında etkilidir (Şekil 2.5). Dünya genelinde buğday, mısır ve arpa tarımının yoğun yapılması nedeniyle bu mikotoksine oldukça sık rastlanılmaktadır (Sun ve diğ., 2016). Bu mikotoksinin üreticisi olan en önemli küf türleri *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum*'dur (Kirimker ve diğ., 2020).



Şekil 2.5 : DON mikotoksininin kimyasal yapısı (NCBI, 2022).

DON, IARC tarafından Grup 3 (insanlara karşı karsinojen olarak sınıflandırılmayan) olarak kategorize edilmektedir. Kontamine gıdaların tüketilmesiyle bulantı, kusma, karın ağrısı, diyare, baş ağrısı, baş dönmesi ve ateşe sebep olduğu bildirilmektedir (Alshannaq ve Yu, 2017). Toksisitenin temelinde yatan mekanizma DNA hasarı ve hücre apoptozudur. DON, peptidil transferaz enzimine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Ayrıca, beyinde dopamin reseptörlerini aktive ederek güçlü bir kusma refleksi oluşturur (Sobrova ve diğ., 2010). Akut zehirlenmeler kemik iliği, lenf düğümleri, dalak, timus ve bağırsak mukozasında ciddi hasara neden olabilmektedir (Wu, 2007).

DON hakkında söylenebilecek en önemli hususlardan biri de yüksek sıcaklık uygulamalarına dayanıklı olmasıdır. 170-350 °C aralığındaki sıcaklıklarda dahi oldukça kararlıdır. 170 °C'de 30 dakikalık ısıtılardan sonra bile DON konsantrasyonunda herhangi bir azalma olmadığı rapor edilmiştir (Sobrova ve diğ., 2010). Ayrıca ısıtılardan sonrası açığa çıkan bileşikler tam olarak bilinmediğinden parçalanma ürünleriyle ilgili

kapsamlı bir toksisite çalışması yürütülmemiştir. Bu nedenle, DON'la bulaşık gıdalarda ısıtma işlem uygulamasının detoksifikasyon sağladığına yönelik açık bir kanıt bulunmamaktadır (Kabak, 2009).

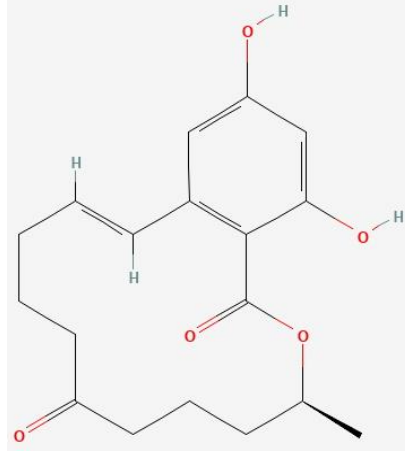
2.1.4 Zearalenon

Zearalenon, başta *F. graminearum* ve *F. culmorum* olmak üzere bazı *Fusarium* türleri tarafından üretilen bir mikotoksin çeşididir (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Tahıl ürünlerinde ZEA kontaminasyonuna oldukça sık rastlanmaktadır. En yaygın görüldüğü gıdalar başta mısır olmak üzere arpa, buğday, yulaf, pirinç, sorgum ve bunlardan yapılan ürünlerdir (Zhang ve diğ., 2018). *Fusarium* türleri serin ve nemli ortamlarda gelişebildiğinden ürün henüz tarladayken ya da depolama esnasında mahsulü kontamine edebilirler (Lee ve Ryu, 2015).

ZEA, IARC tarafından Grup 3 (insanlara karşı karsinogen olarak sınıflandırılmayan) olarak kategorize edilmekle birlikte karsinogenik, hepatotoksik, genotoksik ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileri olduğu rapor edilmektedir (Lee ve Ryu, 2015). Kimyasal yapısı (Şekil 2.6), doğal östrojen yapılarıyla benzerlik göstermektedir (Alshannaq ve Yu, 2017). Bu nedenle östrojen reseptörlerine bağlanmada agonist (yarışmacı) bir karakter sergiler (Pauka ve diğ., 2018). Reseptörlere bağlanma gücü 17 β -estradiol'e kıyasla her ne kadar az olsa da östrojenik aktivitesi halk sağlığı açısından risk yaratmaktadır (Lee ve Ryu, 2015). Toksikolojik çalışmalar bu mikotoksinin üreme sisteminde farklılaşmalara ve doğurganlığın azalmasına neden olduğunu göstermektedir (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Deney hayvanlarında kısırlık, uterus ve vulvada şişme, yumurtalıklarda atrofi ve embriyo letal rezorpsiyonuna sebep olduğu belirlenmiştir (Alshannaq ve Yu, 2017). Yapılan araştırmalarda kontamine yemle beslenmiş hayvanların meme bezi ve genital organlarının büyüdüğü tespit edilmiştir (Pauka ve diğ., 2018). ZEA maruziyeti, progesteron ve estradiol seviyesinin anormal düzeylere çıkmasına neden olmaktadır (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Bir dış etkenin östrojen seviyesine böylesi kontrolsüz müdahalesi düşük, ölü doğum ve teratojeniz gibi üreme bozukluklarına neden olabilmektedir (Wu ve diğ., 2021). Ayrıca ZEA, genellikle DON ve fumonisinlerle beraber bulunduğundan bu mikotoksinlerle birlikte sinerjistik etkileşim göstermesi de muhtemeldir (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018).

ZEA, yaygın bulunuşu ve ısıtma stabilitesi nedeniyle gıda zincirinden tamamen çıkartılamamaktadır (Zhang ve diğ., 2018). Geçmiş raporlarda 120 °C'de 4 saatlik ısıtma

işleme dayandığı ifade edilmektedir (Kabak, 2009). Numanoğlu ve diğ. (2013), kontamine mısır kullanarak ekme k üretim sürecinde ZEA'nın termal degradasyonunu incelemişlerdir. 250  C'de fırınlama işlemine rağmen ekme k kabuğunda yalnızca %13.1'lik bir ZEA redüksiyonu tespit edilebilmiştir. Ekme k içinde ise ZEA miktarının beklenenin aksine %3'l k bir artış g sterdiğı belirlenmiştir.



şekil 2.6 : ZEA mikotoksininin kimyasal yapısı (NCBI, 2022).

2.2 Funguslarda Mikotoksin  retimi

2.2.1 Mikotoksin üretiminin nedenleri

Pek çok mikroorganizma türü çok geniş yelpazede ikincil metabolit bileşikler üretebilmektedir. Mikroorganizmaların bakterilerden mantar ve alglere, protozoalardan metazoolara kadar değişen çeşitlilikte rekabet ettiğı ve etkileşime girdiğı karmaşık ekosistemler göz önüne alındığında bu durum hiç de şaşırtıcı değildir (Brakhage, 2013). Funguslar, farmasötik kullanıma uygun bileşikler kadar (penisilin, siklosporin, statin vb.) toksik etkili ikincil bileşiklerin de üretiminden sorumludurlar (Magan ve Aldred, 2007).

Mikotoksinler, küflerin yaşam döngüleri için elzem bileşikler olmadığından ikincil metabolit olarak sınıflandırılmaktadır. Mikotoksinlerin organizma için işlevleri tam olarak çözülebilmiş değildir. Bununla birlikte, aynı ortamda rekabet eden diğer mikroorganizmaların yok edilmesinde rol oynadıklarına inanılmaktadır (Br se ve diğ., 2009). Mikotoksinler dahil bazı ikincil metabolitlerin üretimi özellikle mikroorganizma stres altındayken (besin kıtlığı gibi) başlamaktadır. Esasında bu metabolitlerin biyosentezi yüksek enerji tüketimi gerektiren bir süreçtir. Besin kıtlığı olan bir ortamda mikroorganizmanın yüksek enerji gerektiren bir biyosentez olayına yönelmesi dikkat çekici bir noktadır. Bu durum, küflerin rekabet avantajı sağlamak için mikotoksin

üretimine giriştiği savını destekleyen bir kanıt olarak görülmektedir (Magan ve Aldred, 2007).

Mikotoksijenik küfler, ekolojik bir alan içinde tek başına bulunmazlar. Genellikle, etkili bir şekilde rekabet etmeleri ve diğer türleri kolonileşme bölgesinden dışlamaları gereken çeşitli bir mikroorganizma topluluğunun parçasıdır. Bu nedenle, besinlere erişim elde etmek için öncelikle hidrolitik enzimleri hızlıca üretmeleri; ardından da bölgede tutunmak için mikotoksin sentezi gerçekleştirmeleri gerekmektedir (Magan ve Aldred, 2007). Mikotoksinler, antibakteriyel etkisiyle rekabetçi türleri yok etmede doğrudan kullanılabildikleri gibi mikotoksin üreticisi canlıya dolaylı olarak da avantaj sağlayabilmektedir. Örneğin, bazı *Fusarium* türleri tarafından üretilen fusarik asit ortamdaki demiri bağlayarak bakteriler tarafından kullanılmasını engelleyebilmektedir. Bazı mikotoksinler ise bakterilerdeki quorum sensing (QS) mekanizmasını inhibe ederek aktivite göstermektedirler. Zearalenon ve fumonisin'in *Chromobacterium violaceum* popülasyonundaki QS sürecini inhibe ettiği bildirilmektedir (Venkatesh ve Keller, 2019).

2.2.2 Mikotoksin oluşumu üzerine etkili faktörler

Mikotoksijenik küf türleri arasında en önemli olanları *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri içerisinde yer almaktadır (Medina ve diğ., 2017; Battilani ve diğ., 2020). Dünyada tarımın yapıldığı tüm bölgelerde bu türlere rastlanılmaktadır. Mikotoksin oluşumu için bazı özel koşulların oluşması gerektiğinden bu türlerin varlığı her zaman mikotoksin oluşumuna delil olarak kabul edilemez. Öte yandan, üründe mikotoksijenik türlere rastlanmaması ürünün sağlık açısından güvenilir olduğunu da garanti etmemektedir (Daou ve diğ., 2021).

Tarımsal faaliyetler, yüksek oranda iklim koşullarına bağlıdır (Medina ve diğ., 2017). İklimsel faktörler bitkinin dayanıklılığını ve dolayısıyla küf zararına karşı direncini etkilemektedir. Fungusların gelişimi ve aktiviteleri de ağırlıklı olarak nem ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak şekillenmektedir. Her küf türünün gelişim, sporlanma ve mikotoksin üretimi için ihtiyaç duyduğu optimum koşullar birbirinden farklıdır. Bu nedenle fungal gelişim ve mikotoksin üretimi için tek bir optimum değerden bahsedilemez (Daou ve diğ., 2021). Örneğin, *A. flavus* türleri için minimum gelişme sıcaklığı 10-12 °C iken maksimum gelişme sıcaklığı 43-48 °C aralığındadır. Buna karşın aflatoksin üretimi için gerekli sıcaklık koşulları daha dar bir aralık içerisinde (13-37 °C) değişkenlik göstermektedir. Benzer şekilde, *F. culmorum*'un 25 °C'de ve pH 6.5'te gelişebildiği en düşük su aktivitesi

değeri 0.87 iken; DON üretimi için su aktivitesinin 0.96'nın üzerinde olması gerekmektedir (Pitt ve Hocking, 2009). *A. carbonarius* 30-35 °C'de ve 0.98-0.99 su aktivitesi koşullarında optimum gelişme gösterirken; çoğu suş 15-20 °C'de ve 0.95 su aktivitesinde daha yüksek OTA üretimi yapmaktadır (Magan ve Aldred, 2007).

Genetik özellikler, substrat çeşidi ve besinsel içerik, fungusit kullanımı ve gübreleme, coğrafi koşullar, böcek zararı ve diğer küf kolonileri ile olan etkileşimler de mikotoksin üretimi açısından önemli parametrelerdir (Cinar ve Onbaşı, 2020). Örneğin; aflatoksin üretimini kontrol eden gen bölgelerinin aktivasyonunda sıcaklık kritik öneme sahiptir (Gallo ve diğ., 2016; Shabeer ve diğ., 2022). Bunun dışında, *F. graminearum* türleri daha çok sıcak iklime sahip bölgelerde bulunurken; *F. culmorum* türleri denize kıyısı olan ve nispeten daha soğuk iklime sahip bölgelerde yaygın bulunmaktadır (Ibanez-Vea ve diğ., 2012; West ve diğ., 2012). Dolayısıyla, farklı coğrafi bölgelerde yetiştirilmiş tahıl ürünlerinin üzerinde rastlanan küf florası ve mikotoksin çeşidi de farklılık gösterebilmektedir.

Mikotoksinlerin en yaygın görüldüğü gıda çeşitleri tahıl ürünleri, kuru meyveler, sert kabuklu meyveler (fındık, fıstık vb.), üzüm ve şarap, baharatlar, yağlı tohumlar, kahve, kakao, meyve ve meyve suları, bira ve yem bitkileridir. Mikotoksin oluşumu ürün daha tarladayken gerçekleşebileceği gibi taşıma, işleme (kurutma) ya da depolama sırasında da meydana gelebilmektedir (Agriopoulou ve diğ., 2020). Genellikle *Fusarium* türleri ürün daha tarladayken; *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri ise (bazı istisnalar hariç) uygun olmayan kurutma ve depolama koşullarında kolonize olmaktadır (Medina ve diğ., 2017). Bilhassa, aşırı nem ve sıcaklık koşullarında uzun süreli depolama tahıllar da dahil pek çok mahsulde küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunu teşvik etmektedir (Agriopoulou ve diğ., 2020). Kurutulmuş meyveler yüksek şeker içeriği, kullanılan hasat tekniği ve kurutma koşulları nedeniyle küf zararına oldukça hassastır. Toprak, küflerin doğal habitatını oluşturur ve güneşte kurutma esnasında meyvenin toprakla teması küf kontaminasyonuna neden olur. Ayrıca kurutma süresinin gereğinden fazla uzaması üründe böcek zararıyla birlikte enfeksiyon riskini de arttırmaktadır (Ozer ve diğ., 2012).

2.3 Mikotoksin Zararının Ekonomik Boyutu

Mikotoksin oluşumu özellikle tropikal ve sub-tropikal iklime sahip ülkelerde yaygın görülmektedir. Ancak tarım ürünlerinin uluslararası ticareti nedeniyle dünyanın her yerinde mikotoksin kontaminasyonuna rastlanabilmektedir (Oğuz, 2017). Dünya genelinde

yetiştirilen tarla bitkilerinin yaklaşık %25'inin küf kontaminasyonuna maruz kaldığı değerlendirilmektedir (Alshannaq ve Yu, 2017; Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Yapılan son çalışmalar ise bu değerin çok daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Streit ve diğ. (2013), yem ve yem hammaddelerinde en az bir mikotoksin çeşidini barındıran pozitif örnek oranını %72 olarak bulmuşlardır. Bir başka çalışmada ise 100 farklı ülkeden toplanan 74 821 yem örneğinde en az bir mikotoksin çeşidi açısından pozitif örnek oranı %88 olarak bulunmuştur (Gruber-Dorninger ve diğ., 2019).

Pek çok parametrenin etkili olması nedeniyle mikotoksin zararının formülize edilmesi ve net bir şekilde hesaplanması oldukça zordur (Zain, 2011). Küf zararı ve mikotoksin oluşumunun yarattığı ekonomik kayıplar genel itibariyle şu şekilde özetlenebilir (Oğuz, 2017):

- 1- Küflerin neden olduğu bitki enfeksiyonlarına bağlı verim kayıpları,
- 2- Mikotoksin kontaminasyonu nedeniyle tarım ürünlerinin ticari değer kaybı,
- 3- Kontamine yemlerle beslenen hayvanlarda gözlenen verim kaybı,
- 4- Halk sağlığının korunmasına yönelik yapılan harcamalar.

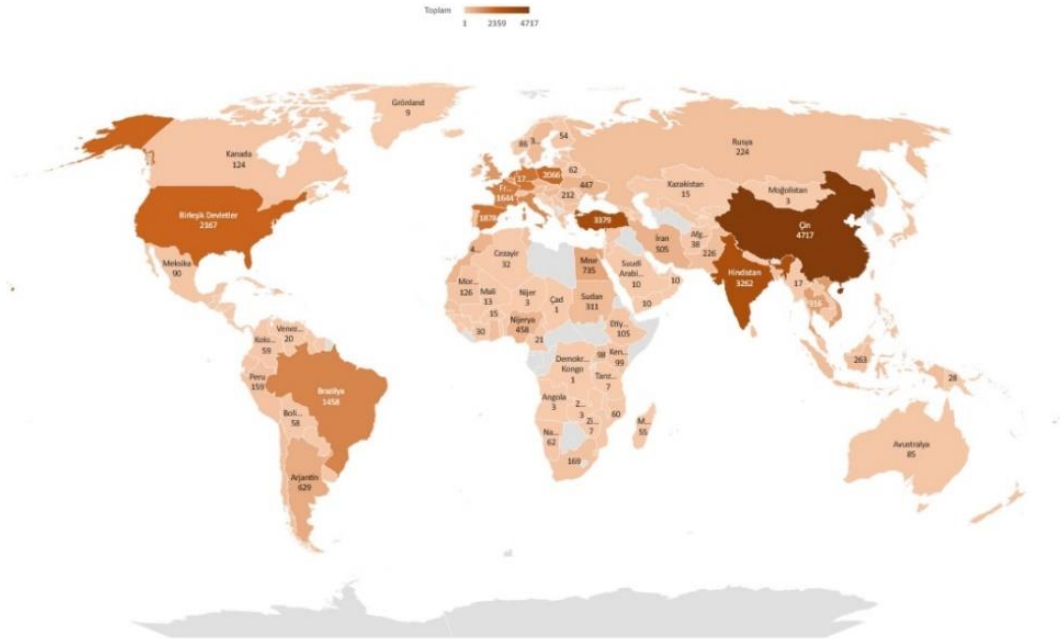
Mikotoksin oluşumu hem gelişmiş hem de gelişen ülkeler için önemli bir sorun oluşturmaktadır (Zain, 2011). Gelişmiş ülkeler daha çok ticari sorunlar ve ekonomik kayıplarla mücadele ederken; gelişmekte olan ülkeler hem ekonomik kayıplara hem de sağlık sorunlarıyla ilgili ek maliyetlere katlanmak zorundadır (Udomkun ve diğ., 2017). Küf zararının, ABD ekonomisi üzerine etkisinin yıllık 0.5-1.5 milyar USD arasında olduğu tahmin edilmektedir (Oğuz, 2017). Yalnızca aflatoksin oluşumunun ABD'li mısır üreticilerine yıllık 163 milyon USD'lık kayıp yaşattığı değerlendirilmektedir (Udomkun ve diğ., 2017). Afrika kıtasında aflatoksin zararının yıllık 750 milyon USD'nin üzerinde olduğu belirtilmektedir. AB'de ise aflatoksin düzenlemesinin ihracatçı firmalara yıllık tahmini 670 milyon USD'ye mal olduğu bildirilmektedir (Gbashi ve diğ., 2018). Geçmiş araştırmaların çoğu ticari kayıplara odaklanırken; kontaminasyonun neden olduğu sağlık harcamalarına ilişkin çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Örneğin, mikotoksikoz sonucu karaciğer kanserinden muzdarip bir kişinin tıbbi giderleri ve dolaylı harcamaları tam olarak bilinmemektedir (Udomkun ve diğ., 2017).

2.4 Türkiye'deki Mikotoksin Tehlikesine İlişkin Görünüm

2.4.1 Yerli ürünlerde mikotoksin bulunuşu

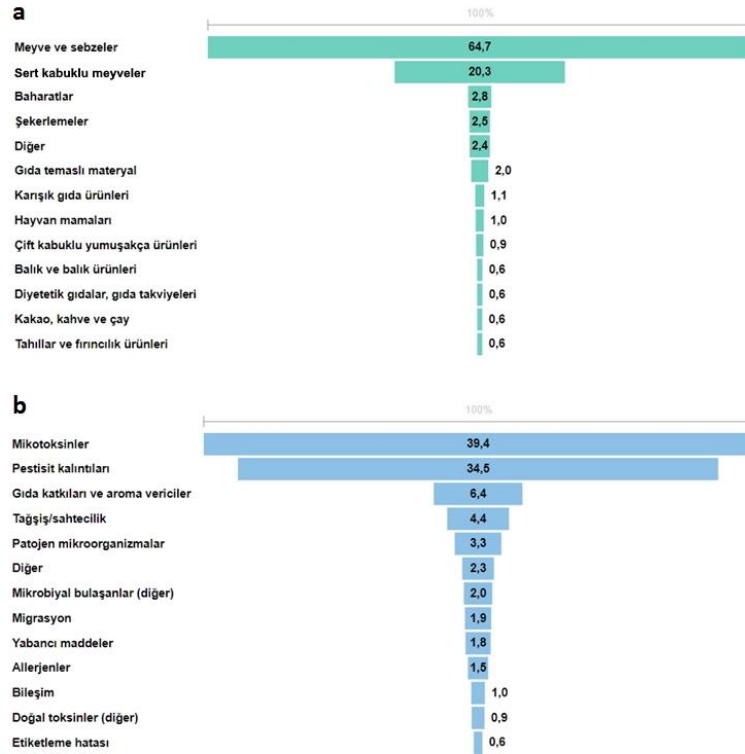
Türkiye gerek üretim miktarı gerekse ihracat hacmi bakımından tarımsal üretimde dünyada söz sahibi ülkelerden biridir. Kuru incir, kuru kayısı, kuru üzüm gibi kurutulmuş meyveler ve fındık üretiminde dünyada lider konumdadır. Aynı zamanda Antep fıstığı ve ceviz üretiminde de önemli bir yere sahiptir. 2020 yılı piyasa verilerine göre Avrupa Birliği'ne en fazla gıda ürünü ihraç eden ülkeler listesinde 6. sırada yer almaktadır (Karakaya ve Yilmaztekin, 2022).

Avrupa Birliği ve Avrupa Ekonomik Bölgesi ülkeleri gıda ve yemlerde rastlanan tehlikelere karşı daha hızlı bilgi paylaşımı sağlamak üzere Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi'ni (RASFF) kurmuşlardır. Bu sistemde, sorun tespit edilen gıda ürünleri tehlikenin boyutuna göre kategorize edilmekte ve gerekli tedbirlerin alınması için sisteme kayıtlı diğer ülkelere anlık bilgi akışı sağlanmaktadır. RASFF, sisteme kayıtlı olmayan ihracatçı ülkelerin kendi mamullerindeki tehlikeleri görmesi açısından da oldukça işlevseldir (Karakaya ve Yilmaztekin, 2022). Bu bağlamda, Türkiye orijinli ürünlerde karşılaşılan sorunları tespit etmek için 2011-2020 yılları arasındaki dönemi içeren RASFF sistem kayıtları incelenmiştir (Anonim, 2021a). Bu on yıllık periyotta ürünlerine (gıda, gıda temashı materyal ve yem) en fazla bildirim verilen ülkelerin sırasıyla Çin (4717 bildirim), Türkiye (3379 bildirim) ve Hindistan (3262 bildirim) olduğu görülmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 : 2011-2020 yılları arasında bildirim sayılarının menşei ülkelere göre dağılımı.

Türkiye'nin ihraç ettiği ürünler arasında en fazla bildirim alan grup meyve ve sebzeler olurken bunu sırasıyla sert kabuklu meyveler (fıstık, fındık, ceviz vb.) ve baharatlar takip etmektedir (Şekil 2.8a). Türkiye menşeli ürünlerde karşılaşılan en büyük sorun olarak mikotoksin kontaminasyonu karşımıza çıkmaktadır. Belirtilen dönemde Türkiye adına açılan kayıtların yaklaşık %39.4'ünü tek başına mikotoksinler oluşturmaktadır (Şekil 2.8b). Mikotoksin bildirimlerinin hemen hemen tamamına yakını ise aflatoksinlerle ilişkilidir.



Şekil 2.8 : 2011-2020 yılları arasında Türkiye menşeli ürünlerde ürün grubu (a) ve tehlike tipine (b) göre RASFF bildirimlerinin dağılımı.

Türkiye, AB'ye ihracat yapan ülkeler arasında ne yazık ki en fazla mikotoksin bildirim alan ülke durumundadır (Çizelge 2.1). Geçmiş çalışmalar, mikotoksin tehlikesinin sadece 2011-2020 arası dönemle sınırlı kalmadığını; uzun yıllardır süregelen bir sorun olduğunu göstermektedir (Yorulmaz ve Bircan, 2010).

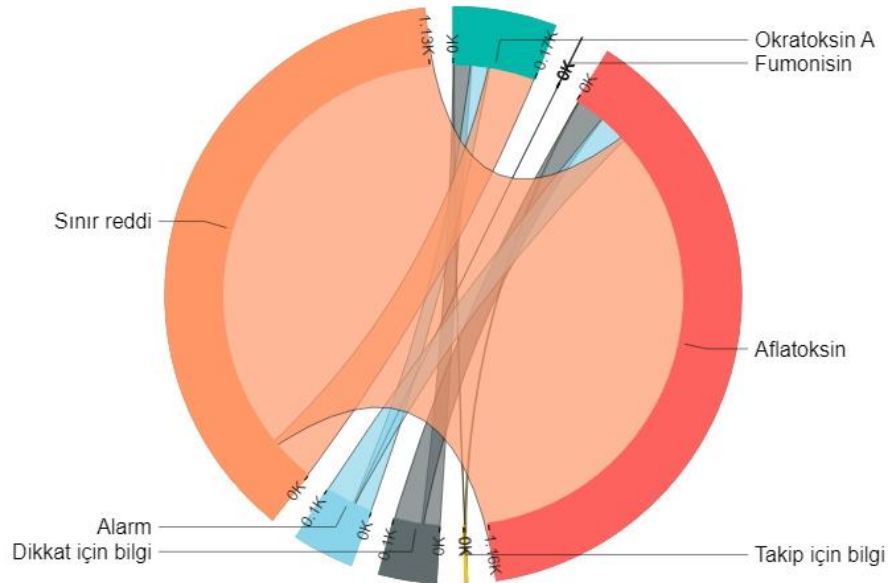
Mikotoksinler halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturduğundan kontaminasyon tespit edilen ihracat ürünleri çoğunlukla gümrükten geri çevrilmektedir (Şekil 2.9). Ege İhracatçı Birlikleri raporuna göre sadece 2021 yılında 668 ton kuru incir aflatoksin bulaşı nedeniyle imha edilmiştir (Anonim, 2022b). Ayrıca, yüksek bildirim sayısı, Türkiye menşeli ürünlerde ticari prestij kaybına yol açmakta ve sonraki yıllarda sınır kontrol sıklığının artırılmasına neden olmaktadır. Bu durum ihracatçı firmalara ekstra maliyet

yüklerken; gümrükten geçiş süreci de uzatmaktadır. Yaş meyve-sebze gibi malların gümrükte uzun süre bekletilmesi kalite ve ürün kayıplarına yol açabilmektedir (Yılmaz Çebi ve Olhan 2017).

Çizelge 2.1 : 2011-2020 yılları arasında toplam mikotoksin (Tm) ve aflatoksin (Af) bildirimlerinde en fazla bildirim alan 5 menşei ülke (Anonim, 2021a).

		2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Toplam
Türkiye	Tm	140	169	123	97	117	127	150	153	143	112	1331
	Af.	138	164	105	88	104	108	137	110	104	99	1157
Hindistan	Tm	183	122	38	45	38	47	54	33	32	44	636
	Af.	179	120	34	41	36	40	51	29	26	40	596
Çin	Tm	69	62	57	43	102	55	82	50	40	20	580
	Af.	64	61	54	40	98	53	82	43	34	15	544
ABD	Tm	21	12	18	27	38	51	57	98	93	54	469
	Af.	21	11	18	27	37	48	49	92	89	53	445
İran	Tm	41	21	17	49	55	60	52	31	15	31	372
	Af.	39	20	14	49	55	56	50	29	14	30	356
RASFF	Tm	707	557	472	451	527	580	598	689	630	463	5674
Toplamı*	Af.	637	506	391	395	455	490	549	582	526	389	4920

* Tüm ülkelerin aldığı bildirim toplamı.



Şekil 2.9 : 2011-2020 yılları arası Türkiye menşeli ürünlerde tespit edilen mikotoksin çeşitleri ve verilen bildirim tiplerinin dağılımı.

Yurt içi pazar ürünleri üzerine yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlar da iç açıcı değildir. Geçmiş bir çalışmada toz kırmızı biber, kuru incir, ceviz ve çekirdeksiz kuru üzüm numunelerinde aflatoksinli örnek oranı sırasıyla %72, %51, %64 ve %64 olarak bulunmuştur (Yılmaz, 2017). Bir başka çalışmada ise çikolata ve çikolatalı gofret örneklerinin (n=130), %16.9'sunda aflatoksin; %24.6'sında OTA varlığına rastlanmıştır

(Kabak, 2019). Türkiye piyasasında satışa sunulmuş pirinç örneklerinde (n=20) DON ve ZEA mikotoksinleri açısından pozitif örnek oranı sırasıyla %35 ve %55 olarak belirlenmiştir. Mısır örneklerinde (n=15) ise bu oran sırasıyla %13.3 ve %20 olarak tespit edilmiştir (Golge ve Kabak, 2020). Başka bir çalışmada, tahıl bazlı bebek ve çocuk mamalarında DON bulunma oranı %21.3 olarak rapor edilmiştir (Kirimker ve diğ., 2020).

Kontamine yemlerden hayvansal ürünlere taşıma yoluyla mikotoksin geçişi bilinen bir olgudur. Gruber-Dorninger ve diğ. (2019), dünyanın çeşitli noktalarından 10 yıl boyunca yem örnekleri toplamış ve mikotoksin varlığını analiz etmişlerdir. Türkiye'nin de içerisinde yer aldığı Güney Avrupa bölgesinden temin edilmiş yemlerde AFB₁, OTA, DON ve ZEA açısından pozitif örnek oranı sırasıyla %28.9, %21.2, %52.9 ve %36.3 olarak bulunmuştur. Bölgeyi en fazla örnekle (%10.4 örnek oranı) Türkiye temsil ettiğinden ülkemizde kullanılan besi yemlerinin de ciddi bir mikotoksin riski taşıdığı düşünülmektedir. Keza, Adana ilinden temin edilen süt ürünlerinde AFM₁ varlığını inceleyen bir araştırmada 20 süt numunesinin tamamında (%100) AFM₁ bulaşı tespit edilirken; beyaz peynirde 16 numune (%80), kaşar peynirde ise 10 numune (%50) pozitif sonuç vermiştir (Var ve Kabak, 2009). Kayseri ilinden toplanan köy sütlerinde ise 90 numunenin tamamının AFM₁ ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu numunelerden %70'inin AB mevzuatlarınca belirlenen limitlerin üzerinde AFM₁ içerdiği tespit edilmiştir (Buldu ve diğ., 2011).

2.4.2 Toplum sağlığı açısından mikotoksinler

Tarlada ya da depolama sırasında fungal kontaminasyonun engellenememesi, ekonomik kayıpların yanı sıra halk sağlığı için de kaçınılmaz olarak risk oluşturmaktadır (Lee ve Ryu, 2015). Dünya genelinde, yalnızca aflatoksin maruziyetine bağlı yıllık engelliliğe ayarlanmış yaşam yılı (DALY) kaybının 36 milyon yıla kadar çıkabildiği belirtilmektedir (Marechera ve Ndwiga, 2014).

Türkiye pazarındaki ürünlerde mikotoksinlerin yaygın bulunuşu maruziyet riskini de bir o kadar arttırmaktadır. Türkiye'de yaşayan insanların mikotoksinlere maruz kalma sıklığı ve düzeyi üzerine yapılan araştırmalar özellikle son yıllarda hız kazanmıştır. Sabuncuoğlu ve diğ. (2015), orta Anadolu bölgesinde yaşayan insanlarda aflatoksin ve OTA maruziyetinin mevsimsel değişimini incelemişlerdir. Kış mevsiminde alınan kan serumu numunelerinin %74.3'ünde AFB₁ tespit edilirken; yaz mevsiminde bu oran %90.8'e ulaşmıştır. Benzer şekilde kış ayında alınan numunelerde OTA tespit edilen örnek oranı

%83.2 iken; yaz aylarında alınan tüm örneklerin OTA pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde yaşayan insanların OTA maruziyeti incelenmiştir. Yapılan değerlendirmede, OTA tespit edilen örnek oranının %76.7 (kış mevsimi) ile %97.5 (yaz mevsimi) arasında değiştiği belirlenmiştir (Erkekoğlu ve diğ., 2010).

Mikotoksin varlığına yalnızca kan serumunda değil anne sütünde de sık rastlanmaktadır. Ankara ilinde toplanmış 75 anne sütü numunesinin tamamında 620.87 ile 13111.30 ng/L arası değişen düzeylerde OTA kontaminasyonuna rastlanmıştır. Bu sonuç annelerin yüksek düzeyde OTA'ya maruz kaldıklarına ve mikotoksin kontaminasyonunun hem bebekler hem de anneler için tehlike arz ettiğine işaret etmektedir (Gürbay ve diğ., 2010). Anne sütü üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise 90 numunenin tamamında 35.7-682 ng/L arası değişen miktarlarda ZEA bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada anne sütündeki DON konsantrasyonunun 400-14997 ng/L arasında değiştiği belirlenmiştir (Dinleyici ve diğ., 2018).

Mikotoksin bulaşı büyükten küçüğe tüm toplumu tehdit etmektedir. Asci ve diğ. (2014), Antalya bölgesinde yaşayan 4-8 yaş arası kız çocuklarında ZEA maruziyetini araştırmış ve bu konuda oldukça önemli bulgular elde etmişlerdir. Kontrol grubu çocuklardan alınan idrar örneklerinin %88'inde ZEA kalıntısına rastlanmıştır. Ayrıca, premature telarş² hastası çocuklara ait numunelerde kontrol grubunun yaklaşık 2 katı ZEA bulunurken; idiyopatik santral puberte prekoks³ hastası çocuklardan alınan numunelerde kontrol grubunun yaklaşık 3 katı kadar ZEA bulunduğu belirlenmiştir (Asci ve diğ., 2014).

Bu sonuçlar, mikotoksin maruziyetinin Türk toplumunda oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Sorunun temelini gıda ve yemlerdeki mikotoksin kontaminasyonu oluşturmaktadır. Gıda güvenliğinin sağlanması için iç piyasa ve ihracat ürünlerinde denetim sıklığının artırılması gerektiği açıktır. Uzun vadede kalıcı bir çözüm içinse mikotoksin oluşumunu önlemeye yönelik yeni politikalar üretilmesine ihtiyaç vardır. Alınacak önlemlerin etkinliğini kontrol etmek için sıkı bir takip ve denetim programı yürütülmesi gerektiği değerlendirilmektedir (Karakaya ve Yılmaztekin, 2022).

² Premature telarş: 8 yaşından önce diğer bulgular olmaksızın meme gelişimi.

³ İdiyopatik santral puberte prekoks: İkincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesi.

2.5 Yasal Düzenlemeler ve Mikotoksin Analizleri

Mikotoksinler, düşük bulaş seviyelerinde bile sağlık üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. Dünya çapında dağılım göstermesi ve yaygın bulunuşu nedeniyle halk sağlığı konusunda endişe yaratmaktadır. Bu nedenle, birçok ülke tüketiciyi mikotoksin kaynaklı sağlık risklerinden korumak için gıdalarda bulunabilecek mikotoksin üst sınırlarıyla ilgili yasal düzenlemeler oluşturmuştur (Lee ve Ryu, 2015). Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2003 yılı raporunda en az 99 ülkenin gıda ve yemlerde bulunabilecek mikotoksin miktarları ile ilgili yasal düzenleme ya da talimatnamelere sahip olduğu bildirilmektedir (van Egmond ve diğ., 2007). Bu konuda özellikle Afrika ülkelerinin oldukça geride kaldığı ve bu ülkelerin sadece %28'inde mikotoksinlerle ilgili düzenleme bulunduğu ifade edilmektedir (Chilaka ve diğ., 2022).

Yasal düzenlemeler mevcut risk değerlendirmeleri dikkate alınarak hazırlanmaktadır. Limitler belirlenirken bileşiğin bilinen toksik etkileri, o bölgede yaşayan insanların diyet alışkanlıkları ve ürünün hitap ettiği nihai tüketici kesimi (bebek, çocuk veya yetişkin) dikkate alınmaktadır (van Egmond ve diğ., 2007). Avrupa Komisyonu tarafından düzenlemesi yapılan mikotoksinler aflatoksinler (B_1 , $B_1+B_2+G_1+G_2$, M_1), okratoksin A, deoksinivalenol, zearalenon, fumonisinler (B_1+B_2) ve patulindir. Ayrıca T-2 ve HT2 mikotoksinlerinin de kapsam dahiline alınması gündemdedir (EC, 2006a). Türkiye'de de çeşitli gıdalarda bulunabilecek bulaş üst limitlerini düzenlemek üzere "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği" yürürlüğe konmuştur. Mevcut düzenleme, Avrupa Birliği'ne uyum çerçevesi kapsamında yukarıda adı geçen mikotoksinleri (T-2 ve HT2 hariç) kapsamaktadır (TGK, 2011). Her bir mikotoksin için belirlenen üst limit gıdadan gıdaya değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin, bebek ve küçük çocuk ek gıda formülasyonlarında AFB_1 kalıntı limiti daha düşükken, baharatlar için belirlenen limit nispeten daha yüksektir (EC, 2006a; TGK, 2011). Ayrıca analizlerde kullanılacak örnekleme prosedürü ve metodun bazı asgari yeterlilikleri karşılaması amacıyla "Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği" yürürlüğe konmuştur (TGK, 2018).

Mikotoksinler gözle görülemediği gibi karakteristik kokuları yoktur ve üzerinde bulunduğu gıdaların organoleptik özelliklerini de değiştirmezler (Agriopoulou ve diğ., 2020). Bu nedenle, gıda ve yemlerdeki mikotoksin varlığı ileri analiz teknikleri

kullanılmadan kolayca tespit edilememektedir (Ngulla, 2019). Çok çeşitli kimyasal özelliklere sahip olduklarından hepsi için ortak bir ekstraksiyon, temizlik ve tespit metodu geliştirmek oldukça güçtür. Ekstraksiyon işlemi genellikle bir blender ya da çalkalayıcıda homojenize edilmiş ürünün organik çözücü karışımlarıyla muamelesini içerir. Temizleme aşamasında ise her bir mikotoksin çeşidi için özel olarak imal edilmiş katı faz ekstraksiyon kolonu ya da immüno affinite kolonlardan faydalanılmaktadır (Ates ve diğ., 2013).

Mikotoksin araştırmalarının başladığı günden bugüne analizlerde sıklıkla kromatografik yöntemlere başvurulmuştur. Bu teknikler geçen zaman dilimi içerisinde sürekli gelişim göstermiş olup mikotoksin varlığını tespit etmek, doğrulamak ve ölçmek amacıyla hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Ngulla, 2019). Günümüzde kullanılan klasik mikotoksin analiz metotları içerisinde bir dedektör sistem (UV, floresans, elektron yakalama, kütle spektrometresi vb.) entegre edilmiş sıvı veya gaz kromatografisi uygulamalarını barındırmaktadır (Krska ve diğ., 2008). Son yıllarda, mikotoksin analizlerinde çoğunlukla üçlü kuadropol kütle spektrometrelerine bağlı sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) sistemi tercih edilmektedir. LC sistemiyle bütünleşik MS/MS dedektörler mikotoksin tespitinde oldukça hassas ve seçici bir analiz aracı olmasıyla öne çıkmaktadır (Herebian ve diğ., 2009; Ates ve diğ., 2013). Bunların dışında ön temizleme ya da türevlendirme işlemi gerektirmeyen ELISA testi gibi hızlı tespit teknikleri de mikotoksin analizlerinde başvuru yöntemleri arasında yer almaktadır (Krska ve diğ., 2008).

2.6 Sinopsis: Mikotoksin Araştırmalarının Dünü, Bugünü ve Yarını

2.6.1 Geçmişten günümüze mikotoksinler

Mikotoksikoz uzun zamandır bilinmesine rağmen 1960'ların başına kadar hep göz ardı edilen bir sorun olarak kalmıştır (van Egmond ve diğ., 2007). Aflatoksinlerin keşfi mikotoksikoloji adına bir kırılma noktası olmuştur (CAST, 2003; Smith ve diğ., 2019). 1960 ile 1975 arasındaki dönemde bilim dünyası bu toksik ajanlar üzerine odaklanmış ve araştırmalar için de iyi bir finansman sağlanmıştır. Bu nedenle, belirtilen zaman dilimi mikotoksinler için "altına hücum" dönemi olarak adlandırılmıştır (Bennett ve Klich, 2003).

Güncel çalışmalar mikotoksin tehlikesinin artarak devam ettiğini göstermektedir. 2020 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada, 79 ülkeden alınan 21 709 yem numunesinin %65'inin en az bir mikotoksinle kontamine olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'nin de içerisinde bulunduğu Ortadoğu bölgesinde birden fazla mikotoksinle kontamine olmuş

numune oranının %80'in üzerine çıktığı belirlenmiştir (Anonim, 2021b). Çeşitli raporlarda Türkiye mikotoksin oluşumu açısından yüksek riskli ülkeler arasında gösterilmektedir (Raduly ve diğ., 2020; Anonim, 2021b). RASFF sisteminde en fazla mikotoksin bildirimi alan ülke konumunda olması da bu çıkarımı desteklemektedir (Anonim, 2021a).

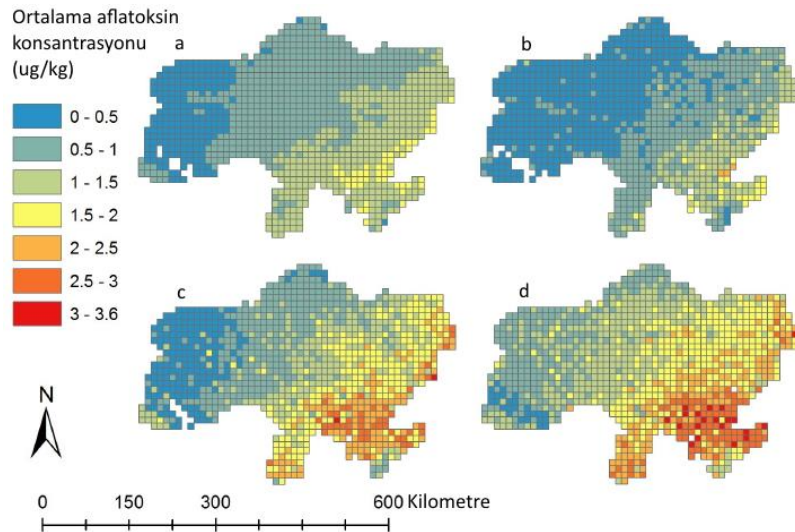
2.6.2 Geleceğe yönelik beklentiler

Mikotoksin oluşumu ve zararına ilişkin gelecek öngörülleri iki temel sorun üzerinde durmaktadır: nüfus artışı ve iklim değişikliği. Birleşmiş Milletler Nüfus Birimi'nin gelecek projeksiyonuna göre dünya nüfusunun 2050 yılında 9.8 milyara ulaşması beklenmektedir. Bazı araştırmacılar yeryüzü kaynaklarının ancak 10 milyara kadar insan nüfusunu destekleyebileceği görüşündedir (Balendres ve diğ., 2019). Sadece 2011-2013 yılları arasında bile hali hazırda 842 milyon insanın yetersiz beslendiği hesaplanmaktadır. Nüfus artış hızı dikkate alındığında insanlığı önümüzdeki yıllarda gıda arzıyla ilgili çok daha büyük bir imtihanın beklediği aşıkardır. Mikotoksinler gibi tehlikeli maddelerin varlığı gıda ürünlerinin arzını sınırlandıran bir faktördür (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Dünyadaki yoksul ve güvenilir gıdaya erişmede sorun yaşayan insanların çoğu kırsal kesimde yaşamaktadır. Doğrudan veya dolaylı olarak tarımsal üretime bağımlı olduklarından tarımsal üretimi etkileyebilecek her türlü riske maruz kalmaktadırlar (FAO, 2015). IARC ve Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016'daki basın bülteninde gelişmekte olan ülkeler için mikotoksin kontaminasyonuna karşı harekete geçme çağrısı yapılmıştır. Rapora göre bu ülkelerde her gün 500 milyon insanın maddi yetersizlikler nedeniyle doğal toksinlere (mikotoksinler dahil) maruz kaldığı bildirilmektedir (Agriopoulou ve diğ., 2020).

Gelecek yıllarda mikotoksin tehdidini alevlendirebilecek bir diğer husus da küresel ısınmadır. Her ne kadar tartışmalar politik ekseninde devam etse de küresel ısınma kanıtları açıkça ortaya konmuş bir gerçekliktir (Medina ve diğ. 2017). Yapılan değerlendirmelerde, ortalama sıcaklığın 21. yüzyılın sonuna kadar 1.5 ile 4.5 °C arası artış göstereceği ifade edilmektedir. Küresel ısınmanın bir sonucu olarak şiddetli yağış, sel, sıcak hava dalgaları, kuraklık, uzun süreli soğuk kış gibi iklim koşullarında aşırılaşma ve sera gazı birikiminde artış yaşanması beklenmektedir (Daou ve diğ., 2021). Tarım endüstrisi, büyük oranda iklim koşullarına bağılı olduğundan aşırı değişimlerden fazlasıyla etkilenmektedir. Küresel ısınma ve iklim değişiklikleri mahsullerin daha fazla biyotik ve abiyotik stres kombinasyonlarına maruz kalmasına neden olacaktır (Medina ve diğ. 2017). Yüksek

sıcaklık, nem veya kuraklık koşullarında küf kontaminasyonu daha fazla gerçekleşmektedir. Örneğin, *A. flavus* türleri olumsuz iklim koşullarına uyum sağlama ve diğer türlere üstünlük kurma konusunda son derece gelişmiş fizyolojik mekanizmalara sahiptir (Mahato ve diğ., 2019). Bircan ve diğ. (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada Aydın'da üretilen kuru incirlerdeki aflatoksin miktarının yıllara göre değişimini incelemiştir. 2003-2007 yılları arasında, en fazla aflatoksin bulaşının 2007 yılına ait mahsullerde olduğu tespit edilmiştir. Belirtilen yılda diğer yıllara kıyasla ortalama sıcaklığın daha yüksek, toplam yağış ve nisbi nemin ise daha düşük olmasından ötürü aflatoksin oluşumunda bir artış yaşandığı sonucuna varmışlardır.

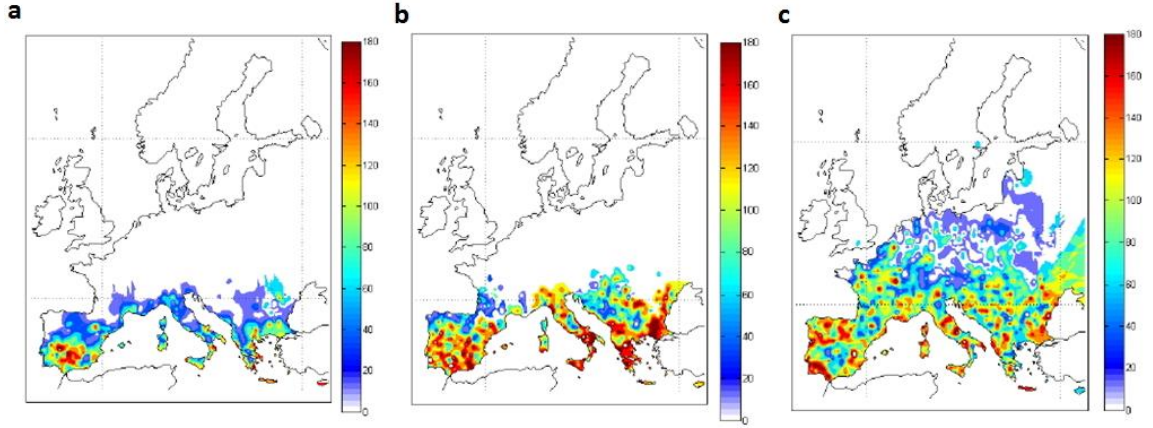
Sıcaklık artışının mikotoksin kontaminasyonuna etkisi üzerine pek çok gelecek modellemesi yapılmıştır. Van der Fels-Klerx ve diğ. (2019) 2030 yılı için oluşturdukları iklim modelleriyle, sıcaklık artışının Ukrayna'da yetiştirilen mısırlarda AFB₁ kontaminasyonunu arttıracaklarını tahmin etmişlerdir (Şekil 2.10). Modeller, özellikle ülkenin güneydoğu kesimlerinde aflatoksin bulaşının daha yüksek olacağını göstermektedir.



Şekil 2.10 : 2030 yılı için 3 farklı iklim senaryosunda mısırdaki tahmini AFB₁ kontaminasyonunu (µg/kg) gösteren Ukrayna haritası. Mevcut durum (10.4-20.8 °C, 360 mm/yıl yağış) (a), DMI modeli (10.6-20.3 °C, 333 mm/yıl yağış) (b), ETHZ modeli (10.9-20.6 °C, 244 mm/yıl yağış) (c), METO modeli (11.4-21.3 °C, 250 mm/yıl yağış) (d); (Van der Fels-Klerx ve diğ., 2019).

İklim değişikliğinin etkisinin coğrafi bölgelere farklılık göstereceği tahmin edilmektedir (Daou ve diğ., 2021). 2079 yılı için 3 farklı sıcaklık senaryosunda Avrupa'da yetiştirilen mısırlarda karşılaşılabilecek AFB₁ kontaminasyon riski modellenmiştir (Şekil 2.11). Modele göre 2 °C'lik sıcaklık artışı Avrupa'da tarımın ağırlıklı olduğu bölgelerde

aflatoksin riskini açık bir şekilde arttırmaktadır. Bu senaryoda özellikle İspanya, İtalya, Balkanlar ve Türkiye⁴ gibi orta ve güney kesimler için risk yüksek gözükmemektedir. Ancak 5 °C'lık sıcaklık artışında güney kesimlerinin iklim koşulları *A. flavus* gelişimi için çok elverişli olmadığından risk nispeten düşüş göstermektedir. Buna karşın, 5 °C'lık sıcaklık artışı senaryosunda AFB₁ riskinin daha çok Avrupa'nın kuzey kesimlerine taşınacağı tahmin edilmektedir (Battilani ve diğ., 2012).



Şekil 2.11 : 2079 yılı için 3 farklı sıcaklık senaryosunda mısırdaki tahmini AFB₁ kontaminasyon riskini gösteren Avrupa haritası. Mevcut iklim koşullarında (a), 2 °C (b) ve 5 °C (c) sıcaklık artışı durumunda oluşacak AFB₁ riski (Battilani ve diğ., 2012).

İklim değişikliğinin doğrudan etkilerinin yanı sıra dolaylı olarak da mikotoksin oluşumuna katkıda bulunabileceği değerlendirilmektedir. İklim koşullarına bağlı olarak böcek zararının artması, mahsulün erken olgunlaşması ve bitki direncinin azalması gibi faktörler de küf zararı ve mikotoksin oluşumuyla yakından ilgilidir (Daou ve diğ., 2021).

2.6.3 Muhtemel fırsatlar

Mikotoksin analizlerinde en sık başvurulanan yöntemler sırasıyla sıvı kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (TLC), ELISA ve gaz kromatografisidir (van Egmond ve diğ., 2007). Özellikle son on yılda mikotoksin analizlerinde en çok tercih edilen teknik HPLC olmuştur (Devreese ve diğ., 2012; Ngulla, 2019). Gıda ve yemlerde gerçekleştirilen mikotoksin analizlerinde güvenilir sonuçlar elde etmek için referans maddelerin kullanımı kilit faktördür (Pascale ve diğ., 2019). Tüm akredite laboratuvarlar doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için yüksek saflıkta standart madde kullanımına ihtiyaç duymaktadır. Ancak küresel ölçekte bu maddelerin ticaretini yapan firma sayısı sınırlı olduğundan fiyatları son derece yüksektir (Ngulla, 2019). Türkiye pazarında satışa sunulan bazı analitik

⁴ Çalışmada, Türkiye'nin sadece Avrupa yakası modele dahil edilmiştir.

mikotoksin standartlarının güncel piyasa fiyatları Çizelge 2.2'de verilmiştir (Anonim, 2022c). Yüksek piyasa fiyatlarının oluşmasında şirket politikaları da etkilidir. Bu alanda faaliyet gösteren bazı şirketlerin oldukça agresif bir pazarlama politikası yürüttüğü ve kar kaybındansa müşteri kaybını tercih ettiği ifade edilmektedir (Chitzos, 2018).

Çizelge 2.2. Bazı analitik mikotoksin standartlarının güncel piyasa fiyatları (Anonim, 2022c).

Analitik standart madde	Konsantrasyon	Ambalajlama biçimi	Satış fiyatı*
Aflatoksin karışık standart çözeltisi	2 µg/mL AFB ₁ , 0.5 µg/mL AFB ₂ , 2 µg/mL AFG ₁ , 0.5 µg/mL AFG ₂	1 mL, asetonitril çözeltisi	7072.9 TL
AFB ₁ standart çözeltisi	2 µg/mL AFB ₁	2 mL, asetonitril çözeltisi	6120.8 TL
AFB ₂ standart çözeltisi	0.5 µg/mL AFB ₂	2 mL, asetonitril çözeltisi	6120.8 TL
OTA standart çözeltisi	10 µg/mL OTA	2 mL, asetonitril çözeltisi	8510.8 TL
DON standart çözeltisi	100 µg/mL DON	2 mL, asetonitril çözeltisi	8335.9 TL
ZEA standart çözeltisi	100 µg/mL ZEA	2 mL, asetonitril çözeltisi	8724.5 TL

* Türkiye Cumhuriyeti Merkez Bankası 25/11/2022 tarihli döviz satış kuru (Euro: 19.431 TL) baz alınmıştır.

Yüksek maliyet nedeniyle pek çok kurum mikotoksin standartlarının temininde güçlük yaşayabilmektedir (Ngulla, 2019). Ayrıca ekonomik çekinceler bilimsel çalışmaları da kısıtlayan bir faktördür (Devreese ve diğ., 2012). Aflatoksinlerin ilk kez tanımlanmasından bugüne Scopus veritabanına 16 binin üzerinde mikotoksin çalışması kaydedilmiştir (Liew ve Mohd-Redzwan, 2018). Son yıllarda, aflatoksin araştırmalarının sayısı tüm dünyada ivme kazanmış olup; konu üzerine en fazla bilimsel çalışma yayınlayan ülkelerden biri de Türkiye'dir (Zyoud, 2019). Buradan hareketle, ilerleyen yıllarda bilimsel çalışmalar için mikotoksin standartlarına daha fazla ihtiyaç duyulacağı söylenebilir.

Yapılan piyasa araştırmaları pazar hacminde büyüme beklentisi olduğunu göstermektedir. Dünya genelinde mikotoksin analiz hizmetleri pazarının 2025 yılına kadar 1.3 milyar doların (USD) üzerine çıkacağı öngörülmektedir (Anonim, 2020b). Bununla birlikte Türkiye, mikotoksin test hizmetleri için gelişen bir pazar olarak görülmekte ve gelecekte bölgenin en büyük pazarlarından biri olması beklenmektedir (Chitzos, 2018). 2015 yılı itibarıyla Türkiye'de akredite olmuş kamu ve özel toplam 156 gıda analiz laboratuvarı bulunduğu bildirilmiştir. Bu laboratuvarlardan 75 tanesinin mikotoksin analizleri için akreditasyonu bulunmaktadır (Yeşilören ve Karataş, 2019). Son yıllarda mikotoksin kontaminasyonunda artış yaşanması nedeniyle ihraç ürünlerinde örnekleme sıklığı da arttırılmıştır. Bu durum ihracatçı firmaların kendi şirket içi analizlerini yapmaya ağırlık vermesine neden olmuştur (Chitzos, 2018). Ayrıca, 2022 yılı kayıtlarına göre ülkemizde eğitim ve araştırma faaliyetlerine devam eden 208 üniversite bulunmaktadır (Anonim, 2022d). Bu üniversitelerin pek çoğu bünyesinde mikotoksinler üzerine araştırma

yapma kapasitesine ve potansiyeline sahip bölüm/anabilim dallarını barındırmaktadır. Kamu, özel ve üniversite/araştırma laboratuvarlarının çokluğu dikkate alındığında, başta analitik standartlar olmak üzere mikotoksin test malzemelerinin Türkiye’de büyük bir pazar hacmine sahip olduğu değerlendirilmektedir.

Güncel çalışmalar, gıda güvenliğini tehdit eden mikotoksin sorunun devam ettiğini göstermektedir (Gruber-Dorninger ve diğ., 2019; Anonim, 2021b; Karakaya ve Yilmaztekin, 2022). Bu konuda yapılan gelecek projeksiyonları da ne yazık ki iyimser tahminler sunmamaktadır (Battilani ve diğ., 2012; Van der Fels-Klerx ve diğ., 2019). Türkiye, son yıllarda RASFF sisteminde en fazla mikotoksin bildirim alan ülke olmasına rağmen analizlerde ihtiyaç duyulan standartları ithalat yoluyla temin etmektedir. Bu durum esasında kendi içerisinde büyük bir tezat oluşturmaktadır. Örneğin, RASFF sistemine kayıtlı bir bildirim (referans no: 2019.3986) göre Türkiye’den gönderilen kuru incir örneğinde 103.48 µg/kg AFB₁ ve 263.69 µg/kg toplam aflatoksin tespit edilmiş ve ürün gümrükten geri çevrilmiştir (Anonim, 2021a). Gümrükten geri dönen aflatoksinli kuru incirler çimento fabrikalarında yakılarak imha edilmektedir (Anonim, 2022b). 1 kg kuru incirin piyasa fiyatı ortalama 100 TL civarındayken; bu incir örneğinin üzerindeki miktara denk saflaştırılmış AFB₁ standardının piyasa değeri yaklaşık 158 345 TL’dir. Bu kadar güçlü mikotoksijenik küf türlerinin bulunduğu ve kontrolsüz koşullarda bile yüksek miktarlarda mikotoksin oluşumuna rastlanılan bir ülkede ne yazık ki mikotoksin standartları ithal edilmektedir. Ancak "Her krizin ortasında bir fırsat yatar" düşüncesini göz önünde bulundurarak, kötümser senaryoların ardından tabloyu bir de tersinden okumakta fayda vardır. Türkiye’de yetişen ürünlerde mikotoksijenik türlere ve mikotoksin kontaminasyonuna sık rastlanması; analizlerde ihtiyaç duyulan sarfların yerli üretimi için bir fırsat yaratmaktadır. Bu konuda yerli üretimin desteklenmesi için ilk adım TÜBİTAK tarafından atılmış ve aflatoksin immüno affinite kolon üretim projesinde ortaya çıkan ürünler için teknoloji transferi gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2016). Ancak analiz maliyetlerini arttıran bir diğer unsur olan analitik mikotoksin standartlarında dışa bağımlılık devam etmektedir. Mikotoksijenik türlerin Türkiye coğrafyasında yaygın bulunuşu sayesinde yerli izolatlar elde edilebileceği ve bu izolatlar kullanılarak kontrollü koşullarda mikotoksin üretimi gerçekleştirilebileceği değerlendirilmektedir. Yerli üretimin mikotoksin standartlarının temininde dışa bağımlılığı ve dolayısıyla ülkeden döviz çıkışı azaltma potansiyeli bulunmaktadır. Uygun maliyetli ve erişilebilir mikotoksin standartlarına sadece yurt içinde değil yurt dışı pazarında da ihtiyaç duyulmaktadır. DSÖ,

gelişmekte olan ülke laboratuvarları için uygun maliyetli analiz sarflarına ve analitik yöntemlere gereksinim duyulduğunu rapor etmektedir (WHO, 2006). Özellikle Afrika lkelerinde analitik standart maliyetinin yüksek oluğu nedeniyle yeterli sayıda mikotoksin analizi gerçekleştirilemediği ifade edilmektedir (Ngulla, 2019). Türkiye'de üretilcek analitik mikotoksin standartlarının Ortadoğu ve Afrika lkeleri bağta olmak üzere yurt dığına ihracat potansiyeli de bulunmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Gıda örnekleri

Çalışmada kullanılmak üzere mikotoksijenik küf gelişimine elverişli toplam 48 adet gıda örneği temin edilmiştir. Numunelerden bir tanesini Brezilya, diğerlerini ise Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinde yetiştirilmiş örnekler oluşturmaktadır (Çizelge 3.1). Örneklerden her biri en az 250 g'lık numuneler halinde, birbiri ile doğrudan temas etmeyecek şekilde paketlenerek derhal bölüm laboratuvarlarına getirilmiştir.

Çizelge 3.1 : İzolasyonda kullanılan gıda örnekleri ve üretim yerleri.

Sıra	Örnek kodu	Gıda örneği	Üretim yeri	Üretim yılı
1	A1	Arpa	Konya	2019
2	B1	Buğday	Antalya	2020
3	B2	Buğday	Batman	2019
4	B3	Buğday	Konya	2019
5	BK1	Biber, kuru	Antalya	2020
6	BK2	Biber, kuru	Antalya	2021
7	BKY1	Biber, kapa	Mersin	2020
8	BKY2	Biber, kapa	Kahramanmaraş	2021
9	BKY3	Biber, kapa	Mersin	2020
10	BKY4	Biber, kapa	Mersin	2020
11	CF1	Çam fıstığı	Adana/Antep	2020
12	IS1	İsot biber	Şanlıurfa	2020
13	IS2	İsot biber	Şanlıurfa	2020
14	IS3	İsot biber	Şanlıurfa	2020
15	IE1	İncir, ezme	Aydın	2019
16	IK1	İncir, kuru	Aydın	2019
17	IK2	İncir, kuru	Aydın	2019
18	IK3	İncir, kuru	Antalya	2019
19	IK4	İncir, kuru	Aydın	2019
20	IK5	İncir, kuru	Aydın	2020
21	IK6	İncir, kuru	Aydın	2020
22	IK7	İncir, kuru	Aydın	2020
23	KC1	Kahve çekirdeği	Brezilya	2019
24	KC2	Kahve çekirdeği	Antalya	2020
25	KK1	Kayısı, kuru	Malatya	2019
26	KK2	Kayısı, kuru	Malatya	2019
27	KK3	Kayısı, kuru	Malatya	2020
28	KK4	Kayısı, kuru	Malatya	2019
29	KK5	Kayısı, kuru	Malatya	2020
30	KY1	Kayısı, yaş	Malatya	2020
31	KY2	Kayısı, yaş	Malatya	2020
32	M1	Mısır	Antalya	2020

Çizelge 3.1 (devam) : İzolasyonda kullanılan gıda örnekleri ve üretim yerleri.

Sıra	Örnek kodu	Gıda örneği	Üretim yeri	Üretim yılı
33	M2	Mısır	Antalya	2020
34	M3	Mısır	Antalya	2020
35	M4	Mısır	Adana	2020
36	PB1	Pulbiber	Şanlıurfa	2019
37	PB2	Pulbiber	Şanlıurfa	2019
38	PB3	Pulbiber	Şanlıurfa	2019
39	TB1	Toz biber	Kahramanmaraş	2020
40	TB2	Toz biber	Kahramanmaraş	2020
41	UK1	Üzüm, kuru	Malatya	2019
42	UK2	Üzüm, kuru	Malatya	2019
43	UK3	Üzüm, kuru	Malatya	2019
44	UY1	Üzüm, yaş	Mersin	2020
45	UY2	Üzüm, yaş	Mersin	2020
46	YF1	Yer fıstığı	Antalya	2019
47	YF2	Yer fıstığı	Osmaniye	2019
48	YF3	Yer fıstığı	Osmaniye	2019

3.1.2 Besiyerleri

Besiyeri bileşiminde kullanılan antibiyotikler (oksitetrasiklin, ampisilin ve kloramfenikol) Sigma-Aldrich firmasından (Almanya) satın alınmıştır. Maya ekstraktı, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve pH ayarlamada kullanılan HCl (%37) Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. $NaNO_3$ Chemsolute (Renningen, Almanya), malahit yeşili okzalat tuzu ise ZAG Kimya (İstanbul, Türkiye) firmalarından satın alınmıştır. Aksi belirtilmediği sürece, diğer besiyeri bileşenleri Sigma-Aldrich firmasından (Steinheim, Almanya) temin edilmiştir.

Tüm besiyerleri kullanım öncesi 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak (Nüve OT 90L, Türkiye) sterilize edilmiştir. Besiyerlerinin pH'sı 2 N NaOH ve 2 N HCl çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Agar formunda hazırlanan besiyerlerinde bulaş kontrolü için petriler 2 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanılmıştır. Besiyerleri aşağıda verilen prosedürlere uygun şekilde hazırlanmıştır:

- Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Malt Ekstrakt Agar (MEA) Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Besiyerlerine sterilizasyon sonrası son konsantrasyon 100 mg/L olacak şekilde oksitetrasiklin ilave edilmiştir. Besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra petrilere döküm gerçekleştirilmiştir.
- Patates Dekstroz Broth (PDB) Liofilchem (Teramo, İtalya) firmasından satın alınmıştır. Aksi belirtilmedikçe besiyeri pH'sı 5.5'e ayarlanarak kullanılmıştır.

- Maya Ekstraktı-Sukroz (YES): Bileşiminde 20 g/L maya ekstraktı, 150 g/L sukroz, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 20 g/L agar olacak şekilde hazırlanmıştır (Ritter ve diğ., 2011). Broth besiyerinde, bu bileşimden farklı olarak agar kullanılmamıştır. Besiyeri pH'ları 6.4'e ayarlanmıştır (Xing ve diğ., 2017).

- Czapek's Maya Ekstraktı Agar (CYA): Besiyeri temel stoku ve Czapek konsantresi olmak üzere iki ayrı çözelti hazırlanmıştır. Temel stok için 30 g sukroz, 5 g maya ekstraktı, 1 g K_2HPO_4 , 0.005 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.01 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 20 g agar tartılarak 990 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. Czapek konsantresi için ayrı bir erlen içerisine 30 g $NaNO_3$, 5 g KCl, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 0.1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ tartılmış; karışım 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. Her iki ortam ayrı ayrı sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 990 mL temel besi ortamına 10 mL Czapek konsantresi ilave edilmiş ve pH 6.2'ye ayarlanmıştır. Besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra petrilere döküm yapılmıştır (Pitt ve Hocking, 2009).

- Hindistan Cevizi Sütü Agar (CMA): Besiyerinin hazırlanmasında doğal Hindistan cevizi sütü (Aroy-D, Tayland) kullanılmıştır. Hindistan cevizi sütü üretici firmanın belirttiği bileşim dikkate alınarak son konsantrasyon %1.1 protein, %1.3 karbonhidrat ve %12.7 yağ olacak şekilde distile su ile seyreltilmiştir. Besiyerine 20 g/L olacak şekilde agar ilave edilmiş ve pH 6.8'e ayarlanmıştır (Yazdani ve diğ., 2010).

- *Aspergillus flavus/parasiticus* agar (AFPA): Besiyeri 20 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 0.5 g/L demir (III) amonyum sitrat ($C_6H_8O_7 \cdot xFe \cdot xNH_3$) ve 15 g/L agar kullanılarak hazırlanmıştır. Ayrı bir deney tüpünde 25 mg kloramfenikol/mL etanol olacak şekilde antibiyotik çözeltisi hazırlanmış ve 0.20 µm'lik steril filtreden (Minisart, Sartorius stedim; Almanya) geçirilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyerinin 45 °C'ye kadar soğuması beklenmiş ve 1 L besiyeri içerisine 4 mL antibiyotik solüsyonu ilave edilmiştir. Besiyeri pH'sı 6.3'e ayarlandıktan sonra petrilere döküm yapılmıştır (Pitt ve Hocking, 2009).

- Malahit Yeşili Agar (MGA): Nash-Snyder besiyeri 2.5 ppm malahit yeşili ile modifiye edilerek MGA besiyeri oluşturulmuştur. Bunun için 15 g/L pepton, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 mg/L malahit yeşili okzalat tuzu ve 20 g/L agar kullanılmıştır. Besiyeri pH'sı 6.0 olarak ayarlanmıştır. Sterilizasyondan sonra döküm sıcaklığına gelen besiyeri içerisine 100 mg kloramfenikol/L ve 50 mg ampicilin/L olacak şekilde antibiyotik solüsyonu ilave edilmiştir (Castella ve diğ., 1997; Leslie ve Summerell, 2006).

3.1.3 Kimyasallar

Kromatografik saflıktaki metanol ($\geq 99.9\%$) ve asetonitril ($\geq 99.9\%$) Honeywell (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Etanol stabilize kloroform ve glacial asetik asit Carlo Erba (Val-de-Reuil, Fransa) firmasından satın alınmıştır. Nitrik asit (65% ; 1.44 g/mL) Isolab (Werth, Almanya); potasyum bromür (KBr) ise CDH (Delhi, Hindistan) firmasından satın alınmıştır. Dekontaminasyonda kullanılan aseton Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından; ev tipi sodyum hipoklorit çözeltisi ($\leq 5\%$) ise piyasadan temin edilmiştir. Kromatografik analizlerde kullanılan ultra saf su ($18.2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$) bölüm laboratuvarında Millipore Direct-Q 3 (Almanya) cihazı ile üretilmiştir.

Çalışmada kullanılan analitik mikotoksin standartları asetonitril çözeltisi halinde temin edilmiştir. Aflatoksin karışık standart çözeltisi (2 mL; AFB₁ 2 µg/mL, 98% ; AFB₂ 0.5 µg/mL, 96% ; AFG₁ 2 µg/mL, 97% ve AFG₂ 0.5 µg/mL, 95%) ve ZEA standart çözeltisi (1 mL; 100 µg/mL, 99.7%) Romer firmasından (Avusturya); OTA (1 mL; 10 µg/mL, 98%) ve DON (1 mL; 100 µg/mL, 98%) standart çözeltileri ise Sigma-Aldrich (Avusturya) firmasından alınmıştır.

3.1.4 Affinite kolon ve tampon çözeltiler

Toksijenik izolatların belirlenmesi ve optimizasyon aşamalarında OTA, DON ve ZEA'nın ekstraksiyonu için mikotoksine özgü antikor içeren Aokin immüno affinite kolon (Berlin, Almanya) kullanılmıştır. İAK uygulamaları için gerekli tampon çözeltiler, kolon üreticisi firmanın talimatlarına uygun şekilde hazırlanmıştır (Anonim, 2021c). Çözelti bileşiminde yer alan KCl ve NaHCO₃ Isolab (Werth, Almanya) firmasından; diğer kimyasallar ise Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

- Fosfat tampon çözeltisi 1 (PBS-1): 8 g NaCl, 1.2 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄ ve 0.2 g KCl tartılmış ve 990 mL distile su içerisinde çözölmüştür. 2 N NaOH ve HCl çözeltileri kullanılarak pH 7.0'ye ayarlanmış; eksik hacim distile suyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

- Fosfat tampon çözeltisi 2 (PBS-2): 40 g NaCl, 6 g Na₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄ ve 1 g KCl tartılarak 990 mL distile su içerisinde çözölmüştür. 2 N NaOH ve HCl çözeltileri kullanılarak pH 7.0'ye ayarlanmış; eksik hacim distile suyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

- Metanol:Karbonat çözeltisi: 3 g NaHCO₃ tartılarak 300 mL distile su içerisinde çözöndürölmüştür. 700 mL metanol, 300 mL karbonat çözeltisi ile karıştırlarak metanol:karbonat (70:30, v:v) çözeltisi elde edilmiştir.

3.1.5 Referans küf suşları

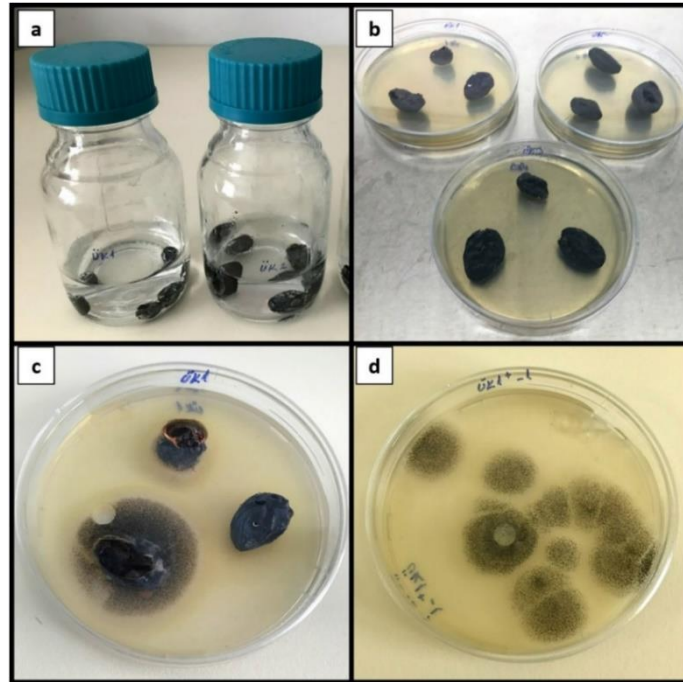
Çalışmada referans tür olarak kullanılan MAM-200682 *Aspergillus flavus* standart suşu TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi küf kültür koleksiyonundan; NRRL 2999 *A. parasiticus* standart suşu Agricultural Research Service kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. *Fusarium* türleri için referans olarak PH-1 *Fusarium graminearum* (NRRL 31084) ve FcUK99 *F. culmorum* (NRRL 54111) suşları kullanılmıştır.

3.2 Küf İzolasyonu

İzolasyonda örnek yapısına göre doğrudan yapıştırma ve dilüsyon-yayma olmak üzere iki farklı yol izlenmiştir. Dilüsyon yöntemi tüm örneklerde uygulanırken; doğrudan yapıştırma yöntemi yüksek tane ağırlığına sahip gıda örneklerine uygulanmıştır.

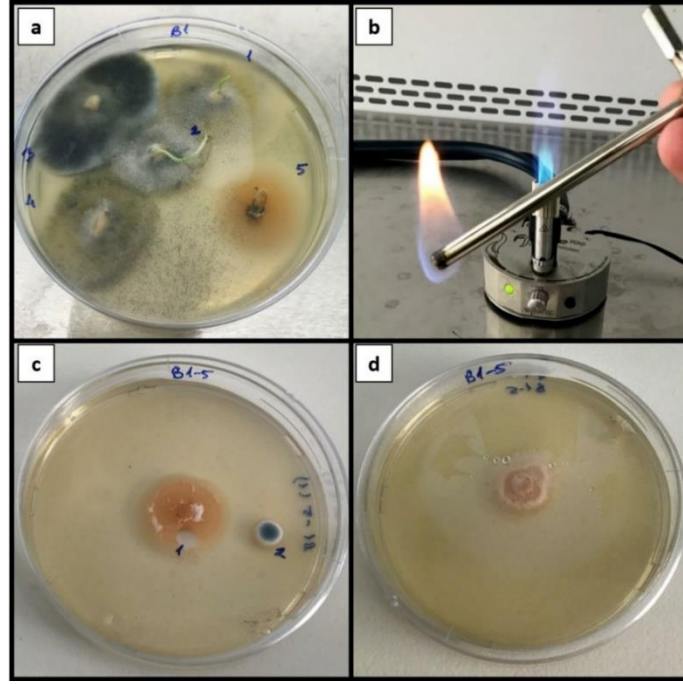
3.2.1 Doğrudan yapıştırma yöntemi

Taşıma veya sergileme aşamasında örnek yüzeyine sonradan bulaşan bazı küf türleri hızlı gelişerek agar yüzeyini örtmekte ve örnekte bulunan diğer küf türlerinin izolasyonunu güçleştirmektedir. Refakatçi floranın uzaklaştırılması için izolasyonda kullanılacak örnekler %0.4'lük sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde 1 dk bekletilmiş; ardından distile su ile 2 kez yıkanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 : Yüzey dezenfeksiyonu ile yapıştırma yöntemi. Kuru üzüm örneğinde yüzey dezenfeksiyonu (a), örneğin yapıştırılması (b), inkübasyon sonrası (c) ve izole küf kültürü.

Kahve çekirdeği, üzüm kurusu ve buğday gibi tane ürünler doğrudan izolasyon işlemine alınırken, kuru incir ve kuru kayısı gibi iri örneklerde ise steril bistüri yardımıyla boyut küçültülmüştür. Her örnekten 3-5 adet kesit birbirine eşit mesafede olacak şekilde PDA yüzeyine yapıştırılmıştır (Pitt ve Hocking, 2009). Ayrıca, dezenfeksiyon aşamasında mikotoksijenik türlerin elenmesi ihtimaline karşı yüzey dezenfeksiyonu uygulanmamış kesitler de ayrı bir PDA petrisine yapıştırılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 : Örnekler yüzey dezenfeksiyonu uygulamadan gerçekleştirilen izolasyon işlemi. İnkübasyon sonunda buğday örneği (a), mantar delginin sterilizasyonu (b), karışık floradan izolasyon (c) ve izole küf kültürü (d).

3.2.2 Dilüsyon-yayma yöntemi

Pul biber ve toz biber gibi ince tabakalı veya toz haldeki ürünler düşük tane yoğunluğuna sahip olduğundan doğrudan agar yüzeyine tutturulmaya uygun değildir. Ayrıca yoğun küf yüküne sahip örneklerde farklı türler birbiri ile iç içe gelişebilmekte ve izolasyon işlemi güçleşmektedir. Bu nedenle, dilüsyon işlemi kullanılarak küf yoğunluğunun seyreltilmesi sağlanmıştır. Dilüsyon için 25 g örnek tartılmış ve 225 mL %0.1'lik peptonlu su ile seyreltilmiştir. Örnekteki küf yoğunluğuna göre 10^{-1} - 10^{-7} arasında değişen seyreltiler hazırlanmıştır. Seyreltilerden 100 µL örnek alınarak PDA yüzeyine yayma yapılmıştır (Pitt ve Hocking, 2009).

3.2.3 İnkübasyon ve izolasyon

Ekim yapılmış petriler 25 °C'de ve karanlıkta 5 gün boyunca inkübasyona (Sartorius Certomat IS, Almanya) bırakılmıştır. İkinci günden itibaren her 24 saatte bir petri kontrolü yapılarak küf gelişimleri takip edilmiştir. Morfolojik olarak birbirinden farklı olduğu gözlenen ve yeterli büyüklüğe erişmiş koloniler seçilerek izolasyon işlemine geçilmiştir. İzolasyonda bir mantar delgi yardımıyla koloni uçlarından 5 mm'lik kesitler alınmış ve bu kesitler yeni PDA petrilerine aktarılmıştır. Aktarım sonrası yeni petrilerde en az 3 gün boyunca inkübasyona devam edilmiştir. Koloni morfolojisi açısından petride yalnızca tek bir izolat türü tespit edilinceye kadar kesit alma ve aktarma işlemine devam edilmiştir (Al Ghamdi ve diğ., 2019). Her izolat için birbirini izleyen en az 3 aktarımdan sonra koloni yapısı büyüteç altında incelenmiş ve morfolojik özellikler kaydedilmiştir.

3.3 Tanımlama

Elde edilen izolatların tanımlanması 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Gelişim ortamında morfolojik değerlendirme

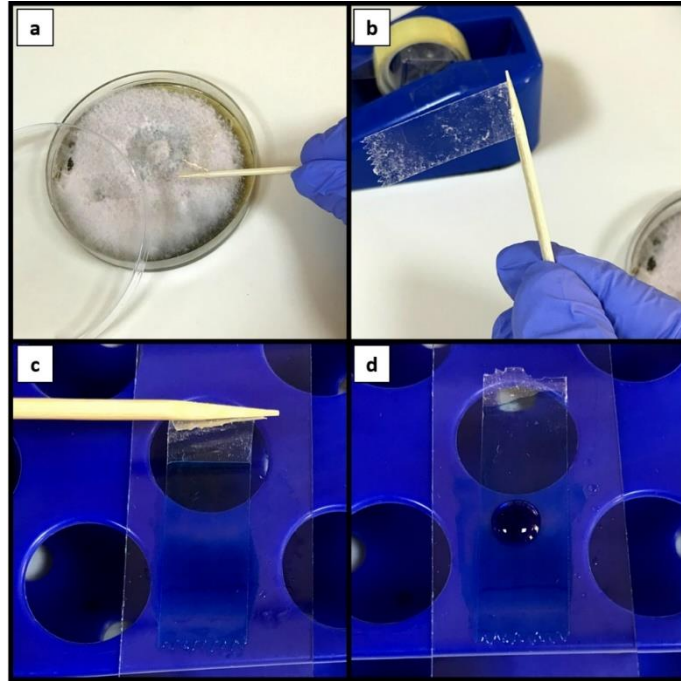
5 mm çapındaki kesitler alınarak PDA ve MEA besi ortamlarına küf inokülasyonu yapılmış ve petriler 25 °C'de karanlıkta 3-7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda izolatların belirtilen besi ortamlarındaki morfolojileri ve gelişim özellikleri kaydedilmiştir. İzolatların gelişim hızı (mm/72 saat), koloni yüzey yapısı (havai miselli, pamuksu, odunsu, kadifemsi, tozlu vb.), koloni yayılış şekli (oluklu, mantarsı, yükseltili vb.) ve koloni rengi (merkez, dış kenar, alt görünüm) incelenmiştir. Gözlem sonuçları geçmiş literatür bilgileri ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

3.3.2 Mikroskobik morfolojinin incelenmesi

Mikroskobik morfoloji miselyum, spor oluşturan yapılar ve sporlar incelenerek değerlendirilmiştir. Sporlanmanın oluşabilmesi için elde edilen tüm izolatlar PDA besi ortamında 25 °C'de 5-7 gün boyunca geliştirilmiştir. Yeterli büyüklüğe erişen izolatlarda misel yapısına zarar vermeden bisturi ve iğne öze yardımıyla örnekler toplanmıştır. Lam üzerine 1 damla %70 etanol damlatılmış ve küf örneği etanol içerisine yayılmıştır. Etanol kurumadan örnek üzerine 1 damla da laktofenol pamuk mavisi (LPM) (Chembio; İstanbul, Türkiye) damlatılmış ve yüzey baloncuk oluşturmada lamel ile kapatılmıştır. Boyanın nüfuz etmesi için 5 dk beklenildikten sonra örnek kameralı ışık mikroskopunda (Image

Projector, Isolab; Almanya) $\times 4$, $\times 10$ ve $\times 40$ 'lık objektiflerle incelenmiştir (Vyzantiadis ve diğ., 2012; Li, 2013).

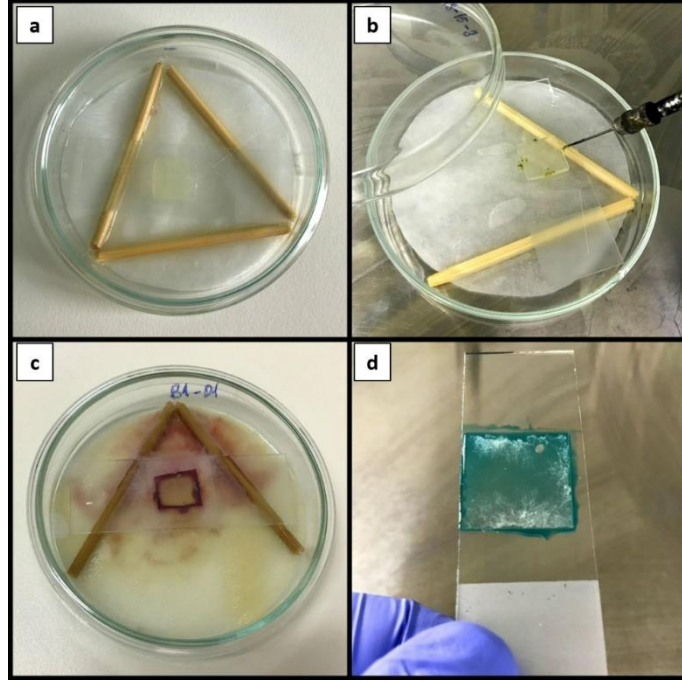
Koloni yüzey yapısı daha kadifemsi olan ve bisturi kullanımının mümkün olmadığı durumlarda yapışkan bant yardımıyla örnekleme gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bu yöntemde ahşap bir çubuk ucuna yaklaşık 10 mm $\times$ 30 mm ebatlarında bant tutturulmuş ve bandın yapışkan yüzeyi koloni üzerine bastırılıp çekilerek örnekleme yapılmıştır. Lam yüzeyine 1 damla LPM damlatıldıktan sonra örnek bandı lam üzerine yerleştirilmiştir. Bant üzerine sırasıyla birer damla %70 etanol ve LPM damlatılmıştır. Örnek, lamel ile kapatılmış ve 5 dk beklenildikten sonra mikroskopik incelemeye geçilmiştir (Vyzantiadis ve diğ., 2012; Li, 2013).



Şekil 3.3 : Yapışkan bant uygulamasıyla besiyerinden küf örneği alma işlemi. Koloniye bant yapıştırılması (a), banda tutunmuş örnekler (b), bandın lam üzerine yapıştırılması (c) ve boyama (d).

Misel bütünlüğü bozulmuş, spor oluşturan yapıları dağılmış ve iyi görüntü alınamayan örneklerde blok agar yöntemi kullanılmıştır. Blok agar metodunda, cam petri tabanına filtre kâğıdı ve onun da üzerinde karşılıklı iki kürdan yerleştirilmiştir. Kürdanlar üzerine bir adet lam konumlandırıldıktan sonra ortam 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. PDA besiyeri içeren başka bir petriden 15 mm $\times$ 15 mm ebatlarında agar blokları kesilmiştir. Steril edilen lam üzerine bir tane agar bloğu yerleştirilmiş ve bloğun dört köşesine iğne öze ile küf inoküle edilmiştir. Bloğun üst kısmı lamel ile kapatılmıştır (Woo ve diğ., 2010). Agar bloğun kurumasını engellemek için petri zeminindeki filtre kâğıdı

steril distile su ile ıslatılmıştır (Şekil 3.4). Petri düz bir şekilde inkübatöre yerleştirilmiş ve karanlıkta 25 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda temiz bir lam üzerine 1 damla LPM damlatılmıştır. Agar bloğunun üzerindeki lamel yavaşça kaldırılarak lam üzerine kapatılmıştır. Yine 5 dk beklenildikten sonra örnek ışık mikroskobu altında incelenmiştir.



Şekil 3.4 : Blok agar yöntemi ile bazı izolatlardan örnekleme işlemi. Agar bloğunun hazırlanması (a), inokülasyon (b), inkübasyon sonunda izolat görünümü (c) ve boyama (d).

Gözlemlerde hiplerdeki septa varlığı (septalı veya septasız) ve dallanma biçimleri incelenmiştir. Ayrıca konidium, fialid, vesikül ve konidiofor yapıları şekil, büyüklük ve diziliş açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen gözlemsel bulgular geçmiş literatür çalışmaları ile kıyaslanarak izolatın cinsi belirlenmeye çalışılmıştır (Pitt ve Hocking, 2009; Campbell ve diğ., 2013; Kidd ve diğ., 2016; Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018).

3.3.3 Seçici-ayırt edici besi ortamında tanımlama

Genel besi ortamındaki koloni morfolojisi ve mikroskopik yapıları incelenen küf izolatlarından *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerine ait olduğu tespit edilen suşlar seçilmiştir. Geriye kalanlar arasında Af, OTA, DON ve ZEA mikotoksinlerinden birini üretmesi mümkün olmayan izolatlar ise çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus* türlerinin teşhisinde *Aspergillus flavus/parasiticus* agar (AFPA) seçici besi ortamı kullanılmıştır. Şüpheli izolatlar 25 °C'de AFPA besi ortamında 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni üst görünümü

beyaz, alt taban görünümü ise turuncu/kızıl renkte olan izolatlar *A. flavus/parasiticus* olarak teşhis edilmiştir (Dehghan ve diğ., 2008; Sukmawati ve diğ., 2018).

Besiyerinde aflatoksin varlığının kontrolü için UV ışık ve amonyum hidroksit (NH₄OH) buharıyla muamele testleri uygulanmıştır. Seçili izolatlardan her biri YES, CYA ve CMA besi ortamlarında geliştirilmiştir (Okoth ve diğ., 2012). 5-7 günlük inkübasyon sonunda petriler karanlık bir ortama alınarak 365 nm UV A ışık (UVP Mineralight, ABD) altında incelenmiştir. Mavi/yeşil floresans ışımaya gözlenen izolatlar "AF⁺"; ışımaya gözlenmeyenler ise "AF⁻" olarak değerlendirilmiştir (Isman ve Bıyık, 2009; Faria ve diğ., 2017). Daha sonra petri kapaklarının iç kısmına 200 µL %25'lik NH₄OH (1.44 g/mL) bırakılmış ve petriler oda sıcaklığında 15 dk ters halde bekletilmiştir. Petri alt tabanında kırmızımsı renk gelişimi gözlenen izolatların aflatoksijenik olabileceği değerlendirilmiştir (Faria ve diğ., 2017; Moradi ve diğ., 2017; Variance ve diğ., 2018; Rajarajan ve diğ., 2021).

Penicillium türlerinin tespitinde YES, MEA ve CYA besi ortamlarındaki bazı karakteristik gelişim özellikleri dikkate alınmıştır (Pitt ve Hocking, 2009). *Fusarium* cinsine ait türlerin teşhisi için CYA ve MGA besi ortamları kullanılmıştır. CYA besiyerinde gelişim hızı dikkate alınırken; MGA ortamında malahit yeşilinin seçicilik özelliğinden faydalanılmıştır (Castella ve diğ., 1997).

3.2.4 Moleküler dizileme ve filogenetik analizler

3.2.4.1 DNA izolasyonu ve PCR

Morfolojik değerlendirmeler sonunda saflığından emin olunan izolatlar PDA besi ortamında geliştirilmiş; DNA izolasyon ve sekanslama çalışmaları için BM Labosis Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye) firmasına gönderilmiştir. Fungal miselya burada sıvı azot ile dondurulmuş ve öğütülerek çok ince toz haline getirilmiştir. Yaklaşık 20 mg (kuru ağırlık) fungal materyal alınarak izolasyon işlemine geçilmiştir. DNA izolasyonunda EURX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. Elde edilen genetik materyalin miktar ve saflığı spektrofotometrik (Thermo Scientific Nanodrop 2000, ABD) olarak belirlenmiştir.

Fungal izolatların tanımlanmasında DNA üzerindeki Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgeleri esas alınmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) universal primer çifti (ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' forward ve ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3' reverse) kullanılmıştır (Romanelli ve diğ., 2014). PCR

  zeltisi $\times 1$ kuvvetinde PCR tamponu, 3 μL DNA kalıbı, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP karışımı, 0.3 μM forward primer, 0.3 μM reverse primer ve 2 U Taq DNA polimeraz enzimi (FIREPol, Solis Biodyne; Estonya) kullanılarak hazırlanmış; çözelti hacmi PCR saflığında su ile 35 μL 'ye tamamlanmıştır. Amplikasyon işlemi Kyratec Thermocycler (Seul, Güney Kore) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR döngüsü, Zhao ve diğ. (2014) tarafından belirtilen metotta küçük iyileştirmeler yapılarak programlanmıştır. Buna göre, hazırlanan çözelti 95  C'de 5 dk bekletilerek başlangıç denatürasyonu sağlanmıştır. Daha sonra sırasıyla 95  C'de 45 s denatürasyon, 57  C'de 45 s yapışma ve 72  C'de 60 s uzama aşamaları gerçekleştirilmiştir. PCR işlemine toplamda 40 döngü halinde devam edilmiştir. Son aşamada ürünler 72  C'de 5 dk bekletilmiş ve sıcaklık 4 C'ye düşürülüp PCR işlemi tamamlanmıştır.

3.2.4.2 Sanger dizileme ve tanımlama

Amplikasyon  r nleri $1\times$ tris asetat EDTA tampon ile hazırlanmış %1.5'lik agaroz jelde 100 V potansiyel altında 90 dk y r t lm ştir. Agaroz jel etidyum bromid ile boyanarak UV ışık altında DNA bant profilleri görüntülenmiştir. Elektroforez sonunda tek bant gözlenmesi PCR işleminin başarılı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Elde edilen tek bant  rnekleri Magbio "HighPrep PCR Clean-up System" (AC-60005) kiti ile saflaştırılmıştır. BigDye Terminator Dizileme Kiti (ver. 3.1 Cycle) ve ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak DNA örneğinin ilgili gen bölgesi dizilenmiştir. Okuma sonuçları BioEdit yazılımında (ver. 7.1; DNASTAR, Madison, WI) CAP contig algoritması kullanılarak bitişik hale getirilmiştir. Düzenlenmiş diziler, National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanına Genbank by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) arayüzü (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak yüklenmiştir. Benzerlik oranı $\geq 98\%$, sorgu kapsamı $\geq 90\%$ olan ve en yüksek benzerlik oranı gösteren BLAST eşleşmesi izolatın türü olarak kabul edilmiştir (Romanelli ve diğ., 2014).

3.2.4.3 Filogenetik analizler

Fungi izolatları ve referans kültürlerin ITS1-ITS4 bölgelerine ait dizi sonuçları kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Ağaçlandırma işlemi MEGA X (Kumar ve diğ., 2018) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hizalanmış diziler, neighbour-joining (komşu birleştirme) metodu ile analiz edilmiştir. Filogeninin güvenilirliği bootstrapping ( ny kleme) analizi ile test edilmiştir (Felsenstein, 1985). Bootstrapping

işleminde istatistiksel destek 1000 replikasyon kullanılarak oluşturulmuştur. Evrimsel tarihlendirme maximum likelihood (maksimum olabilirlik) ve Tamura-Nei modelleri kullanılarak yapılmıştır (Tamura ve Nei, 1983). Muhtemel ağaçlar içerisinde en yüksek olasılığa sahip ağaç esas alınmıştır. Ağaçlar ölçeklendirilerek çizilmiş olup; dal uzunlukları alan başına görülen baz değişiklik sayısı ile orantılı olacak şekilde oluşturulmuştur.

3.4 Mikotoksin Analizleri

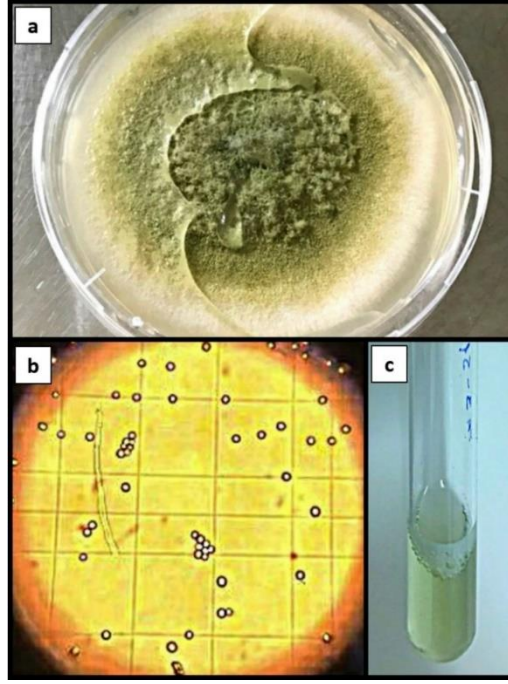
Tür tanımlaması yapılan izolatlar arasında aflatoksin çeşitleri, OTA, DON ve ZEA mikotoksinlerini üretme ihtimali bulunan türler seçilmiştir. Aflatoksin üretim denemelerinde *A. flavus* izolatları; OTA üretim denemelerinde *A. nigri*, *Talaromyces* ve *Penicillium* izolatları; ZEA üretim denemelerinde ise *F. culmorum* izolatları kullanılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olarak referans kültürlerden faydalanılmıştır. Mikotoksijenik türlerin belirlenebilmesi için seçili izolatlar sıvı besi ortamında geliştirilmiş ve inkübasyon sonunda ortamdaki mikotoksin varlığı kontrol edilmiştir.

3.4.1 Aşılama kültürünün hazırlanması ve inokülasyon

Mikotoksijenik olabileceği değerlendirilen izolatlar PDA besi ortamında karanlıkta, 25 °C'de 7 gün süreyle inkübe edilerek sporlanması sağlanmıştır. Inkübasyon sonunda *Aspergillus* ve *Penicillium* petrileri içerisinde 15 mL %0.01 Tween 20 içeren steril distile su ilave edilmiştir. Sporlar cam baget yardımıyla misel yapıları parçalanmadan distile suya geçirilmiştir. Spor solüsyonu aseptik koşullarda çift katlı tülbent ile süzülerek deney tüpleri içerisine alınmıştır. Ardından hemositometre yardımıyla mikroskop altında spor sayımı yapılmış ve konsantrasyon 1×10^7 spor/mL olacak şekilde spor solüsyonu hazırlanmıştır (Şekil 3.5) (Xing ve diğ., 2017).

Aflatoksin üretim denemeleri 100 mL YES broth besi ortamı içeren 250 mL'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Her bir erlene 0.5 mL spor inokülasyonu yapılmış ve 220 rpm çalkalama hızında orbital çalkalayıcı inkübatöre bırakılmıştır (Alshannaq ve Yu, 2020). Inkübasyon işlemi karanlık ortamda 25 °C'de 10 gün devam ettirilmiştir.

OTA üreticisi izolatların tespiti için 25 mL YES broth besi ortamı kullanılmıştır. Erlenlere 0.125 mL spor inokülasyonu yapılmış ve statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon işlemine aflatoksin üretiminde olduğu gibi karanlık ortamda 25 °C'de 10 gün devam edilmiştir (Jeswal ve Kumar, 2015).



Şekil 3.5 : Küf kültürlerine ait spor solüsyonlarının hazırlanması. Sporların suya geçirilmesi (a), hemositometrede sayım (b) ve spor konsantrasyonunun ayarlanması (c).

ZEA ve DON üretiminin kontrolü için Wu ve diğ. (2017) tarafından belirtilen yöntemde küçük iyileştirmeler yapılmıştır. Aşılama için agar ortamındaki *Fusarium* kolonilerin dış kısmından mantar delgi yardımıyla 6 mm'lik kesitler alınmıştır. DON ve ZEA üretim denemeleri PDB besi ortamında gerçekleştirilmiş olup her bir erlene (100 mL) 2 kesit olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Erlenler hareket ettirilmeksizin karanlık ortamda 25 °C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır.

3.4.2 Ekstraksiyon

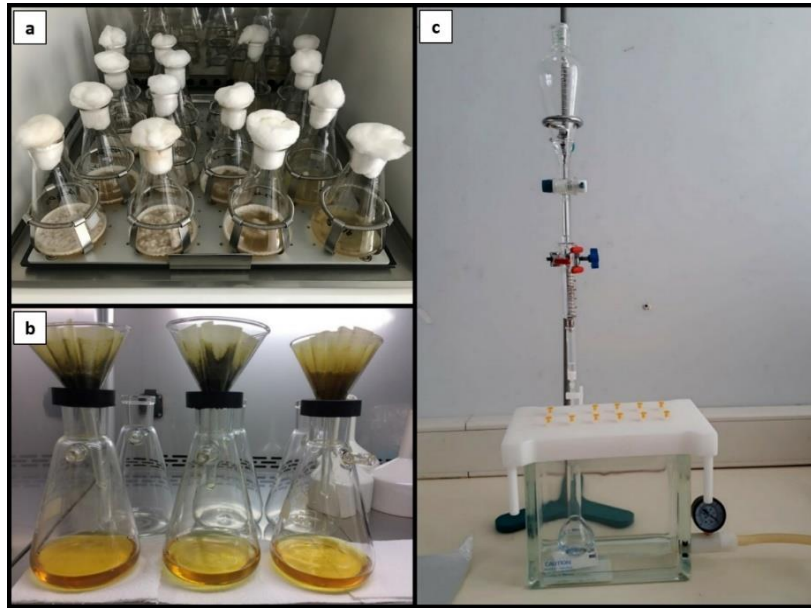
3.4.2.1 Aflatoksin ekstraksiyonu

Falkon tüpü içerisine besiyerinden 1 mL örnek alınarak üzerine 1.5 mL kloroform ilave edilmiştir. Karışım vorteks yardımıyla 30 s boyunca karıştırıldıktan sonra +4 °C'de 5000 ×g kuvvetle 3 dk santrifüj (Thermo Scientific SL 16R, Almanya) edilmiştir. Altta kalan organik faz yeni bir tüpe alınmış ve besiyerinde kalan aflatoksinlerin alınması için ortam 1.5 mL kloroform ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Elde edilen iki ekstrakt deney tüpünde birleştirilmiş (3 mL) ve azot gazı ile kloroform uçurulmuştur. Tüpteki ekstrakt kalıntısı 1 mL mobil faz ile (su:Me:ACN, 5:4:1, v:v:v) tekrar çözelti haline getirilmiştir. Ekstrakt, 0.45 µm'lik enjektör filtresinden geçirildikten sonra amber renkli HPLC vialine alınmıştır (Alshannaq ve Yu, 2020).

3.4.2.2 Okratoksin A ekstraksiyonu

İnkübasyon sonunda erlen muhteviyatına 2.5 g NaCl eklenmiş ve ortam karıştırılarak tuzun çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra erlen içerisine 100 mL metanol:karbonat (70:30, v:v) çözeltisi ilave edilmiştir. Ortam 220 rpm hızla 15 dk orbital çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra katlı filtre kağıdıyla süzölmüştür. 5 mL süzöntü alınarak üzerine 30 mL PBS-1 tampon çözeltisi eklenmiştir. Ortam pH'ı 7.0'ye ayarlandıktan sonra ekstrakt cam mikrofiber filtre kağıdıyla süzölmüş ve affinite kolonla temizleme işlemine geçilmiştir (Anonim, 2021c).

Affinite kolon yükleme öncesi 2 mL metanol:PBS (1:9) çözeltisi ile şartlandırılmıştır. Kolona 1 damla/s hızla 20 mL ekstrakt yüklenmiştir ve ardından kolon 20 mL PBS (%5 Tween 20 katkılı) çözeltisi ile yıkanmıştır (Şekil 3.6). Jel yatak kurutulduktan sonra kolona 1 mL metanol:asetik asit (99:1, v:v) çözeltisi ilave edilerek akış durdurulmuştur. 3 dk'lık inkübasyon sonrası kolona 2 mL daha metanol:asetik asit (99:1) çözeltisi ilave edilmiş ve 1 damla/s hızla tekrar akış verilmiştir. Elde edilen eluat üzerine 1.5 mL distile su ilave edilmiştir. Eluat, filtre edildikten sonra HPLC vialine alınmıştır (Anonim, 2021c).



Şekil 3.6 : Besiyeri matrisinden OTA'nın ekstraksiyonu. Orbital çalkalama (a), filtrasyon (b) ve immüno affinite kolonda temizleme (c).

3.4.2.3 Deoksinivalenol ekstraksiyonu

DON ekstraksiyonu Wu ve diğ. (2017) tarafından belirtilen yöntemde küçük iyileştirmeler yapılarak uygulanmıştır. Öncelikle, erlen içerisindeki 100 mL besiyeri

üzerine 5 g NaCl ilave edilmiş ve orbital çalkalayıcıda 220 rpm'de 15 dk çalkalanmıştır. Besiyeri katlı filtre kâğıdı ile süzölmüş ve süzöntü yaklaşık 25 mL kalıncaya kadar rotary evaporatörde (Buchi, R300, Almanya) konsantre edilmiştir. Erlendeki miselya keki ise 75 mL PBS-2 tampon çözeltisi ile tekrar 15 dk çalkalanmış ve karışım filtre kağıdından süzölerek miselya ekstrakte edilmiştir. Besiyeri süzöntüsü ile miselya ekstraktı yeni bir erlende birleştirilmiştir. Ortam 220 rpm hızla 5 dk orbital çalkalamaya bırakılmıştır. Çözeltinin pH'ı 2 N NaOH ve HCl çözeltileri kullanılarak 7.0'ye ayarlanmıştır. Ekstrakt, cam mikrofiber filtre kağıdıyla süzöldükten sonra affinite kolonla temizleme işlemine geçilmiştir.

Affinite kolon 2 mL PBS-2 tampon çözeltisi ile şartlandırıldıktan sonra kolona 1 damla/s hızla 10 mL ekstrakt yüklenmiştir. Ardından kolondan 10 mL PBS-2 tampon çözeltisi geçirilerek kolon yıkanmıştır. Kolon vakum pompası yardımıyla kurutulmuş ve üzerine 1 mL metanol ilave edilerek akış durdurulmuştur. 3 dk'lık inkübasyon sonrası kolona 2 mL daha metanol ilave edilerek 1 damla/s hızla tekrar akış verilmiştir. Tüpte toplanan ekstraktın metanol fazı azot gazı altında uçurulmuştur. Tüpte kalan DON kalıntısı HPLC hareketli fazı (3 mL) kullanılarak çözöndürölmüş ve 0.45 µm'lik enjektör filtresinden geçirildikten sonra vialle alınmıştır (Anonim, 2021c).

3.4.2.4 Zearalenon ekstraksiyonu

ZEА ekstraksiyonunda DON ekstraksiyonundan farklı olarak miselya metanol ile ekstrakte edilmiştir. Ardından besiyeri filtratı ve miselya ekstraktı birleştirilmiştir Wu ve diğ. (2017). Karışım, beklenen mikotoksin konsantrasyonuna göre PBS-1 tampon çözeltisi ile en az 7 kat seyreltilmiş ve pH 7.0'ye ayarlanmıştır. Ekstrakt, cam mikrofiber filtre kağıdıyla süzölmüş ve affinite kolonla temizleme işlemine geçilmiştir (Anonim, 2021c).

Affinite kolon 2 mL metanol:PBS (1:9, v:v) çözeltisi ile şartlandırıldıktan sonra kolona 1 damla/s hızla 8 mL ekstrakt yüklenmiştir. Ardından kolondan 8 mL metanol:PBS çözeltisi geçirilerek kolon yıkanmıştır. Kolon vakum pompası yardımıyla kurutulmuş ve üzerine 1 mL metanol ilave edilerek akış durdurulmuştur. 3 dk'lık inkübasyon sonrası kolona 2 mL daha metanol ilave edilerek 1 damla/s hızla tekrar akış verilmiştir. Elde edilen eluat üzerine 1.5 mL distile su ilave edilmiştir. Eluat, 0.45 µm'lik enjektör filtresinden geçirildikten sonra analiz edilmek üzere vialle alınmıştır (Anonim, 2021c).

3.4.3 HPLC analizleri

Ekstraktların mikotoksin içeriği ve miktar tespiti Shimadzu marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (Japonya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Sistem, tüm parçaları birbirine entegre DGU-20A5 degaze ünitesi, LC20-AD pompa ünitesi, SIL-20A HT oto-örnekleyici, CTO-20A fırın, CBM-20A arayüz bağdaştırıcısı, RF-10AXL floresans dedektör ve SPD-M20A DAD dedektör ünitelerinden oluşmaktadır. Yanıtların görüntülenmesi ve değerlendirilmesinde LC Solutions yazılımı kullanılmıştır. Toksinlerin kromatografik ayrımı Welchrom C18 kolon (Welch, Çin; 4.6 mm × 250 mm, 5 µm) ile sağlanmıştır.

3.4.3.1 Aflatoksin analizi

Aflatoksijenik izolatların tespitine yönelik gerçekleştirilen analizlerde Kabak (2019) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Kromatografik ayırım izokratik akış şartlarında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak su:Me:ACN (55:40:5, v:v:v) kullanılmış olup; içerisine 4 M HNO₃ çözeltisi (350 µL/L) ve KBr (119 mg/L) ilave edilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 50 µL'dir. Kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. Kolon çıkışına entegre edilen Kobracell elektro-kimyasal türevlendirme hücresi (Biopharm, Almanya) ile AFB₁ ve AFG₁'in floresans yoğunluğu arttırılmıştır. Görüntüleme için floresans dedektör kullanılmış; uyarılma dalga boyu (excitation) 360 nm, yayılma dalga boyu (emission) 440 nm olarak ayarlanmıştır.

Optimizasyon çalışması ve sonrasında gerçekleştirilen aflatoksin analizlerinde ise türevlendirme yapılmamıştır. Kromatografik ayırım yine izokratik akış şartlarında gerçekleştirilmiş olup hareketli faz olarak su:Me:ACN (50:40:10, v:v:v) kullanılmıştır. Akış hızı 0.8 mL/dk, enjeksiyon hacmi 100 µL'dir. Görüntülemeye bir önceki metotla aynı uyarılma ve yayılma dalga boyu kullanılmıştır.

3.4.3.2 Okratoksin A analizi

OTA analizleri Kabak (2019) tarafından belirtilen yöntemde küçük iyileştirmeler yapılarak uygulanmıştır. Ayırım izokratik akış şartlarında su:ACN:asetik asit (48:51:1, v:v:v) kullanılarak sağlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 50 µL, kolon sıcaklığı ise 35 °C olarak ayarlanmıştır. Analizde floresans dedektör kullanılmış; uyarılma dalga boyu 333 nm, yayılma dalga boyu 460 nm olarak ayarlanmıştır.

3.4.3.3 Deoksinivalenol analizi

DON analizleri izokratik akış şartlarında su:ACN (85:15, v:v) hareketli fazı ile yürütülmüştür. Akış hızı 1 mL/dk olup enjeksiyon hacmi 100 µL'dir. Kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. Görüntüleme UV-vis sıralı foto-diyot dedektör ile 218 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (Yu ve diğ., 2019).

3.4.3.4 Zearalenon analizi

Besiyerinde ZEA tespiti, Golge ve Kabak (2020) tarafından kullanılan yöntemde küçük iyileştirmeler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analitik ayırım izokratik akış şartlarında su:ACN (40:60, v:v) kullanılarak sağlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 50 µL olup kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. Analizde floresans dedektör kullanılmış ve uyarılma dalga boyu 274 nm, yayılma dalga boyu 455 nm olarak ayarlanmıştır.

3.4.3.5 Metot validasyonu

Kullanılan HPLC metotlarının geçerli kılınmasına (validasyon) yönelik çalışmalar aynı operatör tarafından aynı laboratuvar ve aynı cihaz kullanılarak yürütülmüştür. Validasyonda doğrusallık (linearity), tespit limiti (limit of detection, LOD), ölçüm limiti (limit of quantification, LOQ), doğruluk (accuracy), geri kazanım (recovery), tekrar edilebilirlik (repeatability) ve kesinlik (precision) parametreleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçların doğrusal olup olmadığının belirlenmesi için her bir toksin standardının 6 farklı konsantrasyonunu içeren seri dilüsyonlar hazırlanmıştır (ICH, 1994). Her bir konsantrasyona ait çözeltinin art arda 3 gün boyunca HPLC'de okuması gerçekleştirilmiş ve kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen R^2 değerleri incelenerek gün içi (intra-day) ve günler arası (inter-day) elde edilen sonuçların doğrusal olup olmadığı ($R^2 > 0.99$) belirlenmiştir.

Tespit ve ölçüm sınırı ISO11843 Part 2'de yer alan geri kazanım değerlerinin belirlenmesine yönelik uygulamalar esas alınarak hesaplanmıştır (Kabak, 2019). Öncelikle mikotoksin pikinin, kromatogram gürültüsü içerisindeki piklerin en az 3 katı büyüklükte bulunduğu ve güvenli bir şekilde tespit edilebildiği bulaş seviyesi belirlenmiştir (ICH, 1994). Kültür içermeyen besi ortamlarına belirlenen seviyeye göre mikotoksin bulaştırılmış ve HPLC analizleri ile besi ortamının mikotoksin içeriği belirlenmiştir. 10 replike analizde tespit edilen mikotoksin miktarı ortalama ve standart sapma şeklinde hesaplanmıştır. Bu

sonuçlara ait standart sapmanın 3 katı tespit limiti; 10 katı ise ölçüm limiti olarak belirlenmiştir (Kabak, 2019; Golge ve Kabak, 2020).

Kullanılan yöntemin doğruluğu (accuracy), mikotoksinin besiyerinden geri kazanım oranının (recovery) hesaplanması şeklinde değerlendirilmiştir. Bu amaçla kültür içermeyen besi ortamlarına düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı seviyede mikotoksin bulaştırma işlemi yapılmıştır. Üç seviyeden 5 ölçüm olmak üzere toplamda 15 ölçüm gerçekleştirilmiştir (ICH, 1994). Elde edilen mikotoksin miktarı, başlangıçta ilave edilen mikotoksin miktarına oranlanarak, mikotoksinin besi ortamından yüzde geri kazanım oranı (%GKO) hesaplanmıştır (Kabak, 2019). Analizlerin kesinlik (precision) değerleri tekrar edilebilirlik bağıl standart sapması (%RSDr) kullanılarak belirlenmiştir. Tekrar edilebilirlik bağıl standart sapması, örneklerden elde edilen standart sapmanın (Sr) örnek ortalamasına (x) oranı şeklinde hesaplanmıştır (Denklem 3.1) (EC, 2006b; TKG, 2018):

$$\%RSDr = \frac{Sr}{x} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5 Optimizasyon Çalışması ve Üretim

3.5.1 Mikotoksin üretiminin optimizasyonu

Optimizasyon denemeleri 100 mL besi ortamı içeren 250 mL'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Kültürlerin hazırlanması, besi ortamına aşılınması, ekstraksiyon ve analizler daha önceki bölümlerde anlatıldığı şekliyle yürütülmüştür. Mikotoksin üretiminin optimizasyonunda pH, sıcaklık ve süreyi içeren farklı gelişim koşullarının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Design-Expert (ver. 8.0.6, Stat-Ease Inc., MN) programında üç değişkenli ve üç seviyeli bir Box-Behnken tasarımı hazırlanmıştır. Merkez nokta sayısı 5 olarak baz alınmış ve toplamda 17 denemelik iki ayrı tasarım (aflatoksin ve zearalenon) oluşturulmuştur. Tasarımlarda kullanılan değişken limitleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 : Mikotoksin üretiminin optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişken limitleri.

	Sembol	Aflatoksin			Zearalenon		
		Düşük (-1)	Orta (0)	Yüksek (+1)	Düşük (-1)	Orta (0)	Yüksek (+1)
pH	X ₁	4.0	6.0	8.0	4.0	6.5	9.0
Sıcaklık (°C)	X ₂	22	28	34	16	22	28
Süre (gün)	X ₃	5	10	15	14	21	28

Üç bağımsız değişkenin uygulanmasıyla elde edilen yanıtlar (mikotoksin miktarı) ve bunlar arasındaki ilişki Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Besiyerindeki mikotoksin konsantrasyonunu en üst seviyeye çıkaracak koşullar optimum üretim koşulları olarak seçilmiştir. İlgili mikotoksinin üretimi aşağıdaki şekilde modellenerek ifade edilmiştir:

$$Y \text{ (ng/mL)} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1 + b_{22}X_2 + b_{33}X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (3.2)$$

Denklem 3.2'de bağımlı değişken (mikotoksin konsantrasyonu) Y terimi ile sembolize edilirken; X_1 , X_2 ve X_3 sırasıyla pH, sıcaklık ve süre değişkenlerini ifade etmektedir. b_0 model sabiti, b_1 , b_2 ve b_3 ise lineer terimleri göstermektedir. b_{11} , b_{22} ve b_{33} kuadratik terimler iken b_{12} , b_{23} ve b_{13} interaksiyon katsayılarını belirtmektedir.

3.5.2 Optimize koşullarda aflatoksin üretimi

Seçili izolat, MAM-200682 *A. flavus* ve NRRL 2999 *A. parasiticus* referans suşları PDA besiyerinde geliştirilmiş ve sonrasında spor solüsyonları (1×10^7 spor/mL) hazırlanmıştır (Xing ve diğ., 2017). Optimizasyon çalışmasında olduğu gibi 100 mL YES besi ortamı içeren 250 mL'lik erlenlere 0.5 mL aşılama yapılmıştır. İnkübasyon, optimizasyon çalışmasıyla belirlenen en uygun mikotoksin üretim koşullarında gerçekleştirilmiştir. Periyodik olarak besiyerinden örnekleme yapılarak aflatoksin miktarı ve pH değişimi de incelenmiştir.

Ayrıca, farklı üretim hacimlerinde aflatoksin miktarındaki değişimini incelemek için ölçek büyütme denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 1 L hacimli erlen içerisine 400 mL YES besi ortamı hazırlanmış ve inkübatör koşullarında üretim yapılmıştır. Diğer denemede ise 2 L hacimli biyoreaktör (Sartorius, Biostat A plus, Almanya) içerisinde 1 L YES besiyeri hazırlanmış ve seçili izolat ile aşılama yapılmıştır. Büyük hacimli üretimlerde aşılama miktarı 100 mL'lik besi ortamı denemeleriyle orantılı olacak şekilde arttırılmıştır.

3.5.3 Optimize koşullarda zearalenon üretimi

ZEA üretimi için seçilen izolat ve FcUK99 *F. culmorum* referans suşunun PDA besiyerinde sporlanması sağlanmıştır. Koloni uçlarından alınan 6 mm'lik kesitler aşılama kültürü olarak kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmasına benzer şekilde 100 mL'lik PDB besi ortamına 2 kesit bırakılarak aşılama yapılmıştır (Wu ve diğ., 2017). Erlenler, istatistiksel olarak ZEA üretiminin en yüksek olacağı tahmin edilen koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Erlen içerisindeki ZEA miktarı ve pH değişimi inkübasyon boyunca periyodik olarak kontrol edilmiştir.

Geniş ölçekli ZEA üretim denemeleri ise 400 mL PDB içeren erlen ve 1000 mL PDB içeren biyoreaktör ortamlarında gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süreci, optimizasyon çalışmasında belirlenen en uygun koşullarda yürütülmüştür. Ortama ilave edilen kültür miktarı, besiyeri hacmindeki artışla orantılı olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.6 Saflaştırma ve Doğrulama

3.6.1 Aflatoksinlerin ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemi Alshannaq ve Yu (2020) tarafından belirtilen metotta modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, besiyeri içeriği kloroformla (2:3, v:v) birleştirilmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra bir süre beklenilmiştir. Alttaki organik faz yeni bir şişeye alınmış ve besiyerinde kalan aflatoksinlerin geri kazanımı için bir kez daha kloroformla ekstraksiyon yapılmıştır. Her iki ekstraksiyon işleminde toplanan kloroform fazları şişede bir araya getirilmiştir. Ekstrakt, rotary evaporatörde 55 °C'de kloroform fazı tamamen uzaklaşınca kadar kurutulmuştur. Balon içerisine ekstraksiyona konu olan besiyeri hacmi kadar HPLC mobil fazı (su:Me:ACN, 5:4:1, v:v:v) ilave edilerek aflatoksin kalıntısı çözündürülmüştür. Aflatoksin çözeltisi, saflaştırma aşamasında kullanımına kadar -21 °C'de depolanmıştır.

3.6.2 Zearalenon ekstraksiyonu

ZEA ekstraksiyonu, Wu ve diğ. (2017) tarafından belirtilen metotta iyileştirme yapılarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri katlı filtre kâğıdı ile süzölmüş; erlende kalan miselya ise besiyeri başlangıç hacmi kadar metanol ile 220 rpm'de 15 dk çalkalamaya bırakılmıştır. Organik çözücü filtre edilerek miselyadan ayrılmış ve elde edilen iki faz (besiyeri filtratı ve miselya ekstraktı) yeni bir şişe içerisinde birleştirilmiştir. Karışım, toplam hacmin %30'u kadar hegzan ile yıkanmıştır. Daha sonra hegzan fazı uzaklaştırılarak yağda çözünen bileşiklerin besiyeri ekstraktından ayrılması sağlanmıştır. Yıkanmış besiyeri ekstraktı rotary evaporatörle 55 °C'de yaklaşık 20 kat konsantre edilmiştir. Konsantre sulu faz üzerine, mevcut hacminin 2 katı kadar metanol ilave edilmiş ve çözelti iyice karıştırılmıştır. Örnekler, saflaştırma aşaması için 0.45 µm'lik enjektör filtresinden geçirildikten sonra HPLC vialine alınmıştır.

3.6.3 Saflaştırma işlemi

Mikotoksinlerin saflaştırılması işlemi HPLC sistemine entegre fraksiyon toplama ünitesi (FRC-10A, Shimadzu, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yarı-preparatif ayırıştırma işlemi için Welch Ultisil XB-C18 kolon (21.2 mm × 250 mm, 5 µm; Çin) kullanılmıştır. Mikotoksinler kolonda izokratik akış şartlarında yürütülmüştür.

Aflatoksinler için hareketli faz olarak su:Me:ACN (5:4:1, v:v:v) kullanılmıştır. Toplam akış hızı 6 mL/dk, enjeksiyon hacmi 500 µL ve analiz süresi 50 dk olarak ayarlanmıştır. ZEA saflaştırmasında ise hareketli faz olarak su:ACN (40:60, v:v) kullanılmıştır. Toplam akış hızı 6.5 mL/dk, enjeksiyon hacmi 400 µL ve analiz süresi de 18 dk olarak uygulanmıştır. İlgili mikotoksinin preparatif kolonda belirlenen alıkonma süresine göre örnek toplama zaman dilimleri ayarlanmıştır.

Art arda yapılan enjeksiyonlardan toplanan kısımlar her bir mikotoksin fraksiyonu ayrı bir şişede olacak şekilde birleştirilmiştir. Bu fraksiyonlardan 50 mL örnek alınarak solvent fazı rotary evaporatörde (55 °C) uçurulmuştur. Balon içerisindeki solvent kalıntıları azot gazı ile giderilmiş ve mikotoksin kalıntısı üzerine 25 mL asetonitril ilave edilmiştir. Yüzeye yapışan tüm mikotoksin kalıntılarının solvente geçmesi için balon 5 dk ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Asetonitril içerisinde hazırlanmış stok toksin çözeltisi tekrar kullanımına kadar -21 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.4 Saflık değerlerinin belirlenmesi

Elde edilen fraksiyonların saflık oranları analitik kolonda, daha önce ifade edilen HPLC metotları (bkz. Bölüm 3.4.3) kullanılarak belirlenmiştir. Mikotoksin fraksiyonunun saflığı, fraksiyon pik alanının kromatogramdaki tespit edilebilir tüm pik alanlarının toplamına oranı şeklinde hesaplanmıştır (Chorfa ve diğ., 2016). Sonuçlar, %HPLC saflığı şeklinde ifade edilmiştir.

3.6.5 Doğrulama analizleri

Saflaştırılmış mikotoksin örneklerinin doğrulanması Agilent 1260 Infinity (CA, ABD) sıvı kromatografisi sistemine entegre Agilent 6460 Triple Quadrupole kütle spektrometresi (TQ MS/MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım Agilent Eclipse Plus C18 kolonda (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.8 µm; ABD) sağlanmıştır. Toplam akış hızı 0.5 mL/dk, kolon sıcaklığı 35 °C ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır. Hareketli faz olarak su (A) ve ACN (B) kullanılmış olup; analiz gradient

akış koşullarında yürütülmüştür. Akış programlaması şu şekildedir: ilk 1 dk %20 B, 3. dk'ya kadar %95 B'ye çıkış, 10. dk'ya kadar %95 B'de bekleme, 10.1 dk'ya kadar tekrar %20 B'ye düşüş ve 12. dk'ya kadar %20 sabit B akışı olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrometresi her iki elektrosprey iyonizasyon (ESI +/-) modunda da çalıştırılmıştır. Kapiler voltaj pozitif (+) modda 3000 V; negatif modda ise (-) 3500 V olarak ayarlanmıştır. Çarpışma kaynaklı ayırma için 30 psi basınçta ve yüksek saflıkta azot gazı (%99.99) kullanılmıştır. Kurutucu gaz (desolvation) sıcaklığı 300 °C, kaynak sıcaklığı ise 400 °C olarak ayarlanmıştır. Nebulizer ve kurutucu olarak yine azot gazından faydalanılmıştır. Analitler, çoklu reaksiyon izleme modunda (MRM) görüntülenmiştir.

3.7 İstatistiksel Analizler

Analizler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar "ortalama±standart sapma" şeklinde verilmiştir. Optimizasyon çalışmasında kullanılan Box-Behnken tasarımı Design-Expert (ver. 8.0.6, Stat-Ease Inc., MN) programında oluşturulmuş ve sonuçlar Yanıt Yüzey Yöntemine (YYY) göre değerlendirilmiştir. Modellemede aşamalı regresyon ($\alpha = \pm 0.1000$) uygulanmış ve Fisher's test kullanılarak model oluşturulmuştur. Regresyon katsayılarının önem durumunu belirlemek için Student's *t*-testinden faydalanılmıştır.

Diğer çıktıların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corp., IL, ABD) paket programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analiziyle (one-way ANOVA) değerlendirilmiştir. Ortalamalar arası farklar, $P < 0.05$ önem seviyesinde Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir.

3.8 Güvenlik Tedbirleri

Çalışma süresince kullanılan ekipmanlar genel laboratuvar malzemelerinden ayrı tutulmuş; laboratuvara sadece görevli personelin girişine izin verilmiştir. Çalışmanın tüm süreçlerinde laboratuvar önlüğü, tulum, nitril eldiven, N95 maske ve UV-koruyucu gözlük kullanılmıştır (FSSAI, 2020). Mikotoksinle temas etmesi muhtemel ekipmanların üzerine biyolojik tehlike uyarı etiketleri yapıştırılmıştır (Şekil 3.7) (PHAC, 2016). Çalışma süresince ekim ve ekstraksiyon işlemleri Sınıf II B2 biyogüvenlik kabini (Mikrotest, Türkiye) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Mikotoksin standartları, elektrostatik saçılma riskine karşı toz yerine çözelti halinde temin edilmiştir (FSSAI, 2020).



Şekil 3.7 : Biyolojik tehlike uyarı etiketi.

Mikotoksinle temas etmiş cam ve metal malzemeler gibi tekrar kullanılabilir laboratuvar ekipmanları dekontaminasyon işlemine tabi tutulmuştur. Yüksek sıcaklığa dayanıklı malzemeler 121 °C'de 20 dk otoklavlandıktan sonra dekontaminasyon işlemine alınmıştır. Mikotoksin kalıntısı içeren çözücülerde ise organik faz rotary evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra kalan sulu faza dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. Mikotoksinlerin çözücü buharı ile sürüklenmesi riskine karşı rotary evaporatörün vakum çıkışına %70 etanol içeren tuzak yerleştirilmiştir. Diğer kuru atıklar, evsel ve tıbbi atık olarak yerinde ayrıştırılmışlardır. Tıbbi atıklar daha sonra yetkili kurumlara teslim edilmek üzere ilgili mevzuata uygun üretilmiş tıbbi atık poşetinde biriktirilmiştir.

Dekontaminasyon işlemleri çeker-ocak içerisinde gerçekleştirilmiştir. Aflatoksinlerin dekontaminasyonu için bulaşık malzemeler %5 NaOCl içerisinde en az 12 saat bekletilmiş; ardından son konsantrasyon %5 olacak şekilde aseton ilave edilmiştir. Diğer mikotoksinlerin dekontaminasyonunda bulaşık ekipman %2.5 NaOCl ve 0.25 N NaOH çözeltisi içerisinde 2-8 saat bekletilmiştir (PHAC, 2016). Malzemeler deterjanla yıkandıktan sonra bol su ile durulanmıştır.

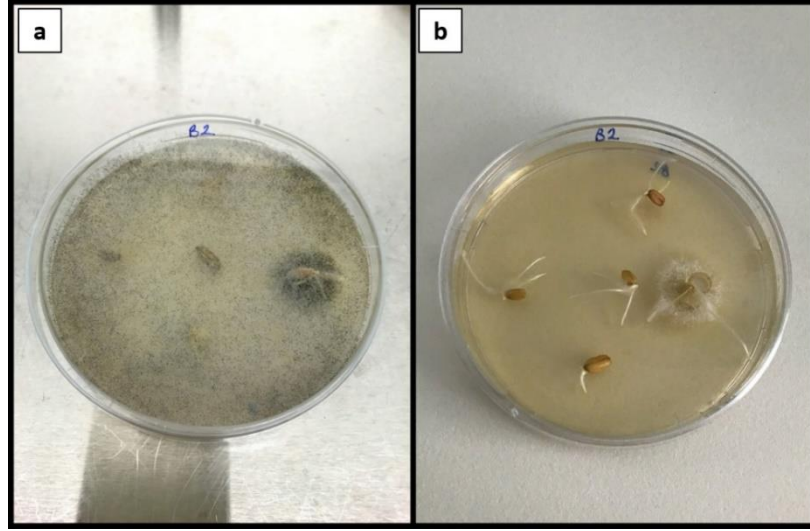
İş bitiminde biyogüvenlik kabini içerisinde UV ışık açılarak fungal dezenfeksiyon sağlanmıştır. Biyoreaktör çevresindeki yüzeyler aflatoksin kontrolü için karanlıkta UV ışık ile taranmıştır. Tezgâh yüzeyleri önce %1 NaOCl ile silinmiş; 10 dk beklenildikten sonra da %5 aseton ile temizlenmiştir (FSSAI, 2020).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 İzolasyon Sonuçları

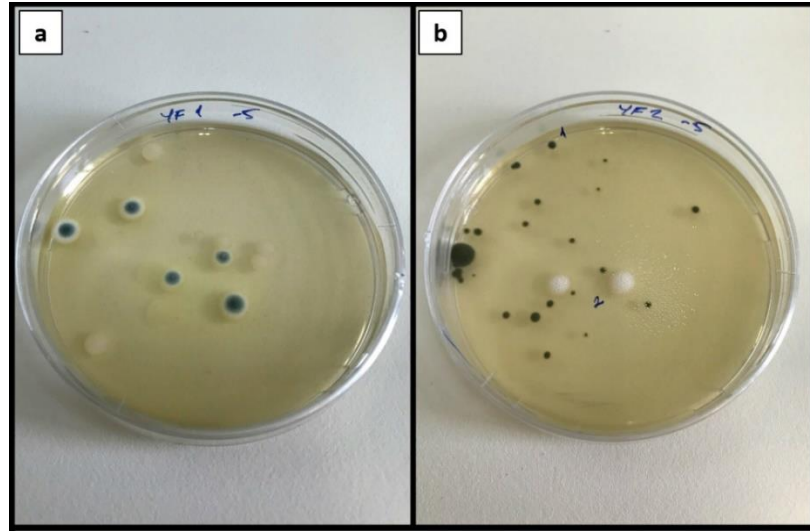
Çalışmanın ilk aşamasında, belirtilen mikotoksin çeşitlerini üretebilecek potansiyele sahip küf türlerinin izolasyonu hedeflenmiştir. Daha önce de bahsedildiği üzere en önemli aflatoksin, OTA, DON ve ZEA üreticisi küfler *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türleri arasında yer almaktadır (Battilani ve diğ., 2020). Bu türler dünyanın pek çok bölgesinde hava ve toprak florasında bulunabilirler. Meyveler çoğunlukla açıkta, güneş altında kurutulduğundan fungal enfeksiyonlara ve mikotoksin oluşumuna karşı oldukça savunmasızdırlar (Galvan ve diğ., 2021). Tahıl ürünlerinde de uygunsuz depolama koşullarına bağlı olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* bulaşı gözlenebilmektedir. Ayrıca *Fusarium*'lar sadece depolama aşamasında değil tarladayken de mahsulü enfekte edebilmektedir (Borbely ve diğ., 2010). Dolayısıyla tahıllar, baharatlar, kuru meyveler ve sert kabuklu meyve ürünleri mikotoksin bulaşının en yaygın olduğu ürün çeşitleridir (Turner ve diğ., 2015). Küf araması yapılacak örnekler de mikotoksin oluşumunun sık gözlemlendiği gıda grupları esas alınarak toplanmıştır.

Bahsi geçen gıdalar gerek depo gerekse satış noktasında genellikle açık şekilde muhafaza edilmektedir. Bu durum gıda yüzeylerinin hava veya toz gibi spor yüklü kaynaklarla kontamine olmasını kaçınılmaz kılmaktadır (Pitt ve Hocking, 2009). Bu tip ürünler doğrudan izolasyona alındığında hızlı gelişen küf türleri petri yüzeyini hifleriyle örtmekte ve altta kalan diğer türlerin izolasyonunu güçleştirmektedir (Şekil 4.1). Yüzey dezenfeksiyonu ürüne sonradan bulaşan refakatçi türlerin elemine edilerek gıdadaki asıl küf florasının geri kazanılmasını sağlayan bir uygulamadır (Pitt ve Hocking, 2009). Çalışmada da yüzey dezenfeksiyonu uygulanmamış örneklerde, dezenfeksiyon uygulananlara göre daha fazla küf gelişimi olduğu görülmüştür. Yüzey dezenfeksiyonuyla örnek üzerindeki küf yükünün %40 azaltılabildiği ifade edilmektedir (Noonim ve diğ., 2008). Ancak dezenfeksiyon uygulaması özellikle gıda yüzeyinde daha yoğun gelişen bazı küf türlerinin izolasyon oranını da düşürebilmektedir. Yassin ve diğ. (2010) sorgum taneleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada *A. niger* ve *F. semitectum* türlerinin dezenfeksiyon sonrası izolasyon sıklığında önemli bir düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. İzolasyon çalışmasında mikotoksijenik türlerin gözden kaçmasını önlemek için her iki yöntem (dezenfeksiyonlu ve dezenfeksiyonsuz) ayrı ayrı uygulanmıştır.



Şekil 4.1 : Örneklerde yüzey dezenfeksiyonu uygulamasının oluşturduğu fark. Yüzey dezenfeksiyonu uygulanmadan besiyerine yapıştırılan örnek (a) ile yüzey dezenfeksiyonu sonrası besiyerine yapıştırılan örnek (b).

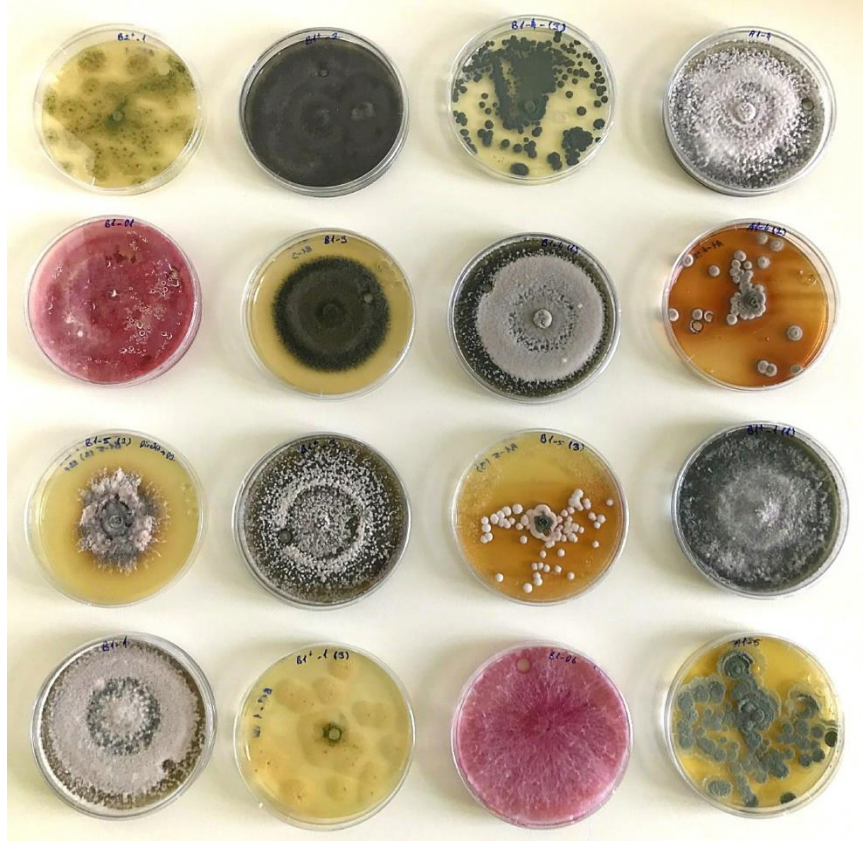
Temin edilen bazı gıda örneklerinde çok yoğun bir fungal kontaminasyon olduğu gözlenmiştir. Mikrobiyal yükün yoğun olduğu örneklerde doğrudan yapıştırma yöntemiyle izolasyon oldukça güçtür. Ayrıca pul biber, toz biber gibi partiküllü ve toz ürünlerde de yapıştırma yöntemi kullanılamamaktadır (Pitt ve Hocking, 2009). Bu tip örneklerde dilüsyon tekniği kullanımının tatmin edici sonuçlar verdiği görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 : Küf yükü yoğun olan farklı yer fıstığı örneklerinde (a ve b) dilüsyon işlemiyle izolasyon.

Ardışık aktarımlar sonrası petride aynı morfolojik özelliklere sahip, yeknesak koloni yapısı gösteren her örnek bir "izolat" olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada 48 farklı gıda örneğinden toplam 126 adet küf izolatu elde edilmiştir (Şekil 4.3). Yaş ürünler arasında sadece mısırdaki küf bulaşı tespit edilmiştir. Mısırdaki küf bulaşının daha mahsul

tarladayken başladığı ve hasattan önce bile çeşitli mikotoksinlerce kontamine olabildiği bildirilmektedir (Giorni ve diğ., 2019). Diğer yaş üzüm, yaş kayısı ve yaş kapa biber numunelerinde küf bulaşına rastlanmazken; bu örneklerin yoğun bir maya florasına sahip oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.3 : Elde edilen bazı küf izolatlarının PDA besi ortamındaki görüntüleri.

4.2 İzolatların Tanımlanması

Çalışmanın amacına uygun küf izolatlarının belirlenebilmesi için öncelikle tür tanımlamalarının yapılması gerekmektedir. Ayrıca mikotoksin üretimi öncesinde elde edilen her izolatın saf kültür halinde tek bir türden oluştuğu da ispatlanmalıdır. Bu amaçla dört aşamadan oluşan bir tanımlama süreci yürütülmüştür.

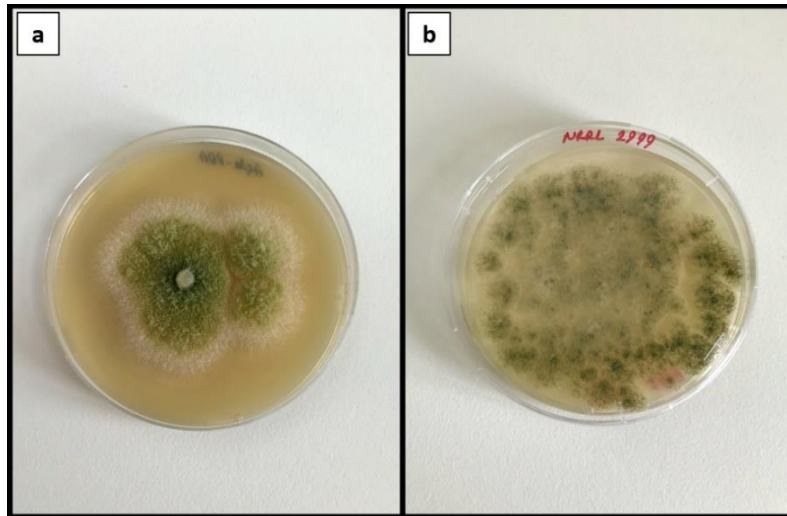
4.2.1 Gelişim ortamında koloni morfolojisine ilişkin bulgular

4.2.1.1 *Aspergillus* spp. şüphelisi izolatların makroskobik morfolojisi

Aspergillus'lar telemorf varlığı, metulae varlığı, metulae ve fialid gibi yapıların dizilimi ve koloni renkleri baz alınarak alt cins ve bölümlere (section, sc.) ayrılırlar (Pitt ve Hocking, 2009; Campbell ve diğ., 2013). Bunlardan ilk üçü mikroskobik özellikler olup,

koloni rengi ise gelişme besi ortamında incelenebilen bir özelliktir. *Aspergillus* cinsi üyelerin tanımlanmasında da ilk olarak koloni renginden faydalanılmaktadır (Nyongesa ve diğ., 2015). Telemorf içermeyen türlerde koloni, rengini doğrudan konidia renklerinden almaktadır (Pitt ve Hocking, 2009). Gelişimin başlarında yüzey beyaz iken gelişim ortamı ve türe bağlı olarak renk yeşil, sarı, turuncu, kahverengi ve siyahın herhangi bir tonuna dönebilir (Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018). Yeşil, koyu yeşil, sarımsı-yeşil gibi koloni renkleri Flavi, Fumigati veya Nidulantes bölümleri ile ilişkilendirilmektedir. Siyah ve kahverengi gibi oldukça koyu renkler Nigri, beyaz renk ise *A. sc. Candidi* bölümü üyelerinin karakteristik renkleridir. Mavimsi-gri tonlarda *A. sc. Clavati*, tarçın benzeri renkler gözleendiğinde ise *A. sc. Circumdati* üyelerinden şüphe edilmektedir (Nyongesa ve diğ., 2015).

A. flavus türleri PDA üzerinde geliştirildiğinde zeytin yeşili merkez, beyaz dış kenar ve sarımsı alt taban oluşturduğu ifade edilmektedir. *A. parasiticus* da *A. flavus* ile benzer morfolojik özellikler sergilerken, koloni merkez rengi daha çok çam yeşilini andırmaktadır (Odhiambo ve diğ., 2013). Çalışmada referans olarak kullanılan MAM-200682 *A. flavus* suşu merkezde zeytin yeşili bir renge sahipken; diğer referans suş NRRL 2999 *A. parasiticus* merkezde daha koyu bir yeşil ton oluşturmıştır (Şekil 4.4). Bu bakımdan elde edilen bulguların geçmiş literatür verileri ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Gerek PDA gerekse MEA besiyeri üzerinde koloni merkez rengi zeytin yeşili veya koyu yeşil olarak görülen izolatların *A. sc. Flavi*'ye ait olabileceği değerlendirilmiştir. Bu izolatlarda koloni dış kenar rengi beyaz iken; alt taban rengi ise yeşilden sarıya doğru farklılıklar göstermiştir.



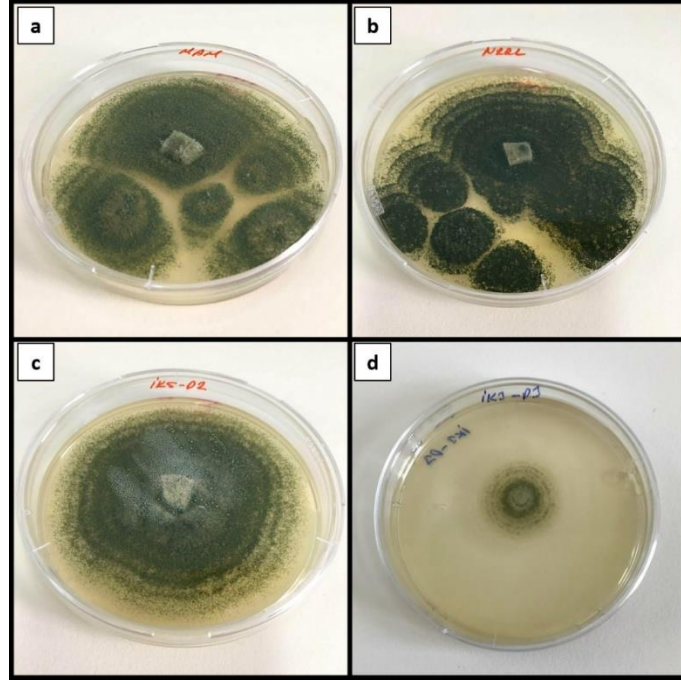
Şekil 4.4 : MAM-200682 *A. flavus* ve NRRL 2999 *A. parasiticus*'un PDA besiyeri üzerindeki görünümü.

A. ochraceus türlerinin PDA üzerinde kahverengi tonlarda koloniler oluşturduğu belirtilmektedir. MEA üzerinde ise üst görünüm açık sarı ile altın sarısı arasında değişirken taban görüntüsü soluk sarı veya kahverengidir. Hem *A. carbonarius* ve hem de *A. ochraceus* türlerinde konidial başlar çıplak gözle görülebilmektedir. Ayrıca MEA besiyeri üzerinde gelişen kolonilerin büyüklüğü 60-70 mm'ye kadar erişebilmektedir (Pitt ve Hocking, 2009). Yapılan morfolojik değerlendirmelerde bu özelliklerin tümünü taşıyan izolat tespit edilememiştir.

Aspergillus niger'de koloni merkezi siyah iken dış merkez beyaz veya krem rengindedir (Walsh ve diğ., 2018). Alt taban rengi soluk veya sarı renkte olabilmektedir (Pitt ve Hocking, 2009). Bu grubun ayırıcı en önemli özelliği siyah küresel konidialara sahip olması ve hiç farklı renk gözlenmemesidir. MEA üzerindeki gelişim hızının 30-60 mm arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (Pitt ve Hocking, 2009). Belirtilen özellikleri taşıyan küf izolatları *A. sc. Nigri* bölümü olarak sınıflandırılmıştır.

Koloni çapı da tanımlama için değerli bilgi sağlayan özelliklerden biridir (Pitt ve Hocking, 2009). Her ne kadar bazı küf cinsleri yavaş gelişim gösterse de *Aspergillus*'lar genellikle 3-5 gün gibi kısa sürelerde olgunluğa erişebilmektedir (Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018). *A. sc. Flavi* olarak sınıflandırılan izolatların PDA ve MEA üzerindeki üç günlük gelişim hızı sırasıyla 42.5 ± 4.0 mm ve 37.3 ± 3.2 mm olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda referans *Aspergillus sc. Flavi* suşlarında ise sırasıyla 42.5 ve 36.0 mm'lik gelişim olduğu kaydedilmiştir. Bu açıdan sonuçların birbiri ile tutarlı olduğu değerlendirilmektedir. Yine *A. sc. Nigri* olarak sınıflandırılan izolatlarda da benzer gelişim hızları not edilmiştir.

Küf türü hakkında önemli ipuçları sağlayan bir diğer parametre de koloni yapısıdır. *Aspergillus*'larda yukarı doğru dik duran hifler bulunur ve bu hiflerin uç kısımlarındaki konidialar çıplak gözle görülebilmektedir (Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018). *Aspergillus* olarak tespit edilen izolatların tamamında bu kabarık ve havai misel yapısına rastlanmıştır. Bazı *Aspergillus* türleri eş-merkezli halkalar oluşturarak gelişim göstermektedir (Sciortino, 2017). Referans kültür ve bazı izolatların iç içe geçmiş halkalar şeklinde miselya yapısını genişlettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



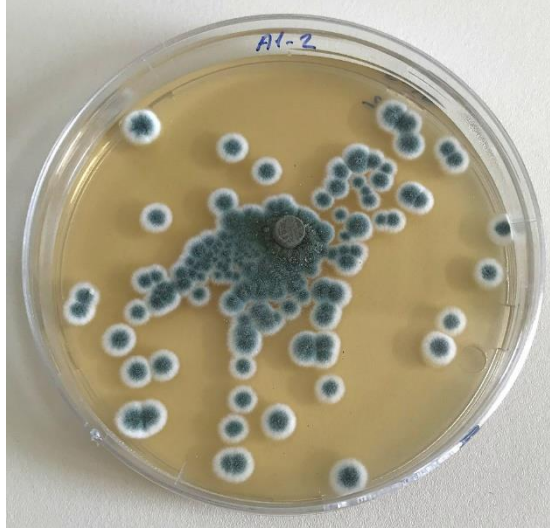
Şekil 4.5 : Bazı *A. sc. Flavi* üyelerinde görülen halkasal koloni genişlemesi. MAM-200682 *A. flavus* (a), NRRL 2999 *A. parasiticus* (b), İK5-D2 (c) ve İK5-D3 (d) izolatları.

4.2.1.2 *Penicillium* spp. şüphelisi izolatların makroskobik morfolojisi

Penicillium türlerinde konidial yapı genellikle koyu yeşilden soluk yeşile kadar değişkenlik göstermektedir (Pitt ve Hocking, 2009). Çeşitli agar ortamlarında mavi-yeşil, gri-yeşil, sarı, beyaz ya da pembe renkte olabilmektedirler (Sciortino, 2017). *Penicillium* olarak sınıflandırılmış tüm izolatlarda merkez renk yeşilin tonları olarak belirlenmiştir. Dış kenar rengi çoğunlukla beyaz; bazı izolatlarda ise yine yeşil olarak gözlenmiştir. İnkübasyon süresi 7 günün üzerine çıktıkça KC2-D2 ve YF1-D1 kodlu izolatlarda dış kenar renginin kırmızıya doğru döndüğü belirlenmiştir. Uzayan inkübasyon süresine bağlı olarak bazı *Penicillium* türlerinde renk değişimi sık gözlenen bir durumdur (Walsh ve diğ., 2018).

Mikotoksijenik türlerden olan *P. verrucosum* kolonilerinin besiyeri üzerinde boncuk taneleri gibi dağıldığı; kadifemsi ve oluklu bir yapıya sahip olduğu bildirilmektedir. *P. verrucosum*'un özellikle MEA üzerinde yavaş gelişim gösterdiği ve koloni büyüklüğünün 12-20 mm arasında olduğu ifade edilmektedir. *P. viridicatum*'da ise koloniler boncuk tanelerinden ziyade yoğun, kadifemsi ve oluklu görünüme sahiptir. Alt görünüm turuncu-kahve veya sarı-kahve tonlardadır (Pitt ve Hocking, 2009). Belirtilen karakteristik tanımlara uyan izolatların *Penicillium* türlerine ait olabileceği değerlendirilmiştir. Bu izolatların tamamında koloni yapısının kadifemsi veya toz gibi olduğu belirlenmiştir. Koloni görünümü çoğunlukla içi yeşil dışı beyaz boncuk taneleri

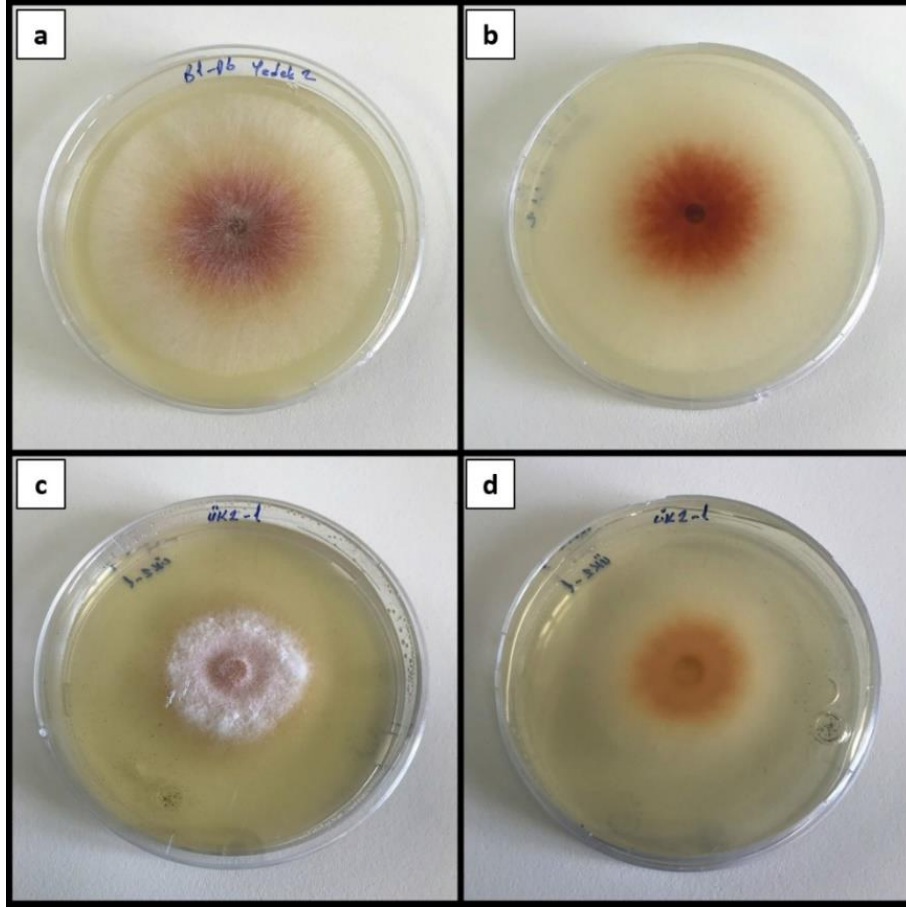
şeklindedir (Şekil 4.6). Büyüme hızlarının *Aspergillus* olarak sınıflandırılan izolatlara göre oldukça yavaş olduğu belirlenmiştir. Şüpheli izolatlar üç günlük inkübasyon sonunda PDA ve MEA besi ortamlarında sırasıyla ortalama 12.5 ± 4.1 mm ve 14.0 ± 6.3 mm büyüme göstermişlerdir.



Şekil 4.6 : *Penicillium* şüphelisi A1-2 kodlu izolatın MEA üzerindeki görünümü.

4.2.1.3 *Fusarium* spp. şüphelisi izolatların makroskopik morfolojisi

Fusarium türleri gelişimlerinin erken döneminde beyaz ve pamuksu koloniler oluşturmaktadırlar. Zamanla merkez renk turuncu, pembe, kırmızı veya menekşe rengine dönebilmektedir (Pitt ve Hocking, 2009; Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018). Sınır kısımları çoğunlukla beyazdır; ancak bazen merkez de beyaz olarak kalabilmektedir. Alt görünüm ise türden türe değişkenlik gösterebilmektedir (Sciortino, 2017). Örneğin *Fusarium culmorum*'un PDA üzerindeki üst görünümü soluk kırmızı, alt görünümü ise kırmızı veya koyu kırmızıdır. *Fusarium oxysporum* da ise görünüm soluk somon ya da leylak rengidir (Pitt ve Hocking, 2009). Eldeki izolatlardan pamuksu yapıda olan ve rengi tamamıyla beyaz ya da zamanla somon/kırmızı tona sahip olanlar *Fusarium* şüphelisi izolat olarak kaydedilmiştir. Üç günlük inkübasyon sonunda B1-D1 ve B1-D6 izolatlarının alt taban rengi kırmızı olurken; UK2-1 kodlu izolatta ise somon rengi bir ton gözlenmiştir (Şekil 4.7). İnkübasyona devam edildikçe B1-D1 ve B1-D6 izolatları ortam rengini tamamen kırmızıya döndürürken; UK2-1 kodlu izolat mevcut görünümünü korumaktadır.



Şekil 4.7 : PDA besi ortamında B1-D6 ve UK2-1 kodlu izolat görünümlerinin karşılaştırılması. B1-D6 izolatının üstten (a) ve alttan (b) görünümü; UK2-1 izolatının üstten (c) ve alttan (d) görünümü.

Fusarium kolonileri besi ortamlarında oldukça hızlı gelişim göstermektedirler (Pitt ve Hocking, 2009). İnkübasyon sonunda kültürün tüm petri yüzeyini kapladığı ve havai hif uçlarının kapağa dokunduğu bildirilmektedir (Sciortino, 2017). Eldeki *Fusarium* şüphelisi izolatların da PDA üzerindeki gelişim hızlarının (>75 mm/72 saat) oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Üç günlük inkübasyon sonunda miseller petri kapak kısmından taşma seviyesindedir. UK2-1 kodlu izolatta gelişim hızının B1-D1 ve B1-D6 kodlu izolatlara göre nispeten daha yavaş olduğu tespit edilmiştir.

4.2.1.4 Makroskobik morfolojiye ilişkin genel değerlendirme

Yapılan gözlemler sonucu elde edilen bulgular Çizelge 4.1'de ayrıntılarıyla sunulmuştur. Makroskobik incelemeler sonrası 126 küf izolatından 44 tanesinin *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsine ait olabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1 : *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerine ait olabileceği değerlendirilen bazı izolatlar ile referans kültürlerin PDA ve MEA besiyeri üzerindeki gelişim özellikleri.

	Sıra no.	Örnek Kodu	Besiyeri	Gelişim hızı (mm / 72 saat)	Koloni merkez rengi	Koloni dış kenar rengi	Alt taban rengi	Koloni yapısı
<i>Aspergillus</i> sc. Flavi	1	B1-C1-3	PDA	44	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	34	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	2	B2-C1	PDA	31	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	40	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	3	IK3-D3	PDA	39	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	33	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	4	IK5-D2	PDA	45	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	38	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	5	IK5-D3	PDA	46	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	39	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	6	KC2-D1	PDA	44	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	40	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	7	M3-D5-3	PDA	42	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	36	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	8	YF3-S1	PDA	43	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	39	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	9	YF3-S2	PDA	46	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	40	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	10	YF3-S3	PDA	45	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	40	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	11	YF3-S4	PDA	43	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	38	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
	12	YF3-D2-1	PDA	42	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel
			MEA	30	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel
Rf.*	MAM-200682	PDA	44	Zeytin yeşili	Beyaz	Yeşil	Havai misel	
		MEA	39	Zeytin yeşili	Beyaz	Sarımsı yeşil	Havai misel	
Rf.	NRRL 2999	PDA	41	Koyu yeşil	Beyaz	Yeşil	Havai misel	
		MEA	33	Koyu yeşil	Beyaz	Yeşil	Havai misel	
<i>Aspergillus</i> sc. Nigri	13	IK1-1	PDA	30	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
			MEA	33	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
			PDA	30	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
	14	IK1-D1	MEA	33	Siyah	Beyaz	Sarı, oluklu	Havai misel, oluklu
	15	IK4-D1	PDA	28	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
			MEA	30	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
			PDA	46	Siyah	Sarımsı	Soluk siyah	Havai misel
	16	KC1-1	MEA	34	Siyah	Sarımsı	Soluk siyah, oluklu	Havai misel, oluklu
			PDA	50	Siyah	Sarımsı	Soluk siyah	Havai misel
	17	KC1-D1	MEA	30	Siyah	Sarımsı	Soluk siyah, oluklu	Havai misel, oluklu
			PDA	49	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
	18	KK3-D1	MEA	30	Siyah	Beyaz	Sarımsı	Havai misel, oluklu
			PDA	48	Siyah	Sarımsı	Soluk siyah	Havai misel
	19	PBM1	MEA	36	Siyah	Sarımsı	Soluk siyah, oluklu	Havai misel
	20	PBM3	PDA	53	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
			MEA	35	Siyah	Beyaz	Sarı-Siyah	Havai misel
			PDA	36	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
	21	UK1-4-2	MEA	34	Siyah	Beyaz	Soluk siyah, oluklu	Havai misel, oluklu
			PDA	36	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
	22	UK1-5	MEA	35	Siyah	Beyaz	Soluk siyah, oluklu	Havai misel, oluklu
			PDA	38	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
	23	UK3-4	MEA	33	Siyah	Beyaz	Siyah, oluklu	Havai misel, oluklu
			PDA	37	Siyah	Beyaz	Soluk siyah	Havai misel
	24	UK3-5	MEA	32	Siyah	Beyaz	Soluk siyah, oluklu	Havai misel, oluklu

Çizelge 4.1 (devam) : *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerine ait olabileceği değerlendirilen bazı izolatlar ile referans kültürlerin PDA ve MEA besiyeri üzerindeki gelişim özellikleri

	Sıra no.	Örnek Kodu	Besiyeri	Gelişim hızı (mm / 72 saat)	Koloni merkez rengi	Koloni dış kenar rengi	Alt taban rengi	Koloni yapısı
<i>Aspergillus</i> sc. Nigri	25	UK3-D1	PDA	39	Siyah	Beyaz	Suluk siyah	Havai misel
			MEA	35	Siyah	Beyaz	Sarı, oluklu	Havai misel, oluklu
	26	YF1-C2	PDA	47	Siyah	Beyaz	Suluk siyah	Havai misel
			MEA	31	Siyah	Sarımsı	Sarı-siyah, oluklu	Havai misel
	27	YF3-D1	PDA	33	Siyah	Beyaz	Suluk siyah	Havai misel
			MEA	35	Siyah	Sarımsı	Sarı-siyah, oluklu	Havai misel, oluklu
Diğer A. sc.	28	KC2-4-2	PDA	15	Koyu yeşil	Beyaz	Opak	Havai misel
			MEA	23	Koyu yeşil	Beyaz	Sarımsı	Havai misel
	29	PBM4	PDA	37	Haki yeşil	Beyaz	Açık haki	Havai misel
			MEA	31	Haki yeşil	Beyaz	Sarı, oluklu	Havai misel
<i>Penicillium</i> spp.	30	A1-2	PDA	16	Mat yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
			MEA	8	Mat yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
	31	A1-5	PDA	12	Mat yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
			MEA	7	Mat yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
	32	A1-D1	PDA	18	Mat yeşil	Beyaz	Siyah	Kadifemsi, boncuk gibi
			MEA	8	Mat yeşil	Beyaz	Opak	Kadifemsi, boncuk gibi
	33	B1-4-3	PDA	10	Koyu yeşil	Koyu yeşil	Koyu yeşil	Kadifemsi
			MEA	9	Koyu yeşil	Beyaz	Koyu yeşil	Kadifemsi
	34	KC2-2	PDA	7	Koyu yeşil	Beyaz	Yeşil-beyaz	Havai misel
			MEA	15	Koyu yeşil	Beyaz	Yeşil-beyaz	Boncuk gibi, toz
	35	KC2-D2	PDA	20	Koyu yeşil	Açık yeşil	Açık yeşil	Havai misel
			MEA	26	Koyu yeşil	Beyaz	Siyah	Havai misel
	36	KK5-C2	PDA	12	Mat yeşil	Beyaz	Opak	Kadifemsi, boncuk gibi
			MEA	24	Mat yeşil	Beyaz	Opak	Kadifemsi, boncuk gibi
	37	YF1-D1	PDA	10	Yeşil	Beyaz	Yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
			MEA	15	Yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
	38	YF2-C1	PDA	7	Yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi
			MEA	16	Yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi, oluklu
	39	YF3-D2	PDA	15	Yeşil	Beyaz	Yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
			MEA	17	Yeşil	Beyaz	Yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
	40	YF3-D8	PDA	10	Yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi
			MEA	9	Yeşil	Beyaz	Sarı-yeşil	Kadifemsi, boncuk gibi
<i>Fusarium</i> spp.	41	B1-D1	PDA	>85	Kırmızı	Beyaz	Kırmızı-beyaz	Pamuksu
			MEA	48	Kırmızı	Beyaz	Kırmızı-beyaz	Pamuksu
	42	B1-D6	PDA	78	Kırmızı	Beyaz	Kırmızı-beyaz	Pamuksu
			MEA	49	Kırmızı	Beyaz	Kırmızı-beyaz	Pamuksu
	43	IK2-1	PDA	81	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Pamuksu
			MEA	>85	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Pamuksu
	44	UK2-1	PDA	29	Kırmızı	Beyaz	Somon rengi	Pamuksu
			MEA	27	Kırmızı	Beyaz	Somon rengi	Pamuksu
	Rf.	FcUK99	PDA	79	Sarı-kırmızı	Beyaz	Kırmızı	Pamuksu
			MEA	48	Sarı-kırmızı	Beyaz	Kırmızı	Pamuksu
Rf.	PH-1		PDA	>85	Sarı-kırmızı	Beyaz	Kırmızı	Pamuksu
			MEA	51	Sarı-kırmızı	Beyaz	Kırmızı	Pamuksu

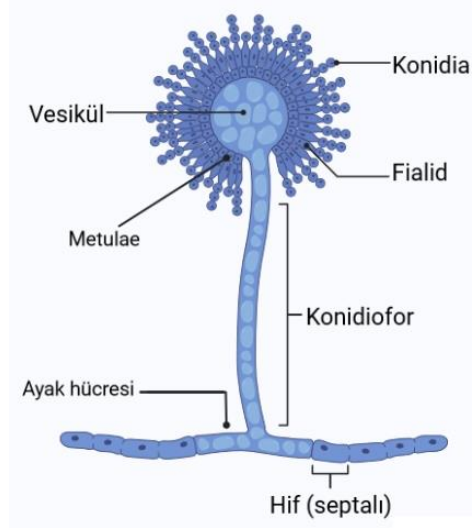
* Rf.: Referans küf türü.

4.2.2 Mikroskobik morfolojiye ilişkin bulgular

Küfler, mikroskobik yapı ve organizasyon bakımından birtakım karakteristik özelliklere sahiptir. Bu nedenle mikroskobik inceleme küflerin izolasyon ve tanımlanmasında oldukça değerli bilgiler sağlamaktadır. Filamentli funguslarda vejetatif yapı dallanmış filament sisteminden ya da diğer ismiyle miselyumdan oluşmaktadır. Miselyumu oluşturan hifler odacıklar halinde bölüntülenmişse septalı; bölüntülenmemişse septasız olarak adlandırılmaktadır. Funguslarda eşeysiz üreme, spor adı verilen hücreler vasıtasıyla gerçekleşir. Sporlar kimi zaman serbest kimi zaman da bir kese içerisinde kümelenmiş halde bulunabilirler. *Ascomycota* ve *Basidiomycota* şubesinin üyeleri tarafından üretilen aseksüel sporlara konidia adı verilir. Konidialar, *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi bazı fungus cinslerinde fialid adı verilen özelleşmiş konidiojen hücreler tarafından üretilmektedirler (Campbell ve diğ., 2013).

4.2.2.1 *Aspergillus* spp. şüphelisi izolatların mikroskobik incelemesi

Aspergillus'larda miselyum septalı hif yapılarından oluşmaktadır. Hiflerin ayak hücresi adı verilen kısımlarından dallanma göstermeyen konidiofor yapıları uzanmaktadır (Walsh ve diğ., 2018). Oldukça uzun boya sahip *Aspergillus* konidioforları uca doğru şişerek vesikül yapısını oluştururlar (Kidd ve diğ., 2016; Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018). Vesiküller, dairesel ya da yarı dairesel bir şekle sahiptirler (Sciortino, 2017). Vesikül üzerine yerleşik fialidlerin görünümü alt kısmı geniş, üst kısmı nispeten dar olduğundan şişeye benzetilmektedir (Walsh ve diğ., 2018). Vesikül, ya doğrudan kendisini bir çit gibi saran fialidlerle (tek katlı, uniseriate) ya da fialidleri üzerinde taşıyan ikinci bir tabaka olan metulae (çift katlı, biseriate) ile bağlantı halindedir (Kidd ve diğ., 2016). Fialidlerin uç kısmında radyal ya da düz şekilde sıralanmış konidia hücreleri bulunmaktadır (Kidd ve diğ., 2016). Vesikül, metulae (eğer varsa), fialidler ve konidia bir araya gelerek konidial başı oluşturmaktadırlar (Kidd ve diğ., 2016). *Aspergillus* cinsinin morfolojik yapı ve organizasyonuna ilişkin temsili görsel Şekil 4.8'de verilmiştir.



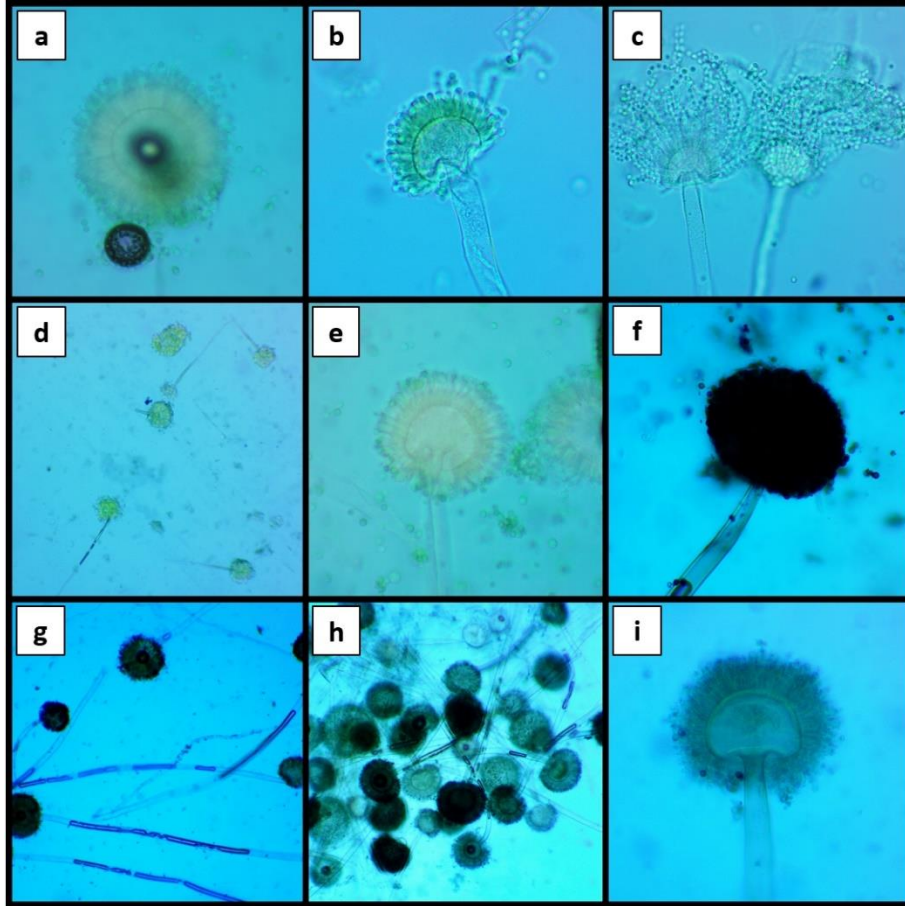
Şekil 4.8 : Biseriate *Aspergillus* türlerine ait temsili morfolojik yapı⁵.

Gözlemlerde *Aspergillus* türlerine ait olduğu düşünülen tüm izolatların uzun konidioforlara sahip olduğu belirlenmiştir. Konidioforlarda septa ve dallanma oluşumuna rastlanmamıştır. Konidiofor sonlarında balon gibi şişmiş vesikül yapıları kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Literatürde, başta *A. flavus* olmak üzere bazı *Aspergillus* türlerinde hem uniseriate hem de biseriate fialid yapısına rastlanılabildiği ifade edilmektedir (Sciortino, 2017). *A. niger* türlerinin ise biseriate formunda bulunduğu; metulae yapısının fialidlerden iki kat daha uzun olduğu belirtilmektedir (Walsh ve diğ., 2018). *A. sc. Flavi şüphelisi* izolatlar arasında yalnızca B2-C1, IK3-D3 ve YF3-D2-1 kodlu izolatlarda metulae tabakası bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bu bölümde değerlendirilen diğer izolatlarda ise uniseriate yapı gözlemlenmiştir.

A. flavus'ta fialidler çok sık değildir. Konidioforlar şeffafken konidialar da soluk yeşil bir renge sahiptir (Kidd ve diğ., 2016). Ayrıca, *A. sc. Nigri* bölümünde ise fialidler tüm vesikülü radyal düzende sardığından oldukça yoğun bir görünüme sahiptir (Walsh ve diğ., 2018). Bu bölümün üyelerinde konidia rengi siyah olarak gözlenmektedir (Kidd ve diğ., 2016). OTA üreticisi olmasıyla bilinen *A. carbonarius*'u diğer siyah *Aspergillus* türlerinden ayıran en önemli özellik daha uzun konidialar üretmesidir (Pitt ve Hocking, 2009). Elde edilen görüntülerde izolatların fialid uçlarının bol miktarda küçük ve küresel konidia barındırdığı görülmüştür. Ancak izolatlar arasında uzun konidiaya sahip bir örneğe rastlanmamıştır. *A. sc. Flavi şüphelisi* izolatların fialid ve konidia yapıları mikroskop altında açık renkli sarımsı-yeşil görüntü oluşturmuştur. Ayrıca referans olarak kullanılan

⁵ Görsel, www.biorender.com adresinde oluşturulmuştur.

NRRL 2999 *A. parasiticus* ve MAM-200682 *A. flavus*'un da *A. sc. Flavi* bölümünün karakteristik özelliklerini taşıdığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan *A. sc. Nigri* şüphelisi izolatlarda fialid ve konidialar oldukça koyu renklidir. Bu nedenle metulae varlığına ilişkin somut görüntü elde edilememiştir. Campbell ve diğ. (2013), vesikül ve fialidlerin arasında kalan metulae tabakasının mikroskopta tespit edilmesinin çoğu zaman oldukça güç olduğunu ifade etmektedirler.

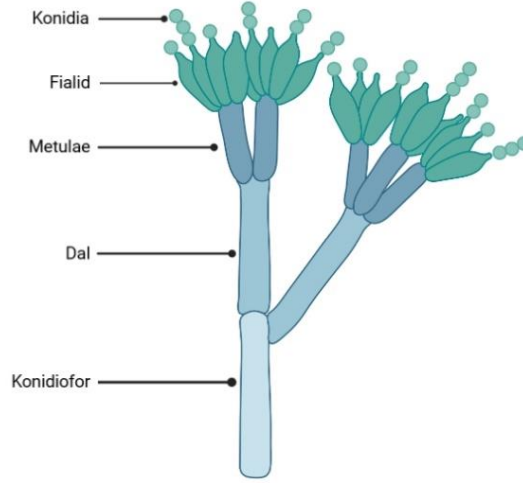


Şekil 4.9 : Bazı *Aspergillus* spp. şüphelisi izolatlara ait mikroskop görüntüleri. B2-C1 (a), IK5-D2 (b), IK5-D3 (c), KC2-4-2 (d), YF3-D2-1 (e), IK1-1 (f), PBM1 (g), PBM3 (h) ve (i).

4.2.2.2 *Penicillium* spp. şüphelisi izolatların mikroskopik incelemesi

Penicillium türlerinde hifler septalı ve şeffaftır (Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018). Bir dizi fialidi üzerinde taşıyan sondan bir önceki kısım metulae olarak tanımlanmaktadır. Metulae ve konidiofor sapı arasında kalan kısımlar ise dal olarak adlandırılmaktadır (Kidd ve diğ., 2016). Konidioforlar dallanmış ya da dallanmamış şekilde olabilmektedirler (Walsh ve diğ., 2018). Dallanma basit (dallanmamış, monovertilat), tek kademe dallanma (simetrik-bivertisilat), çift kademe dallanma

(asimetrik-bivertisilat), üç kademe dallanma (tervertisilat) veya çok kademeli dallanma (kuatervertisilat) şeklinde gerçekleşebilir (Kidd ve diğ., 2016). Bu dallanmalar, *Penicillium* cinsine has fırça benzeri bir görünüm oluşturmaktadır (Kidd ve diğ., 2016; Sciortino, 2017; Walsh ve diğ., 2018). *Penicillium* türlerine ait genel morfolojik yapıyı gösteren temsili görsel Şekil 4.10'da verilmiştir.



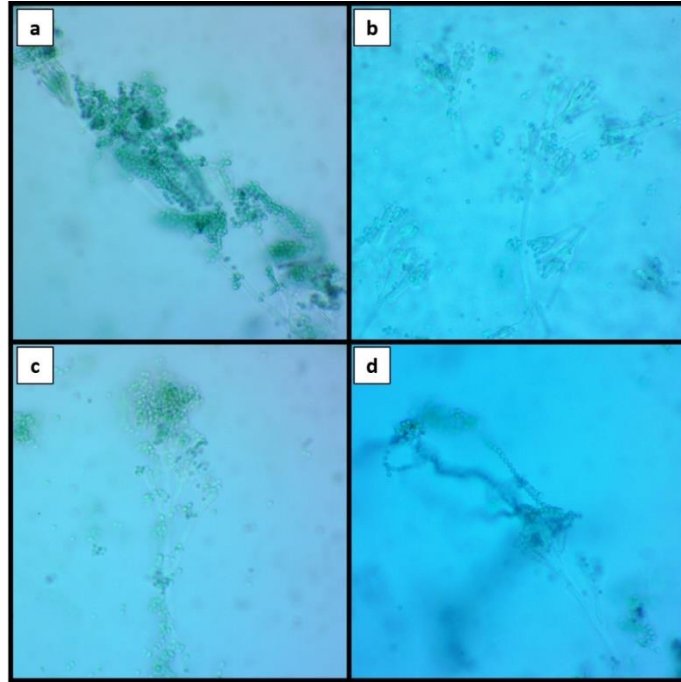
Şekil 4.10 : Tervertisilat dallanma gösteren *Penicillium* türlerine ait temsili morfolojik yapı⁶.

Penicillium cinslerinin altcinslere bölünmesinde ilk taksonomik ayırım bu dallanma şekillerine göre yapılmaktadır. Basit yapılı *Aspergilloides* altcinsi monovertisilat yapı gösterirken; *Penicillium* altcinsinde daha karmaşık dallanma yapıları görülmektedir. Örneğin, *P. verrucosum*'da çoğunlukla bivertisilat ve tervertisilat dallanma tipiyle karşılaşılmaktadır (Pitt ve Hocking, 2009). Makroskobik incelemede *Penicillium* türlerine ait olabileceği değerlendirilen A1-D1 ve KK5-C2 izolatlarının *Aspergillus* türleriyle aynı yapı ve organizasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle belirtilen izolatlar yeniden düzenlenen sınıflandırma tablosunda "Diğer A. sc. Bölümü" altında gösterilmiştir. KC2-D2 kodlu izolatta ise fialidlerin doğrudan konidiofor üzerinde olduğu ve monovertisilat dallanma olduğu belirlenmiştir. Bu izolatın *Penicillium* cinsiyle yakından ilişkili farklı bir altcinse ait olabileceği değerlendirilmiştir. Diğer izolatlarda ise tervertisilat ya kuatervertisilat dallanma biçimleri gözlemlenmiştir.

Penicillium'larda fialidler tek ya da çoklu halde bulunabilmektedir (Kidd ve diğ., 2016). Bunlar ya doğrudan konidiofor üzerinde ya da metulae vasıtasıyla oluşan kısa dallar üzerinde bulunmaktadır (Sciortino, 2017). Yeniden sınıflandırma sonrasında bu grupta

⁶ Görsel, www.biorender.com adresinde oluşturulmuştur.

yer alan izolatların metulae üzerinde çoklu fialidler oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). Fialid şekilleri *Aspergillus*'lar ile benzerlik göstermektedir. *Aspergillus* türlerinde konidialar radyal bir düzende eşzamanlı üretilirler. Bu nedenle oluşan konidia dizilimi de aynı boyda gözükmektedir. Ancak *Penicillium* türlerinde konidialar uzun zincirler halinde sıralanır ve zincir boyları oldukça düzensizdir (Pitt ve Hocking, 2009; Kidd ve diğ., 2016). *Penicillium* şüphelisi izolatlarda konidia zincirlerinin oldukça uzun ancak farklı uzunluklarda olduğu belirlenmiştir. *Penicillium*'ların teşhisinde bir diğer ayırıcı özellik ise vesikül şeklidir. *Aspergillus* türlerinin aksine *Penicillium*'larda, vesikülün hiçbir zaman konidioforun iki katından daha büyük bir genişliğe erişmediği ifade edilmektedir (Campbell ve diğ., 2013). Yapılan değerlendirmelerde de vesikül ucunun konidifora göre nispeten şiş ancak *Aspergillus* vesikülüne göre oldukça dar olduğu belirlenmiştir. İzolatların vesikül görünümü insanlardaki kemik eklemlerini andırmaktadır.

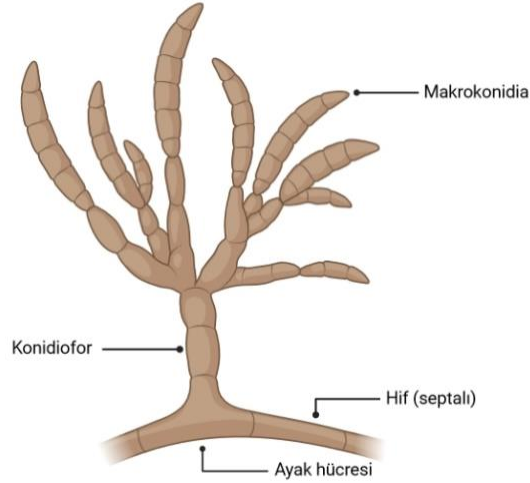


Şekil 4.11 : Bazı *Penicillium* spp. izolatlarına ait mikroskop görüntüleri. YF3-D8 (a), YF1-D1 (b), A1-5 (c) ve A1-2 (d).

4.2.2.3 *Fusarium* spp. şüphelisi izolatların mikroskopik incelemesi

Aspergillus ve *Penicillium*'larda olduğu gibi *Fusarium* türlerinde de hifler septalı ve şeffaftır (Sciortino, 2017). Referans kültürler (FcUK99 *F. culmorum* ve PH-1 *F. graminearum*) ile diğer *Fusarium* şüphelisi izolatların hif septa yapısı açık bir şekilde gözlemlenmiştir. *Fusarium* türlerinde fialidlerin dallanmış ya da dallanmamış konidioforlar üzerinde bulunduğu belirtilmektedir (Walsh ve diğ., 2018). Gözlemlerde tüm

izolatların hif yapılarında dallanmalar tespit edilmiştir. *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinden farklı olarak *Fusarium*'larda fialidler daha ince yapıya olup iki tip konidia üretimi görülmektedir (Kidd ve diğ., 2016; Sciortino, 2017). Kano/hilal benzeri ve septalı hücreler makrokonidia; tek ya da iki hücreden oluşmuş küçük, oval olanlar ise mikrokonidia olarak adlandırılmaktadır (Pitt ve Hocking, 2009; Walsh ve diğ., 2018). *Fusarium* teşhisinde de en önemli unsur bu hilal benzeri, septalı makrokonidialardır (Şekil 4.12) (Pitt ve Hocking, 2009; Sciortino, 2017).

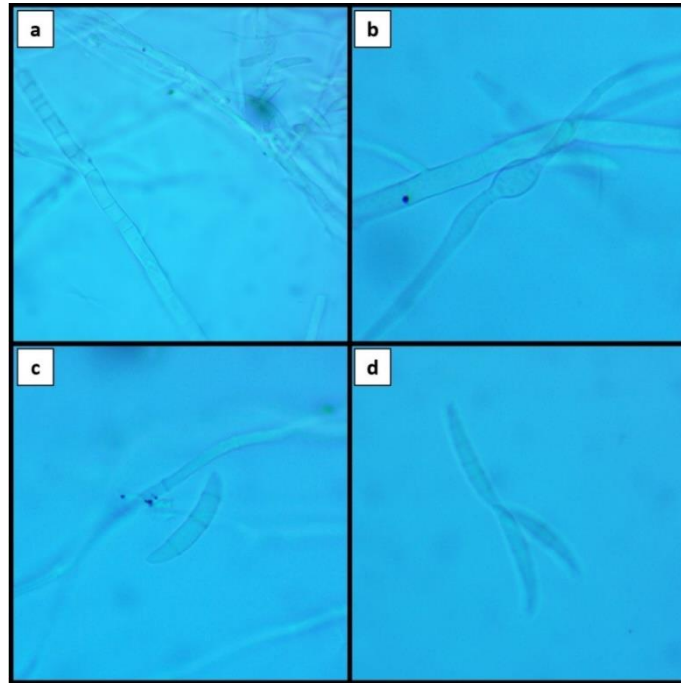


Şekil 4.12 : *Fusarium* türlerine ait temsili morfolojik yapı⁷.

Referans *Fusarium* kültürleri ile B1-D1 ve B1-D6 izolatlarında muz gibi kavisli makrokonidialara rastlanılmıştır. Makrokonidiaların septa sayısı 1-5 arası değişmekle birlikte genellikle üç olarak belirtilmektedir (Pitt ve Hocking, 2009). Yapılan gözlemlerde bazı makrokonidia hücrelerinin 3 bazılarının ise 5 septa barındırdığı görülmüştür (Şekil 4.13). UK2-1 kodlu izolatta makrokonidiaya rastlanmazken; bol miktarda elipsoit şekilli mikrokonidia hücresi gözlemlenmiştir. Bunun dışında hif ucu ya da ortasında klamidokonidia oluşumu da karakteristik bir özelliktir ancak her *Fusarium* türünde klamidokonidia oluşumuna rastlanmamaktadır (Kidd ve diğ., 2016; Walsh ve diğ., 2018). B1-D1 kodlu örnekte tekli klamidokonidia bulunurken; diğer izolatlarda klamidokonidia oluşumuna ilişkin bir kanıt elde edilememiştir (Şekil 4.13). En önemli *Fusarium* türlerinden biri olan *Fusarium graminearum* genellikle beş septalı makrokonidialar üretir ancak mikrokonidia üretimi gözlenmemektedir. Bazı türlerinde yavaş da olsa bir klamidokonidia oluşumu mevcuttur (Pitt ve Hocking, 2009). *Fusarium culmorum*'da ise makrokonidiaların daha geniş ve nispeten kısa olduğu belirtilmektedir. Makrokonidiaları

⁷ Görsel, www.biorender.com adresinde oluşturulmuştur.

genellikle üç veya beş septalıdır. *F. graminearum*'a benzer şekilde mikrokonidia üretimi görülmezken klamidokonidia oluşumuna ise nadiren rastlanabilmektedir. *Fusarium oxysporum*'da ise makrokonidialar hafif kıvrılmış şekilde ve genellikle üç septalıdır (Pitt ve Hocking, 2009; Kidd ve diğ., 2016). Bol miktarda mikrokonidia oluşumu vardır ancak makrokonidia üretimi daha azdır. Klamidokonidialar tek tek veya çiftler halinde üretilmektedir (Pitt ve Hocking, 2009; Campbell ve diğ., 2013). *Fusarium oxysporum* konidioforlarında yoğun bir dallanma söz konusudur (Kidd ve diğ., 2016). Gözlem sonuçları bir arada değerlendirildiğinde B1-D1 ve B1-D6 kodlu izolatların *F. graminearum*, *F. culmorum* ya da yakın bağına sahip bir tür olabileceği değerlendirilmiştir. Besi ortamındaki gelişim hızı diğer *Fusarium* şüpheli izolatlarına göre yavaş olan UK2-1 kodlu izolatın, mikroskopik değerlendirme sonrası *Fusarium* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yoğun mikrokonidia üretimi göstermesi nedeniyle bu izolatın *F. oxysporum* olabileceği tahmin edilmektedir. Koloni morfolojisi açısından *Fusarium* türleriyle ilişkilendirilen İK2-1 kodlu izolatın mikroskopik görüntüsünde ise hiflerde bir kümeleşme durumu söz konusudur. Bu yumak benzeri yapı *Chaetomium* spp. ile benzerlik göstermektedir. Ancak izolatın mikroskopik yapısı hakkında kesin bir çıkarım yapılamadığından *Fusarium* şüpheli izolat olarak sınıflandırmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.13 : B1-D1 izolatının mikroskopik görüntüsü. Hiflerdeki septa yapısı (a), klamidokonidia oluşumu (b), üç septalı (c) ve beş septalı (d) makrokonidia hücreleri.

4.2.2.4 Mikroskobik incelemeye ilişkin genel değerlendirme

Makroskobik ve mikroskobik gözlem sonuçları ile mevcut literatür bilgileri bir arada değerlendirilmiş; *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerinden birine ait olabileceği düşünülen izolatlar Çizelge 4.2'de tekrar sınıflandırılmıştır.

Çizelge 4.2 : *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerine ait olabileceği değerlendirilen bazı izolatlar ile referans kültürlerin mikroskobik morfolojileri.

	Sıra no.	Örnek Kodu	Konidio- forda dallanma**	Vesikül	Metulae	Spor şekli	Spor dizilimi
<i>Aspergillus</i> sc. Flavi	1	B1-C1-3	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	2	B2-C1	Yok	Küresel	Var	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	3	IK3-D3	Yok	Küresel	Var	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	4	IK5-D2	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	5	IK5-D3	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	6	KC2-D1	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	7	M3-D5-3	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	8	YF3-S1	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	9	YF3-S2	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	10	YF3-S3	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	11	YF3-S4	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	12	YF3-D2-1	Yok	Küresel	Var	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	Rf.*	MAM-200682	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	Rf.	NRRL 2999	Yok	Küresel	Yok	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
<i>Aspergillus</i> sc. Nigri	13	IK1-1	Yok	Küresel	T.E.***	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	14	IK1-D1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	15	IK4-D1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	16	KC1-1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	17	KC1-D1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	18	KK3-D1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	19	PBM1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	20	PBM3	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	21	UK1-4-2	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	22	UK1-5	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	23	UK3-4	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	24	UK3-5	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	25	UK3-D1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	26	YF1-C2	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
	27	YF3-D1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, siyah	Radyal, eşzamanlı
Diğer A.	28	A1-D1	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, şeffaf	Radyal, eşzamanlı
	29	KC2-4-2	Yok	Küresel	T.E.	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
	30	KK5-C2	Yok	Küresel	Var	Küresel, şeffaf	Radyal, eşzamanlı
	31	PBM4	Yok	Küresel	Var	Küresel, sarımsı	Radyal, eşzamanlı
<i>Penicillium</i> spp.	32	A1-2	Terv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	33	A1-5	Kuaterterv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	34	B1-4-3	Terv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	35	KC2-2	Terv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	36	KC2-D2	Monov.	Ucu şiş	Yok	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	37	YF1-D1	Terv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	38	YF2-C1	Terv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	39	YF3-D2	Terv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz
	40	YF3-D8	Terv.	Ucu şiş	Var	Küresel, sarımsı	Zincir, düzensiz

Çizelge 4.2 (devam): *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerine ait olabileceği değerlendirilen bazı izolatlar ile referans kültürlerin mikroskopik morfolojileri.

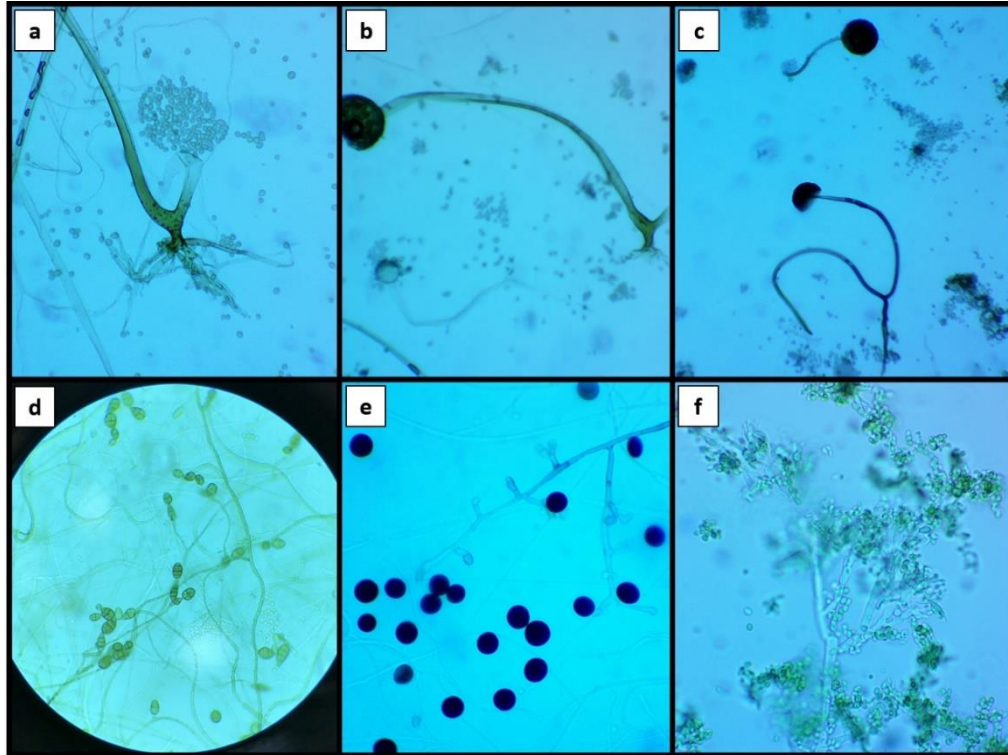
	Sıra no.	Örnek Kodu	Konidio- forda dallanma**	Vesikül	Metulae	Spor şekli	Spor dizilimi
<i>Fusarium</i> spp.	41	B1-D1	Var	İnce uçlu	-	Hilal benzeri	Dağınık
	42	B1-D6	Var	İnce uçlu	-	Hilal benzeri	Dağınık
	43	IK2-1	Var	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
	44	UK2-1	Var	İnce uçlu	-	Mikrokonidia	Dağınık
	Rf.	FcUK99	Var	İnce uçlu	-	Hilal benzeri	Dağınık
	Rf.	PH-1	Var	İnce uçlu	-	Hilal benzeri	Dağınık

* Rf.: Referans küf türü.

** Monov.: Monovertisilat, Terv.: Tervertisilat, Kuaterv.: Kuatervertisilat.

*** T.E.: Tespit edilemedi.

Bu seçili 44 izolatın dışında kalan diğer izolatların büyük bir kısmını *Rhizopus*, *Mucor* ve *Alternaria* türlerinin oluşturduğu belirlenmiştir. Bunlar dışında *Absidia*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Geotrichum*, *Neoscytalidium*, *Nigrospora* ve *Paecilomyces* türlerine de rastlanılmıştır (Şekil 4.14). Bu cinslere ait küf türleri arasında aflatoksin, OTA, DON veya ZEA üreticisi bir tür rapor edilmediğinden kalan izolatlar araştırma kapsamı dışında bırakılmıştır.



Şekil 4.14 : Çalışma kapsamında izole edilen bazı küf türlerine ait mikroskop görüntüleri. *Rhizopus* (a ve b), *Mucor* (c), *Alternaria* (d), *Nigrospora* (e) ve *Paecilomyces* (f).

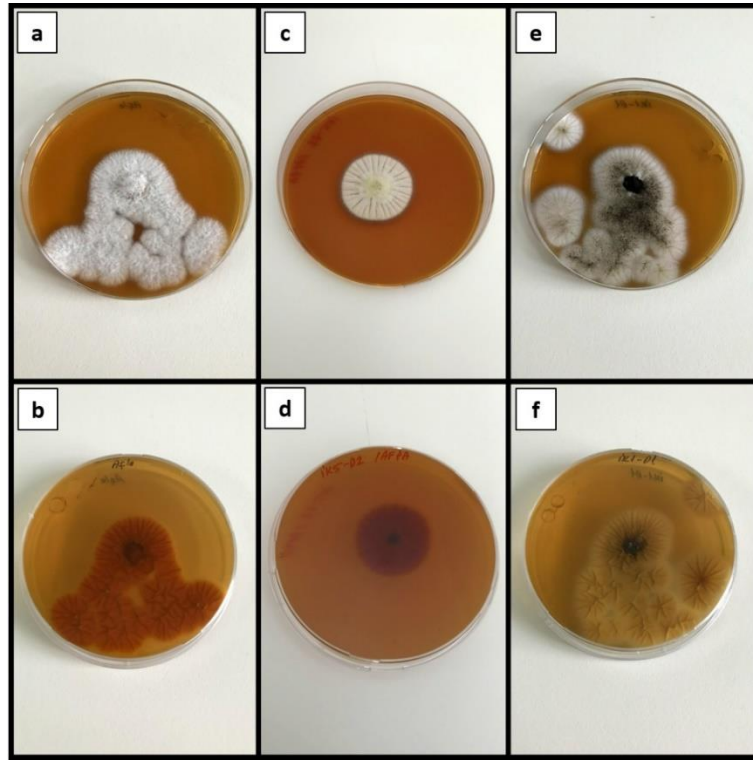
4.2.3 Seçici-ayırt edici besi ortamında gelişim özellikleri

4.2.3.1 *Aspergillus* sc. Flavi üyelerinin spesifik besi ortamlarında incelenmesi

AFPA ortamı, muhtemel aflatoksin üreticisi *A. flavus* ve *A. parasiticus* suşlarının hızlı tespitinde sık kullanılan bir besiyeridir (Dehghan ve diğ., 2008; Isman ve Bıyık, 2009). Bu iki tür, gelişim sırasında aspergillik asit üretmekte ve oluşan metabolit, besiyeri bileşimindeki demir iyonları ile reaksiyon vermektedir (Sukmawati ve diğ., 2018). Gerçekleşen bu reaksiyona bağlı olarak koloni taban rengi yoğun bir sarı/turuncu renk almaktadır. Bu durum, *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri için ayırt edici karakteristik bir özelliktir (Dehghan ve diğ., 2008; Isman ve Bıyık, 2009). Analizlerde *A. sc. Flavi* bölümünde sınıflandırılan 12 izolat ile diğer *A. bölümlerine* ait olabileceği düşünülen 4 izolat incelemeye tabii tutulmuştur. Referans olması açısından MAM-200682 *A. flavus* ve NRRL 2999 *A. parasiticus* standart kültürlerinin de AFPA ortamındaki gelişimleri incelenmiştir. Gerek standart kültürler gerekse *A. sc. Flavi* bölümüne ait izolatların tamamında alt taban rengi turuncu olarak belirlenmiştir. Ancak *A. oryzae* türlerinin de AFPA besiyerinde sarı/turuncu koloni tabanı oluşturduğu ve değerlendirme yapılırken bu türlerin makroskobik özelliklerinin de dikkate alınması gerektiği ifade edilmektedir (Isman ve Bıyık, 2009). Daha önceki incelemelerde *A. sc. Flavi* izolatları arasında *A. oryzae* ile benzer özellikler sergileyen izolat tespit edilmediğinden, turuncu alt tabana sahip 12 izolatın *A. flavus* veya *A. parasiticus* olabileceği değerlendirilmiştir. Ancak diğer 3 izolatın (A1-D1, KK5-C2 ve KC2-4-2) belirtilen kriterlere uymadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, adı geçen 3 izolatın *A. flavus* ya da *A. parasiticus* türlerine ait olmadığı sonucuna varılmıştır. PBM4 kodlu izolat ise AFPA besiyerinde oldukça yoğun bir pigmentasyon oluşturmuş ve renk tonu daha çok koyu kırmızı yaklaşmıştır. AFPA besiyeri testinin güvenilirliğini test etmek amacıyla IK1-D1 kodlu *A. sc. Nigri* bölümüne ait izolat da negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu izolatta alt tabanın krem renginde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15). Elde edilen sonuçlar geçmiş literatür çalışmaları ile tutarlılık göstermektedir (Okoth ve diğ., 2012; Faria ve diğ., 2017; Variane ve diğ., 2018). Şüpheli izolatlar AFPA ortamında 3 günlük inkübasyon sonunda 25-36 mm arası büyüklüğe erişmişlerdir. İzolatların gelişim hızı, referans kültürlerin gelişim hızı ile uyumlu bulunmuştur.

Morfolojik tanımlamalar her ne kadar küf türleri hakkında değerli bilgiler sunsa da incelenen türün toksijenik olup olmadığı hakkında kesin bir bilgi sağlamamaktadır. Çünkü *A. sc. Flavi* bölümü kendi bünyesinde hem toksijenik hem de atoksijenik suşları

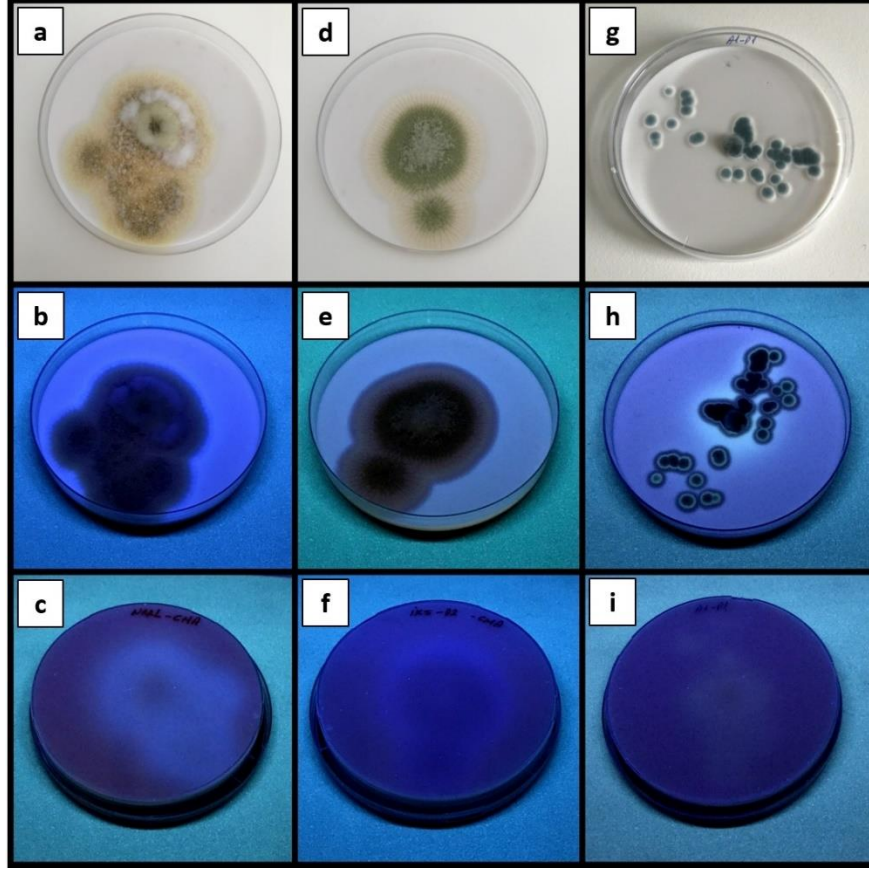
barındırmaktadır. Örneğin, bu bölümde yer alan *A. sojae* ve *A. oryzae*, mikotoksijenik *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un varyantları olmasına rağmen aflatoksin üretimi yapmamaktadır (Chang ve diğ., 2007). AFPA ortamı da *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un izolasyonu için elverişli; toksijenik suşlar bu besiyerinde aflatoksin üretimi yapmamaktadır (Reddy ve diğ., 2009). Aflatoksijenik suşların hızlı tespitine yönelik bazı kültürel metotlar geliştirilmiştir. UV ışımının kontrolü ve amonyum hidroksit buharı uygulaması bu amaçla kullanılan başlıca yöntemlerdir (Sudini ve diğ., 2015). Yapılan çalışmalarda Hindistan cevizi sütü agar (CMA), maya ekstraktı sükröz agar (YES) ve Czapek maya ekstraktı agarın (CYA) bu amaç için uygun besi ortamları olduğu ifade edilmektedir (Reddy ve diğ., 2009; Yazdani ve diğ., 2010).



Şekil 4.15 : Bazı küf kültürlerinin AFPA besi ortamında oluşturdukları görünüm. MAM-200682 *A. flavus* referans kültürü üst (a) ve alt (b) görünümü; IK5-D2 izolatu üst (c) ve alt (d) görünümü; IK1-D1 izolatu üst (e) ve alt (f) görünümü.

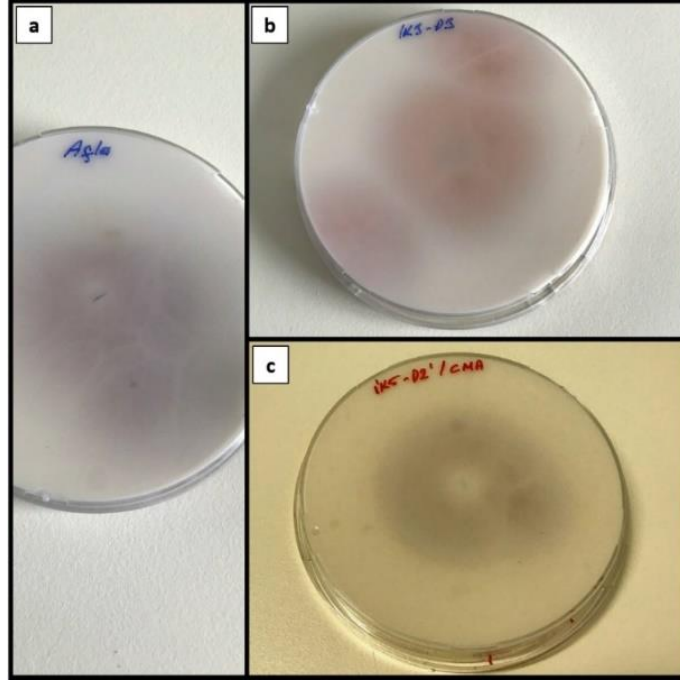
Bu çalışmada da aflatoksijenik olabileceği değerlendirilen izolatlar YES, CYA ve CMA besi ortamlarında geliştirilmiş; inkübasyon sonunda petrideki alt ve üst görünümü 365 nm UV ışık altında incelenmiştir (Şekil 4.16). CMA besi ortamında, diğer besiyerlerine göre daha fazla pozitif sonuç (11/16) elde edilmiştir. Hindistan cevizi bileşenlerinin floresans özellikli pigment üretiminde etkisi olduğu bilinmektedir (Rajarajan ve diğ., 2021). Aflatoksin üreticisi olduğu bilinen referans *Aspergillus* suşlarının YES ve CYA ortamındaki ışım durumu negatifken; CMA besiyerinde pozitif sonuç vermesi

dikkat çekmiştir. Özellikle *A. sc. Flavi* bölümünde sınıflandırılan ve CMA besi ortamında geliştirilen IK5-D2 ve IK5-D3 kodlu izolatlarda yoğun ışıma tespit edilmiştir. Ayrıca *A. sc. Flavi* bölümü dışında sınıflandırılmış 4 izolattan 3 tanesinin de yine oldukça güçlü ışıma gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.16 : CMA besiyerinde geliştirilmiş bazı küf kültürlerinin aydınlıkta ve UV ışık altında görüntüleri. NRRL 2999 *A. parasiticus* referans kültürünün aydınlıkta (a), UV ışıkta üst (b) ve alt (c) görünümü; IK5-D2 izolatının aydınlıkta (d), UV ışıkta üst (e) ve alt (f) görünümü; A1-D1 izolatının aydınlıkta (g), UV ışıkta üst (h) ve alt (i) görünümü.

Aspergillus suşlarının aflatoksin üretimi sırasında antrakinin ve benzeri ara ürünleri ürettiği bilinmektedir (Sudini ve diğ., 2015). Bu bileşikler amonyum hidroksit buharına maruz kaldıklarında kırmızımsı renk oluşumu meydana gelmektedir. Buradan hareketle, petrilere amonyum hidroksit buharı uygulanmış ve yine en net gözlemler CMA besiyerinde elde edilmiştir (Şekil 4.17). Amonyum buharı uygulaması teste tabii tutulan 16 izolattan 9 tanesinde kızarmaya sebep olmuştur. Diğer *Aspergilli* olarak sınıflandırılan izolatların hiçbirinde kızarma gözlenmemiştir. IK5-D2 ve IK5-D3 kodlu izolatlar burada da güçlü renk değişimi göstermesi ile dikkat çekmektedir. Şüpheli *Aspergillus sc. Flavi* üyelerinin seçici-ayırıcı besi ortamlarındaki gelişimlerine ilişkin gözlem sonuçları Çizelge 4.3'te özetlenmiştir.



Şekil 4.17 : CMA besi ortamında geliştirilmiş bazı küf kültürlerinin amonyum hidroksit buharı ile muamelesi sonucu elde edilen görüntüler. MAM-200682 *A. flavus* referans kültürü (a), IK5-D3 izolatu (b), IK5-D2 izolatu (c).

Çizelge 4.3 : Bazı *Aspergillus* izolatlarının seçici-ayırt edici besi ortamındaki gelişim özellikleri ve aflatoksin üretme yeteneklerinin kontrolü.

Sıra	Örnek Kodu	Alt taban rengi	UV ışık altında floresans****			NH ₄ OH buharında kızarma		
		AFPA***	YES	CYA	CMA	YES	CYA	CMA
1	B1-C1-3	Turuncu	-	-	-	-	-	-
2	B2-C1	Turuncu	-	-	-	-	-	-
3	IK3-D3	Turuncu	-	-	-	-	-	++
4	IK5-D2	Turuncu	-	-	++	-	-	++
5	IK5-D3	Turuncu	-	-	++	-	-	++
6	KC2-D1	Turuncu	-	-	±	-	-	-
7	M3-D5-3	Turuncu	-	-	±	-	-	±
8	YF3-S1	Turuncu	-	-	+	-	-	++
9	YF3-S2	Turuncu	-	-	+	-	-	+
10	YF3-S3	Turuncu	-	-	+	-	-	++
11	YF3-S4	Turuncu	-	-	+	-	-	++
12	YF3-D2-1	Turuncu	-	-	-	-	-	++
13	A1-D1	Siyah	++	+	++	-	-	-
14	KC2-4-2	Opak	-	-	++	-	-	-
15	KK5-C2	Siyah	++	+	++	-	-	-
16	PBM4	Kızıl	-	-	-	-	-	-
Rf.*	MAM-200682	Turuncu	-	-	++	-	-	++
Rf.	NRRL 2999	Turuncu	-	-	++	-	-	++
Ng.**	IK1-D1	Açık krem	-	-	-	-	-	-
Boş	Boş petri	Kahverengi	-	-	-	-	-	-

* Rf.: Referans küf türü.

** Ng.: Negatif kontrol. Negatif kontrol amacıyla *A. sc. Nigri* bölümüne ait olduğu tespit edilen IK1-D1 kodlu izolat kullanılmıştır.

*** AFPA: *Aspergillus flavus/parasiticus* agar, YES: Maya ekstraktı sükröz agar, CYA: Czapek maya ekstraktı agar, CMA: Hindistan cevizi sütü agar.

**** (++) : güçlü sinyal, (+) : orta derece sinyal, (±) : zayıf sinyal, (-) : tespit edilemedi.

Kültürel metotlar ile kromatografik analiz bulguları arasında farklılıklar oluşabilmektedir. Örneğin, *Aspergillus*'ların Hindistan cevizi bileşenlerine karşı yüksek hassasiyet göstermesi nedeniyle bu metodun her zaman güvenilir sonuçlar sağlamayacağı belirtilmektedir (Yazdani ve diğ., 2010). Faria ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada UV altında ışıma ve amonyum buharı testleri pozitif bulunan izolatların HPLC analizleri sonunda aflatoksin üretmedikleri tespit edilmiştir. Öte yandan bu testlere negatif yanıt veren bazı izolatların ise YES besi ortamında aflatoksin üretebildiği görülmüştür. Bu nedenle, aflatoksijenik suşların tespiti için besi ortamında yapılan gözlemlerin kromatografik yöntemlerle de doğrulanması gerekmektedir.

4.2.3.2 *Penicillium* türlerinin spesifik besi ortamlarında incelenmesi

Penicillium şüphelisi izolatların YES, CYA ve MEA besi ortamında alt ve üst görünüşleri incelenmiş; izolatların literatür bilgileriyle uyumlu gelişim gösterdikleri belirlenmiştir (Pitt ve Hocking, 2009). *P. verrucosum* ve *P. nordicum* gibi bazı *Penicillium* türlerinin koloni üzerinde gutasyon damlacıkları oluşturduğu ifade edilmektedir (Gareis ve Gareis, 2007). Yapılan incelemelerde KC2-2 ve KK5-C2 kodlu izolatların koloni merkezine yakın noktalarda gutasyon damlacıkları oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.18). Mikroskopik değerlendirmelerde KC2-2 kodlu izolat *Penicillium* olarak teşhis edilmiş olup bu izolatın *P. verrucosum* veya *P. nordicum* türlerinden birine ait olabileceği değerlendirilmiştir. Bunun dışında *Penicillium* şüphelisi izolatlarla ilgili daha fazla bilgi sağlayabilecek herhangi bir ayırıcı özellik tespit edilememiştir.

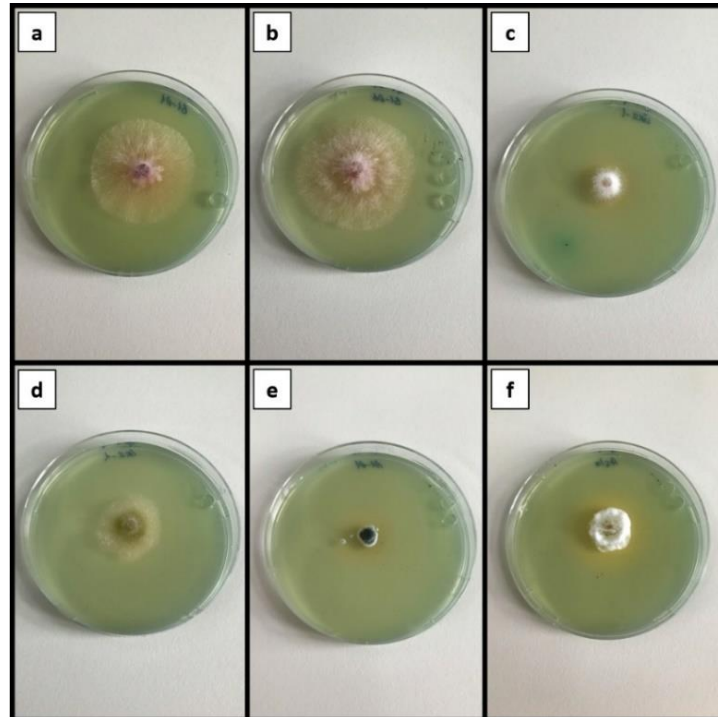


Şekil 4.18 : KC2-2 kodlu izolatın CYA besiyerinde oluşturduğu gutasyon damlacıkları

4.2.3.3 *Fusarium* türlerinin spesifik besi ortamlarında incelenmesi

Geçmiş çalışmalarda belli ölçüde malahit yeşili (2.5 ppm) içeren besi ortamının pek çok fungal türün gelişimini baskıladığı ancak *Fusarium* türlerinin sayısında önemli düzeyde bir değişikliğe yol açmadığı rapor edilmiştir (Castella ve diğ., 1997; Bragulat ve diğ., 2004). MGA besi ortamında geliştirilen *Fusarium* şüphelisi izolatlardan B1-D1 ve B1-D6 oldukça hızlı bir gelişim göstermiştir (Şekil 4.19). 72 saatlik inkübasyon sonunda bu izolatların çapı sırasıyla 44.7 ± 0.5 ve 51.2 ± 0.6 mm olarak ölçülmüştür. Diğer şüpheli izolatlardan IK2-1'de 25.7 ± 0.5 mm, UK2-1'de ise 18.5 ± 0.7 mm gelişim kaydedilmiştir. *Aspergillus* şüphelisi A1-D1 izolatı ise aynı koşullarda aynı besiyeri üzerinde sadece 9.5 ± 0.4 mm gelişme göstermiştir. B1-D1 ve B1-D6 izolatının merkez rengi kırmızı iken dış kenar rengi beyaz olarak not edilmiştir. UK2-1 izolatında ise koloni tümüyle beyaz renge sahiptir. IK2-1'de koloni merkez rengi açık yeşil, dış kenar rengi beyaz olarak belirlenmiştir.

CYA ortamında geliştirilen *Fusarium* şüphelisi izolatlar 5 günlük inkübasyon sonunda 50 mm'nin üzerinde koloni büyüklüğüne erişmişlerdir. Benzer morfolojideki *Acremonium* türlerinin CYA ortamındaki gelişme hızının bu değer altında kaldığı bilinmektedir (Pitt ve Hocking, 2009). Bu sayede *Fusarium* şüphelisi izolatlar arasında *Acremonium* türlerinin bulunmadığına dair kanıt elde edilmiştir.



Şekil 4.19 : Bazı küf kültürlerinin MGA besiyerinde gelişim görüntüleri. B1-D1 (a), B1-D6 (b), UK2-1 (c), IK2-1 (d), A1-D1 (e) izolatları ve MAM-200682 *A. flavus* kültürü (f).

4.2.4 Moleküler analiz sonuçları

4.2.4.1 ITS dizi sonuçlarının değerlendirilmesi

rDNA ITS1-ITS4 bölgelerinin dizi analiz sonuçlarına göre belirlenen izolat türleri ve bu izolatlara kaynaklık eden gıda örnekleri Çizelge 4.4'de verilmiştir. Buna göre daha önceki gözlemlerde *A. sc. Flavi* bölümü altında sınıflandırılmış 12 izolatın da *A. flavus* olduğu belirlenmiştir. Analiz sonucunda *A. sc. Nigri* bölümünde sınıflandırılmış tüm izolatların bu grubun üyesi olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca bu bölümde değerlendirilen izolatların büyük bir kısmını *A. niger*'in oluşturduğu ortaya konmuştur. İzolatlar arasında OTA üreticisi olan *A. carbonarius* ya da *A. ochraceus* türleri tespit edilmemiştir. Genel itibariyle, izolasyon çalışmalarında bu iki türe çok sık rastlanmadığı ifade edilmektedir (Pitt, 2000). Daha önce makroskobik özellikleri her ne kadar *Penicillium* türleri ile benzerlik gösterse de mikroskobik inceleme sonrası 4 izolatın *Aspergillus* türlerine ait olduğuna karar verilmişti. Dizi analizleri sonucunda bu 4 izolattan ikisinin *A. sydowii* (A1-D1 ve KK5-C2; *A. sc. Versicolor*) olduğu tespit edilmiştir. KC-2-4-2 kodlu örneğin *A. stellatus* (*A. sc. Nidulantes*); PBM4 kodlu örneğin ise *A. tamarii* (*A. sc. Flavi*) olduğu belirlenmiştir. PBM4 *A. tamarii* izolatının daha önceki AFPA testinde diğer *A. sc. Flavi* izolatlarıyla benzer taban rengi oluşturduğu hatırlanmalıdır.

Penicillium olarak sınıflandırılmış izolatlar arasında yalnızca KC2-D2 kodlu izolatın *Talaromyces* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Daha önceki mikroskobik değerlendirmelerde bu izolatın monovertisilat yapıda olduğu ve *Aspergilloides* bölümünde yer alabileceği değerlendirilmişti. Bu tür esasında bir *Penicillium* teleomorfı olup; *Penicillium*'lar ile yakından ilişkilidir (Pitt ve Hocking, 2009).

Geçmiş değerlendirmelerde B1-D1 ve B1-D6 izolatlarının *F. graminearum* ya da *F. culmorum* olabileceği düşünülmüştü. Moleküler tanımlama sonucunda her iki izolatın da *F. culmorum* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca besi ortamlarında nispeten yavaş gelişim kaydetmesine rağmen morfolojik özellikleri *Fusarium* cinsiyle benzer özellikler taşıyan UK2-1 kodlu izolat da *F. oxysporum* olarak tanımlanmıştır. Öte yandan, mikroskobik görüntüsünde yumaklaşma tespit edilen IK2-1 kodlu izolatın *Fusarium* spp. değil, *Chaetomium cochliodes* olduğu ortaya çıkmıştır. Genel itibariyle, makroskobik ve mikroskobik morfolojiye ilişkin yapılan gözlem ve değerlendirmelerin izolat cinslerinin tayininde oldukça isabetli olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.4 : Çalışmada elde edilen izolatların moleküler tanımlama sonuçları ve bu izolatlara kaynak teşkil eden gıda örnekleri.

Sıra no.	İzolat kodu	Belirlenen tür	Dizi uzunluğu	Sorgu (%)	Benzerlik oranı (%)	Erişim no.*	Kaynak gıda	Kaynak şehir/ülke
1	A1-2	<i>P. chrysogenum</i>	587	100	99.83	MT594471.1	Arpa	Konya
2	A1-5	<i>P. griseofulvum</i>	586	100	99.66	MN545450.1	Arpa	Konya
3	A1-D1	<i>A. sydowii</i>	555	100	99.28	MT534185.1	Arpa	Konya
4	B1-4-3	<i>P. rubens</i>	571	100	100	MT558923.1	Buğday	Antalya
5	B1-C1-3	<i>A. flavus</i>	587	100	100	MZ468131.1	Buğday	Antalya
6	B1-D1	<i>F. culmorum</i>	533	99	99.81	MT640271.1	Buğday	Antalya
7	B1-D6	<i>F. culmorum</i>	535	100	99.63	MT640271.1	Buğday	Antalya
8	B2-C1	<i>A. flavus</i>	504	100	100	MH345909.1	Buğday	Batman
9	IK1-1	<i>A. niger</i>	588	100	99.83	MT628904.1	İncir, kuru	Aydın
10	IK1-D1	<i>A. tubingensis</i>	601	100	100	MG991653.1	İncir, kuru	Aydın
11	IK2-1	<i>C. cochliodes</i>	550	100	100	MN534819.1	İncir, kuru	Aydın
12	IK3-D3	<i>A. flavus</i>	588	99	100	OW988621.1	İncir, kuru	Antalya
13	IK4-D1	<i>A. niger</i>	588	100	100	MK307680.1	İncir, kuru	Aydın
14	IK5-D2	<i>A. flavus</i>	568	99	99.82	MT635198.1	İncir, kuru	Aydın
15	IK5-D3	<i>A. flavus</i>	567	100	100	MT635198.1	İncir, kuru	Aydın
16	KC1-1	<i>A. niger</i>	601	100	100	ON845751.1	Kahve çek.	Antalya
17	KC1-D1	<i>A. niger</i>	593	100	100	MT628904.1	Kahve çek.	Antalya
18	KC2-2	<i>P. expansum</i>	491	100	100	MT582774.1	Kahve çek.	Brezilya
19	KC2-4-2	<i>A. stellatus</i>	553	98	99.82	MH857416.1	Kahve çek.	Brezilya
20	KC2-D1	<i>A. flavus</i>	503	100	100	OW988621.1	Kahve çek.	Brezilya
21	KC2-D2	<i>T. oumae-annae</i>	580	100	99.14	MT530189.1	Kahve çek.	Brezilya
22	KK3-D1	<i>A. luchuensis</i>	579	100	99.83	KY780508.1	Kayısı, kuru	Malatya
23	KK5-C2	<i>A. sydowii</i>	560	100	99.82	MT534185.1	Kayısı, kuru	Malatya
24	M3-D5-3	<i>A. flavus</i>	595	100	99.83	OW988621.1	Mısır	Antalya
25	PBM1	<i>A. niger</i>	595	99	100	MT628904.1	Pul biber	Şanlıurfa
26	PBM3	<i>A. piperis</i>	519	100	99.81	OL691168.1	Pul biber	Şanlıurfa
27	PBM4	<i>A. tamarii</i>	595	100	99.83	MT340979.1	Pul biber	Şanlıurfa
28	UK1-4-2	<i>A. niger</i>	593	100	100	MK307680.1	Üzüm, kuru	Malatya
29	UK1-5	<i>A. niger</i>	602	100	99.83	MF078659.1	Üzüm, kuru	Malatya
30	UK2-1	<i>F. oxysporum</i>	559	100	99.82	KF751873.1	Üzüm, kuru	Malatya
31	UK3-4	<i>A. niger</i>	593	100	100	MK307680.1	Üzüm, kuru	Malatya
32	UK3-5	<i>A. niger</i>	603	100	99.67	KM458840.1	Üzüm, kuru	Malatya
33	UK3-D1	<i>A. tubingensis</i>	479	100	99.79	OW988507.1	Üzüm, kuru	Malatya
34	YF1-C2	<i>A. niger</i>	507	100	99.80	MH752206.1	Yer fıstığı	Antalya
35	YF1-D1	<i>P. citrinum</i>	585	94	99.82	MT597829.1	Yer fıstığı	Antalya
36	YF2-C1	<i>P. citrinum</i>	555	100	99.82	MT597829.1	Yer fıstığı	Osmaniye
37	YF3-D1	<i>A. niger</i>	518	100	99.61	ON845751.1	Yer fıstığı	Osmaniye
38	YF3-D2	<i>P. citrinum</i>	546	99	99.82	MT597829.1	Yer fıstığı	Osmaniye
39	YF3-D8	<i>P. aurantiogriseum</i>	587	100	100	MG228409.1	Yer fıstığı	Osmaniye
40	YF3-D2-1	<i>A. flavus</i>	524	100	100	LN482516.1	Yer fıstığı	Osmaniye
41	YF3-S1	<i>A. flavus</i>	565	100	100	OW982345.1	Yer fıstığı	Osmaniye
42	YF3-S2	<i>A. flavus</i>	597	100	99.50	OW988621.1	Yer fıstığı	Osmaniye
43	YF3-S3	<i>A. flavus</i>	502	100	100	MT530016.1	Yer fıstığı	Osmaniye
44	YF3-S4	<i>A. flavus</i>	515	100	100	MT447477.1	Yer fıstığı	Osmaniye

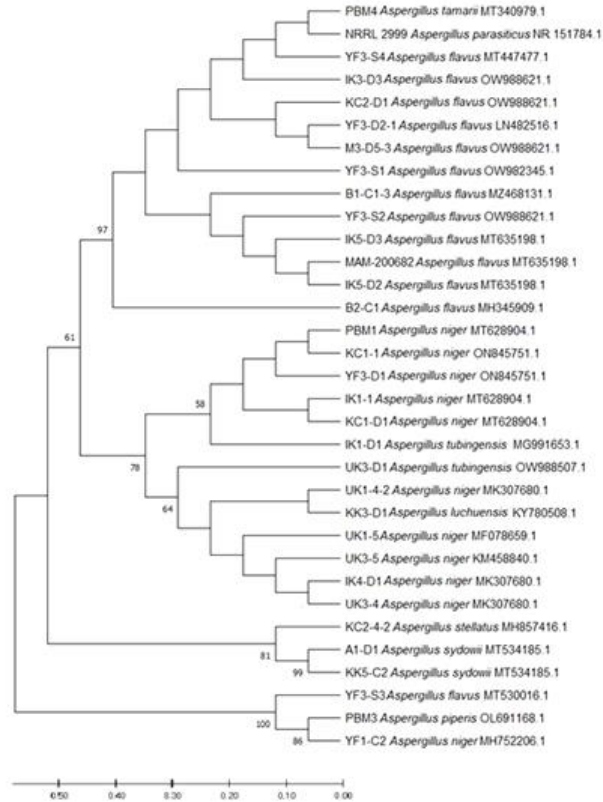
* NCBI veritabanına kayıtlı en yakın türe ait erişim numarası.

4.2.4.2 İzolatların filogenetik ilişkisi

Çalışmada çok sayıda ve farklı türlere mensup izolatlar elde edilmiştir. Bunlar arasındaki genetik yakınlık ve akrabalık düzeylerinin belirlenmesi için ayrı filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Ayrıca evrimsel bağlantı düzeyinin gösterilmesi açısından referans kültürler de ağaçlandırmaya dahil edilmiştir. Bootstrap destek değerleri güçlü

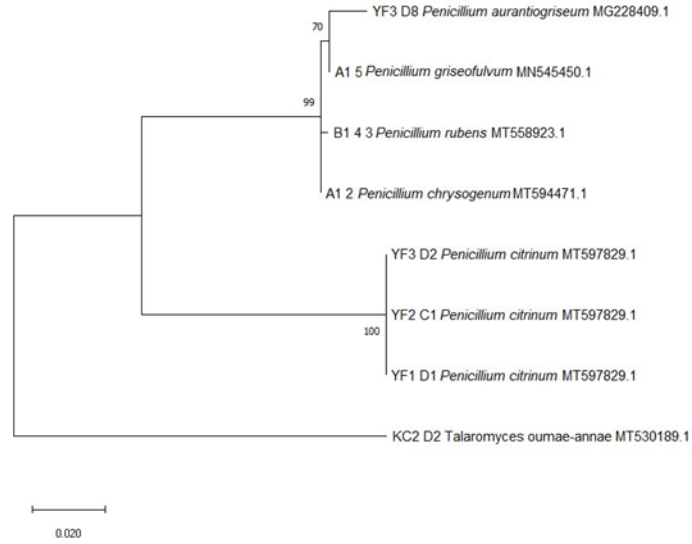
(≥ 85), orta (%70-84), zayıf (%50-69) ve çok az (<%50) şeklinde kategorize edilmiştir (Kress ve diğ., 2005). %50 ve üzeri bağlantılı gruplarda bootstrap değeri dendogram dalları üzerinde gösterilmiştir.

Dendogram incelendiğinde PBM4 *A. tamarii* izolatu ve NRRL 2999 *A. parasiticus* standart kültürünün genetik açıdan birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.20). NRRL 2999 *A. parasiticus*'un dört farklı aflatoxin çeşidini ürettiği bilinirken (Tanuja ve diğ., 2010); *A. tamarii* ise *A. sc. Flavi* içerisinde yer alan atoksijenik suşlardan biridir (Ezekiel ve diğ., 2014). Aflatoxin B₁ ve B₂ üreticisi olan MAM-200682 *A. flavus* referans kültürüne en yakın izolatların sırasıyla İK5-D2 ve İK5-D3 olduğu ve aralarında güçlü bir ilişki olduğu görülmektedir. Bunun dışında YF3-S3 kodlu izolat genetik yakınlık bakımından diğer *A. flavus* izolatlarından ayrılmıştır. YF1-Ç2 *A. niger* izolatının PBM3 *A. piperis* izolatu ile oldukça güçlü bir bağa sahip olduğu ancak diğer *A. sc. Nigri* üyeleri ile kıyaslandığında farklı bir atadan türediği (clade) görülmektedir. Ayrıca "Diğer *A. sc.*" olarak sınıflandırılan 4 izolattan ikisi (A1-D1 ve KK5-C2) arasında oldukça güçlü bir yakınlık ilişkisi bulunduğu tespit edilmiştir.



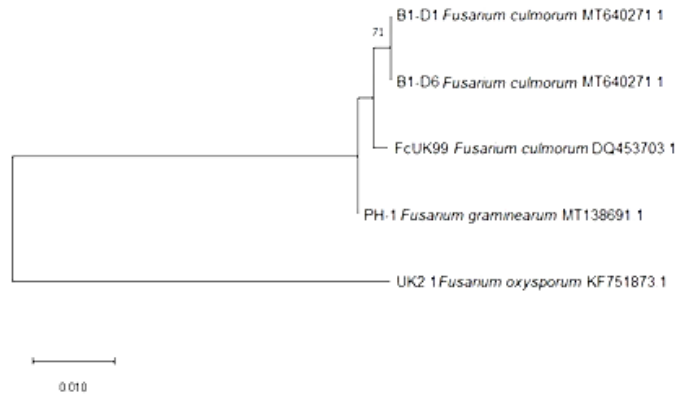
Şekil 4.20 : *Aspergillus* referans kültürleri ve izolatlarının rDNA ITS bölgeleri baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.

Çalışmada yer fıstığı örneklerinden elde edilen *P. citrinum* izolatlarının üçünün de aynı atadan geldiği ancak diğer *Penicillium* izolatları ile çok az bir akrabalık bağına sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21). KC2-D2 *Talaromyces oumae-annae* izolatının ise diğer *Penicillium* kümelerinden oldukça uzak olduğu görülmektedir.



Şekil 4.21 : *Penicillium* izolatlarının rDNA ITS bölgeleri baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.

B1-D1 ve B1-D6 kodlu küf örnekleri aynı buğday kitlesinden izole edilmiştir. Genetik ilişki bakımından da birbirlerine oldukça yakın oldukları belirlenmiş ve aynı ortak atadan türedikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Ayrıca referans kültür FcUK99 *F. culmorum* ile de yakından ilişkili oldukları bulunmuştur. UK2-1 *F. oxysporum* ise gerek referans kültürler gerekse *Fusarium* izolatlarıyla kıyaslandığında ağaçlandırmada bir dış grup olarak yer almıştır.



Şekil 4.22 : *Fusarium* referans kültürleri ve izolatlarının rDNA ITS bölgeleri baz alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.

4.3 Metot Performans Kriterleri

Mikotoksin analizlerinde kullanılacak metotların bazı asgari yeterlilikleri karşılaması gerekmektedir (EC, 2006b; TGK, 2018). Bu nedenle üretim denemelerine geçilmeden önce kullanılacak metotların geçerli kılınmasına yönelik validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Uygulanacak metotlar doğrusallık, tespit ve ölçüm limiti, doğruluk, geri kazanım, tekrar edilebilirlik ve kesinlik değerleri açısından test edilmiştir.

4.3.1 Aflatoksin metot validasyonu

Aflatoksijenik izolatların tespitinde ölçüm hassasiyetini arttırmak için Kobracell ile türevlendirme yapılırken; optimizasyon ve üretim aşamalarında yüksek aflatoksin oluşumu nedeniyle türevlendirmeye ihtiyaç duyulmamıştır. Bu nedenle her iki metot için de ayrı ayrı validasyon çalışması yürütülmüştür. Aflatoksin miktar tayininde seri dilüsyonlar kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden faydalanılmıştır. Türevlendirme uygulanan metotta dilüsyonlar AFB₁ ve AFG₁ için 0.6-20 ng/mL arasında; AFB₂ ve AFG₂ için 0.15-5 ng/mL arasında hazırlanmıştır (Şekil A.1). Diğer metot da ise AFB₁ ve AFG₁ için 2-100 ng/mL; AFB₂ ve AFG₂ içinse 0.5-25 ng/mL arası değişen konsantrasyonlar kullanılmıştır (Şekil A.2). Ardışık üç gün boyunca yapılan analizlerde gün içi ve günler arası R² değerlerinin >0.99 olduğu ve elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 : Aflatoksin analizlerinde kullanılan kalibrasyon grafiklerine ait R² değerleri.

	Gün	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Türevlendirmeli metot	Gün 1	0.9975	0.9978	0.9988	0.9996
	Gün 2	0.9987	0.9991	0.9991	0.9991
	Gün 3	0.9997	0.9999	0.9999	0.9999
Türevlendirmesiz metot	Gün 1	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998
	Gün 2	0.9993	0.9994	0.9988	0.9995
	Gün 3	0.9965	0.9968	0.9951	0.9969

Toksinlerin besiyerinden geri kazanım oranlarının belirlenmesi için her mikotoksin üç farklı konsantrasyon değerinde besiyerine eklenmiştir. Yapılan denemelerde en düşük geri kazanım oranı %71.3 iken; en yüksek geri kazanım %109.1 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği mevzuatları baz alındığında uygulanan bulaş konsantrasyonlarında yeterli geri kazanım oranının sağlandığı belirlenmiştir (EC, 2006b; TGK, 2018).

Çizelge 4.6 : Farklı bulaş seviyelerinde aflatoksinlerin geri kazanım oranları.

Parametreler	Türevlendirmeli metot				Türevlendirmesiz metot			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
İlave edilen (ng/mL)	0.40	0.30	0.40	0.30	2.00	0.50	2.00	0.50
Tespit edilen (ng/mL)	0.31	0.26	0.38	0.26	1.70	0.42	1.68	0.36
Düşük GKO (%)*	77.5	85.9	94.8	86.6	84.8	82.7	83.9	71.3
TGK - GKO (%)**	50-120	50-120	50-120	50-120	70-110	50-120	70-110	50-120
EC - GKO (%)***	50-120	50-120	50-120	50-120	70-110	50-120	70-110	50-120
RSD _r (%)****	10.9	4.0	4.8	2.0	13.1	10.9	15.8	13.9
Orta İlave edilen (ng/mL)	2.00	0.50	2.00	0.50	20.00	5.00	20.00	5.00
Tespit edilen (ng/mL)	1.69	0.41	1.68	0.51	21.49	4.89	21.83	4.81
GKO (%)	84.6	81.7	83.9	101.5	107.5	97.9	109.1	96.0
TGK - GKO (%)	70-110	50-120	70-110	50-120	80-110	80-110	80-110	80-110
EC - GKO (%)	70-110	50-120	70-110	50-120	80-110	80-110	80-110	80-110
RSD _r (%)	6.9	5.7	4.2	6.1	3.3	4.3	2.6	3.4
Yüksek İlave edilen (ng/mL)	6.00	1.50	6.00	1.50	50.00	12.50	50.00	12.50
Tespit edilen (ng/mL)	4.93	1.28	5.08	1.39	46.13	10.26	47.21	10.27
GKO (%)	82.2	85.4	84.7	92.8	92.3	82.1	94.4	82.1
TGK - GKO (%)	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110
EC - GKO (%)	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110	80-110
RSD _r (%)	4.5	4.8	2.8	11.7	2.5	2.9	13.6	3.1

* GKO, Geri kazanım oranı.

** TGK, Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 2018/10.

*** EC, Avrupa Komisyonu, Komisyon Düzenlemesi No 401/2006.

**** RSD_r, Tekrar edilebilirlik bağıl standart sapması.

Tespit ve ölçüm sınırları, uygulanan en düşük bulaş seviyelerine göre belirlenmiştir. Türevlendirmeye AFB₁ ve AFG₁'in sinyal gücü önemli ölçüde arttırılmıştır. Bu sayede türevlendirme uygulanmayan metoda göre daha düşük tespit ve ölçüm limiti elde edilebilmiştir (Çizelge 4.7). Özellikle hangi izolat/izolatların aflatoksin üreticisi olduğunun belirlenmesinde türevlendirmeli metot kullanımının daha hassas sonuçlar sağlayacağı değerlendirilmektedir. Ancak türevlendirme işlemi sırasında aflatoksin yapısına bromid bağlandığı için hedef maddenin kimyasal yapısı da değişmektedir. Çalışmanın amacı bazı mikotoksinlerin yüksek saflıkta eldesini gerektirdiğinden optimizasyon ve üretim aşamalarında türevlendirmesiz metot kullanımı tercih edilmiştir.

Çizelge 4.7 : Aflatoksin tespit (LOD) ve ölçüm (LOQ) sınır değerleri.

Parametre	Türevlendirmeli metot				Türevlendirmesiz metot			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
İlave edilen (ng/mL)	0.40	0.30	0.40	0.30	2.00	0.50	2.00	0.50
Tespit limiti (ng/mL)	0.10	0.03	0.05	0.02	0.35	0.07	0.21	0.09
Ölçüm limiti (ng/mL)	0.34	0.10	0.18	0.05	1.16	0.23	0.71	0.31

4.3.2 Okratoksin A metot validasyonu

Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulmasında 0.25-50.0 ng/mL aralığında hazırlanmış OTA standart çözeltileri kullanılmıştır (Şekil A.3). Üç gün boyunca yapılan ölçümler sonucunda R^2 değerleri sırasıyla 0.9999, 0.9996, 0.9997 olarak belirlenmiştir. Buna göre elde edilen grafiklerin lineer olduğu sonucuna varılmıştır. OTA bulaştırılmış steril besi ortamlarından elde edilen geri kazanım oranları Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Komisyonu mevzuatları ile uyumlu bulunmuştur (Çizelge 4.8) (EC, 2006; TGK, 2018). Tespit ve ölçüm sınırlarının belirlenmesi için besiyerine 1.5 ng/mL düzeyinde OTA standardı bulaştırılmış; ve bu limitler sırasıyla 0.3 ng/mL ve 1.1 ng/mL olarak belirlenmiştir.

4.3.3 Deoksinivalenol metot validasyonu

Metot kalibrasyonu için 50-1000 ng/mL aralığında DON standart çözeltileri kullanılmıştır (Şekil A.4). Elde edilen her bir kalibrasyon grafiğinin R^2 değeri 0.99'un üzerinde (0.9989, 0.9998 ve 0.9997) bulunmuş ve grafiklerin doğrusal olduğuna karar verilmiştir. Mikotoksinin besiyerinden geri kazanım oranları ise %86.0 ve %107.6 arasında değişmektedir (Çizelge 4.8). Elde edilen sonuçların TGK ve Avrupa Komisyonu talimatlarına uygun olduğu belirlenmiştir (EC, 2006; TGK, 2018). Tespit ve ölçüm sınırlarının belirlenmesinde besiyerine 50 ng/mL düzeyinde DON standardı bulaştırılmış; tespit limiti 12.2 ng/mL, ölçüm limiti ise 40.7 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

4.3.4 Zearalenon metot validasyonu

ZEA kalibrasyon grafikleri 2.5-500 ng/mL arasında hazırlanan standart çözeltileri kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil A.5). Gün içi ve günler arası elde edilen kalibrasyon grafiklerinin (R^2 : 0.9992, 0.9997 ve 0.9997) doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, ZEA bulaştırılan besiyerlerinden elde edilen geri kazanım oranlarının TGK ve Avrupa Komisyonunun ilgili kriterlerini karşıladığı belirlenmiştir (Çizelge 4.8) (EC, 2006; TGK, 2018). Tespit ve ölçüm limitlerinin belirlenmesinde besi ortamına 20 ng/mL düzeyinde ZEA ilave edilmiştir. Analiz metodunun tespit limiti 2.4 ng/mL, ölçüm limiti de 8.1 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8 : OTA, DON ve ZEA mikotoksinleri için belirlenen geri kazanım oranları.

		OTA	DON	ZEA
Düşük	İlave edilen (ng/mL)	1.50	50.00	20.00
	Tespit edilen (ng/mL)	1.05	49.2	19.52
	Geri kazanım oranı (GKO) (%)	70.1	98.5	97.6
	TGK - GKO (%) [*]	70-110	- ****	60-120
	EC - GKO (%) ^{**}	70-110	-	60-120
	RSD _r (%) ^{***}	6.4	6.1	5.5
	TGK - RSD _r (%)	≤20	-	≤40
	EC - RSD _r (%)	≤20	-	≤40
Orta	İlave edilen (ng/mL)	7.50	150.00	50.00
	Tespit edilen (ng/mL)	5.77	128.99	51.38
	Geri kazanım oranı (GKO) (%)	77.0	86.0	102.8
	TGK - GKO (%)	70-110	60-110	60-120
	EC - GKO (%)	70-110	60-110	60-120
	RSD _r (%)	4.6	6.3	8.3
	TGK - RSD _r (%)	≤20	≤20	≤40
	EC - RSD _r (%)	≤20	≤20	≤40
Yüksek	İlave edilen (ng/mL)	15.00	250.00	100.00
	Tespit edilen (ng/mL)	13.96	269.1	109.46
	Geri kazanım oranı (GKO) (%)	93.0	107.6	109.5
	TGK [*] - GKO ^{***} (%)	70-110	60-110	70-120
	EC ^{**} - GKO (%)	70-110	60-110	70-120
	RSD _r ^{***} (%)	2.5	4.1	2.5
	TGK - RSD _r (%)	≤20	≤20	≤25
	EC - RSD _r (%)	≤20	≤20	≤25

* TGK, Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 2018/10.

** EC, Avrupa Komisyonu, Komisyon Düzenlemesi No 401/2006.

*** RSD_r, Tekrar edilebilirlik bağlı standart sapması.

**** TGK ve EC mevzuatlarında ≤100 µg/kg düzeyindeki DON bulaşı için GKO ve RSD_r değerlerine ilişkin bir limit belirtilmemiştir.

4.4 Mikotoksijenik İzolatların Tespiti

4.4.1 Aflatoksijenik izolatların belirlenmesi

Aflatoksin üretimi yapan en önemli küf türleri olarak *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* kabul edilmektedir. *A. flavus* gıdalarda oldukça yaygın bulunurken *A. nomius* türleri ile nadiren karşılaşılmaktadır (Copetti ve diğ., 2011). Daha önceki araştırmalarda *A. flavus*'ların tümünün aflatoksijenik olmadığı; sadece bir bölümünün aflatoksin ürettiği vurgulanmaktadır (Rodrigues ve diğ., 2012). Bu nedenle, belirli koşullar altında erlen üretimleri yapılarak hangi izolatların aflatoksijenik olduğu ve yüksek kapasiteyle aflatoksin üretimi sağlayabileceği belirlenmeye çalışılmıştır.

Aflatoksin üreticisi olabileceği değerlendirilen 12 *A. flavus* izolatı 25 °C'de 10 gün boyunca geliştirilmiştir. Ayrıca, pozitif kontrol amacıyla MAM-200682 *A. flavus* ve NRRL 2999 *A. parasiticus* referans kültürleri de aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri ortamında tespit edilen aflatoksin miktarları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Belirtilen koşullarda MAM-200682 *A. flavus* kültürü yalnızca B tipi aflatoksinleri

üretirken; NRRL 2999 *A. parasiticus* referans kültürünün 4 tip aflatoksinini birlikte ürettiği belirlenmiştir. Buna göre kullanılan besi ortamı ve koşulların aflatoksin üretimini desteklediği sonucuna varılmıştır. 12 izolat ile yürütülen denemelerde 6 besi ortamında ölçüm seviyesinin üzerinde AFB₁ tespit edilirken; yalnızca iki besi ortamında AFB₂ varlığına rastlanılmıştır. *A. flavus* izolatlarının hiçbirinde G tipi aflatoksin üretimi tespit edilememiştir. Geçmiş çalışmalarda da *A. flavus* türlerinin yalnızca B tipi aflatoksinleri üretebildiği; buna karşın *A. parasiticus* türlerinin hem B hem de G tipi aflatoksinleri üretebildiği ifade edilmektedir (Rodrigues ve diğ., 2012). *A. flavus* izolatları arasında en yüksek aflatoksin üretimini IK5-D2 ve IK5-D3 izolatları sağlamıştır. Bu iki izolatın AFB₁ üretim miktarları ile diğer izolatların üretimi arasında anlamlı düzeyde ($P<0.05$) fark olduğu bulunmuştur. Bu iki izolatın aynı besi ortamı içerisinde eşzamanlı olarak AFB₁ ve AFB₂ üretimi gerçekleştirebildiği belirlenmiştir. Özellikle aflatoksijenik MAM-200682 kültürü ile IK5-D2 izolatının AFB₁ üretimleri birbirine oldukça yakın olup aradaki fark önemsiz ($P \geq 0.05$) seviyededir.

Çizelge 4.9 : Gelişim ortamında tespit edilen aflatoksin miktarları.

No	İzolat	Tür	Aflatoksin miktarı (ng/mL)			
			AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
1	B1-C1-3	<i>A. flavus</i>	1.0±0.1 ^a	T.E. ^{***}	T.E.	T.E.
2	B2-C1	<i>A. flavus</i>	5.1±0.5 ^a	T.E.	T.E.	T.E.
3	IK3-D3	<i>A. flavus</i>	<LOQ ^{**}	T.E.	T.E.	T.E.
4	IK5-D2	<i>A. flavus</i>	3502.4±362.8 ^b	57.1±4.9 ^a	T.E.	T.E.
5	IK5-D3	<i>A. flavus</i>	2443.1±247.4 ^c	41.0±3.7 ^a	T.E.	T.E.
6	KC2-D1	<i>A. flavus</i>	10.6±1.0 ^a	T.E.	T.E.	T.E.
7	M3-D5-3	<i>A. flavus</i>	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
8	YF3-S1	<i>A. flavus</i>	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
9	YF3-S2	<i>A. flavus</i>	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
10	YF3-S3	<i>A. flavus</i>	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
11	YF3-S4	<i>A. flavus</i>	2.00±0.2 ^a	T.E.	T.E.	T.E.
12	YF3-D2-1	<i>A. flavus</i>	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Rf.*	MAM-200682	<i>A. flavus</i>	3953.6±402.4 ^b	270.0±39.9 ^b	T.E.	T.E.
Rf.	NRRL 2999	<i>A. parasiticus</i>	33799.8±4358.0	3049.5±391.2	21831.0±3085.2	1385.7±181.6

* Rf., referans *Aspergillus* kültürleri.

** <LOQ, ölçüm limitinin altında.

*** T.E., tespit edilemedi.

**** İstatistiksel harflendirme, aynı sütun altında verilmiş *A. flavus* kültürlerine ait sonuçları kapsamaktadır.

IK5-D2 ve IK5-D3 suşları aynı gıda numunesinden izole edilmişlerdir. Daha önceki filogenetik değerlendirmelerde de iki izolat arasındaki akrabalık ilişkisinin kuvvetli olduğu vurgulanmıştır. Bunun yanı sıra, IK5-D2 izolatı ile MAM-200682 *A. flavus* kültürünün aynı atadan türemiş olması da önemli noktalardan bir tanesidir. En yüksek aflatoksin üretimini sağlama, izolatlar arasında (IK5-D3 hariç) başka yüksek seviye aflatoksin üreticisinin

bulunmaması nedeniyle aflatoksin üretim denemelerinde IK5-D2 kodlu *A. flavus* izolatının kullanılması kararlaştırılmıştır.

4.4.2 Okratoksijenik izolatların tespiti

Aspergillus ve *Penicillium*'a ait bazı türler belirli çevresel koşullarda OTA üretebilirken; bunlardan pek azı gıdalarda OTA kontaminasyonuna neden olmaktadır (Cabañes ve diğ., 2010). Gıdalarda OTA üretiminden sorumlu en önemli türlerin başında *A. carbonarius* gelmektedir. *A. carbonarius*'un hemen hemen tüm suşları yüksek miktarlarda OTA üretimi yapabilmektedir (Kizis ve diğ., 2014). Ancak çalışmada elde edilen izolatlar arasında *A. carbonarius* suşuna rastlanmamıştır. Diğer siyah *Aspergilli* türlerine kıyasla *A. carbonarius*'un doğada daha nadir bulunduğu ve izolasyon çalışmalarında bu türe çok sık rastlanmadığı bildirilmektedir (Pitt, 2000; Noonim ve diğ., 2008; Farbo ve diğ., 2014; Kizis ve diğ., 2014). OTA üreticisi olarak bilinen diğer başlıca *Aspergillus* türleri arasında *A. ochraceus*, *A. niger* ve *A. tubingensis* yer almaktadır (Ostry ve diğ., 2013). Ancak *A. ochraceus* türü içerisinde yüksek OTA üretimi sağlayan suş sayısının az olduğu ifade edilmektedir (Geremew ve diğ., 2016). Bu nedenle literatürde *A. ochraceus* ve bağlantılı olduğu türlerin OTA üretimi üzerinde çok fazla durulmamıştır (Ostry ve diğ., 2013). *Penicillium* cinsi içerisinde OTA üretimiyle öne çıkan türler ise *P. verrucosum*, *P. viridicatum* ve *P. nordicum*'dur (Cabañes ve diğ., 2010). Son olarak Zhang ve diğ. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada bazı *P. rubens* ve *Talaromyces* spp. suşlarının da OTA üretebildiği rapor edilmiştir.

Elde edilen izolatlar arasında OTA üretme ihtimali bulunan 15 küf suşu (11 adet *A. niger*, 2 adet *A. tubingensis*, 1 adet *P. rubens* ve 1 adet *T. oumae-annae*) belirlenmiştir. Yapılan incelemede, yalnızca YF1-C2 kodlu *A. niger* izolatın bulunduğu besi ortamında OTA izine rastlanmış ancak elde edilen miktarın tespit limitinin altında (<LOD) kaldığı belirlenmiştir. Magnoli ve diğ. (2006) YES besiyerinde kullanılarak yapılan bir çalışmada 112 adet *A. niger* izolatından sadece iki tanesinin 20 ng/mL'nin üzerinde OTA üretimi yapabildiğini belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada ise 571 adet *A. niger* izolatı arasında OTA üreticisi olanların oranı yalnızca %4 olarak belirlenmiştir (Serra ve diğ., 2005). Dolayısıyla, *A. niger* türleri arasında OTA üreticisi suşlara çok fazla rastlanılmadığı değerlendirilmektedir. Çalışmada OTA üreticisi bir izolat elde edilememesi nedeniyle bu mikotoksinin üretimi araştırma kapsamından çıkartılmıştır.

4.4.3 Deoksinivalenol ve zearalenon üreticisi izolatların tespiti

Bazı *F. culmorum* türleri hem DON hem de ZEA mikotoksinlerini birlikte üretebilirken (Kokkonen ve diğ., 2010); *F. oxysporum* türleri sadece ZEA üretimi yapabilmektedir (Beev ve diğ., 2013). Bu nedenle ZEA üretim denemelerinde *F. culmorum* (B1-D1 ve B1-D6) ve *F. oxysporum* (UK2-1) izolatları kullanılırken; DON üretim denemelerinde yalnızca *F. oxysporum* (UK2-1) izolatları kullanılmıştır.

14 günlük inkübasyon sonunda B1-D1 ve B1-D6 *F. culmorum* izolatlarının DON üretimi yapmadığı tespit edilmiştir. Ancak aynı koşullarda gerçekleştirilen pozitif kontrol denemesinde PH-1 *F. graminearum* referans kültürünün 4224.4 ± 61.9 ng/mL düzeyinde DON ürettiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, ortam koşulları toksin üretimi için uygun olduğu ancak bu iki izolatın DON üreticisi olmadığına karar verilmiştir. Yapılan izolasyon çalışmalarında başka toksijenik izolat elde edilemediğinden DON üretimi çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

ZEA üretim denemeleri, DON denemesiyle aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. B1-D1 ve B1-D6 *F. culmorum* izolatları ile UK2-1 *F. oxysporum* izolatının kullanıldığı çalışmada her üç izolatın da ZEA üretebildiği belirlenmiştir. En yüksek ZEA üretimini 2556.0 ± 56.2 ng/mL ile B1-D1 izolatı sağlarken; B1-D6 ve UK2-1 izolatlarından sırasıyla 1311.6 ± 32.6 ng/mL ve 85.8 ± 1.6 ng/mL ZEA verimi elde edilmiştir. Ayrıca FcUK99 *F. culmorum* referans kültürünün kullanıldığı besi ortamında ZEA miktarı 95.8 ± 4.2 ng/mL iken; PH-1 *F. graminearum*'un kullanıldığı besi ortamında ise 87.1 ± 5.8 ng/mL olarak hesaplanmıştır. B1-D1 ve B1-D6 izolatlarının ZEA üretim miktarlarıyla diğer küf örneklerinden elde edilen üretimler arasında önemli seviyede ($P < 0.05$) fark olduğu tespit edilmiştir. Filogenetik analizde, aynı gıda örneğinden izole edilen bu iki izolatın aynı ortak atadan geldiği tespit edilmişti. Bu nedenle, ZEA üretim çalışmasında daha yüksek üretim performansı göstermesi nedeniyle B1-D1 *F. culmorum* izolatının kullanılması kararlaştırılmıştır.

4.5 Mikotoksin Üretiminin Optimizasyonu

4.5.1 Aflatoksin üretiminin optimizasyonu

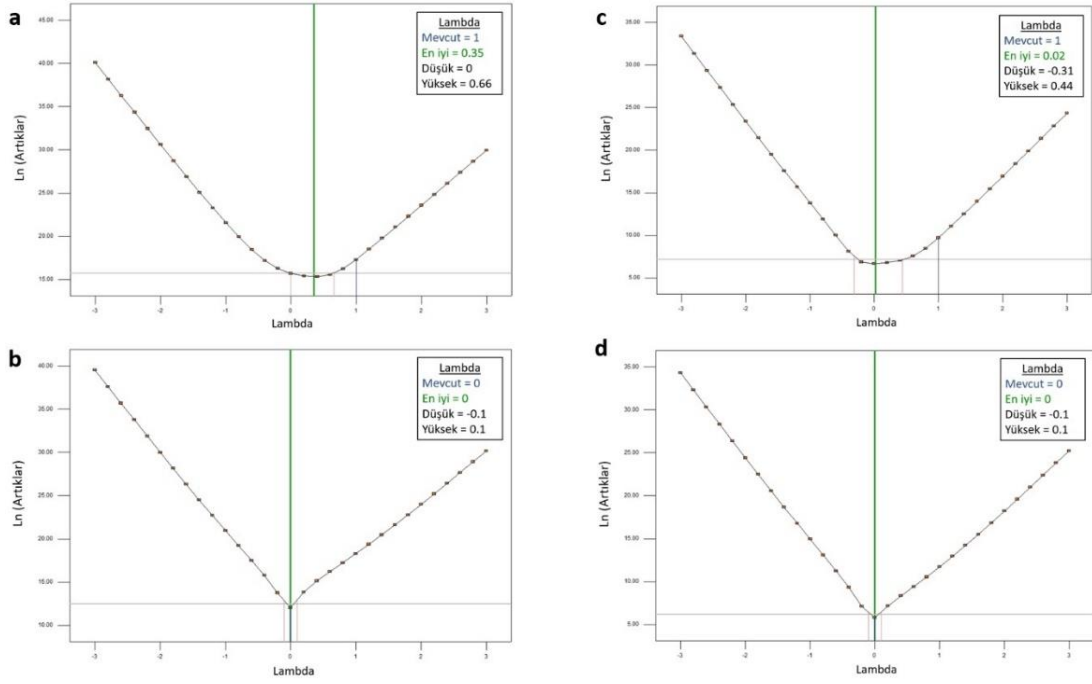
pH, sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisini incelemek üzere 17 deneme ünitesinden oluşan Box-Behnken dizaynı oluşturulmuştur. Bu dizayna göre farklı gelişim koşulları altında elde edilen aflatoksin miktarları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10 : Yanıt yüzey yönteminde üç bağımsız değişken esas alınarak hazırlanan deneysel tasarım ve elde edilen aflatoksin miktarları.

No.	X_1	X_2	X_3	Mikotoksin	
	pH	Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	AFB ₁ (ng/mL)	AFB ₂ (ng/mL)
1	-1 (4)	-1 (22)	0 (10)	1052.72 ± 109.78	71.32 ± 6.20
2	+1 (8)	-1 (22)	0 (10)	7989.58 ± 869.20	539.48 ± 61.08
3	-1 (4)	+1 (34)	0 (10)	7.04 ± 0.80	< LOD*
4	+1 (8)	+1 (34)	0 (10)	71.25 ± 5.99	0.79 ± 0.05
5	-1 (4)	0 (28)	-1 (5)	24.56 ± 1.10	0.87 ± 0.06
6	+1 (8)	0 (28)	-1 (5)	494.43 ± 30.36	13.02 ± 1.04
7	-1 (4)	0 (28)	+1 (15)	605.50 ± 4 3.7	6.28 ± 0.57
8	+1 (8)	0 (28)	+1 (15)	15952.70 ± 2302.22	283.29 ± 30.06
9	0 (6)	-1 (22)	-1 (5)	178.24 ± 23.00	7.57 ± 0.84
10	0 (6)	+1 (34)	-1 (5)	3.01 ± 0.38	< LOD
11	0 (6)	-1 (22)	+1 (15)	7564.6 ± 827.20	325.34 ± 33.02
12	0 (6)	+1 (34)	+1 (15)	32.76 ± 3.02	0.60 ± 0.07
13	0 (6)	0 (28)	0 (10)	3117.83 ± 323.93	50.44 ± 4.10
14	0 (6)	0 (28)	0 (10)	3234.10 ± 329.84	51.38 ± 6.65
15	0 (6)	0 (28)	0 (10)	2183.82 ± 308.20	36.65 ± 2.94
16	0 (6)	0 (28)	0 (10)	2368.27 ± 198.55	30.57 ± 2.92
17	0 (6)	0 (28)	0 (10)	2601.81 ± 227.25	64.85 ± 5.93

* LOD, tespit limitinin altındadır.

Çevresel faktörler AFB₁ ve AFB₂ üretimini farklı düzeylerde etkileyebileceğinden her iki mikotoksinin besiyerindeki miktarları ayrı ayrı değerlendirmeye tabi tutulmuştur. AFB₁ ve AFB₂ üretimlerinin modellenmesinde lineer, iki faktör etkileşimli, kuadratik ve kübik model kullanım imkanları incelenmiştir. Box-Behnken tasarımı küçük bir deneme dizaynı kullanılmasıyla ötürü kübik modelin prosesi ifade etmede uygun bir seçim olmadığı belirlenmiştir. İstatistik çalışmalarında yüksek R² değeri uygun model seçiminde önemli bir parametredir (Chabra ve diğ., 2020). Diğer iki modele kıyasla daha yüksek R² değerleri vermesi nedeniyle aflatoksin üretim prosesi için kuadratik model uygun görülmüştür. Box-Cox grafikleri incelendiğinde elde edilen sonuçların asimetric bir dağılım gösterdiği ve modele dönüşüm uygulanması gerektiği tespit edilmiştir (Şekil 4.23). $\lambda=0$ olarak tespit edildiğinde modele logaritmik dönüşüm uygulanması önerilmektedir (Grieco ve diğ., 2012; Vohra ve Labaran, 2020). Bu nedenle her iki modele de doğal logaritmik dönüşüm uygulanmış ve dönüşüm sonrasında R² değerlerinin yükseldiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.23 : Aflatoksin üretim modellerine ilişkin Box-Cox grafikleri. AFB₁ üretim modelinde kuvvet dönüşümü öncesi (a) ve sonrası (b); AFB₂ üretim modelinde kuvvet dönüşümü öncesi (c) ve sonrası (d).

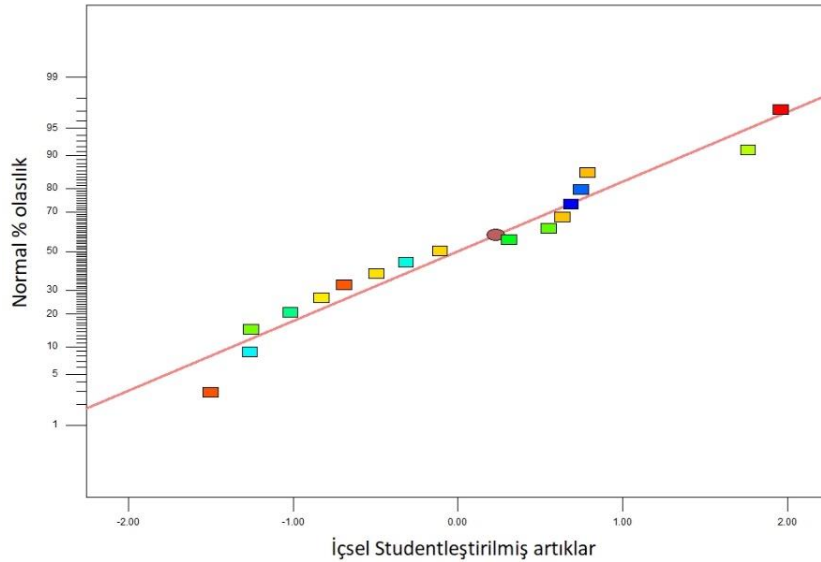
4.5.1.1 Aflatoksin B₁ üretimi üzerine istatistiksel değerlendirmeler

Optimizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. F-değeri 206.85 olarak hesaplanmış ve modelin anlamlı olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçların gürültüye bağlı olarak tesadüfen bu büyüklükte olmaları %0.01'den düşük ("Prob>F" değeri <0.0001) bir ihtimaldir. Buna göre ortaya konan modelin prosesi açıklamada önemli olduğuna karar verilmiştir. Uyumsuzluk değeri (lack-of-fit) model yeterliliğinin tespitinde dikkate alınması gereken bir çıktıdır. Uyumsuzluk değerinin standart hataya kıyasla önemsiz olması, modele dayalı yapılacak tahminlerin yeterli doğrulukta olacağını gösteren bir etmendir (Yuan ve diğ., 2019; Chabra ve diğ., 2020). AFB₁ üretimine ilişkin modelin uyumsuzluk değeri önemsiz bulunmuştur (Şekil B1.a).

Matematiksel modellemelerde R^2 değeri 1'e ne kadar yakın olursa modelin de prosesi açıklamada o denli başarılı olacağı ifade edilmektedir (Kwatia ve diğ., 2017; Chabra ve diğ., 2020). Bilhassa, düzeltilmiş R^2 değerinin 0.80'in üzerinde olması modelin iyi çalıştığının bir göstergesidir (Yang ve diğ., 2020). Optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen R^2 değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. R^2 , düzeltilmiş R^2 ve tahmin R^2 'si sırasıyla 0.9938, 0.9890 ve 0.9756 olarak hesaplanmıştır. Düzeltilmiş R^2 ve

tahmin R^2 'si arasındaki farkın 0.20'den küçük olması bu iki değerin birbiri ile uyumlu olduğunu göstermektedir (Kwatia ve diğ., 2017; Radhathirumalaiarasu ve Mahalakshmi, 2020). Sonuçların kesinliğini anlamada varyasyon katsayısından faydalanılmaktadır. Düşük varyasyon katsayısı yüksek kesinliğe işaret etmektedir. Varyasyon katsayısı arttıkça modelin güvenilirliği de düşmektedir (Li ve diğ., 2006; Taşan ve Akpınar, 2020). Varyasyon katsayısı %4.36 olarak bulunmuş ve standart sapmaların ortalama değere göre yeterince küçük olduğu sonucuna varılmıştır. Modelden elde edilen anlamlı veriler sinyal olarak değerlendirilirken standart hata kaynaklı veriler ise gürültü olarak değerlendirilmektedir. Yeterli kesinlik değeri sinyal/gürültü oranının hesaplanmasıyla elde edilmekte ve bu oranının 4'ten büyük olması istenmektedir (Yuan ve diğ., 2019; Chabra ve diğ., 2020; Radhathirumalaiarasu ve Mahalakshmi, 2020). AFB₁ üretim modelinde yeterli kesinlik değeri 44.5 olarak belirlenmiş olup; üretilen sinyal büyüklüğünün yeterli düzeyde olduğu sonucuna varılmıştır.

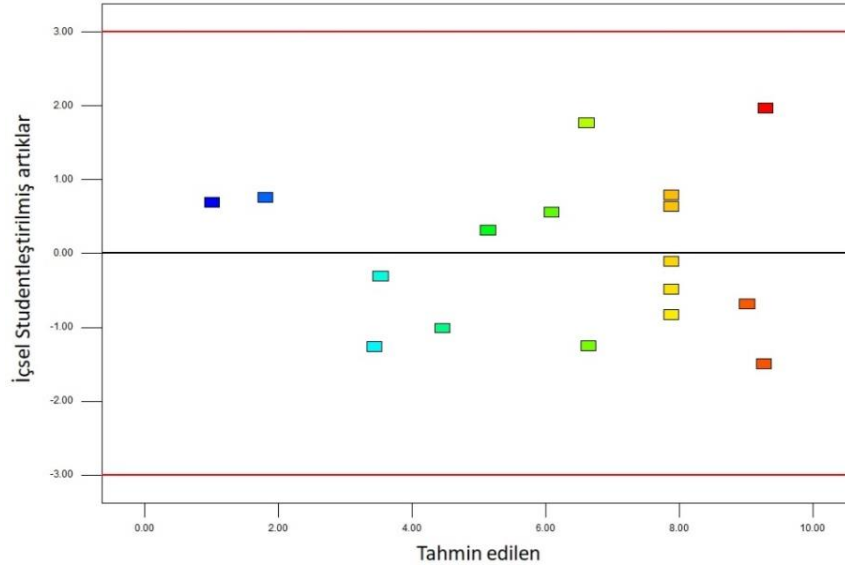
Varyans analizlerinin dışında modelin geçerli kılınması için birtakım çıktıların kontrol edilmesi gerekmektedir. Bunlardan bir tanesi normal % olasılık dağılımı olup dağılımın lineer olması beklenmektedir (Vohra ve Labaran, 2020). Mevcut çalışmada normal % olasılık dağılımında normal bir dağılım olduğu görülmüş; tahmini değerler ile artıklar arasında iyi bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 : AFB₁ üretiminde artıkların normal % olasılık dağılımı.

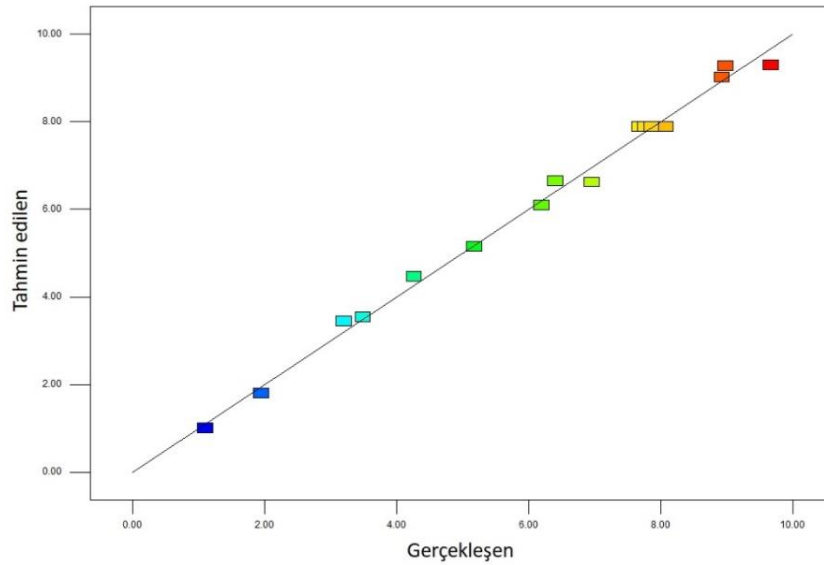
Modelin uygunluğunun kontrolünde bir diğer önemli gösterge de Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin edilen değerlerin kıyasıdır. Bu grafik doğrusal olmayan hata varyanslarının ve aykırı değerlerin tespitinde faydalı bir araçtır. Artıkların 0 hattının

etrafında rastgele dağılması modelin doğrusal olduğunun kabulü için yeterli kanıt sunmaktadır (Vohra ve Labaran, 2020). Grafik incelendiğinde dağılımın belirlenen sınırlar (-3, +3) içerisinde rastlantısal dağıldığı görülmektedir (Şekil 4.25). Bu durumda, elde edilen sonuçların bir t-dağılımı sergilediği ve tahmin edilenin dışında aykırı bir sonuç bulunmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.25 : AFB₁ üretiminde içsel Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin değerleri.

Modelden elde edilen tahminler ve deneysel üretim sonuçlarının birbirine oldukça iyi uyduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26). Artıkların düşük olması modelin süreci doğru bir şekilde açıkladığına kanıt olarak gösterilmektedir (Taşan ve Akpınar, 2020).



Şekil 4.26 : Tahmin edilen ve gerçekleşen AFB₁ üretimleri arasındaki ilişki.

Modelin yeterliliği istatistiksel değerlendirmelerle desteklenmektedir. Buradan hareketle, IK5-D2 *A. flavus* izolatı kullanılarak YES besi ortamında AFB₁ üretim prosesi matematiksel olarak modellenmiştir. "Prop>F" değeri 0.0500'den küçük olan faktörler modelin önemli terimleri olarak kabul edilmiştir (Li ve diğ., 2006; Radhathirumalaiarasu ve Mahalakshmi, 2020). pH, sıcaklık, süre, sıcaklık-süre, pH², sıcaklık² ve süre² terimlerinin AFB₁ üretim modeli için önemli olduğu sonucuna varılmıştır. AFB₁ üretimini ifade eden model Denklem 4.1'de verilmiştir:

$$\ln (AFB_1) = -42.99 + 1.64X_1 + 2.86X_2 + 1.59X_3 - 0.01X_2X_3 - 0.08X_1^2 - 0.06X_2^2 - 0.05X_3^2 \quad (4.1)$$

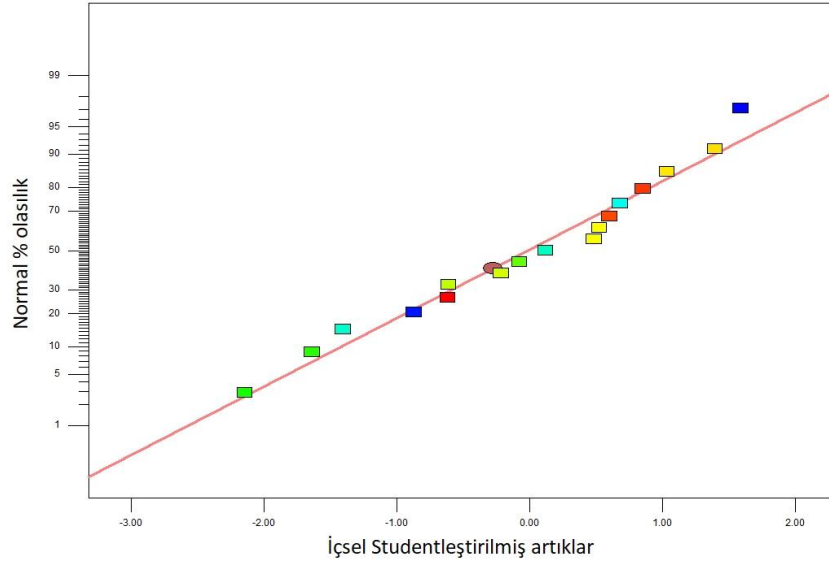
Denklemde X_1 , X_2 ve X_3 olarak gösterilen değişkenler sırasıyla pH, sıcaklık (°C) ve inkübasyon süresini (gün) ifade etmektedir. YYY çalışmalarında belirlenen hedef arzu edirlilik (desirability) olarak adlandırılmaktadır. Asıl hedef olan maksimum üretimin sağlandığı koşullarda arzu edirlilik 1 veya 1'e yakın bir değerde olmaktadır. Bağımsız değişkenler çalışmada kullanılan aralıklar içerisinde serbest bırakılmış; yanıt ise maksimum olacak şekilde modelden tahminler üretilmiştir. Bu tahminler içerisinde AFB₁ üretimini en üst düzeye ulaştırması beklenen koşullar pH 8.0, sıcaklık 24.06 °C ve süre 13.79 gün olarak tespit edilmiştir. Belirtilen koşullarda 29648.2 ng/mL AFB₁, 951.9 ng/mL AFB₂ olmak üzere toplam 30600.1 ng/mL aflatoksin üretilebileceği hesaplanmıştır. Bu durumda arzu edirlilik değeri 1 olarak belirlenmiştir.

4.5.1.2 Aflatoksin B₂ üretimi üzerine istatistiksel değerlendirmeler

Optimizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlara göre modelin F-değeri 102.15 olarak belirlenmiştir. Prob>F değeri %0.01'den küçük olduğundan modelin prosesi açıklamada önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Arzu edildiği üzere AFB₂ üretiminde de uyumsuzluk değeri (lack-of-fit) önemsiz bulunmuştur (Şekil B.1b). Modelin R², düzeltilmiş R² ve tahmin R²'si ise sırasıyla 0.9789, 0.9693 ve 0.9397 olarak hesaplanmıştır. Düzeltilmiş R² ve tahmin R²'si arasındaki farkın 0.20'den küçük olduğu ve birbirleri ile uyumlu oldukları sonucuna varılmıştır. Varyasyon katsayısı %20.8 olarak tespit edilmiş ve standart sapmaların ortalamaya göre yeterince küçük olduğu saptamıştır. Sinyal/gürültü oranı 34.2 olarak hesaplanmış ve sonuçların değerlendirme yapılabilmesi için yeterli kesinliği sağladığı (>4) sonucuna varılmıştır.

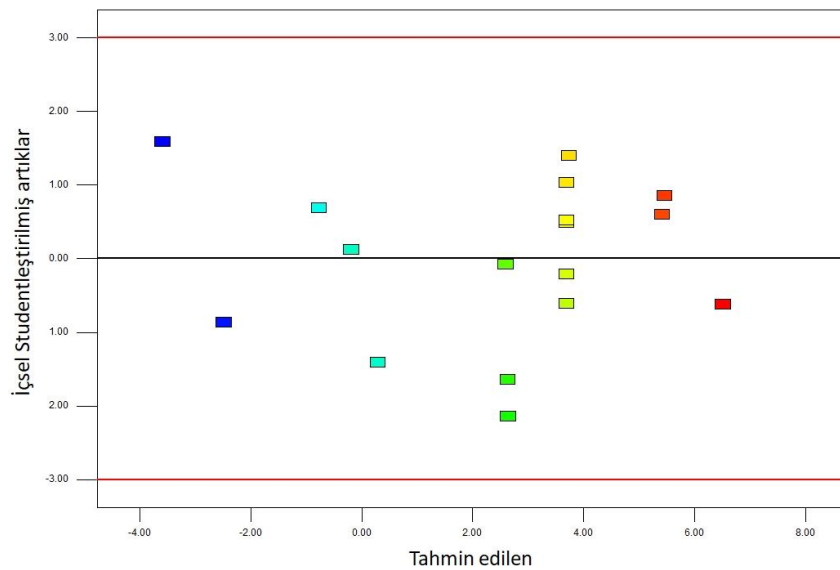
Normal % olasılık dağılımının düz bir çizgi şeklinde dağılması artıklar ve tahmin edilen değerler arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Şekil 4.27).

Uyumsuzluk değerin düşük bulunması, yapılan tahminlerin deneysel üretimlere yakın olması sonucunu desteklemektedir.

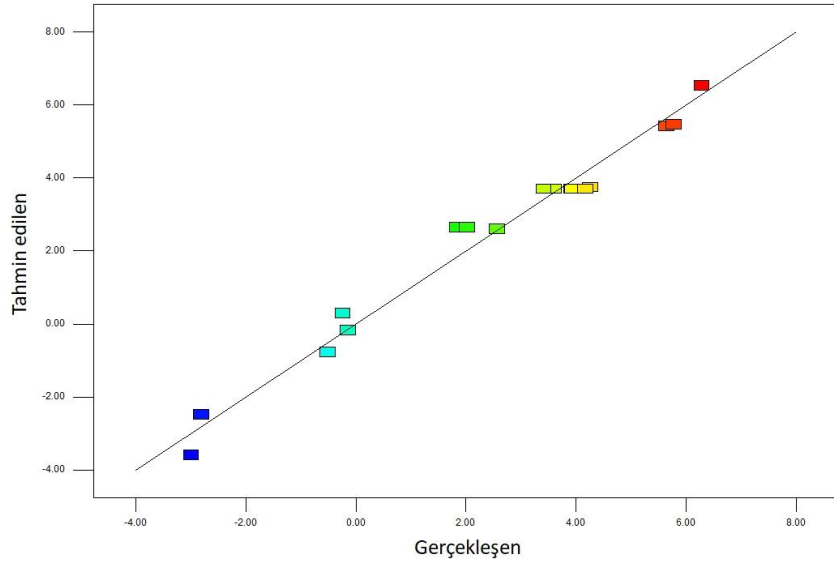


Şekil 4.27 : AFB₂ üretiminde artıkların normal % olasılık dağılımı.

Artıkların, 0 çizgisi etrafında rastlantısal dağıldığı görülmektedir (Şekil 4.28). Bu durum, artıklar ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu varsayımının makul olduğunu göstermektedir. Artıkların, 0 hattının etrafında kabaca bir yatay bant oluşturması hata terimlerinin varyanslarının eşit olduğunu ifade etmektedir. Hiçbir artığın belirlenen sınırlar (-3, +3) dışına çıkmaması aykırı değerlerin bulunmadığına işaret etmektedir. Optimizasyon denemesinde elde edilen üretim değerleri modelden üretilen tahminler ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.29).



Şekil 4.28 : AFB₂ üretiminde içsel Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin değerleri.



Şekil 4.29 : Tahmin edilen ve gerçekleşen AFB₂ üretimleri arasındaki ilişki.

Model için yürütülen tanı analizleri modelin AFB₂ üretim prosesini açıklamada yeterli olduğunu göstermiştir. AFB₂ üretimi matematiksel olarak modellenmiş; pH, sıcaklık, süre, sıcaklık² ve süre² terimlerinin model açısından önemli olduğu belirlenmiştir. AFB₂ üretimini ifade eden matematiksel model Denklem 4.2'de verilmiştir:

$$\ln(AFB_2) = -29.71 + 0.70X_1 + 2.10X_2 + 1.15X_3 - 0.05X_2^2 - 0.04X_3^2 \quad (4.2)$$

Modele göre en yüksek AFB₂ üretimi sağlayacak koşullar pH 8.0 (X_1), sıcaklık 22.49 °C (X_2) ve süre 13.28 gün (X_3) olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 25269.6 ng/mL AFB₁, 1088.3 ng/mL AFB₂ olmak üzere toplam 26357.9 ng/mL aflatoksin üretilebileceği hesaplanmıştır. Optimize edilen koşullarda arzu edirlilik değeri 1'dir.

4.5.1.3 Aflatoksin üretiminde optimum koşullar

IK5-D2 *A. flavus* izolatının aynı besi ortamı içerisinde eşzamanlı olarak AFB₁ ve AFB₂ üretimi gerçekleştirebildiği daha önce (bkz. Bölüm 4.4.1) ifade edilmişti. Optimizasyon denemelerinde ise izolatın gelişme koşullarındaki değişimlere aflatoksin üretimi açısından benzer tepkiler verdiği görülmüştür. Örneğin inkübasyon sıcaklığının 34 °C olarak ayarlanması her iki mikotoksinin de üretiminde ciddi düşüşlere sebep olmuştur. Benzer şekilde besiyerinde alkali başlangıç pH'sı kullanılması her iki aflatoksin miktarında da artış yaratmıştır. Endüstriyel üretimlerde yüksek üretim hacmi kadar maliyet ve verimlilik faktörleri de gözetilmektedir. Optimizasyon çalışmalarında da benzer durumlar için eğer mümkünse aynı anda birden fazla mikotoksinin eşzamanlı üretimi üzerinde durulmaktadır (Wu ve diğ., 2017). Üretim miktarları açısından, AFB₁ ve AFB₂ üretimlerini

ayrı ayrı maksimize etmek ile toplam aflatoksin miktarını maksimize etmek arasında ciddi bir fark olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.11). Aflatoksin üretiminin tek bir proses şeklinde yürütülmesiyle malzeme ve zamandan tasarruf sağlanabileceği; buna bağlı olarak da üretim maliyetlerinin aşağı çekilebileceği öngörülmektedir. Bu nedenle aflatoksin üretimi için en uygun koşulların pH 8.0, sıcaklık 24.0 °C ve süre 13.8 gün şeklinde olması gerektiği değerlendirilmiştir.

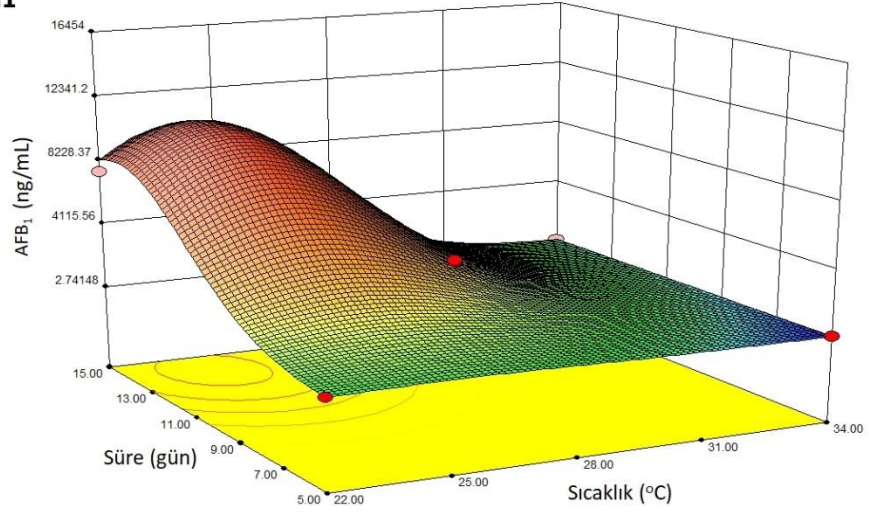
Çizelge 4.11 : İstatistiksel modellemeye göre optimize koşullarda elde edilmesi beklenen aflatoksin miktarları.

Maksimize edilecek kısım	Koşullar			Mikotoksin miktarları		
	pH	Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	AFB ₁ (ng/mL)	AFB ₂ (ng/mL)	Toplam aflatoksin (ng/mL)
AFB ₁	8.00	24.06	13.79	29648.2	951.9	30600.1
AFB ₂	8.00	22.49	13.28	25269.6	1088.3	26357.9
Toplam	8.00	24.00	13.80	29645.9	960.0	30605.9

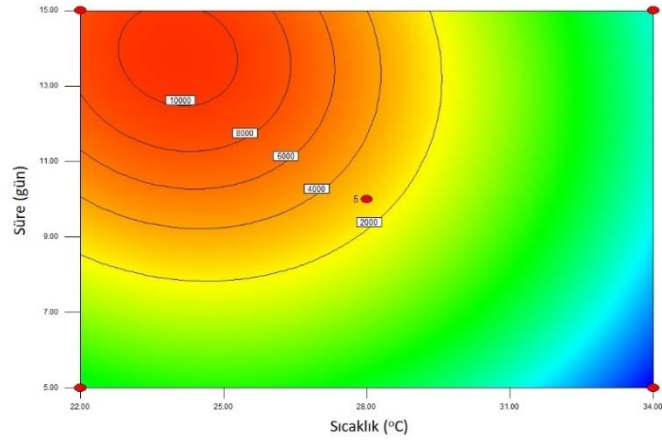
4.5.1.4 Gelişim koşullarının aflatoksin üretimi üzerine etkisi

Çeşitli biyotik ve abiyotik faktörler aflatoksin biyosentezini etkilemektedir. Çevresel faktörler arasında özellikle sıcaklık, pH, su aktivitesi ve besinsel bileşimin aflatoksin sentezi ile yakından ilişki olduğu bilinmektedir (Yu, 2012). Mevcut çalışmada da sıcaklık, pH ve inkübasyon süresinin aflatoksin üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuçlara göre inkübasyon süresi arttıkça besiyerindeki aflatoksin birikiminin arttığı görülmüştür. Bununla birlikte, yanıt yüzeyi grafiği inkübasyonun son gününde aflatoksin üretim hızının ivmesini kaybettiğini ortaya koymaktadır. En yüksek aflatoksin konsantrasyonuna 13. ve 15. günler arasında erişileceği değerlendirilmektedir (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31). Geçmiş bir çalışmada besiyerindeki aflatoksin miktarının 14. günden sonra azalma gösterdiği belirlenmiştir. Belirtilen çalışmada kültür yaşlandıkça miselya yapısının parçalandığı ve ortama salınan intramissellar birtakım bileşiklerin aflatoksin degradasyonuna sebep olduğu ifade edilmiştir (Huynh ve Lloyd, 1984). Bir başka çalışmada da aflatoksin üretiminin 10 gün boyunca artış gösterdiği ancak 15. günde ortamdaki mikotoksin miktarında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Kusumaningtyas ve diğ., 2006). Yanıt yüzeyi yöntemiyle belirlenen optimum inkübasyon süresinin geçmiş literatür bilgileriyle tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

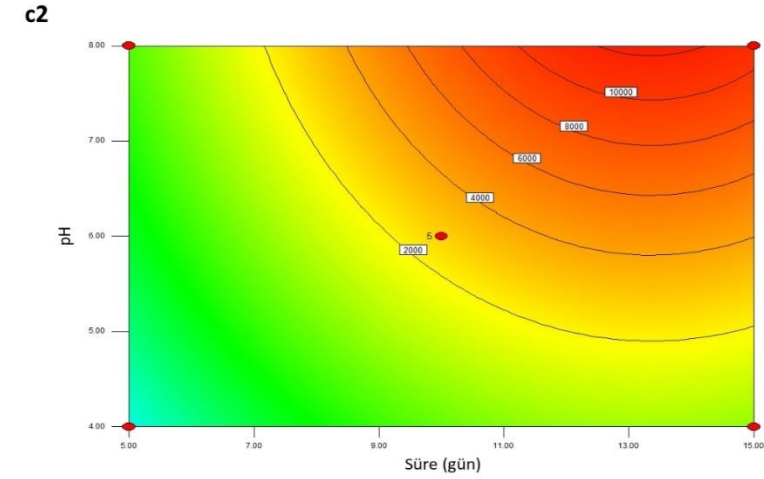
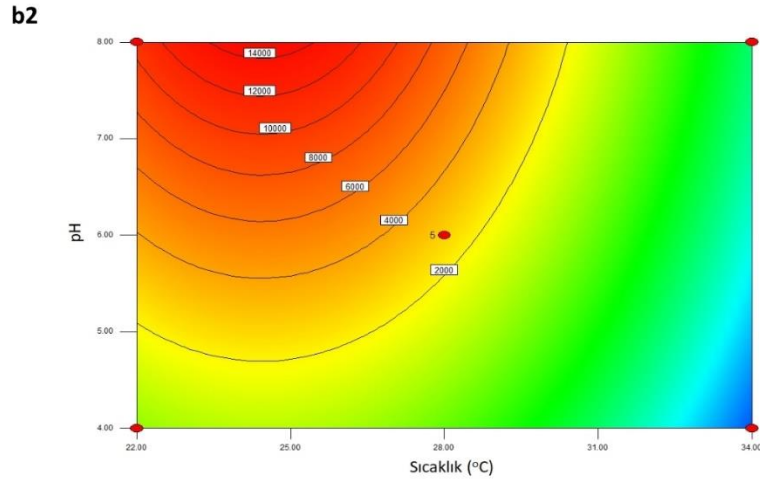
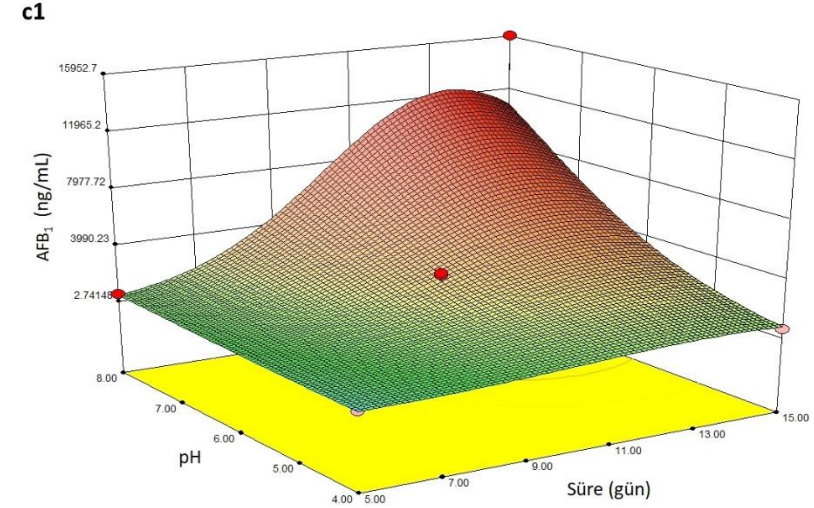
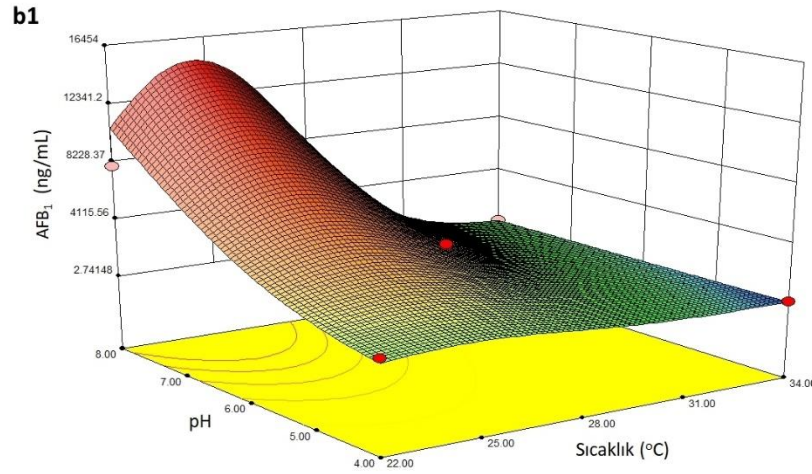
a1



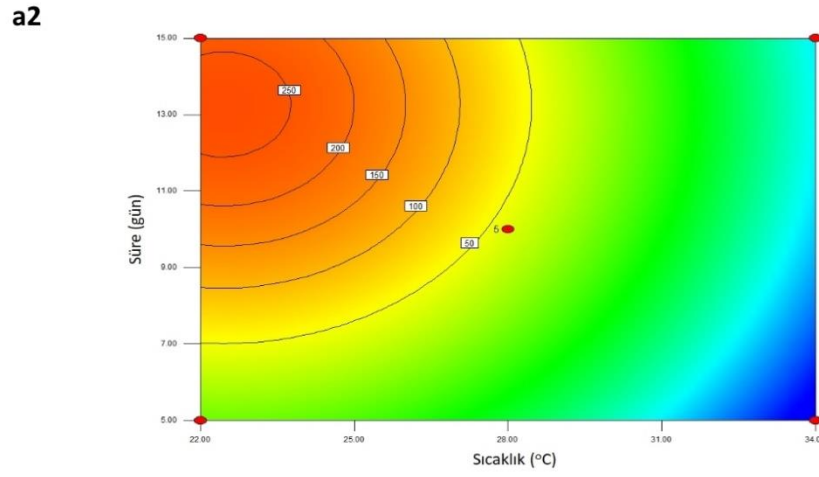
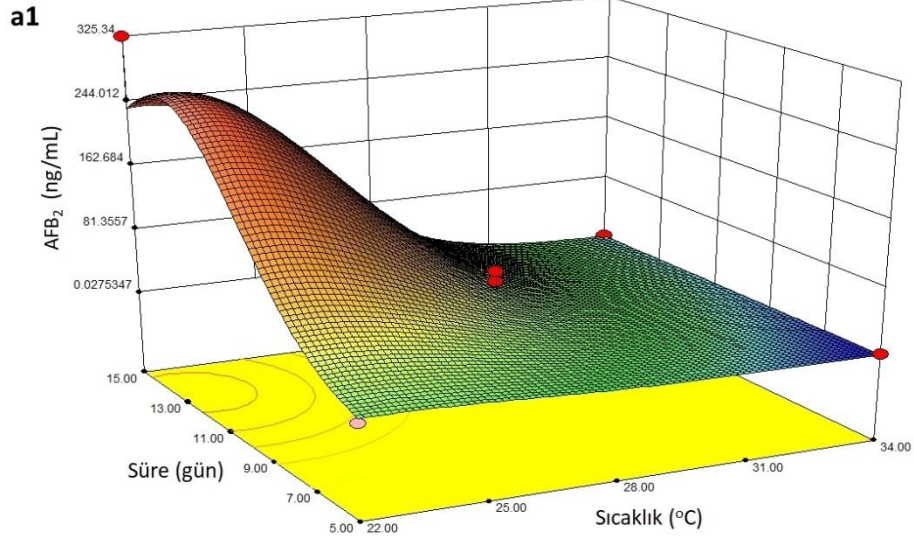
a2



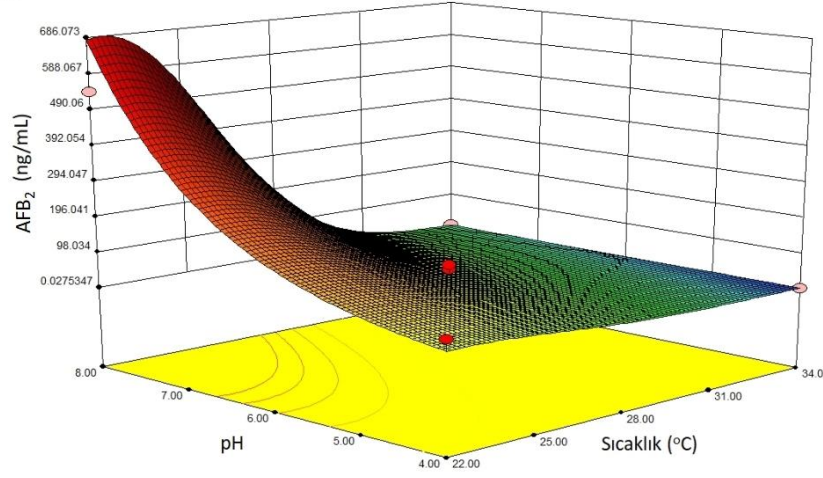
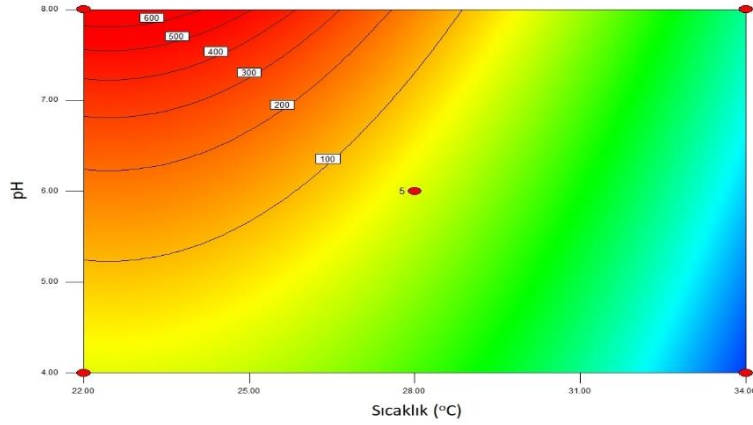
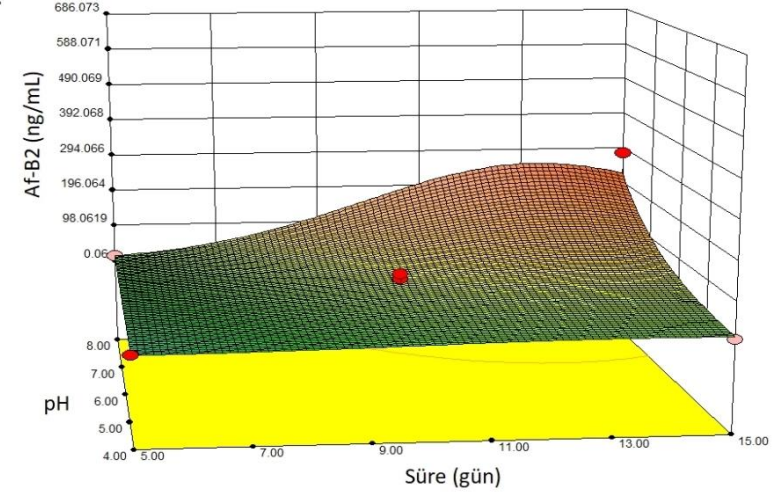
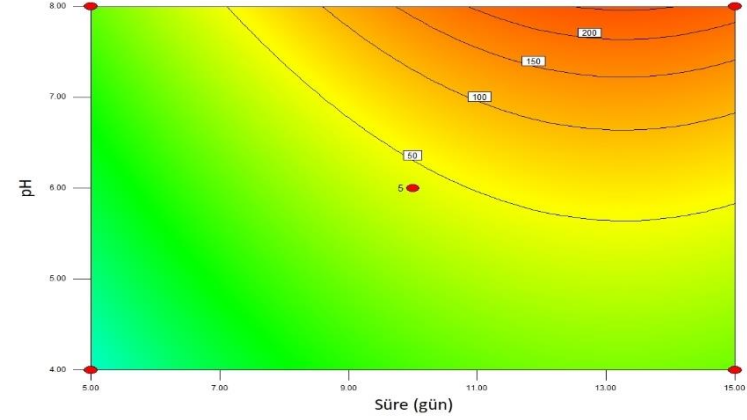
Şekil 4.30 : AFB₁ üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri. İnkübasyon süresi ve pH (a1 ve a2), pH ve sıcaklık (b1 ve b2), pH ve inkübasyon süresi (c1 ve c2) etkileşimlerinin etkisi.



Şekil 4.30 (devam) : AFB₁ üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri. İnkübasyon süresi ve pH (a1 ve a2), pH ve sıcaklık (b1 ve b2), pH ve inkübasyon süresi (c1 ve c2) etkileşimlerinin etkisi.



Şekil 4.31 : AFB₂ üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri. İnkübasyon süresi ve sıcaklık (a1 ve a2), pH ve sıcaklık (b1 ve b2), pH ve inkübasyon süresi (c1 ve c2) etkileşimlerinin etkisi.

b1**b2****c1****c2**

Şekil 4.31 (devam) : AFB₂ üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri. İnkübasyon süresi ve sıcaklık (a1 ve a2), pH ve sıcaklık (b1 ve b2), pH ve inkübasyon süresi (c1 ve c2) etkileşimlerinin etkisi.

Mikotoksin üretimi çeşitli abiyotik faktörlerden etkilense de sıcaklığın aflatoksin oluşumu üzerinde çok büyük etkisi bulunmaktadır (Shabeer ve diğ., 2022). Ortam sıcaklığının 36 °C'nin üzerine çıkması aflatoksin oluşumunun neredeyse durma noktasına gelmesine sebep olmaktadır (Yu, 2012). Klich ve diğ. (2009) bazı *A. flavus* suşlarının 37 °C'de aflatoksin üretimine devam ettiği ancak üretim miktarının oldukça düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Aflatoksin üretimi için en uygun sıcaklık aralığının 24-30 °C olduğu ve bu değerlerden uzaklaşıldıkça aflatoksin üretiminin düştüğü belirtilmektedir (Klich, 2007; OBrian ve diğ., 2007). Optimizasyon çalışmasında da en yüksek aflatoksin üretimleri 22 ve 28 °C'de yürütülen denemelerde elde edilmiştir. Sıcaklığın 34 °C olduğu uygulamalarda aflatoksin üretimi dramatik bir düşüş sergilemiştir. Sıcaklık küf gelişimini etkilemesinin yanı sıra aflatoksin üretiminden sorumlu gen bölgelerinin aktivasyon kazanmasında da büyük rol oynamaktadır (Shabeer ve diğ., 2022). Yapılan çalışmalar aflatoksin biyosentezini kontrol eden genlerin 20 ve 37 °C'ye kıyasla 28 °C'de daha fazla ifade edildiğini göstermektedir (OBrian ve diğ., 2007; Gallo ve diğ., 2016). Gen ifadesi ve dolayısıyla aflatoksin üretimi sıcaklığa bağımlı şekilde gerçekleşmektedir (Gallo ve diğ., 2016). Matematiksel modelleme, besiyerindeki toksin birikiminin 24 °C'de maksimum olacağını göstermektedir (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31). Bu bağlamda, yapılan istatistiksel değerlendirmelerin geçmiş araştırma sonuçlarıyla uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

pH, mikotoksin biyosentezinde yer alan biyokimyasal yolların düzenlenmesinde etkili olabilen faktörlerden biridir. Aflatoksin üretimi en az 27 enzimatik reaksiyondan oluşan biyokimyasal bir süreçtir. Bu enzimleri kodlayan genlerin ifadeleri *aflR* ve *aflS* adı verilen iki düzenleyici tarafından koordine edilmektedir. Aflatoksin üretimi esnasında mikroorganizmanın pH değişimine verdiği yanıtta *aflR* promotor bölgesi üzerinde *PacC* transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinin kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü alkali koşullarda *PacC* transkripsiyon faktörü oldukça güçlü bir şekilde ifade edilmektedir (Caceres ve diğ., 2020). Geçmiş çalışmalar, hafif asidik pH'ya sahip besi ortamlarında aflatoksin üretiminin genellikle daha yüksek olduğunu göstermektedir (Price ve diğ., 2005; Hamed ve diğ., 2016). Mevcut çalışmada ise yüksek başlangıç pH'sı aflatoksin üretiminde artış sağlarken; pH'nın 4.0 olarak ayarlanması aflatoksin üretimini olumsuz etkilemiştir. Düşük başlangıç pH'sı genellikle lag fazını uzatmakta ve küf gelişimini geciktirmektedir (Casquete ve diğ., 2017). *A. flavus*'ta sklerotial gelişimin pH 4.0'ın altında en az %50; pH 3.0'ın altında ise tamamen inhibe olduğu belirtilmektedir (Cotty, 1988). Bu nedenle alkali/nötral besi ortamlarında miselya gelişiminin daha hızlı olduğu; pH'nın kritik

seviyenin altına inmesiyle de aflatoksin üretiminin hız kazanmış olabileceği değerlendirilmiştir. Keza, aflatoksijenik küf aşılانmış besi ortamında pH'nın inkübasyon süresi boyunca düşüş gösterdiği ifade edilmektedir (Lisker ve diğ., 1993; Keller ve diğ., 1997).

4.5.2 Zearalenon üretiminin optimizasyonu

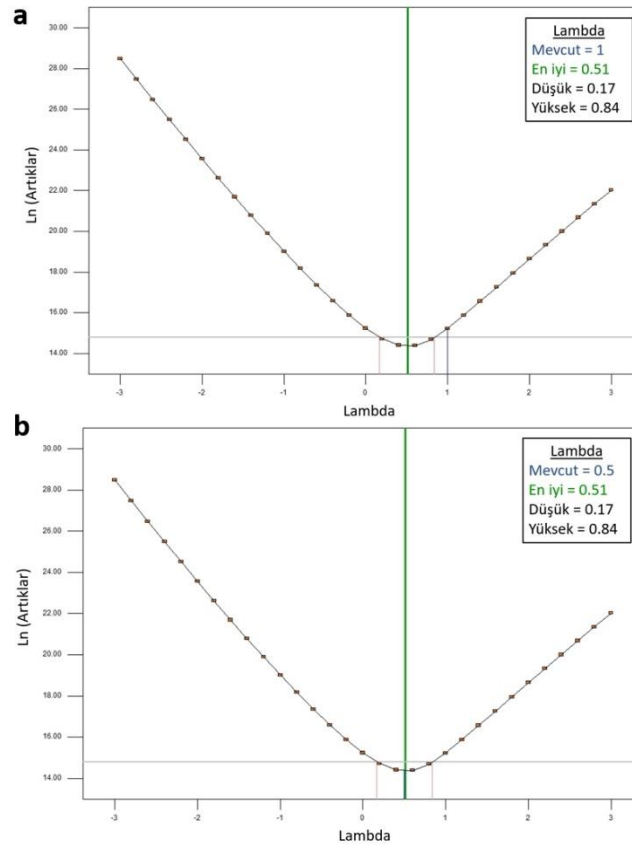
4.5.2.1 Zearalenon üretimi üzerine istatistiksel değerlendirmeler

Box-Behnken dizaynına göre oluşturulan deneme üniteleri ve bu denemelerde elde edilen ZEA miktarları Çizelge 4.12'de verilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak prosesin matematiksel ifadesi için lineer, iki faktör etkileşimli, kuadratik ve kubik modeller incelenmiştir. Deneme dizaynı yeterli büyüklükte olmadığı için kubik model kullanımı uygun bulunmamıştır. Diğer modeller içerisinde daha yüksek R^2 değerleri göstermesi nedeniyle kuadratik modelin ZEA üretim prosesini açıklamada daha kullanışlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.12 : Yanıt yüzey yönteminde üç bağımsız değişken esas alınarak hazırlanan deneysel tasarım ve elde edilen zearalenon miktarları.

	X_1	X_2	X_3	Miktar (ng/mL)
No.	pH	Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	Zearalenon
1	-1 (4)	-1 (16)	0 (21)	81.09 ± 6.52
2	+1 (9)	-1 (16)	0 (21)	2715.72 ± 176.22
3	-1 (4)	+1 (28)	0 (21)	61.64 ± 6.25
4	+1 (9)	+1 (28)	0 (21)	1403.78 ± 176
5	-1 (4)	0 (22)	-1 (14)	432.46 ± 32.78
6	+1 (9)	0 (22)	-1 (14)	141.14 ± 8.82
7	-1 (4)	0 (22)	+1 (28)	324.61 ± 25.9
8	+1 (9)	0 (22)	+1 (28)	7017.86 ± 447.77
9	0 (6.5)	-1 (16)	-1 (14)	447.24 ± 34.62
10	0 (6.5)	+1 (28)	-1 (14)	317.97 ± 34.48
11	0 (6.5)	-1 (16)	+1 (28)	7355.91 ± 684.12
12	0 (6.5)	+1 (28)	+1 (28)	2845.09 ± 232.82
13	0 (6.5)	0 (22)	0 (21)	3192.86 ± 245.4
14	0 (6.5)	0 (22)	0 (21)	4069.01 ± 328.34
15	0 (6.5)	0 (22)	0 (21)	3382.57 ± 279.1
16	0 (6.5)	0 (22)	0 (21)	4098.85 ± 326.3
17	0 (6.5)	0 (22)	0 (21)	3879.07 ± 298.7

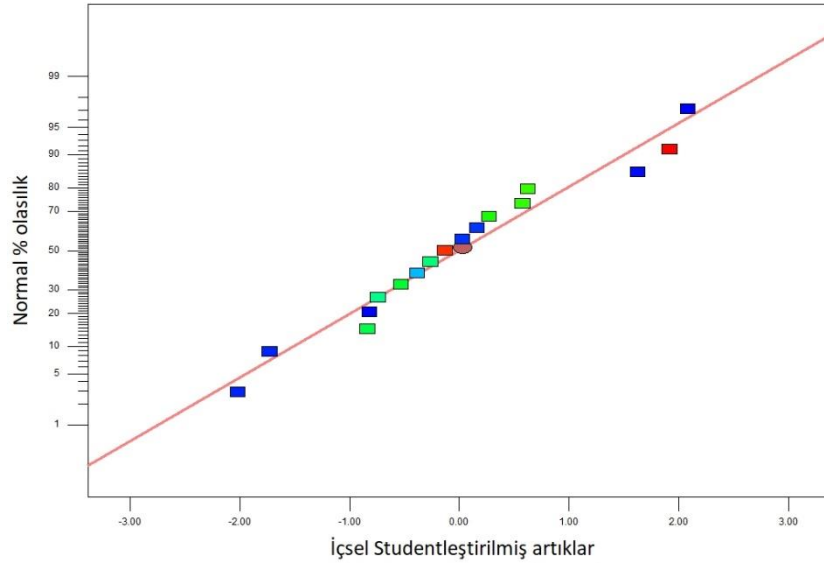
Box-Cox grafiğinde model için karekök dönüşümü ($\lambda=0.51$) önerilmektedir (Şekil 4.32). Dönüşüm yapılmış ve yapılmamış modellerin R^2 değerlerinde önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak, dönüşüm sonrası modelin uyumsuzluğunda (lack-of-fit) ciddi bir artış meydana geldiğinden kuvvet dönüşümü yapılmasının uygun olmayacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.32 : Zearalenon üretim modeline ilişkin Box-Cox grafikleri. Kuvvet dönüşümü öncesi (a) ve sonrası (b).

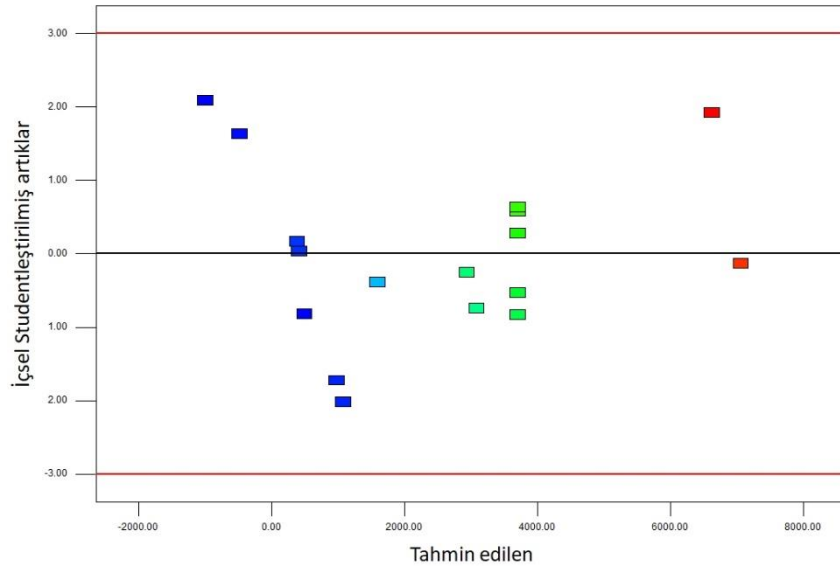
Modelin F-değeri 26.59 olarak bulunmuş ve modelin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil B.1c). Prob>F değeri, bu büyüklükteki sonuçların gürültü nedeniyle oluşma ihtimalinin %0.01'den az olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuç, denemelerde elde edilen yanıtların tesadüfi olarak oluşmadığını ispatlamaktadır. Modelin uyumsuzluk değeri (lack-of-fit) önemsiz olarak bulunmuştur. Uyumsuzluk değerinin önemsiz olması modelden türetilcek tahminlerin yüksek doğrulukla gerçekleşeceğine işaret etmektedir. Modele ait R^2 , düzeltilmiş R^2 ve tahmin R^2 değerleri sırasıyla 0.9539, 0.9180 ve 0.7181 olarak belirlenmiştir. Modellemelerde düzeltilmiş R^2 değerinin 0.80'den büyük olması ve tahmin R^2 ile arasındaki farkın 0.20'den küçük olması istenen bir durumdur (Kwatia ve diğ., 2017). Bu bağlamda, ZEA üretim modeli yeterli R^2 büyüklüğüne sahiptir. Daha önce de ifade edildiği üzere sinyal/gürültü oranının 4'ten büyük olması istenmektedir. Yeterli kesinlik (sinyal/gürültü) 17.4 olarak ölçülmüş ve modelin yeterli büyüklükte sinyal oluşturduğu saptanmıştır.

ANOVA analizleri sonrası modelin tanımlanmasına geçilmiştir. İlk olarak normal % olasılık dağılımı incelenmiş ve dağılımın lineer olduğu görülmüştür (Şekil 4.33). Artıkların düşük ve sonuçların beklenen değerlere yakın olduğu belirlenmiştir.



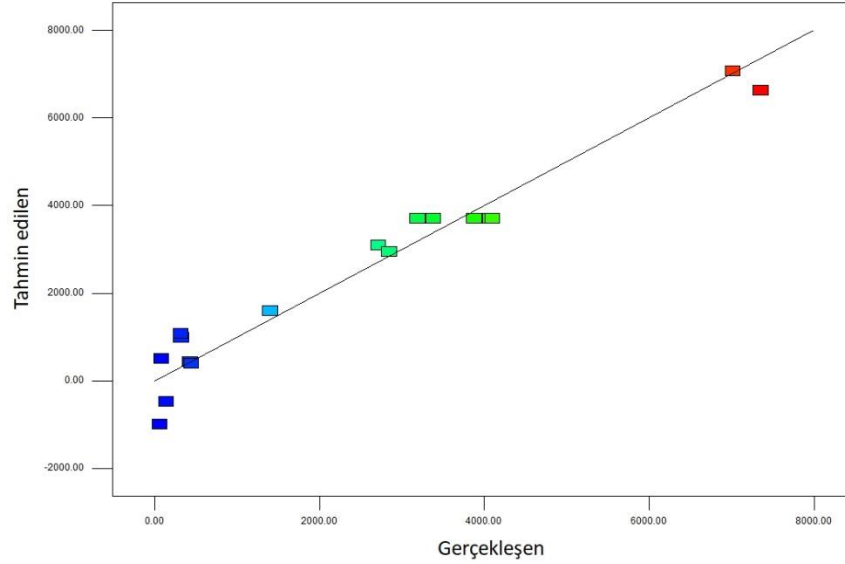
Şekil 4.33 : ZEA üretiminde artıkların normal % olasılık dağılımı

İçsel Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin edilen değerler arasındaki ilişki Şekil 4.34'te verilmiştir. Artık değerler, grafikte 0 hattı boyunca rastgele dağılım sergilemektedir. Bu sonuç, bir önceki grafikte öne sürülen artıklar ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu varsayımını desteklemektedir. Artıkların dağılımı hata terimlerinin varyanslarının eşit olduğuna işaret etmektedir. Tüm deneme artıklarının belirlenen limitler (-3, +3) dahilinde olması elde edilen sonuçlar arasında aykırı bir değer bulunmadığı anlamına gelmektedir.



Şekil 4.34 : ZEA üretiminde içsel Studentleştirilmiş artıklara karşı tahmin değerleri.

Modelden elde edilen tahminler ve deneysel üretim sonuçlarının birbirine oldukça iyi uyduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.35). Artıkların düşük olması modelin süreci doğru bir şekilde açıkladığına kanıt olarak gösterilmektedir (Taşan ve Akpınar, 2020).



Şekil 4.35 : Tahmin edilen ve gerçekleşen ZEA üretimleri arasındaki ilişki.

ZEA üretiminin modellenmesinde önemli terimler pH, sıcaklık, süre, pH-süre, sıcaklık-süre, pH^2 ve $sıcaklık^2$ olarak belirlenmiştir. ZEA üretimini ifade eden model Denklem 4.3'te verilmiştir.

$$ZEA = -25781.71 + 1985.67X_1 + 1584.42X_2 + 214.58X_3 + 99.78X_1 X_3 - 26.08X_2 X_3 - 274.01X_1^2 - 26.39X_2^2 \quad (4.3)$$

Denklemde pH faktörü X_1 , sıcaklık faktörü X_2 ve süre faktörü X_3 şeklinde ifade edilmiştir. Bu eşitliğe göre ZEA üretiminin maksimuma ulaşacağı gelişim koşulları pH 8.70, sıcaklık 16.20 °C ve süre 28.00 gün olarak belirlenmiştir. Belirtilen koşullarda 7980.18 ng/mL ZEA üretilebileceği hesaplanmıştır.

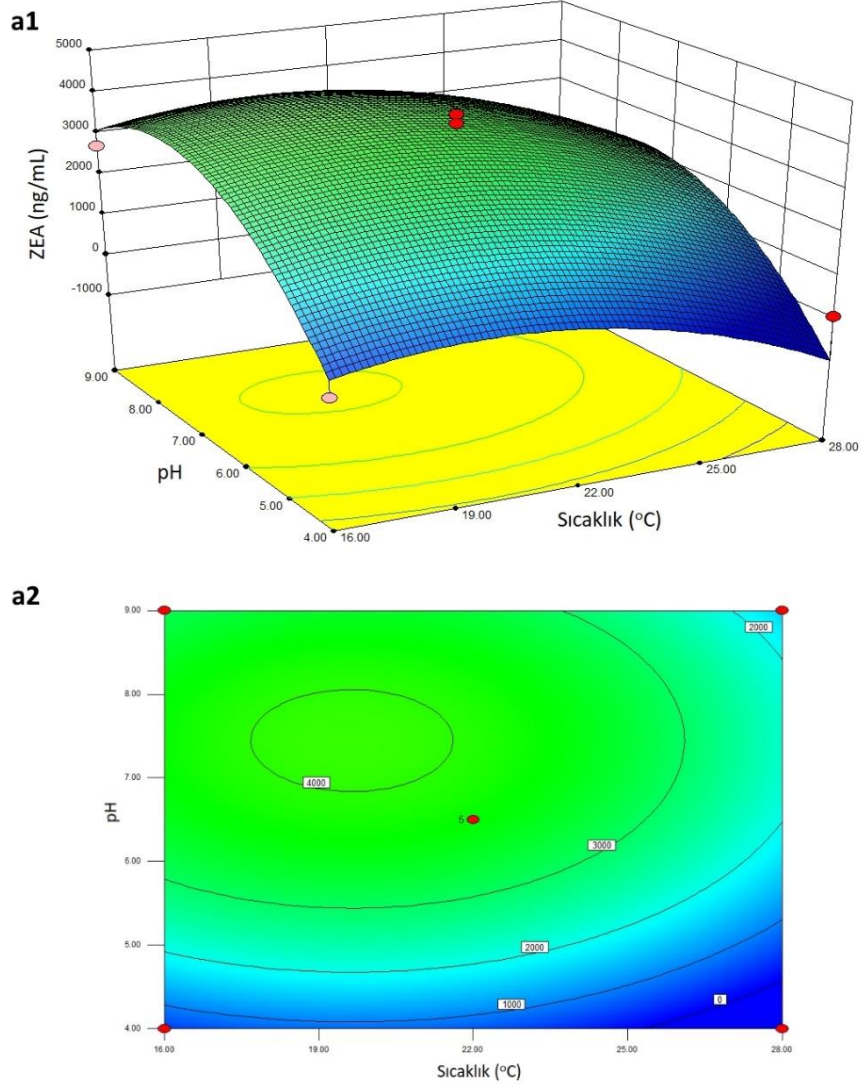
4.5.2.2 Gelişim koşullarının zearalenon üretimi üzerine etkisi

Farklı sıcaklık ve pH koşullarında geliştirilen B1-D1 izolatının ürettiği ZEA miktarları 14, 21 ve 28. günler sonunda kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre inkübasyon süresi uzadıkça besiyerindeki ZEA birikiminin arttığı görülmüştür. Literatürde çeşitli *Fusarium* türleri kullanılarak farklı gelişme koşulları altında (substrat, su aktivitesi, pH, sıcaklık vb.) ZEA üretimini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda besi ortamındaki ZEA miktarının yaklaşık 4-5 haftalık periyot boyunca sürekli artış gösterdiği

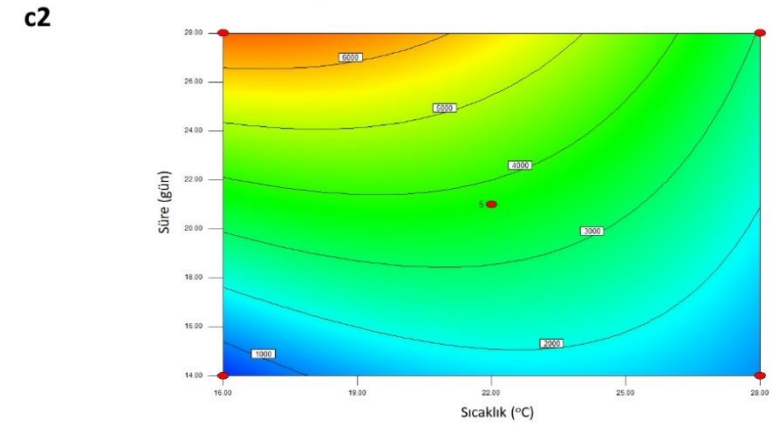
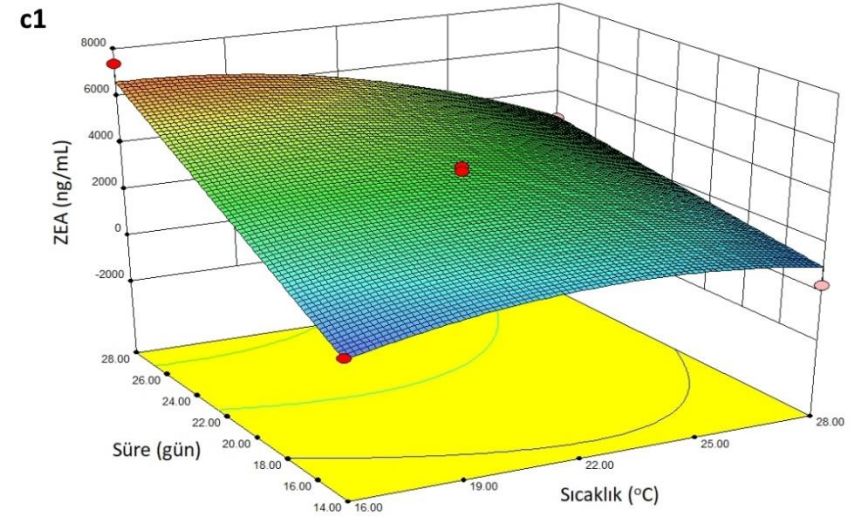
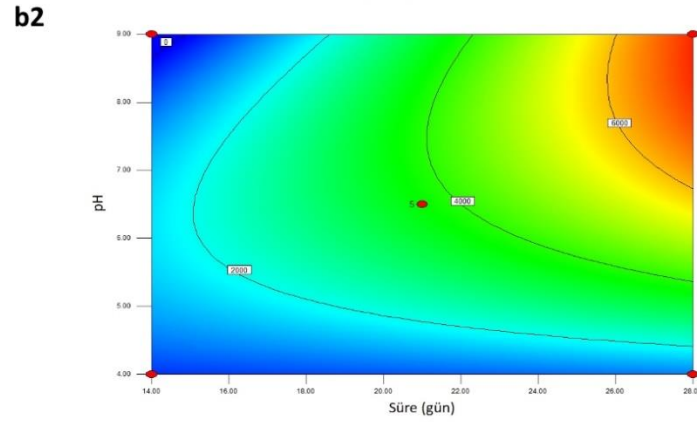
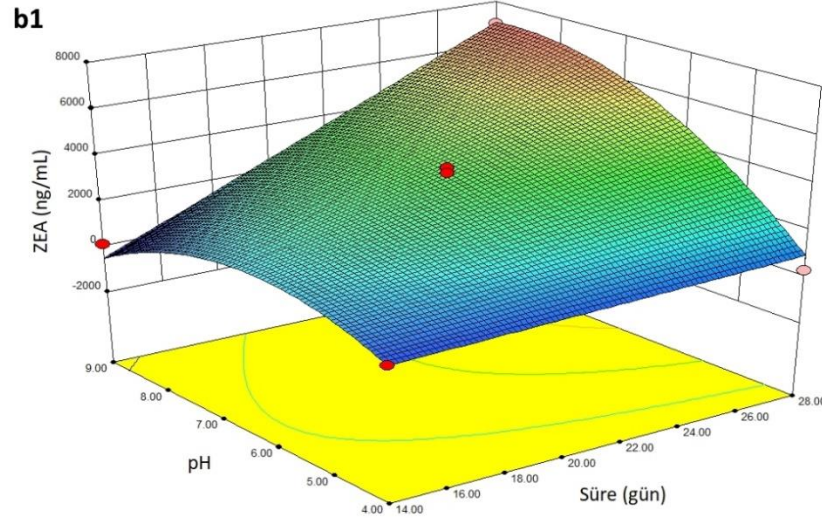
tespit edilmiştir (Martins ve Martins, 2002; Ezekiel ve diğ., 2008). Borzekowski ve diğ. (2018), substrat olarak pirinç unu kullanmış ve ZEA birikiminin 32 günlük inkübasyon sonunda dahi artmaya devam ettiğini bulmuşlardır. Substrat olarak amarant tohumu kullanılan bir başka çalışmada ise ortamdaki ZEA miktarının 7 haftaya kadar artış gösterdiği belirlenmiştir (Bresler ve diğ., 1998). Genel olarak yapılan değerlendirmeler yaklaşık bir aylık periyotta ZEA üretiminin sürekli artış gösterdiği yönündedir. Modellemeye göre de 4 haftalık periyot içerisinde en yüksek ZEA birikimine 28. günde ulaşılabileceği değerlendirilmiştir (Şekil 4.36).

Mikotoksin üreticisi *Fusarium* türlerinin optimal gelişim sıcaklıkları birbirinden farklıdır. *F. graminearum* türleri yaz mevsimini sıcak geçiren bölgelerde daha yoğun görülürken; *F. culmorum* türleri serin iklime sahip deniz kıyısı bölgelerde daha yaygın bulunmaktadır (West ve diğ., 2012). *F. culmorum* türlerinin özellikle oda sıcaklığının altında kalan sıcaklıklarda daha fazla ZEA ürettiği bildirilmektedir (Jimenez ve diğ., 1996). Seirafinia ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada düşük sıcaklık stresinin *Fusarium* türlerinde ZEA üretimini arttırdığı ortaya konmuştur. Fungus, özellikle uygun sıcaklıkta (yaklaşık 25 °C) gelişerek substratı istila ettikten sonra sıcaklığın düşmesi daha fazla ZEA üretimine neden olmaktadır (Llorens ve diğ., 2004). Optimizasyon kapsamında yapılan üretimlerde besiyerindeki ZEA miktarı ile sıcaklık artışı arasında bir ters orantı bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle sıcaklığın 28 °C olarak uygulandığı denemelerde daha düşük ZEA konsantrasyonu elde edilmiştir. Model grafikler en yüksek ZEA üretiminin 16-22 °C arasında gerçekleşeceğini göstermektedir (Şekil 4.36). Bu noktada, elde edilen verilerin geçmiş araştırma sonuçları ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Besiyeri başlangıç pH'sının yüksek olması ZEA üretimini olumlu yönde etkilemektedir. *F. graminearum* izolatı kullanarak ZEA üretimi gerçekleştirilen geçmiş bir çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir (Wu ve diğ., 2017). Genel itibarıyla optimizasyon denemelerinde ulaşılan sonuçlar, düşük sıcaklık ve yüksek pH koşullarında uzun süre inkübasyonun ZEA üretimini teşvik edeceğini göstermektedir.



Şekil 4.36 : ZEA üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri. pH ve sıcaklık (a1 ve a2), pH ve inkübasyon süresi (b1 ve b2), inkübasyon süresi ve sıcaklık (c1 ve c2) etkileşimlerinin etkisi.



Şekil 4.36 (devam) : ZEA üretimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve karşıt gösterim grafikleri. pH ve sıcaklık (a1 ve a2), pH ve inkübasyon süresi (b1 ve b2), inkübasyon süresi ve sıcaklık (c1 ve c2) etkileşimlerinin etkisi.

4.6 Mikotoksin Üretimi

4.6.1 Optimum koşullarda aflatoksin üretimi

IK5-D2 *A. flavus* izolatı için aflatoksin üretiminde en uygun koşulların pH 8.0, sıcaklık 24.0 °C ve sürenin 13.8 gün olduğu belirlenmiştir. Bu koşullar altında elde edilmesi beklenen ve gerçekleşen aflatoksin üretim miktarları Çizelge 4.13'te verilmiştir. Modele göre beklenen ve deneysel üretimlerde gerçekleşen miktarların birbirine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Gerçekleşen üretim miktarları, modelin %95 güven aralığı içerisinde yer almaktadır. Bu sonuçlar, modelin aflatoksin üretim prosesini açıklamada yeterli güvenilirliği sağladığı ve yüksek doğrulukla çalıştığının bir ispatı olarak kabul edilmektedir.

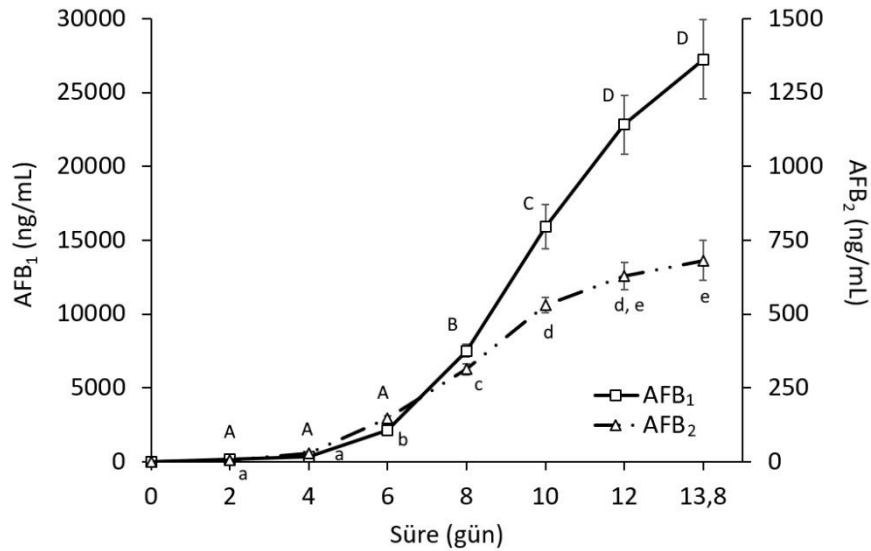
Çizelge 4.13 : Optimum koşullarda beklenen ve gerçekleşen aflatoksin üretim miktarları.

Aflatoksin	Tahmin edilen miktar (ng/mL)	%95 Güven aralığı (Düşük) (ng/mL)	%95 Güven aralığı (Yüksek) (ng/mL)	Gerçekleşen miktar (ng/mL)
AFB ₁	29645.9	19684.6	44647.9	27244.5 ± 2693.3
AFB ₂	960.0	518.9	1775.9	681.8 ± 67.5
Toplam	30605.9	20203.5	46423.8	27926.3 ± 2760.8

Belirtilen gelişim koşulları sadece kullanılan izolatının değil aynı zamanda referans kültürlerin de aflatoksin üretiminde artışa sebep olmuştur. MAM-200682 *A. flavus* referans kültürünün bu koşullardaki AFB₁ ve AFB₂ üretim miktarları sırasıyla 25302.7±2064.9 ng/mL ve 1174.8±95.0 ng/mL olarak belirlenmiştir. MAM-200682 *A. flavus* referans kültürü ile IK5-D2 *A. flavus* izolatı arasında aflatoksin verimi açısından anlamlı bir fark olmadığı ($P \geq 0.05$) tespit edilmiştir. Ayrıca NRRL 2999 *A. parasiticus* referans kültürü de aynı koşullarda 50734.0±5558.8 ng/mL AFB₁, 4474.0±672.6 ng/mL AFB₂, 81183.4±2404.7 AFG₁ ve 4115.4±177.9 ng/mL AFG₂ üretimi göstermiştir. Optimizasyon öncesi yapılan denemelerde (pH 6.4, 25.0 °C) NRRL 2999 *A. parasiticus* kültürünün ağırlıklı olarak B tipi aflatoksin ürettiği belirlenmişti. Optimize koşullar (pH 8.0, 24.0 °C) uygulandığında ise *A. parasiticus* referans kültürünün G tipi aflatoksinleri daha fazla ürettiği belirlenmiştir. Buna göre, pH ve sıcaklığın üretilen aflatoksin çeşidi üzerinde de önemli etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Keza, Buchanan ve Ayres (1975) besi ortamının başlangıç pH'sı arttıkça G tipi aflatoksin üretiminin ağırlık kazandığını ortaya koymuşlardır. Bu durumun temelinde aflatoksin üretiminden sorumlu gen bölgelerinin ifade edilme düzeyi yatmaktadır. Alkali ortam koşullarında *PacC* bağlanma bölgesi daha

fazla aktivite kazanırken; bu durumun AFB₁ üretimini desteklemediği ifade edilmektedir (Caceres ve diğ., 2020).

İnkübasyon süresince, IK5-D2 *A. flavus* izolatını içeren besi ortamının aflatoksin içeriğindeki değişim Şekil 4.37'de verilmiştir. İnkübasyonun ilk 6 gününde AFB₁ birikimi açısından önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ($P \geq 0.05$). Süre ilerledikçe aflatoksin üretimi hızlanmış ve örnekleme zamanları arasında anlamlı farklılıklar ($P < 0.05$) oluşmaya başlamıştır. İnkübasyonun 10. gününden itibaren aflatoksin üretim hızının ivmesini kaybetmeye başladığı görülmektedir. Özellikle 12 ve 13.8 günleri arasında besi ortamındaki aflatoksin konsantrasyonları arasında önemli bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, modellemenin öngördüğü aflatoksin üretiminin 13.8 günde zirveye ulaşacağı tahminini doğrulamaktadır.



Şekil 4.37 : Optimize koşullar altında besiyerindeki aflatoksin birikiminin süreye bağlı değişimi (Büyük harfler AFB₁; küçük harfler AFB₂ için istatistiksel önem düzeylerini ($P < 0.05$) göstermektedir).

pH, biyokimyasal yolların düzenlenmesinde önemli bir faktör olduğundan mikotoksin sentezini de etkilemektedir (Casquete ve diğ., 2017). Yapılan ölçümler inkübasyonun ilk günlerinde ortam pH'sında önemli değişimler meydana geldiğini göstermektedir. Ortam tamponlanmadığı için başlangıçta 8.0 olarak ayarlanan pH'nın 2. gün sonunda hızlı bir şekilde 5.81'e düştüğü saptanmıştır. pH, 6. günde 5.51 olarak ölçülmüş ve kalan günlerde önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir ($P \geq 0.05$). Benzer şekilde *A. flavus* veya *A. parasiticus* kültürleri ile yapılan geçmiş çalışmalarda da tamponlanmamış ortam pH'sının düşme eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (Cotty, 1988; Lisker ve diğ., 1993; Keller ve diğ., 1997; Ehrlich ve diğ., 2005).

Geçmiş çalışmalarda pH'nın aflatoksin üretimi üzerine etkisine dair ihtilaflı görüşler mevcuttur (Calvo ve diğ., 2002). Tamponlanmış besi ortamları kullanıldığında en yüksek AFB₁ üretimi pH 4.0 ve 5.0'te, en düşük üretim ise pH 8.0'de elde edilmiştir (Keller ve diğ., 1997). Das ve diğ. (2012), pH 3.0-9.0 arasında pirinç samanı üzerinde aflatoksin oluşumu görüldüğünü; en fazla toksin miktarına ise pH 4.5 ve 6.0'da ulaşıldığını ifade etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise pH 5.0 civarında aflatoksin üretiminin maksimum olduğunu belirtilmiştir (Hamed ve diğ., 2016). Farklı sonuçların elde edilmesine kullanılan suş çeşidi ve besiyeri bileşenlerindeki farklılığın sebep olduğu değerlendirilmektedir (Calvo ve diğ., 2002; Casquete ve diğ., 2017). Genel itibariyle hafif asidik pH koşullarında (4.5-6.0) aflatoksin üretiminin daha yüksek olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmada başlangıç pH'sının 8.0 olarak ayarlanmasıyla izolat gelişimi ve ortama adaptasyonunun hızlandırılmış olabileceği düşünülmüştür. Keza, *A. flavus* gelişiminin pH 7.5 civarında en yüksek hıza ulaştığı bildirilmektedir (Pitt ve Hocking, 2009). Bu zaman diliminde pH koşullarının yeterince elverişli olmamasına bağlı olarak aflatoksin birikiminin de düşük olduğu öngörülmektedir. pH'nın 5.5'e düşmesiyle aflatoksin üretiminin de hız kazandığı değerlendirilmektedir.

4.6.2 Yüksek hacimli aflatoksin üretimi

Optimize koşullarda gerçekleştirilen küçük ölçekli üretimlerde 100 mL besi ortamı içeren 250 mL hacimli erlenler kullanılmıştı. Ölçek arttırma çalışmaları ise yine optimize koşullarda 400 mL besi ortamı içeren büyük erlen (1000 mL hacimli) ve 1000 mL besi ortamı içeren biyoreaktör (2000 mL hacimli) ortamlarında yürütülmüştür. IK5-D2 *A. flavus* izolatı kullanılarak farklı üretim ortamlarından elde edilen aflatoksin verimleri Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14 : Farklı besiyeri hacimleri kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen aflatoksin miktarları *.

Üretim ortamı	AFB ₁ (ng/mL)	AFB ₂ (ng/mL)	Toplam (ng/mL)	Üretim kapasitesi (µg/parti)
Küçük erlen (100 mL besiyeri / 250 mL erlen hacmi)	27244.5 ± 2693.3 ^a	681.8 ± 67.5 ^a	27926.3 ± 2760.8 ^a	2792.6 ± 276.1 ^a
Büyük erlen (400 mL besiyeri / 1000 mL erlen hacmi)	20117.0 ± 1286.1 ^b	675.1 ± 37.6 ^a	20792.1 ± 1269.3 ^b	8316.8 ± 507.7 ^b
Biyoreaktör (1000 mL besiyeri / 2000 mL reaktör hacmi)	25.9 ± 0.9 ^c	0.9 ± 0.0 ^b	26.8 ± 0.9 ^c	26.8 ± 0.9 ^c

* Her sütunda, kendi içerisindeki anlam düzeyine göre istatistiksel harflendirme yapılmıştır.

Erlen ortamındaki besiyeri hacminin arttırılması AFB₂ üretiminde anlamlı bir düşüşe sebep olmazken ($P \geq 0.05$); AFB₁ miktarındaki değişimin önemli olduğu ($P < 0.05$) tespit edilmiştir. Biyoreaktör ortamında ise her iki aflatoksin miktarında da ciddi bir düşüş meydana geldiği ve erlen üretimleriyle arasındaki farkın önemli düzeyde ($P < 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Biyoreaktör üretimindeki belirgin düşüşe ortamın havalandırma ve karıştırma şeklinin sebep olmuş olabileceği değerlendirilmiştir. Codner ve diğ. (1963), mevcut çalışmayla benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Belirtilen çalışmada orbital çalkalamaya bırakılan 250 mL'lik erlenlerde aflatoksin üretimi oldukça yüksek iken; 3 ve 20 L hacimli havalandırılmalı ve karıştırmalı fermentörlerde yapılan üretim denemesi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Havalandırmanın aflatoksin üretimi üzerine etkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Shih ve Marth (1973), dışarıdan fermentöre verilen hava miktarı arttırıldıkça ortamdaki aflatoksin miktarının düştüğünü belirlemişlerdir. Buna karşın, içeri doğrudan hava akışı sağlanmayan fermentör ortamında daha yüksek aflatoksin verimi elde etmişlerdir. Üretim ortamına dışarıdan hava verilmesinin aflatoksin üretimini azaltıcı yönde etki yaptığı ifade edilmektedir. Esasında oksijen, küf gelişimi ve mikotoksin üretimi için elzemdir. Ancak besi ortamına yoğun oksijen girişi aflatoksin üretimini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, mevcut çalışmada biyoreaktör ortamının zorlamalı şekilde (pompa vasıtasıyla) havalandırılmasından özellikle imtina edilmiştir. Erlen üretiminde erlenin ağız kısmı pamuk ile kapatılarak ortam kendiliğinden havalandırmaya bırakılmıştır. Biyoreaktörde ise hava akışı, ucuna steril gaz filtresi (0.20 μm) takılmış iki ayrı havalandırma açıklığından sağlanmıştır. Steril gaz filtrelerinin iç ortama yeterince hava akışı sağlayamamış olabileceği değerlendirilmiştir.

Reaktör sisteminde yaşanan başarısızlıkta asıl sorunun karıştırma şeklinden ileri geldiği düşünülmektedir. Erlen üretimlerinde karıştırma işlemi orbital çalkalama şeklinde yürütülmüştür. Biyoreaktör ortamında ise karıştırma işlemi impeller pedal vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Orbital çalkalamalı ortamda *A. flavus* sporları homojen küresel tanecikler halinde gelişme göstermiştir. Reaktör içerisinde ise miselya gelişiminin yosun benzeri lifler halinde gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.38). Misel gelişim şekilleri arasındaki farkın elde edilen aflatoksin verimi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Ciegler ve diğ. (1966) tarafından yapılan çalışma sonuçları da bu varsayımı destekler niteliktedir. Keza, belirtilen çalışmada iri pellet/tane şeklinde gelişimin daha az aflatoksin üretimine sebep olduğu; partiküllerin ince, küçük ve iyi dağılmış olmasının aflatoksin verimini de arttırdığı ifade edilmiştir. Reaktör ortamında yüksek impeller hızının miselyum

yapısında yırtılmalara sebep olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle fungus çalışmalarında yüksek hızda (750-1000 rpm) çalışan küçük impeller yerine, düşük hızda (350-500 rpm) çalışan büyük impeller kullanımı önerilmektedir (Hidy ve diğ., 1977). Her ne kadar mevcut çalışmada düşük impeller hızı (220 rpm) kullanılmış olsa da pedalların dönüş esnasında misel yapısını parçaladığı tespit edilmiştir. Misel yapısındaki parçalanmanın aflatoksin üretimini iki açıdan etkilemiş olabileceği değerlendirilmektedir. İlk olarak, yırtılmaların miselya olgunlaşmasını ve dolayısıyla aflatoksin üretimini geciktirmiş olabileceği düşünülmüştür. Diğer taraftan, misel yapısı parçalandıkça üretilen aflatoksini degrade edecek bazı enzimlerin besi ortamına salınmış olabileceği değerlendirilmektedir. Geçmiş bir çalışmada, miselyanın parçalanması veya homojenize edilmesi sonucu aflatoksinleri degrade eden bazı intramisel maddelerin ortama salındığı belirlenmiştir (Huynh ve Lloyd, 1984). Misel şekli ve karıştırma tipinin aflatoksin üzerine etkisine dair literatürde başka veri veya değerlendirme bulunmaması elde edilen bulguların önemini daha da arttırmaktadır. Sonuç olarak biyoreaktörün tasarımından ileri gelen dezavantajlar nedeniyle aflatoksin üretimi için uygun bir ortam olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.38 : Büyük hacimli erlen (a) ve biyoreaktör (b) ortamında aflatoksin üretimleri.

Araştırmanın nihai amacı dikkate alındığında ortaya konan üretim modelinin endüstriyel açıdan uygulanabilir olması önem arz etmektedir. Bu bağlamda belirlenen prosesin ekonomik, verimli ve yeterli miktarda mikotoksin üretimi sağlaması gerekmektedir. Tek bir partide (batch) en yüksek aflatoksin üretimi (8316.8 µg toplam aflatoksin) büyük erlen ortamında elde edilmiştir. Buradaki aflatoksin miktarının diğer erlen veya biyoreaktör ortamlarındaki toplam üretim miktarlarıyla arasında önemli seviyede ($P < 0.05$) fark olduğu bulunmuştur. Piyasadaki standart çözeltilerin aflatoksin

içeriği üretici firmaya göre farklılık göstermekle birlikte çoğunlukla 2 µg AFB₁/mL asetonitril ve 0.5 µg AFB₂/mL asetonitril şeklinde satışa sunulmaktadır (Anonim, 2022c). Bu durum dikkate alındığında büyük erlen içerisinde üretimin oldukça yüksek aflatoksin miktarı sağladığı görülmektedir. Bu nedenle, saflaştırma sürecinde büyük erlen ortamından elde edilen ekstraktların kullanılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir.

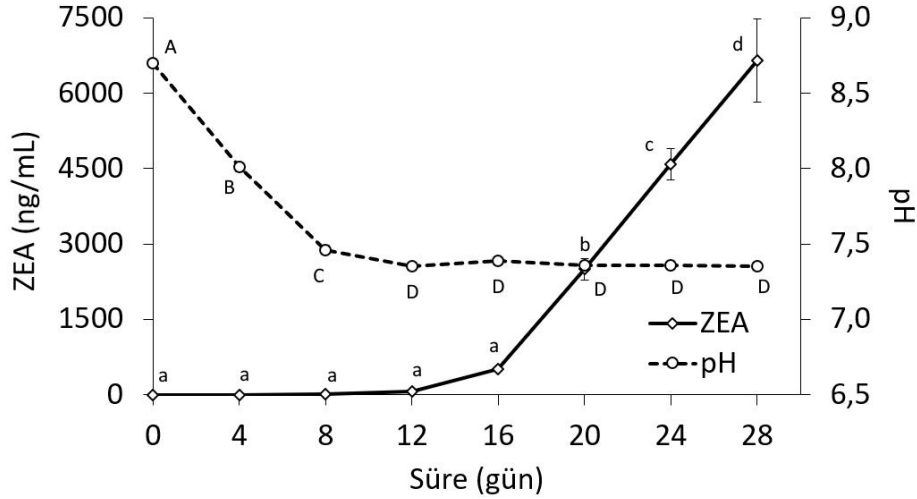
4.6.3 Optimum koşullarda zearalenon üretimi

Optimizasyon çalışması sonunda en yüksek ZEA üretimine ulaşılması beklenen gelişim koşulları pH 8.70, sıcaklık 16.20 °C ve süre 28.00 gün olarak belirlenmişti. Modellemeye göre belirtilen koşullarda %95 güven aralığında 6537.1 ile 9423.2 ng/mL arasında ZEA üretilbileceği hesaplanmıştır. Modelde, gerçekleşmesi en muhtemel ZEA üretim tahmini 7980.2 ng/mL olarak öngörülmüştür. Optimize koşullarda yürütülen ve 100 mL besiyeri içeriğine sahip erlen denemelerinde 6645.9±829.5 ng/mL ZEA üretildiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuç modelden türetilen tahmin değerine yakın olup; %95 güven aralığı içerisinde yer almaktadır. Buna göre, modelin B1-D1 *F. culmorum* izolatu ile ZEA üretim sürecini ifade etmede yeterli güvenilirliği sağladığı sonucuna varılmıştır. Belirtilen koşullar aynı zamanda FcUK99 *F. culmorum* kültürünü de daha fazla ZEA üretmeye teşvik etmiş ve referans kültür ortamında 1391.0±92.5 ng/mL düzeyinde ZEA birikimi sağlanmıştır. Ancak yine de referans kültürün ZEA üretimi B1-D1 izolatına kıyasla anlamlı düzeyde ($P < 0.05$) düşük kalmıştır.

Besi ortamında ZEA varlığı 8. günden itibaren tespit edilmeye başlanmıştır. İlk 16 gün ortamdaki ZEA konsantrasyonları arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P \geq 0.05$) (Şekil 4.39). ZEA'nın besiyerinde tespit edilebilir düzeye ulaşması için gerekli inkübasyon süresi çeşitli gelişim koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Ezekiel ve diğ. (2008), 25 °C'de gerçekleştirdikleri çalışmada substrat buğday iken 12. günde; soya fasulyesi iken 24. günde ortamındaki ZEA varlığını tespit edebilmişlerdir. Böylelikle substrat çeşidinin bir diğer ifadeyle besi ortamı bileşiminin ZEA üretim hızını etkilediği ortaya konmuştur. Martins ve Martins (2002) ise farklı sıcaklıklarda depolanan kontamine kırık mısır örneklerinde ZEA oluşumunun farklı zamanlarda gerçekleştiğini bulmuşlardır. Mevcut çalışmada besi ortamındaki ZEA miktarı 16. günden sonra lineer bir artış göstermiş ve inkübasyon sonuna kadar bu artış devam etmiştir. Benzer şekilde Zill ve diğ. (1988), ZEA oluşumunun 1 haftalık inkübasyon sonunda yavaş yavaş başladığını ve 14. günden itibaren hız kazanarak devam ettiğini bildirmişlerdir. Çeşitli çalışmalarda da ZEA

birikiminin 4-5 haftalık zaman dilimi boyunca sürekli bir artış gösterdiği ifade edilmektedir (Martins ve Martins, 2002; Ezekiel ve diğ., 2008; Wu ve diğ., 2017).

Üretim sırasında gerçekleşen pH değişimi incelendiğinde 12 günde pH'nın 8.70'ten 7.35'e kadar gerilediği belirlenmiştir (Şekil 4.39). Bu noktadan sonra inkübasyon süresinin sonuna dek pH'da önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir ($P \geq 0.05$). pH'nın 7.50'nin altına düşmesi ve mikotoksin üretiminin başlaması eşzamanlı olmuştur. Bu nedenle hafif alkali veya nötral pH'daki ortamların ZEA üretimini teşvik ettiği değerlendirilmiştir. *F. oxysporum* kullanılan geçmiş bir çalışmada, en yüksek miselyal kitle artışı ve ZEA üretiminin pH'nın 7 olduğu ortam koşullarında gerçekleştiği bulunmuştur (El-Kady ve El-Maraghy, 1982). Wu ve diğ. (2017) ise besi ortamının alkali nitelikte (pH 9.0) olmasının *F. graminearum* kültürünü daha fazla ZEA üretimine teşvik ettiği sonucuna varmışlardır. Geçmiş çalışmalarda ortamın tamponlanmamış olması ve inkübasyon esnasında pH takibinin yapılmaması pH'nın ZEA üretimi üzerindeki etkisine dair kesin bir kıyas yapılmasını olanaksız kılmaktadır. Ancak genel bulgular alkali veya nötral ortamlarda ZEA üretiminin daha yüksek olduğu yönündedir. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar da bu görüşü desteklemektedir.



Şekil 4.39 : İnkübasyon süresi ve pH'ya bağlı ZEA miktarındaki değişim (Büyük harfler pH; küçük harfler ZEA miktarı için istatistiksel önem düzeylerini ($P < 0.05$) göstermektedir).

4.6.4 Yüksek hacimli zearelenon üretimi

B1-D1 *F. culmorum* izolatu kullanılarak yürütülen çalışmada 100 mL besi ortamı içerisinde inkübasyon sonunda 6645.9 ng/mL düzeyinde ZEA birikimi olduğu belirlenmişti. Besiyeri hacminin 400 mL'ye çıkarılmasıyla 5761.4 ± 347.9 ng/mL ZEA üretimi elde edilmiştir (Çizelge 4.15). Yapılan erlen üretimlerinde ZEA konsantrasyonları

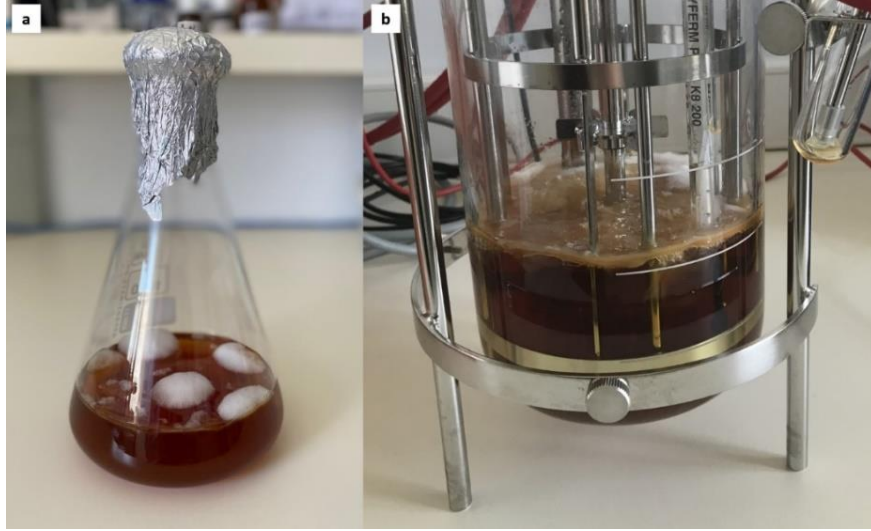
bakımından önemli düzeyde bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($P \geq 0.05$). Buna karşın, 1000 mL besiyeri hacmine sahip biyoreaktör sisteminde mikotoksin verimi anlamlı bir düşüş ($P < 0.05$) göstermiş ve ortamda yalnızca 330.1 ± 12.4 ng/mL düzeyinde ZEA bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.15 : Farklı besiyeri hacimleri kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen ZEA miktarları.*

Üretim ortamı	ZEA (ng/mL)	Üretim kapasitesi (µg/parti)
Küçük erlen (100 mL besiyeri / 250 mL erlen hacmi)	6645.9 ± 829.5^a	664.6 ± 83.0^a
Büyük erlen (400 mL besiyeri / 1000 mL erlen hacmi)	5761.4 ± 347.9^a	2304.6 ± 139.2^b
Biyoreaktör (1000 mL besiyeri / 2000 mL reaktör hacmi)	330.1 ± 12.4^b	330.1 ± 12.4^c

* Her sütunda, kendi içerisindeki anlam düzeyine göre istatistiksel harflendirme yapılmıştır.

Erlen ortamında gerçekleştirilen geçmiş bir çalışmada da yüksek miktarda ZEA üretimi sağlanmıştır (Wu ve diğ., 2017). Ancak, endüstriyel ölçekli reaktör sistemlerinde yürütülen çalışmaların başarısızlıkla sonuçlandığı ifade edilmektedir (Hidy ve diğ., 1977). Bilhassa, daldırma (submerge) tip fermentörlerde yüksek verimle ZEA üretimi için mutant suş kullanımının elzem olduğu bildirilmektedir (Hidy ve diğ., 1977; Leslie, 1983; Smalley ve Lin, 1990). Yapılan fermentör denemesinde temel problemin oksijene sınırlı erişim olduğu düşünülmektedir. Referans kültürler *F. graminearum* ve *F. culmorum* da dahil olmak üzere yapılan tüm denemelerde kültürlerin sıvı besi ortamı yüzeyinde bir zar gibi gelişim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.40). Kültür, bir taraftan yüzeyin üst kısmında havayla doğrudan temas ederken diğer taraftan da sıvı ortamdan besin öğelerini alarak ZEA üretimi gerçekleştirmiştir. Erlen denemesinden biyoreaktör denemesine geçişte, havayla temas eden yüzey alanı besiyeri hacmi ile doğru orantılı bir şekilde artmamaktadır. Bu nedenle, biyoreaktörde havayla temas eden yüzey alanının erlen üretimine kıyasla daha az olmasının ZEA üretimini kısıtlayan bir faktör olduğu düşünülmüştür. Reaktör sisteminde gözlenen bir diğer olumsuzluk ise aşılama esnasında ortama bırakılan bazı agar kesitlerinin dibe batma eğilimi göstermesidir. Erlen denemelerinde besi ortamının dip ve yüzey katmanları arası mesafe kısa iken biyoreaktör ortamında bu mesafe oldukça derindir. Biyoreaktörde dibe doğru sürüklenen kesitlerde küf gelişiminin çok yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun elde edilen ZEA verimini üzerine olumsuz etkilemiş olabileceği değerlendirilmektedir.



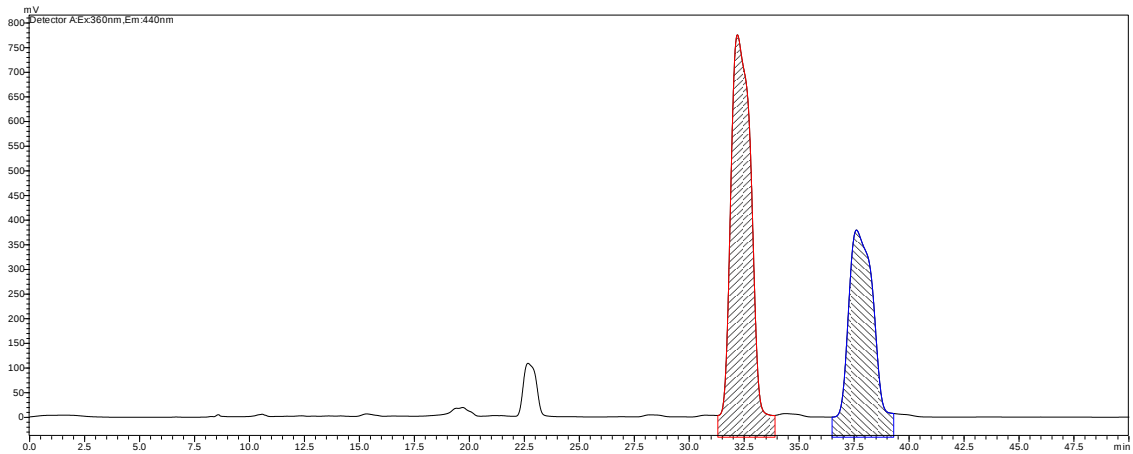
Şekil 4.40 : Büyük hacimli erlen (a) ve biyoreaktör (b) ortamında ZEA üretimleri.

Piyasaya arz edilen standart çözeltilerin içeriğinde genellikle 100 µg/mL ZEA bulunmaktadır (Anonim, 2022c). Hacim artırma çalışmasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde tek bir üretimde (batch) en fazla ZEA eldesini (2304.6 µg) büyük erlen denemesi sağlamıştır. Tıpkı aflatoksin üretiminde olduğu gibi büyük erlen denemesi toplam üretim kapasitesi açısından burada da diğer deneme ünitelerinden önemli farkla ($P < 0.05$) ayrılmaktadır. Bu nedenle, saflaştırma çalışmasında da büyük erlen denemelerinden elde edilen ekstraktların kullanılması uygun görülmüştür.

4.7 Mikotoksin Saflaştırması ve Doğrulama

4.7.1 Yarı-preparatif sistemde aflatoksinlerin ayrıştırılması

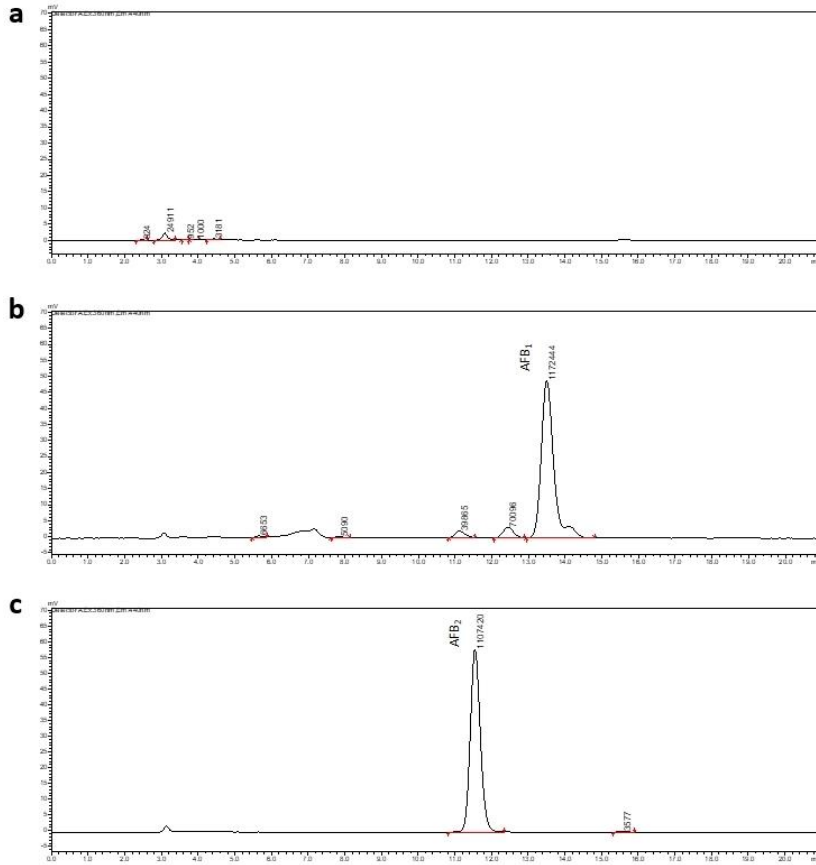
Preparatif kolonda AFB₂ fraksiyonu ortalama 31.25±0.05 ile 34.05±0.15 dk'ları arası; AFB₁ fraksiyonu ise 36.48±0.24 ile 39.31±0.19 dk'ları arasında toplanmıştır (Şekil 4.41). Hareketli fazın akış hızı 6.0 mL/dk olduğundan toplam 8 enjeksiyon sonunda 136.2 mL AFB₁ ve 134.4 mL AFB₂ fraksiyonu içeren çözelti biriktirilmiştir. Enjeksiyonlarda kolona yüklenen toplam AFB₁ ve AFB₂ miktarı sırasıyla 10796.91 ng ve 385.49 ng olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.41: AFB₁ (mavi) ve AFB₂ (kırmızı) fraksiyonlarının yarı-preparatif sistemde besiyeri ekstraktlarından ayrıştırılması.

Çözücüsü uçurulan mikotoksin fraksiyonları asetonitril ile rekonstitüe edildikten sonra çözelti içerisinde 158.54 ng/mL AFB₁ ve 5.74 ng/mL AFB₂ bulunması gerektiği hesaplanmıştır. Analitik kolonda gerçekleştirilen HPLC analizleri sonunda çözeltilerin içerisinde 115.99 ng/mL AFB₁ ve 4.75 ng/mL AFB₂ bulunduğu tespit edilmiştir. Buna göre AFB₁ ve AFB₂ mikotoksinlerinin besiyerinden yarı-preparatif olarak ayrıştırılmasında geri kazanım oranları sırasıyla %73.2 ve %82.8 olarak belirlenmiştir.

Saflığın belirlenmesinde kolona öncelikle örnek içermeyen boş mobil faz enjekte edilmiş; hareketli fazdan ileri gelen pik bulunup bulunmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 4.42a). Daha sonra sırasıyla sisteme AFB₁ ve AFB₂ çözeltileri verilerek mikotoksine ve diğer safsızlıklara ait pik alanları belirlenmiştir (Şekil 4.42b-c). Yapılan değerlendirmede AFB₁ ve AFB₂ çözeltilerinin sırasıyla %90.3±0.5 ve %99.6±0.1 HPLC saflığında olduğu belirlenmiştir. Aflatoksinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasına yönelik çalışma sayısı oldukça sınırlı olup; bu çalışmaların çoğunda elde edilen ekstraktların saflık değerlerine ilişkin veri bulunmamaktadır. Stubblefield ve diğ. (1968), silika jel kolon kullanarak kontamine pirinç ve buğday örneklerinden aflatoksinleri ayırmayı başarmıştır. Elde edilen fraksiyonların toplam aflatoksin içeriğinin %75-94 (a:a) arasında değiştiğini bulmuşlardır. Bir başka çalışmada ise santrifüjlü partiyon kromatografisi kullanılarak sıvı besi ortamından %96 üzeri saflıkta aflatoksin fraksiyonları elde edilmiştir (Endre ve diğ., 2019).



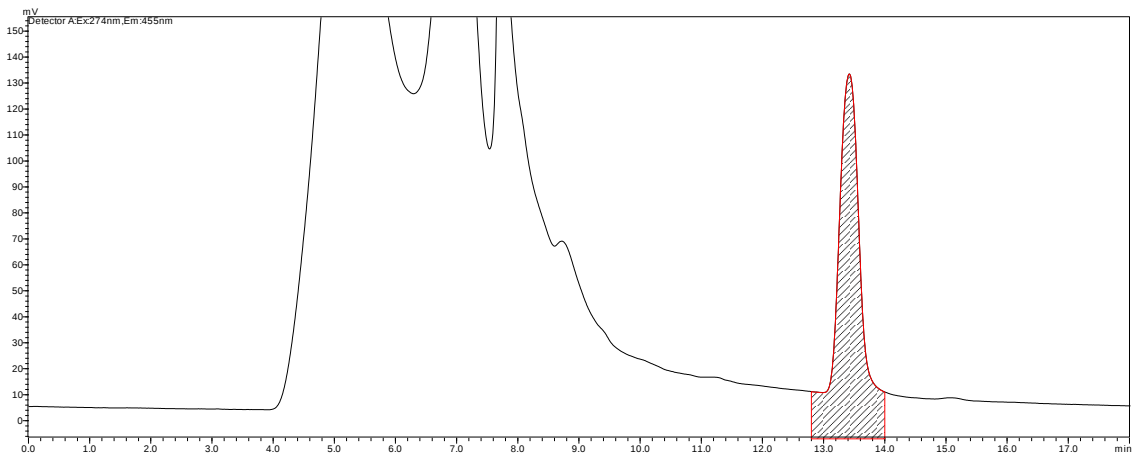
Şekil 4.42 : Boş mobil faz (a), AFB₁ (b) ve AFB₂ (c) çözeltilerine ait HPLC kromatogramları.

Piyasada satışa sunulan mikotoksin kalibrasyon standartlarının saflık oranları genellikle %95 ve hatta %99'un üzerinde olduğu iddia edilmektedir. Ancak yapılan çalışmalar standart maddelerdeki saflık oranının belirtilen değerlerin altında kaldığını göstermektedir (Krska ve diğ., 2005). Bennett ve Shotwell (1990), piyasadaki standartlarda saflık oranının %90'a kadar düşebildiği tespit etmişlerdir. Çalışmanın temel amacını izolatlar tarafından üretilen mikotoksinlerin yüksek saflıkta ($\geq$ %90) eldesi oluşturmaktadır. Bu sonuçlara göre, aflatoksin çözeltilerinin üretiminde başlangıçta hedeflenen saflık düzeylerine ulaşıldığı görülmektedir. Aflatoksin analitik standartlarında %95 üzeri bir saflık gıda analizlerinde kullanımı için yeterli görülmektedir (FSSAI, 2020). Hali hazırda üretilen AFB₂ çözeltisinin analitik standart olarak kullanılabilecek bir saflık düzeyine (>%95) ulaştığı belirlenmiştir. Gerekli görülmesi halinde yarı-preparatif ayırım metodu üzerinde küçük iyileştirmeler yapılarak AFB₁ çözeltisinin de saflık düzeyinin %95 üzerine çıkarılabileceği düşünülmektedir. Örneğin birden fazla kez kolonda yürütülmesiyle pik çözünürlüğü ve ayırımın arttığı; bu sayede daha yüksek saflık değerlerine ulaşıldığı ifade edilmektedir (Jibril ve diğ., 2018; Speybrouck ve diğ., 2020; Anonim, 2022e). Ayrıca

mevcut teknolojik altyapıya bağılı olarak preparatif sistemde geri dönüştürme (recycling) uygulamasıyla kullanılan solventten de tasarruf edilebileceği belirtilmektedir (Speybrouck ve diğ., 2020; Anonim, 2022e).

4.7.2 Yarı-preparatif sistemde zearalenonun ayrıştırılması

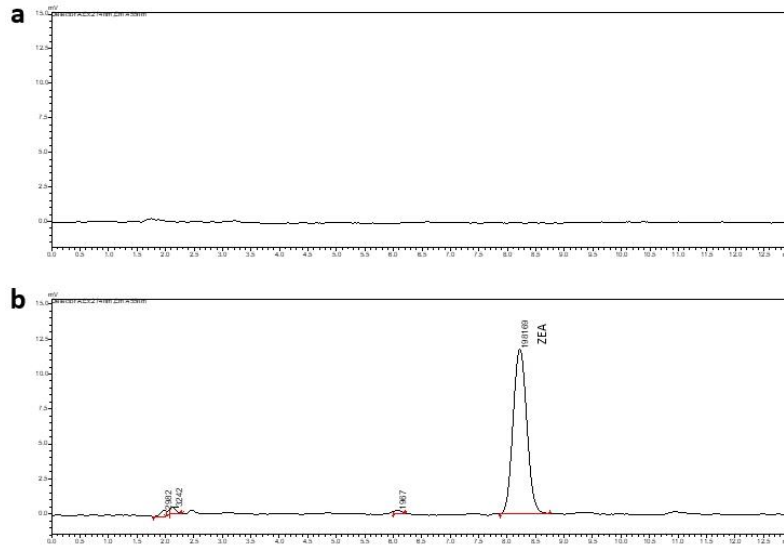
Preparatif kolonda ZEA fraksiyonunun ortalama alıkonma sürelerinin 12.90 ± 0.18 ile 14.13 ± 0.20 dk'ları arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.43). ZEA fraksiyonlarını toplama amacıyla toplam 11 enjeksiyon yapılmış ve bölümlendirme işlemi sonucunda 87.75 mL fraksiyon toplanmıştır. Bu enjeksiyonlar sırasında kolona toplam 6337.54 ng ZEA yüklenmiştir. ZEA fraksiyonunun solventi uçurulup yerine asetonitril ilave edildikten sonra çözeltinin konsantrasyonunun 144.45 ng/mL olması gerektiği hesaplanmıştır. Yapılan analiz sonucu çözeltideki ZEA konsantrasyonu 131.51 ng/mL; geri kazanım oranı ise %91.04 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.43 : ZEA (kırmızı) fraksiyonunun yarı-preparatif sistemde besiyeri ekstraktından ayrıştırılması.

Örnek içermeyen hareketli fazın analitik kolonda analizi sonucu, mobil faz kaynaklı bir pik oluşumuna rastlanmamıştır (Şekil 4.44a). Saflaştırılmış ZEA örneği kolona yüklendiğinde safsızlıktan ileri gelen üç pik tespit edilmiştir. Yapılan hesaplama sonucunda ZEA fraksiyonunun saflık oranı $\%95.4 \pm 1.8$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.44b). Elde edilen sonuç çalışmada hedeflenen saflık değerine ($\geq \%90$) uygun bulunmuştur. Ayrıca, üretilen ZEA çözeltisinin ek bir saflaştırma prosedürüne ihtiyaç duyulmaksızın gıda analizlerinde kullanılabilecek düzeyde yüksek saflığa ($> \%95$) sahip olduğu belirlenmiştir. Wu ve diğ. (2017), *F. graminearum* izolatu kullanarak ürettikleri ZEA'yı preparatif HPLC sisteminde ayrıştırmış ve elde edilen ürünün saflık değerinin %87 olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve diğ. (2019), önce makrogözenekli reçine ardından da

preparatif kromatografi olmak üzere iki basamaklı saflaştırma işlemi yürütmüş ve ürünün saflığını %98.9'a kadar yükseltmeyi başarmışlardır. Ancak iki basamaklı işlem nedeniyle geri kazanım oranı (%73.9) mevcut çalışmaya göre düşük kalmıştır.



Şekil 4.44 : Boş mobil faz (a) ve ZEA (b) çözeltilerine ait HPLC kromatogramları.

4.7.3 Fraksiyonların doğrulanması

Her bir mikrobiyal tür içerisinde bulunduğu gelişme ortamı ve koşullarına bağlı olarak çok sayıda metabolit üretir (Magan ve Aldred, 2007). Bu metabolitlerden bir kısmı mikroorganizma tarafından gelişme ortamına bırakılmaktadır (CAST, 2003). Ortamın çok sayıda kompleks bileşik içermesi mikotoksin analizlerini güçleştirmekte ve ekstraktın analit dışındaki yabancı maddelerden temizlenmesini elzem kılmaktadır. Bu amaçla, mikotoksin analizlerinde çoğunlukla immüno affinite kolon (İAK) kullanılmakta ve matris etkisi giderilmeye çalışılmaktadır (Pascale ve Visconti, 2008). Optimizasyon sonrası yapılan üretimlerde oldukça yüksek mikotoksin konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. İAK'ların düşük mikotoksin bağlama kapasitesine sahip olmaları nedeniyle yarı-preparatif saflaştırma öncesi ekstrakta bir ön temizlik işlemi uygulanmamıştır. Buna bağlı olarak, elde edilen fraksiyonlarda girişime sebep olabilecek birtakım safsızlıkların bulunabileceği ve mikotoksin varlığının ikinci bir tespit yöntemiyle doğrulanması gerektiği değerlendirilmiştir.

Sıvı kromatografisine entegre kütle spektrometresi (LC-MS), mikotoksinlerin doğrulanmasında uzun yıllardır kullanılan başlıca yöntemdir (Pascale ve Visconti, 2008). Son yıllarda, üçlü kuadrupol MS sistemleri hem düşük hem de yüksek molekül ağırlığına sahip analitlerin doğrulanmasında oldukça hassas ve seçici bir teknik olarak öne

çıkılmaktadır (Herebian ve diğ., 2009). Çalışmada, HPLC sisteminde floresans dedektör kullanılarak ulaşılan sonuçların nitel ve nicel olarak doğrulanması için de sıvı kromatografisi üçlü kuadrupol kütle spektrometresinden (LC-TQ/MS) yararlanılmıştır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 : Çoklu görüntüleme modunda mikotoksin analizleri için kullanılan LC-TQ/MS parametreleri.

Analit	Öncül iyon [M+H] ⁺ (m/z)	Ürün iyon (m/z)	Gecikme süresi (ms)	Parçalanma enerjisi (v)	Çarpışma enerjisi (v)	Polarite
AFB ₁	313.0	285.0* / 240.9	30	130	22 / 38	Pozitif
AFB ₂	315.0	287.0* / 258.9	30	140	24 / 30	Pozitif
AFG ₁	329.0	242.9* / 200.0	30	120	26 / 38	Pozitif
AFG ₂	331.0	312.9* / 245.0	50	120	24 / 30	Pozitif
ZEA	317.0	130.9* / 174.9	50	130	12 / 20	Negatif

* Kantitatif iyon.

Çalışmanın iki farklı evresinde LC-TQ/MS analizi ile doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak optimizasyon çalışmasına geçilmeden önce seçili izolatin bulunduğu besi ortamındaki mikotoksin varlığı teyit edilmiştir. Bu analizlerde, IK5-D2 *A. flavus* izolatinın kullanıldığı besiyeri ekstraktlarında AFB₁ ve AFB₂ mikotoksinlerinin varlığı doğrulanmış ancak G tipi mikotoksinler tespit edilememiştir. B1-D1 *F. culmorum* izolatinın geliştirildiği besiyeri ekstraktlarında da ZEA varlığı teyit edilmiştir. Bu sonuçlar, HPLC analizlerinde elde edilen çıkarımları doğrulamaktadır. İkinci olarak, saflaştırma sonrası yüksek saflıktaki mikotoksin çözeltilerinin içeriği değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Beklenildiği üzere her örnek vialinin içeriğinde, preparatif olarak toplanan fraksiyona ait mikotoksin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil C.1). Elde edilen kalitatif ve kantitatif sonuçlar HPLC analizleri ile uyumlu bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye, üretim miktarı ve ihracat hacmi bakımından dünyanın en önemli tarım ülkeleri arasında yer almaktadır. Yapılan çeşitli bilimsel araştırmalar, gümrük ve piyasa denetimleri, Türkiye menşeli tarım ürünlerinde en temel sorunun mikotoksin oluşumu olduğunu göstermektedir. Ancak ne yazık ki mikotoksin analizlerinde ihtiyaç duyulan analitik standartların yerli üretimi yapılmadığından bu maddeler yurt dışından oldukça yüksek bedellerle ithal edilmektedir. Tespit edilen eksikliği gidermek üzere, mevcut çalışmada en az bir mikotoksin çeşidinin %90 ve üzeri saflıkta yerli olarak üretimi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yerli kaynaklardan küf izolatlarının eldesi, mikotoksijenik özelliği olanların seçilmesi, mikotoksin üretiminin optimizasyonu, üretim hacminin artırılması ve mikotoksinlerin yüksek saflıkta eldesi hedeflenmiştir.

Kültür koleksiyonlarından temin edilecek suşlarla çalışmak ürünün ticarileştirilmesi ve endüstriyel mikotoksin üretimi açısından telif riski barındırmaktadır. Bu nedenle, çalışmaya ilk olarak yerli izolatların eldesi ile başlanmıştır. İzolasyonda, doğrudan yapıştırma yönteminin yoğun küf yükü barındıran örneklerde başarısız olduğu görülmüştür. Küf izolasyonunda yüzey dezenfeksiyonu ve dilüsyon uygulamalarının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. İzolasyonda çok sayıda küf suşu elde edilmesi mikotoksijenik türlere rastlama ihtimalini arttırmıştır.

İzolatların koloni gelişimlerinin kimi durumlarda birbirine oldukça benzer olduğu bulunmuştur. Küfler, hücresel yapı ve organizasyon bakımından oldukça karakteristik özelliklere sahip olduğundan mikroskopik inceleme izolat cinsleri hakkında daha detaylı bilgiler sağlamıştır.

AFPA besi ortamı *A. flavus/parasiticus* türlerinin seçilmesinde %100 doğruluk oranıyla sonuç vermiştir. Aflatoksijenik türlerin görsel olarak tespitinde CMA besiyeri kullanımının daha doğru sonuçlar verdiği görülmüştür. Ancak, ışıma veya renk değişiminin nispeten zayıf olduğu bazı durumlarda hatalı pozitif sonuç elde edilebilmektedir. Bu nedenle, aflatoksijenik türlerin kesin tanısı için kromatografik analizlerden de faydalanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, *Fusarium* şüpheli izolatların MGA seçici besi ortamında genel olarak iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Nihai değerlendirmede ise bu besiyerinde iyi gelişim gösteren her izolatın *Fusarium* sp. olmayabileceği ortaya konmuştur. Moleküler analiz sonucunda *Aspergillus*, *Penicillium* ya da *Fusarium* sp. olarak sınıflandırılan 44 izolattan 42'sinin (%95.5) bu cinslere ait olduğu

belirlenmiştir. Yapılan makroskobik ve mikroskobik değerlendirmelerin izolat cinslerini belirlemede oldukça başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, çok sayıda *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* izolatı eldesi çalışmanın ilk aşaması için belirlenen hedefe ulaşıldığını göstermektedir.

İzolatlar arasında yüksek miktarda aflatoksin ve ZEA üretebilen türlerin bulunduğu tespit edilirken; OTA ve DON üreticisi suşa rastlanmamıştır. Bu sonuç, en az bir mikotoksin çeşidinin üretilmesi yolunda önemli bir hedefin başarıyla gerçekleştirildiğine işaret etmektedir. Seçili izolatlar içerisinde en yüksek aflatoksin üretimini IK5-D2 kodlu *A. flavus* izolatı sağlarken; en yüksek ZEA üretimi ise B1-D1 kodlu *F. culmorum* izolatı tarafından gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analiz bu iki izolatın sırasıyla aflatoksijenik MAM-200682 *A. flavus* ve ZEA üreticisi FcUK99 *F. culmorum* referans kültürleriyle ortak atadan geldiklerini göstermektedir. Bunun yanı sıra, evrimsel tarihlendirmede her ne kadar NRRL 2999 *A. parasiticus* kültürüne (güçlü bir aflatoksin üreticisi) oldukça yakın olsa da PBM4 *A. tamarii* izolatının aflatoksin üretmediği tespit edilmiştir. Buna göre, genetik yakınlık mikotoksin üreticisi türler hakkında bir fikir sağlasa da birbirine akraba her türün mikotoksijenik olmayabileceği sonucuna varılmıştır.

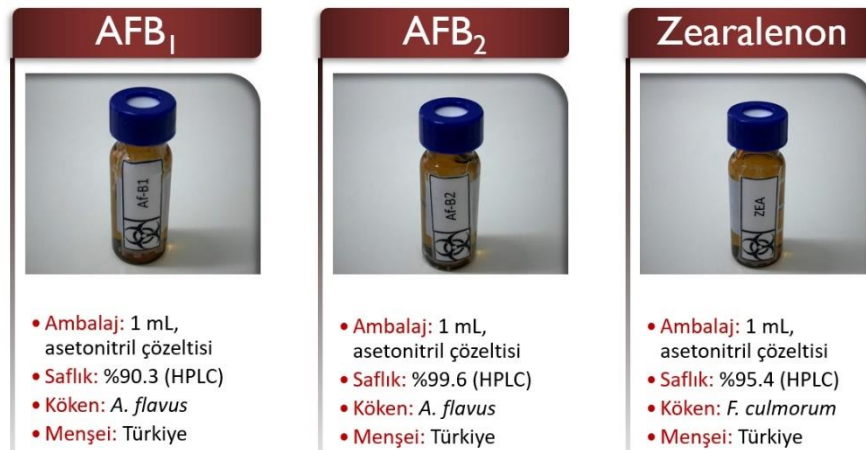
Hem aflatoksin hem de zearalenon üretiminde pH, sıcaklık ve sürenin önemli etkisi olduğu görülmüştür. Her iki mikotoksin çeşidinin üretiminde de yüksek başlangıç pH'sı uygulanmasının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. 22-28 °C arasında aflatoksin üretimi artarken; sıcaklığın 34 °C düzeyine çıkmasıyla aflatoksin veriminde ciddi bir düşüş yaşandığı tespit edilmiştir. Geçmiş çalışmalar da dikkate alındığında, aflatoksin senteziyle ilgili genlerin ifade edilmesinde sıcaklığın oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. ZEA üretiminde ise 16-22 °C'lerde daha yüksek mikotoksin verimi elde edilmiştir. Soğuk stresinin *F. culmorum* izolatını daha fazla ZEA üretimi yapmaya teşvik ettiği varsayılmaktadır.

Üretim koşullarının optimize edilmesiyle besiyerindeki mikotoksin birikiminde önemli bir artış sağlanmıştır. Mikotoksin (AFB₁, AFB₂ ve ZEA) üretim modellerine göre ulaşılması beklenen maksimum miktarlar ile gerçekleşen miktarların birbiri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç mikotoksin üretiminin istatistiksel olarak modellenabilir bir süreç olduğunu ifade etmektedir. Elde edilen modeller, mikotoksin üretiminin artırılması hedefine başarıyla katkı sağlamıştır.

Optimize koşullarda gerçekleştirilen erlen üretimlerinde ortamdaki mikotoksin miktarı ve pH değişimi arasındaki ilişki incelenmiştir. Gerek aflatoksin gerekse ZEA üretim denemelerinin ilk günlerinde pH'nın hızlı bir şekilde düştüğü; sonraki günlerde ise pH'da anlamlı bir değişim yaşanmadığı tespit edilmiştir. İnkübasyonun ilk günlerinde alkali olan ortam pH'sının küf gelişimini ve ortama adaptasyonunu kolaylaştırdığı varsayılmaktadır. Ortamın hafif asidik/nötral pH değerlerine ulaşmasıyla mikotoksin üretiminin hız kazandığı görülmüştür. İnkübasyon süresince ortama bırakılan bazı metabolitlerin pH'yı düşürdüğü ve hafif asidik ortam pH'sının mikotoksin üretimini daha fazla desteklediği düşünülmektedir.

Biyoreaktör denemelerinde erlen üretimlerine kıyasla önemli seviyede verim kaybı yaşanmıştır. Aflatoksin üretiminde asıl sorunun impeller pedalın miselyumu yırtmasından ileri geldiği düşünülürken; ZEA üretiminde oksijene kısıtlı erişimin verim kaybına neden olduğu değerlendirilmiştir. Geçmiş çalışmalarda karıştırma şeklinin aflatoksin üretimi üzerine etkisine dair bir çıkarım bulunmamaktadır. Bu bağlamda, elde edilen sonucun bilimsel literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

400 mL besiyeri içeren erlen ortamında endüstriyel üretim için yeterli miktarda AFB₁, AFB₂ ve ZEA üretilbildiği saptanmıştır. Yarı-preparatif kromatografi yöntemiyle besiyerinden ayrıştırılan mikotoksin çözeltilerinin ≥ 90 saflığa ulaştığı belirlenmiş ve çözeltilerin mikotoksin içeriği LC-MS/MS analiziyle de doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, çalışmanın amacına uygun şekilde yerli izolatlar kullanılarak yüksek saflıkta AFB₁, AFB₂ ve ZEA üretildiğini ispatlamaktadır (Şekil 5.1). Ortaya konan üretim süreçlerinin faydalı model olarak tescillenebileceği ve ürünün ticarileşmesinin mümkün olduğu değerlendirilmektedir.



Şekil 5.1 : Çalışma sonucu ortaya çıkan ürün prototipleri.

Elde edilen sonuçlar ışığında, sonraki çalışmalar için verilebilecek öneriler aşağıda sunulmuştur:

- Mikotoksin üretimi üzerine etkili diğer bazı gelişim faktörleri de (su aktivitesi, besi ortamının bileşimi vb.) optimize edilerek elde edilecek verim arttırılmaya çalışılabilir.
- Daha büyük ölçekli fermenter üretimleri için biyoreaktör ortamında mikotoksin verimini etkileyen parametreler (havalandırma, karıştırıcı tipi, karıştırma hızı vb.) incelenebilir.
- İzolatların genetik modifikasyonu ile mikotoksin biyosentezini kontrol eden gen bölgesinin ifadesini arttırmaya yönelik çalışmalar yürütülebilir.
- Safılık oranının arttırılması ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi için preparatif toplama sürecinin optimize edilmesi önerilmektedir.
- Toplanan fraksiyon, birden fazla kez sisteme enjekte edilerek hedef mikotoksin piki ve safsızlıkların birbirinden daha fazla ayrışması sağlanabilir. Bu sayede, mikotoksin fraksiyonunun saflık oranı arttırılabilir.
- Preparatif saflaştırmada, ilk pik gelene kadar geçen sürede yeni enjeksiyonlar yapılabilir. Yığın (stack) enjeksiyon adı verilen bu uygulama ile birinci enjeksiyonu takip eden diğer enjeksiyonlarda gecikme süresi azaltılırken solvent ve zaman kaybı da minimize edilebilir.
- Kromatografik sistemde geri dönüşüm (recycling) uygulamasından faydalanılabilir. Bu uygulamada, üretim başına harcanan hareketli faz oranı minimize edilirken aynı zamanda mikotoksin fraksiyonunun saflık oranında da artış sağlanabilir.

Analitik mikotoksin standartları, Türkiye pazarında henüz üretimi yapılmayan yüksek katma değere sahip ürünlerdir. Çalışma sonuç çıktıları analitik mikotoksin standartlarının biyoteknolojik yöntemler kullanılarak yurt içinde üretiminin mümkün olduğunu göstermektedir. Yapılan önerilerden de faydalanılarak daha verimli ve uygun maliyetli mikotoksin üretimi gerçekleştirilebilir. Ürünün ticarileşmesiyle bu konuda dışa bağımlılığın azaltılabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca, dünyada da pek çok ülke analitik mikotoksin standartlarına ihtiyaç duyduğundan ortaya çıkan ürünlerin Türkiye için yeni bir ihracat kalemi olma potansiyeli mevcuttur.

KAYNAKLAR

- Açu, M. & Ocak, Ö. Ö. (2019). Gıdalarda aflatoksin düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemleri, *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4 (2), 168–181.
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E. & Varzakas. T. (2020). Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods, *Foods*, 9, article 137.
- Al Ghamdi, F. L., Bokhari, F. M. & Aly, M. M. (2019). Toxigenic fungi associated with dried fruits and fruit-based products collected from Jeddah province, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 14 (1), 10–20.
- 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), article 632.
- Alshannaq, A. F. & Yu, J. H. (2020). A liquid chromatographic method for rapid and sensitive analysis of aflatoxins in laboratory fungal cultures, *Toxins*, 12, article 93.
- Anonim (2016). TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi. İmmüne afinite kolon teknolojisi teknoloji transferi. Erişim: 12 Ekim 2022, <https://mam.tubitak.gov.tr/en/node/1224>
- Anonim (2020a). Kimyasal, Biyolojik, Radyoaktif, Nükleer (KBRN) Çalıştay (II. KBRN Çalıştay Raporu), Ankara, Türkiye: Yükseköğretim Kurulu.
- Anonim (2020b). Markets and Markets: Mycotoxin testing market - Global forecast to 2025. Erişim: 26 Temmuz 2022, <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/mycotoxin-testing-market-229073477.html>
- Anonim (2021a). Data Europa. RASFF notifications pre-2021 public information. Erişim: 28 Nisan 2022, https://data.europa.eu/data/datasets/restored_rasff?locale=en
- Anonim (2021b). Biomim. World Mycotoxin Survey: Impact 2021. Erişim: 25 Kasım 2022, <https://www.biomin.net/science-hub/world-mycotoxin-survey-impact-2021/>
- Anonim (2021c). Aokin Columns. Erişim: 18 Nisan 2021, <https://aokin.de/products/columns/?lang=en>
- Anonim (2022a). European Patent Office. Erişim: 11 Kasım 2022, <https://worldwide.espacenet.com/>
- Anonim (2022b). Ege İhracatçı Birlikleri. Ege Kuru Meyve ve Mamulleri İhracatçıları Birliği 2021/22 Sezonu Çalışma Raporu ve Faaliyet Planı. İzmir: EİB.
- Anonim (2022c). Sigma-Aldrich. Mycotoxin. Erişim: 5 Ekim 2022, <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/mycotoxin?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=mycotoxin&type=product>
- Anonim (2022d). Yüksek Öğretim Kurumu. Yüksek öğretim bilgi yönetim sistemi. Erişim: 12 Ekim 2022, <https://istatistik.yok.gov.tr/>
- Anonim (2022e). YMC. Effective preparative separation techniques. Erişim: 26 Ekim 2022, https://www.ymc.co.jp/en/tech/chromato/chromato_007.html

- Artvinli, F.** (2020). Salgınların Tarihi: Toplumsal ve Siyasal Açıdan Kısa Bir Bakış. In S. Badur, O. Ş. Yenen (Eds.), *Pandemi ve COVID-19* (pp. 129–150). İstanbul, Türkiye: Ayrıntı Yayınları.
- Asci, A., Durmaz, E., Erkekoglu, P., Pasli, D., Bircan, I. & Kocer-Gumusel, B.** (2014). Urinary zearalenone levels in girls with premature thelarche and idiopathic central precocious puberty, *Minerva Pediatrica*, 66 (6), 571–578.
- Ates, E., Mittendorf, K., Stroka, J. & Senyuva, H.** (2013). Determination of *Fusarium* mycotoxins in wheat, maize and animal feed using on-line clean-up with high resolution mass spectrometry, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (1), 156–165.
- Balendres, M. A. O., Karlovsky, P. & Cumagun, C. J. R.** (2019). Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in agricultural crop commodities in the Philippines: A review, *Foods*, 8, article 249.
- Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., Fels-Klerx, H., Booij, C. J. H., Moretti, A., Logrieco, A., Migliett, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B. & Brera, C.** (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change, *EFSA Supporting Publications*, 9 (1) 1–172.
- Battilani, P., Palumbo, R., Giorni, P., Dall'Asta, C., Dellafiora, L., Gkrillas, A., Toscano, P., Crisci, A., Brera, C., De Santis, B., Cammarano, R. R., Seta, M.D., Campbell, K., Elliot, C., Venancio, A., Lima, N., Gonçalves, A., Terciolo, C. & Oswald, I. P.** (2020). Mycotoxin mixtures in food and feed: Holistic, innovative, flexible risk assessment modelling approach: MYCHIF, *EFSA Supporting Publications*, 17 (1), 1757E.
- Beev, G., Denev, S. & Bakalova, D.** (2013). Zearalenone-producing activity of *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* isolated from Bulgarian wheat, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19 (2), 255–259.
- Bennett, G. A. & Shotwell, O. L.** (1990). Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73 (2), 270–275.
- Bennett, J. W. & Klich, M.** (2003). Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3), 497–516.
- Bircan, C., Barringer, S. A., Ulken, U. & Pehlivan, R.** (2008). Increased aflatoxin contamination of dried figs in a drought year, *Food Additives and Contaminants*, 25 (11), 1400–1408.
- Borbely, M., Sipos, P., Pelles, F. & Gyori, Z.** (2010). Mycotoxin contamination in cereals, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 16 (2), 96–98.
- Borzekowski, A., Drewitz, T., Keller, J., Pfeifer, D., Kunte, H. J., Koch, M., Rohn, S. & Maul, R.** (2018). Biosynthesis and characterization of zearalenone-14-sulfate, zearalenone-14-glucoside and zearalenone-16-glucoside using common fungal strains, *Toxins*, 10 (3), article 104.
- Bragulat, M. R., Martinez, E., Castella, G. & Cabanes, F. J.** (2004). Selective efficacy of culture media recommended for isolation and enumeration of *Fusarium* spp., *Journal of Food Protection*, 67 (1), 207–211.

- Brakhage, A. A.** 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (1), 21–32.
- 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.
- Bresler, G., Vaamonde, G., Degrossi, C., & Pinto, V. F.** (1998). Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels, *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1-2), 57–61.
- Buchanan Jr, R. L. & Ayres, J. C.** (1975). Effect of initial pH on aflatoxin production. *Applied Microbiology*, 30 (6), 1050–1051.
- Buldu, H., Koc, A. N. & Uraz, G.** (2011). Aflatoxin M1 contamination in cow's milk in Kayseri (central Turkey), *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 35 (2), 87–91.
- Cabañes, F. J., Bragulat, M. R. & Castellá, G.** (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*, *Toxins*, 2 (5), 1111–1120.
- Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., P. Oswald, I., El Khoury, A., Atoui, A., Puel, O. & Bailly, J. D.** (2020). Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review, *Toxins*, 12 (3), article 150.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. & Keller, N. P.** (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3), 447–459.
- Campbell, C. K., Johnson, E. M. & Warnock, D. W.** (2013). *Identification of Pathogenic Fungi* (2nd Ed). Hoboken, NJ: Wiley Blackwell.
- Casquete, R., Benito, M. J., de Guía Córdoba, M., Ruiz-Moyano, S. & Martín, A.** (2017). The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors, *Journal of Dairy Science*, 100 (9), 6987–6996.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology).** (2003). *Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems* (Task Force Report No. 139). Ames, IA, USA: CAST.
- Castella, G., Bragulat, M. R., Rubiales, M. V. & Cabanes, F. J.** (1997). Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp., *Mycopathologia*, 137, 173–178.
- Chabra, M., Saini, B. S. & Dwivedi, G.** (2020). Optimization of the dual stage procedure of biodiesel synthesis from Neem oil using RSM based Box Behnken design, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 1–24.
- Chang, P. K., Matsushima, K., Takahashi, T., Yu, J., Abe, K., Bhatnagar, D., Yuan, G. F., Koyama, Y. & Cleveland, T. E.** (2007). Understanding nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*: A windfall of aflatoxin biosynthesis research, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (5), 977–984.

- Chilaka, C. A., Obidiegwu, J. E., Chilaka, A. C., Atanda, O. O. & Mally, A.** (2022). Mycotoxin regulatory status in Africa: a decade of weak institutional efforts, *Toxins*, 14 (7), article 442.
- Chitzos, K. P.** (2018). Sector analysis of food testing on mycotoxins (Master thesis). International Hellenic University, School of Economics, Thessaloniki.
- Chorfa, N., Savard, S. & Belkacemi, K.** (2016). An efficient method for high-purity anthocyanin isomers isolation from wild blueberries and their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, 197, 1226–1234.
- Ciegler, A., Peterson, R. E., Lagoda, A. A. & Hall, H. H.** (1966). Aflatoxin production and degradation by *Aspergillus flavus* in 20-liter fermenters, *Applied Microbiology*, 14 (5), 826–833.
- Cinar, A. & Onbaşı, E.** (2020). Mycotoxins: The Hidden Danger in Foods. Mycotoxins and Food Safety. In: S. Sabuncuoğlu (Ed.), *Mycotoxins and Food Safety* (Chapter 4, pp. 1–21). Retrieved from <https://www.intechopen.com/chapters/69163>
- Codner, R. C., Sargeant, K. & Yeo, R.** (1963). Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts, *Biotechnology and Bioengineering*, 5 (3), 185–192.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H. & Taniwaki, M. H.** (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa, *International Journal of Food Microbiology*, 148 (2), 141–144.
- Cotty, P. J.** (1988). Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: Influence of pH, *Phytopathology*, 78 (9), 1250–1253.
- Daou, R., Joubrane, K., Maroun, R. G., Khabbaz, L. R., Ismail, A., El Khoury, A.** (2021). Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies, *AIMS Agriculture and Food*, 6 (1), 416–447.
- Das, A., Angayarkanni, J., Bhattacharya, S. & Palaniswamy, M.** (2012). Quantification of aflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus* MTCC 2798 in rice straw under solid-state fermentation, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6 (4), 1663–1669.
- Dehghan, P., Zaini, F., Rezaei, S., Jebali, A., Kordbacheh, P. & Mahmoudi, M.** (2008). Detection of Aflr gene and toxigenicity of *Aspergillus flavus* group isolated from patients with fungal sinusitis, *Iranian Journal of Public Health*, 37 (3), 134–141.
- Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P. & Croubels, S.** (2012). Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric methods, *Journal of Chromatography A*, 1257, 74–80.
- Dinleyici, M., Aydemir, O., Yildirim, G. K., Kaya, T. B. & Carman, K. B.** (2018). Human mature milk zearalenone and deoxynivalenol levels in Turkey, *Neuroendocrinology Letters*, 39, 325–330.
- EC (European Commission).** (2006a). *Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*, OJ L 364, 20 December 2006.

- EC (European Commission).** (2006b). *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*, OJ L L 70, 9 March 2006.
- Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G. & Cotty, P. J.** (2005). Divergent regulation of aflatoxin production at acidic pH by two *Aspergillus* strains, *Mycopathologia*, 159 (4), 579–581.
- Endre, G., Hegedüs, Z., Turbat, A., Škrbić, B., Vágvolgyi, C. & Szekeres, A.** (2019). Separation and purification of aflatoxins by centrifugal partition chromatography, *Toxins*, 11 (6), article 309.
- Erkekoğlu, P., Sabuncuoğlu, S., Aydın, S., Şahin, G. & Giray, B.** (2010). Determination of seasonal variations in serum ochratoxin A levels in healthy population living in some regions of Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay, *Toxicon*, 55 (2-3), article 507.
- Ezekiel, C. N., Odebode, A. C. & Fapohunda, S.O.** (2008). Zearalenone production by naturally occurring *Fusarium* species on maize, wheat and soybeans from Nigeria, *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 2 (6), 77–82.
- Ezekiel, C. N., Atehnkeng, J., Odebode, A. C. & Bandyopadhyay, R.** (2014). Distribution of aflatoxigenic *Aspergillus* section Flavi in commercial poultry feed in Nigeria, *International Journal of Food Microbiology*, 189, 18–25.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** (2015). Climate change and food security: risks and responses. Italy: FAO.
- Farbo, M. G., Urgeghe, P. P., Fiori, S., Marcello, A., Oggiano, S., Balmas, V., Ul Hassan, Z., Jaoua, S. & Migheli, Q.** (2018). Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*, *International Journal of Food Microbiology*, 284, 1–10.
- Faria, C. B., dos Santos, F. C., de Castro, F. F., Sutil, A. R., Sergio, L. M., Silva, M. V., Machinski Junior, M. & Barbosa-Tessmann, I. P.** (2017). Occurrence of toxigenic *Aspergillus flavus* in commercial Bulgur wheat, *Food Science and Technology*, 37 (1), 103–111.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution*, 39, 783–791.
- FSSAI (Food Safety and Standards Authority of India).** (2020). *Manual of Methods of Analysis of Foods-Mycotoxins*, File No: 11014/08/2020, 4 December 2020.
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G. & Perrone, G.** (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium, *International journal of Food Microbiology*, 217, 162–169.
- Galvan, A. I., Rodriguez, A., Martin, A., Serradilla, M. J., Martinez-Dorado, A. & Cordoba, M. D. G.** (2021). Effect of temperature during drying and storage of dried figs on growth, gene expression and aflatoxin production, *Toxins*, 13 (2), article 134.

- Gareis, M. & Gareis, E. M.** (2007). Guttation droplets of *Penicillium nordicum* and *Penicillium verrucosum* contain high concentrations of the mycotoxins ochratoxin A and B, *Mycopathologia*, 163 (4), 207–214.
- Gbashi, S., Madala, N. E., De Saeger, S., De Boevre, M., Adekoya, I., Adebo, O. A. & Njobeh, P. B.** (2018). The socio-economic impact of mycotoxin contamination in Africa. In P. B. Njobeh & F. Stepman (Eds.), *Mycotoxins - Impact and Management Strategies* (Chapter 1). Retrieved from <https://www.intechopen.com/chapters/62483>
- Geremew, T., Abate, D., Landschoot, S., Haesaert, G. & Audenaert, K.** (2016). Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption, *Food Control*, 69, 65–73.
- Giorni, P., Bertuzzi, T. & Battilani, P.** (2019). Impact of fungi co-occurrence on mycotoxin contamination in maize during the growing season, *Frontiers in Microbiology*, 10, article 1265.
- Golge, O. & Kabak, B.** (2020). Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals and cereal products from Turkey, *Food Control*, 110, article 106982.
- Grieco, S. H. H., Wong, A. Y., Dunbar, W. S., MacGillivray, R. T., & Curtis, S. B.** (2012). Optimization of fermentation parameters in phage production using response surface methodology, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39 (10), 1515–1522.
- Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V. & Berthiller, F.** (2017). Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (33), 7052–7070.
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T. & Schatzmayr, G.** (2019). Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey, *Toxins*, 11 (7), article 375.
- Guerra, M. M. M., de Almeida, A. M. & Willingham, A. L.** (2016). An overview of food safety and bacterial foodborne zoonoses in food production animals in the Caribbean region, *Tropical Animal Health and Production*, 48 (6), 1095–1108.
- Gürbay, A., Girgin, G., Sabuncuoğlu, S. A., Şahin, G., Yurdakök, M., Yiğit, Ş. & Tekinalp, G.** (2010). Ochratoxin A: is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara, Turkey?, *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 30 (4), 329–333.
- Haarmann, T., Rolke, Y., Giesbert, S. & Tudzynski, P.** (2009). Ergot from witchcraft to biotechnology, *Molecular Plant Pathology*, 10 (4), 563–577.
- Hamed, M. A., Abdel Ghany, T. M., Elhussieny, N. I. & Nabih, M. A.** (2016). Exploration of fungal infection in agricultural grains, aflatoxin and zearalenone synthesis under pH stress, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5 (4), 1007–1017.
- Haque, M. A., Wang, Y., Shen, Z., Li, X., Saleemi, M. K. & He, C.** (2020). Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review, *Microbial Pathogenesis*, 142, article 104095.
- Herebian, D., Zühlke, S., Lamshöft, M. & Spiteller, M.** (2009). Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental

- study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap, *Journal of Separation Science*, 32 (7), 939–948.
- Heussner, A. H. & Bingle, L. E.** (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data, *Toxins*, 7 (10), 4253–4282.
- Hidy, P. H. & Baldwin, R. S., Greasham, R. L., Keith, C. L., McMullen, J. R.** (1977). Zearalenone and some derivatives: Production and biological activities. In D. Perlman (Ed.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 22, pp. 59–82). New York, ABD: Academic Press.
- Huynh, V. L. & Lloyd, A. B.** (1984). Synthesis and degradation of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. I. Synthesis of aflatoxin B1 by young mycelium and its subsequent degradation in aging mycelium, *Australian Journal of Biological Sciences*, 37 (2), 37–44.
- ICH (International Conference on Harmonisation).** (1994). *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 27 Ekim 1994.
- Ibáñez-Vea, M., Lizarraga, E., González-Peñas, E. & de Cerain, A. L.** (2012). Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain, *Food Control*, 25 (1), 81–88.
- Isman, B. & Bıyık, H.** (2009). The aflatoxin contamination of fig fruits in Aydın city (Turkey), *Journal of Food Safety*, 29, 318–330.
- Jeswal, P. & Kumar, D.** (2015). Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS, *International journal of microbiology*, 2015, article 242486.
- Jibril, S., Basar, N., Sirat, H. M., Wahab, R. A., Mahat, N. A., Nahar, L. & Sarker, S. D.** (2019). Application of Box–Behnken design for ultrasound-assisted extraction and recycling preparative HPLC for isolation of anthraquinones from *Cassia singueana*, *Phytochemical Analysis*, 30 (1), 101–109.
- Jimenez, M., Manez, M. & Hernandez, E.** (1996). Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species, *International Journal of Food Microbiology*, 29 (2-3), 417–421.
- Kabak, B.** (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (4), 549–554.
- Kabak, B.** (2019). Aflatoxins and ochratoxin A in chocolate products in Turkey, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 12 (4), 225–230.
- Karakaya, H. & Yilmaztekin, M.** (2022). Analysis of E.U. Rapid Alert System Notifications for Food and Feed Products: Turkey Report from 2011 to 2020. In Ö. P. Can, Hastaoğlu, E., Saraç M. G. (Eds), *International Congress on Food Researches*, (pp. 458-465). Türkiye: Sivas Cumhuriyet University, October 14-16.
- Karami-Osboo, R., Maham, M. & Nasrollahzadeh, M.** (2020). Synthesised magnetic nano-zeolite as a mycotoxins binder to reduce the toxicity of aflatoxins, zearalenone, ochratoxin A, and deoxynivalenol in barley, *IET Nanobiotechnology*, 14 (7), 623–627.

- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I.P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T. & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination, *Mycotoxin Research*, 32 (4), 179–205.
- Keller, N. P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T. D. & Burow, G. B. (1997). pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp., *Phytopathology*, 87 (6), 643–648.
- Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N. & Groopman, J. D. (2011). Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120, S28–S48.
- Ketney, O., Santini, A. & Oancea, S. (2017). Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review, *International Journal of Dairy Technology*, 70 (3), 320–331.
- Khalesi, M. & Khatib, N. (2011). The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32 (2), 113–121.
- Kidd, S., Halliday, C., Alexiou, H. & Ellis, D. (2016). *Descriptions of Medical Fungi* (3rd Ed.). Adelaide, Australia: The National Library of Australia Cataloguing.
- Kirimker, S. E., Turksoy, S., Kabak, B. (2020). Assessment of dietary exposure to deoxynivalenol and fumonisin in the population of infants and toddlers in Turkey, *Food and Chemical Toxicology*, 140, article 111304.
- Kizis, D., Natskoulis, P., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2014). Biodiversity and ITS-RFLP characterisation of *Aspergillus* section Nigri isolates in grapes from four traditional grape-producing areas in Greece, *PLoS One*, 9 (4), e93923.
- Klich, M.A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *Mycoscience*, 48, 71–80.
- Klich, M. A., Tang, S. & Denning, D. W. (2009). Aflatoxin and ochratoxin production by *Aspergillus* species under ex vivo conditions, *Mycopathologia*, 168 (4), 185–191.
- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P. & Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 143, 17–25.
- Köszegi, T. & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level, *Toxins*, 8 (4), article 111.
- Kress, W. J., Liu, A. Z., Newman, M. & Li, Q. J. (2005). The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and polyphyletic genus of gingers, *American Journal of Botany*, 92 (1), 167–178.
- Krska, R., Schothorst, R. C., van Egmond, H. P., Josephs, R. D., Lepschy, J., Pettersson, H., Chan, D., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Kandler, W., Parich, A. & Welzig, E. (2005). Processing and purity assessment of standards for the analysis of type-B trichothecene mycotoxins, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (8), 1848–1858.

- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. & Crews, C.** (2008). Mycotoxin analysis: An update, *Food Additives and Contaminants*, 25 (2), 152–163.
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K. & Kang, S. G.** (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management, *Frontiers in Microbiology*, 7, article 2170.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K.** (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6), 1547–1549.
- Kusumaningtyas, E., Widiastuti, R. & Maryam, R.** (2006). Reduction of aflatoxin B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination, *Mycopathologia*, 162 (4), 307–311.
- Kwatia, S., Dzogbefia, V.P. & Ofosu, I.W.** (2017). Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* cultivated on yam peels in solid state fermentation using response surface methodology, *African Journal of Biochemistry Research*, 11 (7), 34–42.
- Lee, H. J. & Ryu, D.** (2015). Advances in mycotoxin research: Public health perspectives, *Journal of Food Sciences*, 80 (12), 2970–2983.
- Leitão, A. L.** (2019). Occurrence of ochratoxin A in coffee: Threads and solutions-A mini-review, *Beverages*, 5 (2), article 36.
- Leslie, J. F.** (1983). Some genetic techniques for *Gibberella zeae*, *Phytopathology*, 73 (7), 1005–1008.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A.** (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, IA: Blackwell Publishing.
- Li, H., Liang, W. Q., Wang, Z. Y., Luo, N., Wu, X. Y., Hu, J. M., Lu, J. Q., Zhang, X. Y., Wu, P. C. & Liu, Y. H.** (2006). Enhanced production and partial characterization of thermostable α -galactosidase by thermotolerant *Absidia* sp. WL511 in solid-state fermentation using response surface methodology, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (1), 1–7.
- Li, D. W.** (2013). Microscopic Methods for Analytical Studies of Fungi. In V. K. Gupta, M. G. Tuohy (Eds.), *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology* (pp. 113–131). New York, NY: Springer.
- Liew, W. P. P. & Mohd-Redzwan, S.** (2018) Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, article 60.
- Lisker, N., Michaeli, R. & Frank, Z. R.** (1993). Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel, *Mycopathologia*, 122 (3), 177–183.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M. J., Logrieco, A., & Jimenez, M.** (2004). Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp., *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (2), 253–260.
- Magan, N. & Aldred, D.** (2007). Why do fungi produce mycotoxins? In J. Dijksterhuis, R. A. Samson (Eds.), *Food Mycology: A Multifaced Approach to Fungi and Food* (Vol. 25, pp. 121–133). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

- Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S. & Dalcero, A. M.** (2006). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina, *Mycopathologia*, 161 (1), 53–58.
- Mahato, D. K., Lee, K. E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K. N., Kumar, P. & Kang, S. G.** (2019). Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies, *Frontiers in Microbiology*, 10, article 2266.
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S. & Severino, L.** (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development, *Toxins*, 10 (6), article 214.
- Marechera, G. & Ndwiga, J.** (2014). Farmer perceptions of aflatoxin management strategies in lower Eastern Kenya, *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 6 (12), 382–392.
- Martins, M. L. & Martins, H. M.** (2002). Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*, *Food Chemistry*, 79, 315–318.
- Medina, Á., González-Jartín, J. M. & Sainz, M. J.** (2017). Impact of global warming on mycotoxins, *Current Opinion in Food Science*, 18, 76–81.
- Mohd-Redzwan, S., Jamaluddin, R., Abd.-Muttalib, M. S. & Ahmad, Z.** (2013). A mini review on aflatoxin exposure in Malaysia: past, present, and future, *Frontiers in Microbiology*, 4, article 334.
- Moradi, M., Fani, S. R., Dargahi, R., Moghadam, M. M. & Sherafati, A.** (2017). A simple procedure to evaluate competitiveness of toxigenic and atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* in solid and liquid media, *Journal of Chemical Health Risks*, 7 (2), 105–112.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information).** (2022). PubChem Compound Summary. Mycotoxin. Erişim: 14 Aralık 2022, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=mycotoxin>
- Ngulla, H. M.** (2019). Production of mycotoxin standards with 99% chromatographic purity (Master thesis). University of Johannesburg, Faculty of Science, Johannesburg.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. & Samson, R. A.** (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand, *International Journal of Food Microbiology*, 128 (2), 197–202.
- Numanoglu, E., Yener, S., Gökmen, V., Uygün, U. & Koksels, H.** (2013). Modelling thermal degradation of zearalenone in maize bread during baking, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (3), 528–533.
- Nyongesa, B. W., Okoth, S. & Ayugi, V.** (2015). Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya, *Advances in Microbiology*, 5 (4), article 205.
- OBrian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Yu, J., Abbas, H. K., Bhatnagar, D. & Nierman, W., Payne, G. A.** (2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis, *Mycologia*, 99 (2), 232–239.

- Odhiambo, B. O., Murage, H. & Wagara, I. N.** (2013). Isolation and characterisation of aflatoxigenic *Aspergillus* species from maize and soil samples from selected counties of Kenya, *African Journal of Microbiology Research*, 7 (34), 4379–4388.
- Oğuz, H.** (2017). Mikotoksinler ve önemi. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology*, 3 (2), 113–119.
- Okoth, S., Nyongesa, B., Ayugi, V., Kang'ethe, E., Korhonen, H. & Joutsjoki, V.** (2012). Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya, *Toxins*, 4, 991–1007.
- Ozer, H., Oktay Basegmez, H. I. & Ozay, G.** (2012). Mycotoxin risks and toxigenic fungi in date, prune and dried apricot among Mediterranean crops, *Phytopathologia Mediterranea*, 148–157.
- Öksüztepe, G. & Erkan, S.** (2016). Mikotoksinler ve halk sağlığı açısından önemi, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5 (2), 190–195.
- Pascale, M. & Visconti, A.** (2008). Overview of Detection Methods for Mycotoxins. In J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, A. Visconti (Eds.), *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade* (pp. 171–183). Oxfordshire, UK: CABI.
- Pascale, M., De Girolamo, A., Lippolis, V., Stroka, J., Mol, H. G. & Lattanzio, V. M.** (2019). Performance evaluation of LC-MS methods for multimycotoxin determination, *Journal of AOAC International*, 102 (6), 1708–1720.
- Pauka, I. H., Koch, F. J., Schaumberger, S., Woechtl, B., Novak, J., Sulyok, M. & Nagl, V.** (2018). Current challenges in the diagnosis of zearalenone toxicosis as illustrated by a field case of hyperestrogenism in suckling piglets, *Porcine Health Management*, 4 (1), 1–9.
- PHAC (Public Health Agency of Canada).** (2016). *Canadian Biosafety Handbook* (2nd Ed.). Ottawa, Canada: Public Health Agency of Canada.
- Pickova, D., Ostry, V., Toman, J. & Malir, F.** (2021). Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation, *Toxins*, 13, article 399.
- Pitt, J. I.** (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins, *British Medical Bulletin*, 56 (1), 184–192.
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D.** (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3rd Ed.). New York, NY, USA: Springer.
- Pitt, J. I. & Miller, J. D.** (2017). A concise history of mycotoxin research, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 7021–7033.
- Price, M. S., Connors, S. B., Tachdjian, S., Kelly, R. M. & Payne, G. A.** (2005). Aflatoxin conducive and non-conductive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production, *Fungal Genetics and Biology*, 42 (6), 506–518.
- Radhathirumalaiarasu, S. & Mahalakshmi, G. K.** (2020). Optimized parameters using Box–Behnken design methodology facilitate enhanced phenol degradation of *Bacillus cereus* PB1 by immobilization and adsorption, *Environmental Quality Management*, 30 (2), 13–20.

- Raduly, Z., Szabo, L., Madar, A., Pocs, I. & Csernoch, L.** (2020). Toxicological and medical aspects of *Aspergillus*-derived mycotoxins entering the feed and food chain, *Frontiers in Microbiology*, 10, article 2908.
- Rajarajan, P., Sylvia, K., Periasamy, M.P. & Subramanian, M.** (2021). Detection of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from animal feed in Karnataka, India, *Environmental Analysis Health and Toxicology*, 36 (3), article e2021017.
- Reddy, K. R. N., Saritha, P., Reddy, C. S., & Muralidharan, K.** (2009). Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains, *African Journal of Biotechnology*, 8 (14), 3303–3308.
- Ritter, A. C., Hoeltz, M. & Noll, I. B.** (2011). Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31 (3), 623–628.
- Rodrigues, P., Venancio, A. & Lima, N.** (2012). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins in Portuguese almonds, *The Scientific World Journal*, 2012, article 471926.
- Romanelli, A. M., Fu, J., Herrera, M. L. & Wickes, B. L.** (2014). A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification, *Mycoses*, 57, 612–622.
- Ryu, D., Bianchini, A. & Bullerman, L. B.** (2008). Effects of processing on mycotoxins, *Stewart Postharvest Review*, 4 (6), 1–7.
- Sabuncuoglu, S., Erkekoglu, P., Aydin, S., Şahin, G. & Kocer-Gumusel, B.** (2015). The effects of season and gender on the serum aflatoxins and ochratoxin A levels of healthy adult subjects from the Central Anatolia Region, Turkey, *European Journal of Nutrition*, 54 (4), 629–638.
- Sciortino, C. V.** (2017). *Atlas of Clinically Important Fungi*. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell.
- Seirafinia, M., Omid, A., Rasooli, A., Mohebbi, M. & Hoseinzadeh, S.** (2021). Influence of low-temperature stress on the production of zearalenone by three *Fusarium* species in vitro, *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 4 (1), 63–70.
- Serra, R., Braga, A. & Venancio, A.** (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A, *Research in Microbiology*, 156 (4), 515–521.
- Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A. & Ali, A.** (2022). Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: An updated review, *Toxins*, 14 (5), article 307.
- Sharif, L. & Al-Malki, T.** (2010). Knowledge, attitude and practice of Taif University students on food poisoning, *Food Control*, 21, 55–60.
- Shih, C. N. & Marth, E. H.** (1973). Aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* when incubated in the presence of different gases, *Journal of Milk and Food Technology*, 36 (8), 421–425.
- Smalley, E. B. & Lin, B.** (1990). Research on fungal growth stimulants for domestic animals in China, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 4 (5-6), 48–54.

- Smith, J. S., Williams, W. P. & Windham, G. L.** (2019). Aflatoxin in maize: a review of the early literature from "moldy-corn toxicosis" to the genetics of aflatoxin accumulation resistance, *Mycotoxin Research*, 35, 111–128.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R.** (2010). Deoxynivalenol and its toxicity, *Interdisciplinary Toxicology*, 3 (3), 94.
- Speybrouck, D., Howsam, M. & Lipka, E.** (2020). Recent developments in preparative-scale supercritical fluid- and liquid chromatography for chiral separations, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 133, article 116090.
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O. & Oswald, I. P.** (2012). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe, *Toxins*, 4, 788–809.
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I. & Schatzmayr, G.** (2013). Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: Long-term analysis with special focus on Europe and Asia, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (12), 2892–2899.
- Stubblefield, R. D., Shotwell, O. L. & Shannon, G. M.** (1968). Aflatoxins B1, B2, G1, and G2: Separation and purification, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45 (10), 686–688.
- Sudini, H., Srilakshmi, P., Kumar, K. V. K., Njoroge, S. M., Osiru, M., Seetha, A. & Waliyar, F.** (2015). Detection of aflatoxigenic *Aspergillus* strains by cultural and molecular methods: A critical review, *African Journal of Microbiology Research*, 9 (8), 484–491.
- Sukmawati, D., Setyaningsih, A., Handayani, T. K., Rahayu, S., Rustam, Y., Moersilah, M., Wahyudi, P. & Husna, S. N. A.** (2018). Isolation and characterization of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. from maize of livestock feed from Bogor. In A. G. Abdullah, A. B. D. Nandiyanto (Eds.), *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (434, 012105). Bandung, Indonesia: IOP Publishing, April 18.
- Sun, C., Ji, J., Wu, S., Sun, C., Pi, F., Zhang, Y., Tang, L., Sun, X.** (2016). Saturated aqueous ozone degradation of deoxynivalenol and its application in contaminated grains, *Food Control*, 69, 185–190.
- Tamura, K. & Nei, M.** (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–526.
- Tan, K.** (2020). Aflatoxin and its toxic tragedies in Kenya. *Journal of Young Investigators*, 38 (2), 10–12.
- Tanuja, K., Hemalatha, K., Karuna, R. & Sashidhar Rao, B.** (2010). Effect of various surfactants (cationic, anionic and non-ionic) on the growth of *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) in relation to aflatoxin production, *Mycotoxin Research*, 26 (3), 155–170.
- Taşan, N. T. & Akpınar, Ö.** (2020). Microwave assisted extraction of pectin from grapefruit peel and optimization of extraction conditions, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8 (7), 1528–1535.

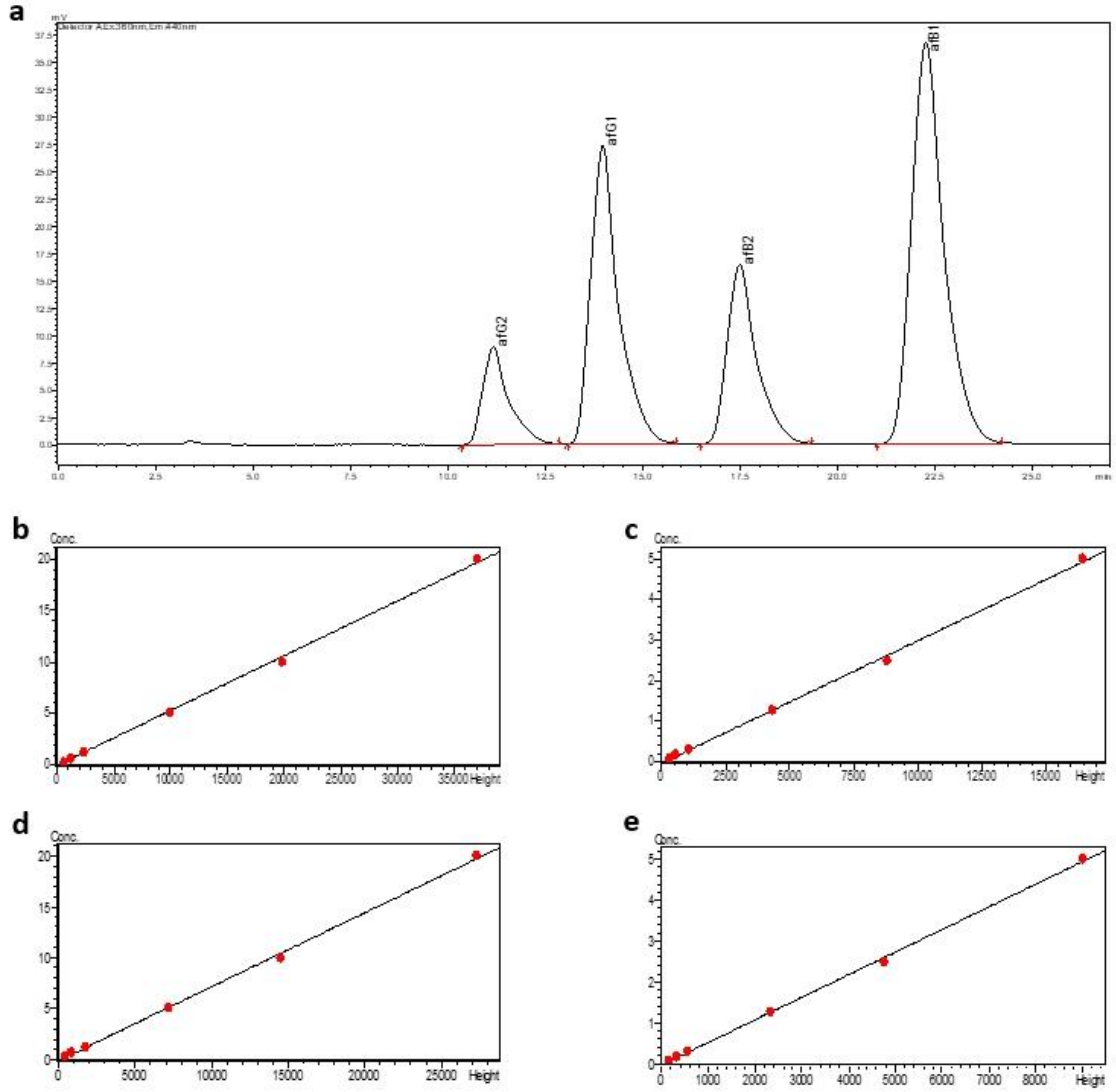
- TGK (Türk Gıda Kodeksi).** (2011). *Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği*. 29 Aralık 2011, Resmî Gazete Sayı: 28157, 3. Mükerrer.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi).** (2018). *Türk Gıda Kodeksi Gıdalardaki Mikotoksin Seviyelerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği*. 15 Mart 2018, Resmî Gazete Sayı: 30361, Tebliğ No: 2018/10.
- Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R. & Piletsky, S. A.** (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014) , *Analytica Chimica Acta*, 901, 12–33.
- Udomkun, P., Wiredu, A. N., Nagle, M., Bandyopadhyay, R., Müller, J. & Vanlauwe, B.** (2017). Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook, *Food Control*, 72, 110–122.
- van Egmond, H. P., Schothorst, R. C. & Jonker, M. A.** (2007). Regulations relating to mycotoxins in food, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1), 147–157.
- Van der Fels-Klerx, H. J., Vermeulen, L. C., Gavai, A. K. & Liu, C.** (2019). Climate change impacts on aflatoxin B1 in maize and aflatoxin M1 in milk: A case study of maize grown in Eastern Europe and imported to the Netherlands, *PLoS One*, 14 (6), e0218956.
- Var, I. & Kabak, B.** (2009). Detection of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Adana, Turkey, *International Journal of Dairy Technology*, 62 (1), 15–18.
- Variane, A. C. F., dos Santos, F. C., de Castro, F. F., Barbosa-Tessmann, I. P., dos Santos, G. T. & dos Santos Pozza, M. S.** (2018). The occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. in dairy cattle feed in Southern Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 919–928.
- Venkatesh, N. & Keller, N. P.** (2019). Mycotoxins in conversation with bacteria and fungi, *Frontiers in microbiology*, 10, article 403.
- Vohra, M. S. & Labaran, B. A.** (2020). Photocatalytic treatment of mixed selenocyanate and phenol streams: Process modeling, optimization, and kinetics, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 39 (4), e13401.
- Völkel, I., Schröer-Merker, E. & Czerny, C. P.** (2011). The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation, *Food and Nutrition Sciences*, 2, 852–867.
- Vyzantiadis, T. A. A., Johnson, E. M., & Kibbler, C. C.** (2012). From the patient to the clinical mycology laboratory: How can we optimise microscopy and culture methods for mould identification?, *Journal of Clinical Pathology*, 65 (6), 475–483.
- Walsh, T. H., Hayden, R. T., Larone, D. H.** (2018). *Larone's Medically Imported Fungi: A Guide to Identification*. Washington, DC: ASM Press.
- Wang, G., Chen, W., Hu, J., Fan, B., Shi, J. & Xu, J.** (2019). Preparative isolation and purification of zearalenone from rice culture by combined use of macroporous resin column and high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography B*, 1110, 43–50.

- West, J. S., Holdgate, S., Townsend, J. A., Edwards, S. G., Jennings, P. & Fitt, B. D.** (2012). Impacts of changing climate and agronomic factors on *Fusarium* ear blight of wheat in the UK, *Fungal Ecology*, 5 (1), 53–61.
- WHO (World Health Organization).** (2006). Mycotoxins in African foods: Implications to food safety and health, *AFRO Food Safety Newsletter*, 2, 1–10.
- Wild, C. P. & Gong, Y. Y.** (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue, *Carcinogenesis*, 31 (1), 71–82.
- Woo, P. C. Y., Ngan, A. H. Y., Chui, H. K., Lau, S. K. P. & Yuen, K. Y.** (2010). Agar block smear preparation: A novel method of slide preparation for preservation of native fungal structures for microscopic examination and long-term storage, *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (9), 3053–3061.
- Wu, F.** (2007). Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds, *Animal Feed Science and Technology*, 137 (3-4), 363–374.
- Wu, L., Qiu, L., Zhang, H., Sun, J., Hu, X. & Wang, B.** (2017). Optimization for the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* using response surface methodology, *Toxins*, 9, 57, 1–17.
- Wu, K., Ren, C., Gong, Y., Gao, X., Rajput, S. A., Qi, D. & Wang, S.** (2021). The insensitive mechanism of poultry to zearalenone: A review, *Animal Nutrition*, 7 (3), 587–594.
- Xing, F., Wang, L., Liu, X., Selvaraj, J. N., Wang, Y., Zhao, Y. & Liu, Y.** (2017). Aflatoxin B1 inhibition in *Aspergillus flavus* by *Aspergillus niger* through downregulating expression of major biosynthetic genes and AFB₁ degradation by atoxigenic *A. flavus*, *International Journal of Food Microbiology*, 256, 1–10.
- Yang, X., Guo, P., Li, M., Li, H., Hu, Z., Liu, X. & Zhang, Q.** (2020). Optimization of culture conditions for amoxicillin degrading bacteria screened from pig manure, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17 (6), article 1973.
- Yassin, M. A., El-Samawaty, A. R., Bahkali, A., Moslem, M., Abd-Elsalam, K. A. & Hyde, K. D.** (2010). Mycotoxin-producing fungi occurring in sorghum grains from Saudi Arabia, *Fungal Diversity*, 44 (1), 45–52.
- Yazdani, D., Zainal Abidin, M. A., Tan, Y. H. & Kamaruzaman, S.** (2010). Evaluation of the detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates, *African Journal of Biotechnology*, 9 (45), 7654–659.
- Yeşilören, G. & Karataş, S.** (2019). Türk Akreditasyon Kurumu. Gıda analiz laboratuvarları için akreditasyon süreci ve gerekliliği. Erişim: 12 Ekim 2022, <https://www.turkak.org.tr/makaleler/gida-analiz-laboratuvarlari-icin-akreditasyon-sureci-ve-gerekliligi.html>
- Yılmaz, S. Ö.** (2017). The contamination rate of aflatoxins in ground red peppers, dried figs, walnuts without shell and seedless black raisins commercialized in Sakarya city center, Turkey, *Italian Journal of Food Science*, 29 (4), 591–598.
- Yılmaz Çebi, S. & Olhan, E.** (2017). Avrupa Birliği Gıda ve Yemde Hızlı Alarm Sistemi'nin Türkiye'nin gıda ürünleri ihracatı üzerine etkilerinin

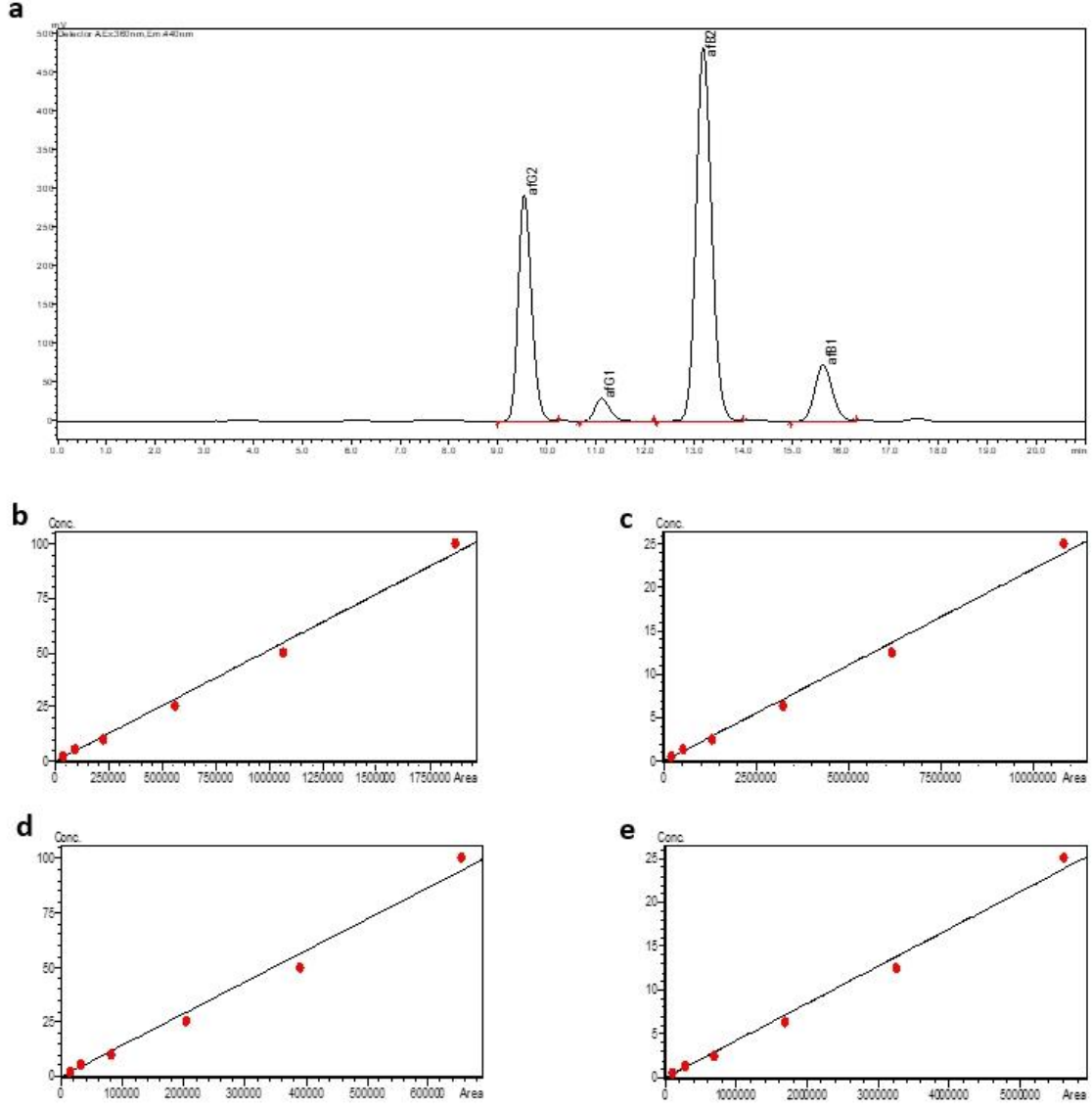
- değerlendirilmesi, *Turkish Journal of Agricultural Economics*, 23 (1), 133–144.
- Yorulmaz, A., & Bircan, C.** (2010). Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi (RASFF) 2003-2008 Türkiye Raporu, *Hasad Gıda*, 25, 42–49.
- Yu, J.** (2012). Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination, *Toxins*, 4 (11), 1024-1057.
- Yu, J., Mikiashvili, N. & Liang, C. L.** (2019). Deoxynivalenol and ochratoxin A in North Carolina grown organic wheat grains, *Journal of Food Safety*, 39, article 12687.
- Yuan, W., Cheng, J., Huang, H., Xiong, S., Gao, J., Zhang, J. & Feng, S.** (2019). Optimization of cadmium biosorption by *Shewanella putrefaciens* using a Box-Behnken design, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175, 138–147.
- Zain, M. E.** (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals, *Journal of Saudi Chemical Society*, 15 (2), 129–144.
- Zhang, X., Li, Y., Wang, H., Gu, X., Zheng, X., Wang, Y., Diao, J., Peng, Y. & Zhang, H.** (2016). Screening and identification of novel ochratoxin A-producing fungi from grapes, *Toxins*, 8 (11), article 333.
- Zhang, G. L., Feng, Y. L., Song, J. L. & Zhou, X. S.** (2018). Zearalenone: A mycotoxin with different toxic effect in domestic and laboratory animals' granulosa cells, *Frontiers in Genetics*, 9, article 667.
- Zhao, S., Liu, D., Ling, N., Chen, F., Fang, W. & Shen, Q.** (2014). Bio-organic fertilizer application significantly reduces the *Fusarium oxysporum* population and alters the composition of fungi communities of watermelon *Fusarium* wilt rhizosphere soil, *Biology and Fertility of Soils*, 50, 765–774.
- Zill, G., Engelhardt, G. & Wallnöfer, P. R.** (1988). Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 187 (3), 246–249.
- Zyoud, S. H.** (2019). Global scientific trends on aflatoxin research during 1998–2017: A bibliometric and visualized study, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 14, article 27.

EKLER

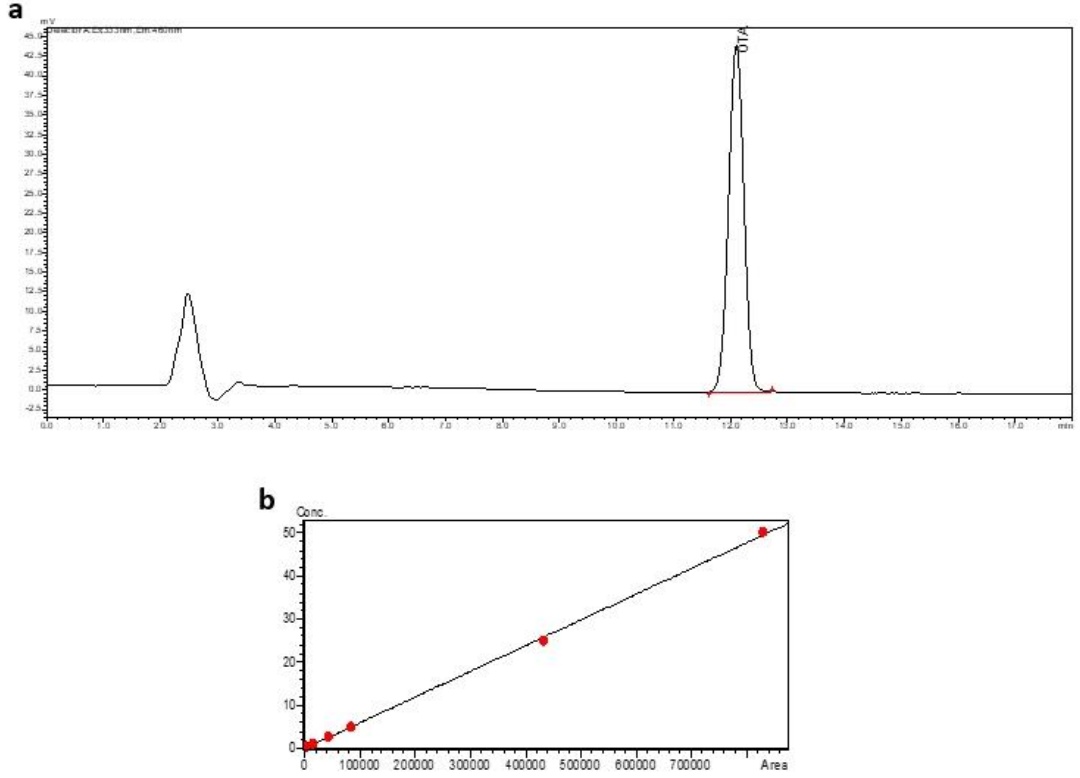
EK A : Mikotoksin analizlerine ait kromatogram görüntüleri ve kalibrasyon eğrileri.



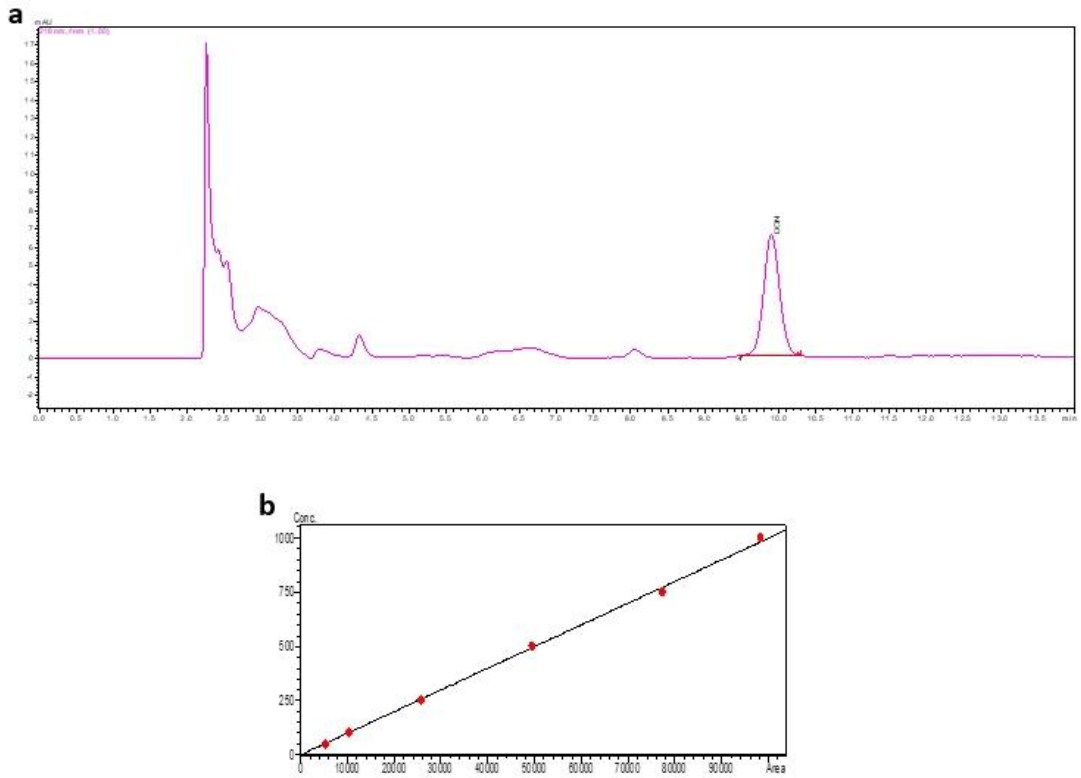
Şekil A.1 : Aflatoksin analizine (Kobracell ile türevlendirmeli) ait kromatogram ve kalibrasyon eğrileri. 50 ng/mL toplam aflatoksin miksine ait kromatogram (a) ile AFB₁ (b), AFB₂ (c), AFG₁ (d) ve AFG₂ (e) için oluşturulan kalibrasyon grafikleri.



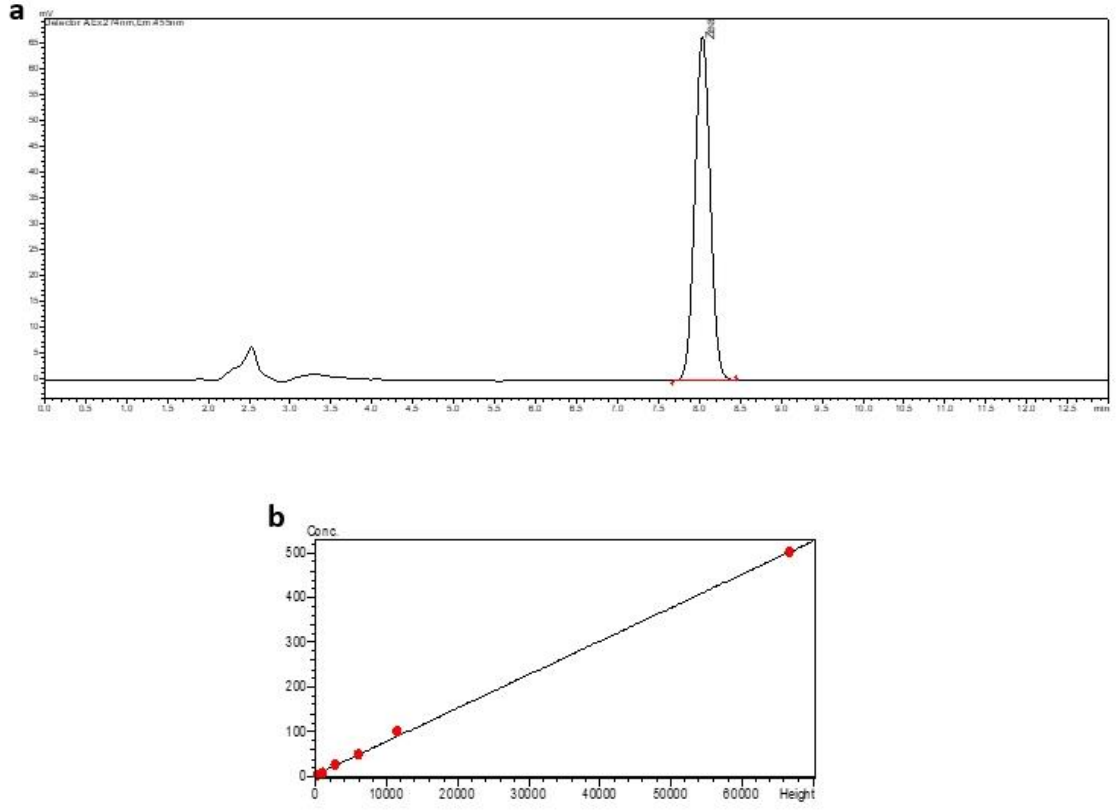
Şekil A.2 : Aflatoksin analizine (türevlendirmesiz) ait kromatogram ve kalibrasyon eğrileri. 250 ng/mL toplam aflatoksin miksine ait kromatogram görüntüsü (a) ile AFB₁ (b), AFB₂ (c), AFG₁ (d) ve AFG₂ (e) için oluşturulan kalibrasyon grafikleri.



Şekil A.3 : OTA standart çözeltisine (50 ng/mL) ait kromatogram görüntüsü (a) ve kalibrasyon eğrisi (b).



Şekil A.4 : DON standart çözeltisine (1000 ng/mL) ait kromatogram görüntüsü (a) ve kalibrasyon eğrisi (b).



Şekil A.5 : ZEA standart çözeltisine (500 ng/mL) ait kromatogram görüntüsü (a) ve kalibrasyon eğrisi (b).

EK B : Optimizasyon çalışmasında elde edilen sonuçlara ilişkin ANOVA analizi

a ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	106.81	7	15.26	206.85	< 0.0001	significant
A-pH	14.08	1	14.08	190.94	< 0.0001	
B-Sıcılık	46.32	1	46.32	627.98	< 0.0001	
C-Sure	20.53	1	20.53	278.26	< 0.0001	
BC	0.46	1	0.46	6.28	0.0336	
A ²	0.45	1	0.45	6.09	0.0356	
B ²	17.22	1	17.22	233.46	< 0.0001	
C ²	5.97	1	5.97	80.98	< 0.0001	
Residual	0.66	9	0.074			
Lack of Fit	0.55	5	0.11	3.77	0.1114	not significant
Pure Error	0.12	4	0.029			
Cor Total	107.47	16				

b ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	126.84	5	25.37	102.15	< 0.0001	significant
A-pH	15.45	1	15.45	62.20	< 0.0001	
B-Sıcılık	77.64	1	77.64	312.64	< 0.0001	
C-Sure	15.97	1	15.97	64.30	< 0.0001	
B ²	11.94	1	11.94	48.09	< 0.0001	
C ²	4.94	1	4.94	19.88	0.0010	
Residual	2.73	11	0.25			
Lack of Fit	2.38	7	0.34	3.82	0.1066	not significant
Pure Error	0.36	4	0.089			
Cor Total	129.57	16				

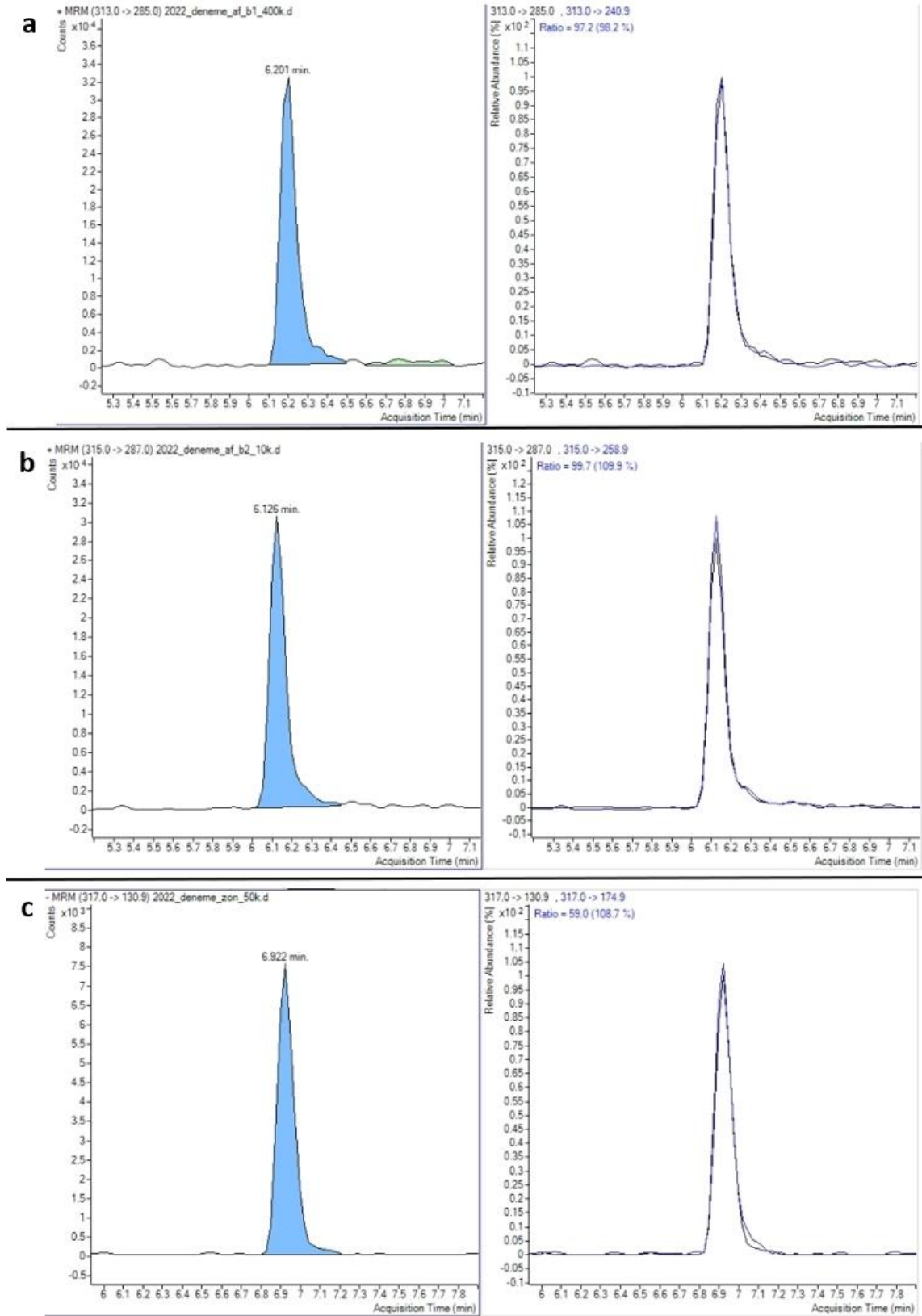
c ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	8.475E+007	7	1.211E+007	26.59	< 0.0001	significant
A-pH	1.346E+007	1	1.346E+007	29.57	0.0004	
B-Sıcılık	4.457E+006	1	4.457E+006	9.79	0.0121	
C-Sure	3.282E+007	1	3.282E+007	72.09	< 0.0001	
AC	1.220E+007	1	1.220E+007	26.79	0.0006	
BC	4.799E+006	1	4.799E+006	10.54	0.0100	
A ²	1.238E+007	1	1.238E+007	27.20	0.0006	
B ²	3.811E+006	1	3.811E+006	8.37	0.0178	
Residual	4.098E+006	9	4.553E+005			
Lack of Fit	3.415E+006	5	6.831E+005	4.00	0.1017	not significant
Pure Error	6.823E+005	4	1.706E+005			
Cor Total	8.885E+007	16				

Şekil B.1 : AFB₁ (a), AFB₂ (b) ve ZEA (c) için ANOVA analiz sonuçları.

EK C : Mikotoksin fraksiyonlarının LC-TQMS ile doğrulanması



Şekil C.1 : AFB₁ (a), AFB₂ (b) ve ZEA (c) fraksiyonlarına ait LC-MS/MS kromatogramları.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Hüseyin KARAKAYA

ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** : 2011, Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2016, İnönü Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM

- 2014 yılından beri İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN ÇALIŞMALAR

- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2022, December)**. Optimizing the Production of Zearalenone by *F. culmorum* Using Response Surface Methodology. In: Silk Road International Scientific Research Conference, (pp. 494).
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2022, June)**. Isolation of Aflatoxin Producing *Aspergillus* sp. from Dried Food Products and Grains. In: International Conference on Global Practice of Multidisciplinary Scientific Studies Dedicated to the 100th Anniversary of "Georgian Technical University – GTU", (pp. 501).

DİĞER ÇALIŞMALAR

Ulusal ve Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- **Karakaya, H., Ozturk, F. S., Bilenler Koc, T. & Yasar, K. (2022)**. Chemical composition and antimicrobial activity of pummelo (*Citrus maxima*) essential oil derived from fruit peel, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25 (3), 524–535.
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2022)**. Natural vanillin production from isoeugenol by using *Pseudomonas putida* in biphasic bioconversion medium, *Journal of Agricultural Sciences (Tarım Bilimleri Dergisi)*, 28 (3), 423–429.
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2021)**. Elektrostatik ekstrüzyon tekniği ile kapsüllenmiş bazı aroma maddelerinde sıcaklığın depolama stabilitesi üzerine etkisi, *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11 (3), 988–998.
- **Karakaya, H., Ozturk, F. S. & Yilmaztekin, M. (2020)**. Taze ve olgunlaştırılmış Taşköprü sarımsağından (*Allium sativum* L.) farklı çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırılması, *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (3), 762–770.
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2020)**. *Pseudomonas putida* ile izoöjenolden doğal vanilin üretiminde bazı ortam koşullarının molar verim üzerine etkisi, *Gıda*, 45 (1), 9–19.

Ulusal/Uluslararası Kongre/Sempozyum/Konferanslarda Sunulan Bildiriler

- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2022, October).** Analysis of E.U. Rapid Alert System Notifications for Food and Feed Products: Turkey Report from 2011 to 2020. In: International Congress on Food Researches (ICONFOOD), (pp. 458-465).
- **Bilcanoglu Cagan, B., Yilmaztekin, M. & Karakaya, H. (2022, June).** Adsorption Characteristics of Epigallocatechin-3-gallate from Green Tea Extract on Macroporous Resin. In: International Conference on Global Practice of Multidiciplinary Scientific Studies Dedicated to the 100th Anniversary of "Georgian Technical University – GTU", (pp. 502).
- **Ozturk, F. S., Karakaya, H., Atalay, E., Gökbulut, İ. & Yilmaztekin, M. (2020, October).** Türkiye'de Yetişen Kuşburnu (*Rosa canina* L.) Meyvelerinin Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. In: 2nd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2020), (pp.779–785).
- **Bilenler, T., Karakaya, H., Tekelioğlu, K. & Öztürk, F. S. (2018, April).** Maviyemiş (*Vaccinium myrtillus*) Meyvesinin Kimyasal Kompozisyonu ve Fonksiyonel Özellikleri. In: 2nd International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), (pp. 83).
- **Karakaya, H., Bilenler, T., Öztürk, F. S. & Tekelioğlu, K. (2018, April).** Pomelo (*Citrus maxima* Burm. Merrill) Uçucu Yağının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. In: 2nd International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), (pp. 85).
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2017, November).** Applications of Recombinant DNA Technology in Food Biotechnology. In: International Advanced Researches and Engineering Congress (IAREC), (pp. 2207).
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2017, November).** Effects of Temperature, pH and Aeration on Vanillin Production by *Pseudomonas putida*. In: 8th International Advanced Technologies Symposium (IATS), (pp. 52).
- **Bozdoğan, A., Yilmaztekin, M., Karakaya, H. & Ulukanlı, Z. (2017, October).** Investigation of Volatile Organic Compounds in the Essential Oils of Enterdonat Lemon Leaves and Fruit Peels. In: International Symposium on Medicinal, Aromatic and Dye Plants (REYHAN), (pp. 152).
- **Yilmaztekin, M., Bozdoğan, A., Karakaya, H. & Ulukanlı, Z. (2017, October).** Identification of Volatile Organic Compounds in Essential Oils of King Mandarin Leaves and Fruit Peels. In: International Symposium on Medicinal, Aromatic and Dye Plants (REYHAN), (pp. 130).
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2017, October).** Aroma Maddeleri ve Esansiyel Yağlarda Tağşişin Tespitine Yönelik Kullanılan Kromatografik Teknikler. In: International Symposium on Medicinal, Aromatic and Dye Plants (REYHAN), (pp. 140–145).
- **Karakaya, H. & Yilmaztekin, M. (2016, October).** Biotechnological Approaches in Production of Natural Vanillin. In: 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC), (pp. 3392–3397).

Projeler

- Gıda ve Yem Analizlerinde Kullanılan Bazı Analitik Mikotoksin Standartlarının Yerli Olarak Üretiminin Araştırılması (2022). TÜBİTAK, Proje no: 120O978 (Bursiyer).
- *Pseudomonas putida* ile İzoojenolden Doğal Vanilin Üretiminin Optimizasyonu (2017). İnönü Üniversitesi BAP Birimi, Proje no: 2015/17 (Araştırmacı).

Etkinlikler

- Gıda Mühendisliği 9. Öğrenci Kongresi (GMOK-9), 4-5 Mayıs 2018, Malatya/Türkiye (Bilimsel Sekreteryar/Organizasyon Komitesi).
- International Symposium on Medicinal, Aromatic and Dye Plants (REYHAN), 5-7 October 2017, Malatya/Türkiye (Scientific Secretary/Organization Committee).