

Funguslar ve Mikotoksinler¹

Nezihe TUNAİL

Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

01. Giriş
02. Tarihçe
03. Gıdalarda Bulunan Mikotoksinler ve Üretici Fungusları
04. Mikotoksinlerin Canlılara Etkileri
05. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler
 - 05.01. Bağlı Nemin veya Su Aktivitesinin (A_s) Etkisi
 - 05.02. Sıcaklığın Etkisi
 - 05.03. Diğer Faktörlerin Etkisi
06. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyon Yolları
07. Aflatoksin
 - 07.01 Aflatoksin Oluşturan Funguslar ve Toksin Oluşum Koşulları
 - 07.02 Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları ve Biyosentezi
 - 07.03. Aflatoksinlerin Etkisi
 - 07.04. Aflatoksinle Kontamine Gıdalar
 - 07.05 Aflatoksin Detoksifikasyonu
 - 07.06. Gıdalarda ve Yemlerde Sınır Değerler
08. Okratoksin
09. Patulin
10. Diğer Önemli *Aspergillus* ve *Penicillium* Toksinleri
 - 10.01. Sterigmatosistin
 - 10.02. Ksantomegnin
 - 10.03. Penisilikasit
 - 10.04. Siklopiazonikasit
 - 10.05. Sitrinin ve Sitreoviridin
 - 10.06. Luteosikrin ve Diğerleri
11. Fusarium Toksinleri
 - 11.01. Trikotesenler
 - 11.02. Zearalenon
 - 11.03. Fumonisin ve Moniliformin
12. Alternaria Toksinleri
13. Mikotoksinlerin Belirlenmesi

01. Giriş

Gıdalarda ve yemlerde bulunan filamentli funguslar (hifli küfler) dendiğinde taksonomide Mycobiota (funguslar âlemi) içinde Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota bölümleri altında yer alan değişik cins ve türdeki funguslar akla gelmektedir (Şekil 1). Tarımsal ürünler hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında ortam koşullarına, tarım ürününün bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik küflerle kontamine olurlar. Küflerle kontaminasyon iki açıdan önemlidir. Yakın zamana kadar tarımsal ürünlerdeki küflerin varlığı yalnızca bozulmalar, ürünün besin değerindeki kayıplar, danelerin çimlenme kabiliyetindeki düşüşler nedeniyle ve özet olarak ekonomik açıdan önemli görülmüştür.

¹ Kaynak : **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s** 03. Bölüm, 13. kısım

MYCOBIOTA



Şekil 1. Tarımsal ürünlerde ve gıdalarda sıklıkla görülen funguslar (Koyu renkli yazılanlar en önemli mikotoksin üreticileridir).

Üzerinde fungusların geliştiği tahılların ve yağlı tohum küspelerinin hayvan yemi olarak değerlendirilmesi sakıncalı bulunmamıştır. Küflerin verdiği ekonomik zararlar, tarım ürünlerindeki kayıplar dikkate alındığında gerçekten azımsanamayacak düzeydedir. Yıllık üretimler baz alındığında; yağlı tohumlarda % 12, pirinçte % 5, yer fıstıklarında % 4.2,

mısırdada % 3, soya fasulyesinde % 3 ürün kayıpları meydana gelmektedir. Ancak gıda ve yemlerde gelişen fungusların gelişme sürecini tamamladıktan sonra miselleri içerisinde oluşturdukları ve birçok durumda üzerinde buldukları ürüne (substrata) salgıladıkları toksik metabolitler, insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır. Fungusların ürettikleri bu sekonder metabolitlere mikotoksin denir. Gıda ve yemler çok çeşitli küflerin saldırısına hedef olmakla beraber, mikotoksin üreten küf sayısının bugün yaklaşık 350 ile sınırlı olduğu bilinmektedir.

Mikotoksin üreten en önemli türler; Deuteromycota (Fungi imperfecti) içinde Hypomycetes sınıfında yer alan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine giren üyelerdir. Bugüne kadar 400 mikotoksin tanımlanmıştır. Sayılarının bu denli artışına mikotoksinler üzerinde yürütülen yoğun çalışmaların yanı sıra, yeni antibiyotik ve kemoterapik ajanların arandığı çeşitli laboratuvarlarda metabolitlerin mikotoksin olarak tanımlanmasının da katkısı olmuştur. Örneğin okratoksin A (OTA) Güney Afrika' da bu şekilde bulunmuştur. Nefrotoksik etkiye sahip OTA' nın Balkan nefropatisiyle olan ilişkisi daha sonraki yıllarda anlaşılmıştır.

Fungusların çok çeşitli sekonder metabolitleri bulunmaktadır. Bu metabolitlerden antibiyotikler sağlık üzerinde olumlu etkiye sahip, çok önemli bir madde grubudur ve tıp ile veterinerlikte terapi amacıyla kullanılmaktadır. Mikotoksinler ise küçük dozlarda alınsalar bile insan, hayvan ve bitkilere toksik etki yaparlar. Bu önemli ayrıma karşın bazı mikotoksinleri antibiyotiklerden ayırt etmek oldukça zordur. Bazı mikotoksinler antibiyotik gibi mikroorganizmaların gelişmelerini engeller. Örneğin ilk kez *Penicillium patulum* (sin. *Pen. urticae*, sin. *Pen. griseofulvum*)'dan izole edilen patulin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterileri etkileyerek geniş bir antibiyotik spektrumu gösterir. Ender de olsa bazı mikroorganizmaların gelişmelerini engelleyen mikotoksinler çıkmaktadır. Griseofulvin, marasmin, giberellin vb bunlara örnek oluşturur. Genelde mikroorganizmalara etkili olanlar antibiyotik, yüksek organizmalara toksik etki gösterenler mikotoksin olarak tanımlanır. Ancak çok geniş anlamda mikotoksinleri fungusların oluşturdukları antibiyotik grubunda düşünmek de olasıdır.

Mikroorganizma, bitki, insan ve hayvanlar tarafından oluşturulan ve çok geniş bir yelpazeye yayılan sekonder metabolitlerin, canlılar aleminin ekosisteminde önemli görevlerinin olduğu bilinmektedir. Organizma üremesine etken fizyolojik öneme sahip sekonder metabolitler bulunduğu gösterilmiştir.

Mikroorganizmaların sekonder metabolitleri sentezlemedeki amacı konusunda çeşitli görüşler vardır. Bu metabolitler küflerin çoğalma evresinin sonuna doğru (tropofaz) veya durma evresinin başında (idiofaz) sentezlenmektedir. Metabolizmanın tamamen durmasındansa, düşük bir akışla süren sekonder metabolizmanın mikroorganizma için bir avantaj oluşturduğu, hücrede biriken bileşiklerin hücreden uzaklaştırılabilecek maddelere çevrimini olanaklı kıldığı ileri sürülmekte, antibiyotik ve mikotoksinlerin antagonizm için gerekli olduğu düşünülmektedir. Ancak ileri sürülen bu fikirler, suda çözünemez bir endotoksin olan sterigmatosistin salgılanmayarak miseller içerisinde birikmesine bir açıklama getirmemektedir. Buna karşıt görüşte ise sentezlenen sekonder metabolitler mikroorganizmalar tarafından direk kullanılmadığından "metabolizmanın yonga ve talaşları" (metabolizmanın gereksiz metabolitleri) olarak tanımlanmaktadır. Antagonistik ilişkilerin doğada pek saptanamaması, sentezlenen ürünlerin miktarca çok düşük olması, antibiyotiklerin genellikle üretici mikroorganizmayı da inhibe etmesi sekonder metabolizmanın amacını açıklayamamaktadır. Pek çok sekonder metabolit sentezini determine eden genin

mikroorganizma için yük olduğu, evrim içinde bu genlerin çoktan delesyonla DNA' dan ayrılmaları gerekirken sürüklenip geldikleri düşünülmekte ve sonuç olarak evrim içerisinde doğanın tahmin edilenden daha konzervatif davrandığı ileri sürülmektedir.

Sekonder metabolitler çok farklı bileşikler kapsar. Bunları genel olarak; karatinoidler, steroidler ve terpenoidler, alkaloidler, naftokinon ve antrokinanlar, kumarinler, siklopeptidler, ksanton yapılar olarak sınıflandırmak mümkündür. Çeşitli mikotoksinler kimyasal yapılarına göre karatinoidler hariç bu gruplarda yer alırlar. Örneğin aflatoksin ve okratoksin kumarinlere, izlanditoksin siklopeptidlere, ergot alkaloidi olan lizergasidinin dietilamid bileşiği alkaloidlere, ksantomegnin binaftokinonlara, luteosikrin antrokinonlara girer. Triketesenler ise tetrasiklik terpenoidler içinde yer alır.

Küçük molekül yapısına sahip mikotoksinlerin, bunları üretme yeteneğinde olan küfler tarafından her zaman, her koşulda üretilebileceklerini düşünmek yanlıştır. Mikotoksin sentezi için özel koşulların oluşması gerekir. Mikotoksinleri, sentezlerini gerçekleştiren küf cins veya türlerine göre ayırt etmek, sınıflandırmak mümkün değildir. Bunun sebebi; bir mikotoksin değişik fungus türleri tarafından sentezlenebildiği gibi, bir fungus türü de eş zamanlı olarak farklı mikotoksinler oluşturabilir. Örneğin patulin; *Byssochlamys nivea*, *Bys. fulva* (sin. *Paecilomyces variotii*), *Aspergillus clavatus*, *Asp. terreus*, *Asp. giganteus*, *Penicillium patulum* (sin. *Pen. urticae*, *Pen. griseofulvum*), *Pen. claviforme*, *Pen. expansum* (sin. *Pen. leucopus*), *Pen. roquefortii* chemotyp II, *Pen. aurantiogriseum* (sin. *Pen. cyclopium*), tarafından sentezlenmektedir. *Pen. aurantiogriseum*; penisilikasit, okratoksin A, tremortin A ve B, siklopiazonikasit üretirken *Pen. viridicatum*; sitrinin, okratoksin A ve penisilinkasit oluşturmaktadır. Bu örnekleri çoğaltmak mümkündür. 97 toksik metabolitin *Penicillium*, 64 toksik metabolitin de *Aspergillus* cinsine ait küfler tarafından oluşturulduğu dikkate alınırsa bunlardan bazılarının her iki cins tarafından da sentezlenebilen aynı toksinler olabileceği düşünülmelidir.

Mikotoksinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde çoğunun aromatik yapıda olduğu, daha az bir kısmının da alifatik bileşiklerden oluştuğu görülür. Genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler, mikotoksin çeşitlerine, sıcaklık derecelerine ve uygulama sürelerine göre farklı stabilite gösterirler. Genellikle kendilerinin sentezledikleri toksinlerden olumsuz etkilenmezler. Mikotoksinler bakteri toksinlerinin aksine küçük moleküllu bileşikler olduğundan bunların immunolojik yöntemlerle belirlenmesinde poliklonal antikorlar (antiserumlar) yeterli olur. Oysa bakteriyel toksinlerin belirlenmesinde monoklonal antikorlara gereksinilmektedir. Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülür. O nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmaz.

02. Tarihçe

1960 yılı mikotoksinlerin kavranmasında dönüm noktasıdır. O tarihe değin tarımsal ürünlerin küflenmesi sadece ekonomik yönden problem yaratırken 1960 sonrası yüksek canlılarda meydana getirdiği hastalıklar nedeniyle ilgi odağı olmuştur. Basidiomycota içinde yer alan şapkalı mantarların ölümcül toksinlerinin (amanita toksin, muskarin, küf atrofini) bilinmesine karşın filamentli fungusların toksinleri üzerinde fazlaca bilgi toplanmamıştır. Ancak 1960 yılında; oral alımlarla canlılarda çok kuvvetli toksik etki gösteren, aynı zamanda kanserojen özellikte, aflatoksin adı verilen bir metabolitin keşfinden sonra mikotoksinler yoğun araştırılan bir konu olmuştur. Oysa küflerin insan ve hayvanlarda hastalık yaptıklarına, hatta

sporadik veya toplu ölümlere yol açtıklarına ilişkin veriler hayli eski tarihlere gider. Çok eskiden beri bilinen, kayıtlara en fazla geçen şapkaklı mantarlar dışında küf zehirlenmesi *Claviceps purpurea* ile enfekte olmuş tahılların tüketilmesi sonucu görülen, ergotizm adı verilen mikotoksikosis olayıdır. Burada etkili madde küfün yapmış olduğu ergot alkaloididir (ergotoksin). M.Ö. 600 yılında çavdar mahmuzu adı ile anılan *Clav. purpurea* sklerotialarıyla bulaşmış tahılların zararlı etkilerinden Asur tabletlerinde söz edilmiştir. M.Ö. 400 yılında da Sparta' da ilk toplu zehirlenmeye ilişkin kayıtlar bulunmuştur. Orta çağda binlerce insan ergotizme yakalanmış, o tarihlerde Aziz Antonius humması adı verilen hastalık literatüre karıncalanma ve uyuşma semptomları gösteren sinir hastalığı olarak geçmiştir. *Penicillium* türlerinin pirinçler üzerinde toksin oluşturmalarına bağlı olarak, pirinçlerin tüketimi ile insan sağlığının bozulduğu 1890 yılından beri Japon patologlar tarafından bilinmekteydi. Sarı pirinçlerde görülen bu toksisite olayının aydınlanması yine 1960' lı yılları beklemiştir. Bugün *Pen. islandicum* ve *Pen. citreoviride* gibi türlerin sarı pirinçler üzerinde luteosikrin, sitrinin, sitreoviridin gibi mikotoksinleri oluşturdukları, bu nedenle pirinçlerin zehirlenmeye neden oldukları bilinmektedir.

1928 yılında Almanya ve İskandinav ülkelerinde domuzlarda nefropati tanılanmıştır. Böbrek hastalığına neden olan ve *Aspergillus ochraceus* tarafından oluşturulan klor içeren izokumarin yapısındaki OTA neden sonra bulunmuş, bunun Yugoslavya, Bulgaristan, Romanya gibi ülkelerde ortaya çıkan Balkan nefropatisinin de nedeni olduğu ise çok daha sonra anlaşılmıştır.

Atların küflü yemlerle beslenmeleri sonucundaki ölümlerine özellikle Doğu Avrupa' da rastlanmıştır. Halk arasında saman hastalığı olarak bilinen bu mikotoksikosis aslında *Stachybotrys atra* 'nın neden olduğu stachybotryotoksi-kosistir. Atların zehirlenerek ölümüne neden olan etkili mikotoksinler; satratoksin, verrukarin, roridin olup at başına alınan 1 mg doz akut etkiye ve hayvanın 6-72 saat içinde ölümüne neden olur. *Penicillium rubrum* ' un izole edildiği küflü mısırlarla beslenen at ve sığırların ölümüne ilişkin raporlar da 1927 yıllarına kadar uzanır. *Pityomyces chartarum* küfö ile bulaşık yemlerle beslenen koyun ve sığırlarda yüz ekzemasının görüldüğü yine 1960 öncesi bilgiler arasındadır.

1942-1944 yılları arasında Rusya' nın Orenburg bölgesinde binlerce insanın ölümü ile sonuçlanan mikotoksikosis olayı "Alimentary Toxic Aleukia, ATA" (beslenmeye bağlı toksik etki ile kanda lökosit sayısının düşmesi sonucu oluşan lösemi) olarak tarihe geçmiştir. Bu büyük yıkıma, savaş nedeniyle zorunlu olarak tarlada kışlatılan tahılların yol açtığı anlaşılmıştır. Tahıllar üzerinde üreyen *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor* ve özellikle de *Fusarium* türlerinin oluşturduğu mikotoksinlerin ölümüne neden olduğu açıktır. Bugün *Fusarium* ' un T-2 toksininin yanında trikotesenlerin ölüme rol oynadığı bilinmektedir.

1960 yılında İngiltere' de 100 000 hindi palazının, ABD' de 1 000 000 genç Forelle' nin (Alabalık) ani ölümü şaşkınlık yaratmış, hastalığa "Turkey X hastalığı" ismi verilerek nedenleri araştırılmıştır. Sonunda hindi palazlarının yemlemesinde kullanılan Brezilya kökenli küflü yer fıstığı küspesinden *Aspergillus flavus* izole edilmiş ve onun metaboliti olan difurankumarin yapının ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Araştırmalar kapsamında bu fungusun geliştiği yem maddeleri tavuk ve hindi yavrularına yedirilmiş, aynı hastalık semptomları izlenmiş ve hastalık kısa sürede ölümle sonuçlanmıştır. Bu metabolite kökenini belirtmek için aflatoksin adı verilmiştir. İlginçtir ki 1910 yılında bir araştırmacı küflenmiş Brezilya cevizinden *Asp. flavus* ' u izole ettiği ve bu küfö toksisiteden sorumlu tuttuğu halde

bunun üzerinde fazlaca durulmamış ve 1980 yılında yapılan bir çalışma ile ilk veriler tekrar doğrulanmıştır.

Aflatoksinin bulunuşu ile toksik etkiye sahip sekonder metabolitler önem kazanmış ve 40 yıldır üzerinde sayısız araştırmaların yürütüldüğü oldukça geniş bir madde grubu oluşmuştur. Bugün gelinen noktada insanları bu toksik grubun etkilerinden korumak amacıyla mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek (tolere edilebilir) en yüksek miktarları yasal düzenlemelerle belirlenmekte, her ülkenin limit (sınır) değerleri farklı olsa da uluslararası ticarete belli normlara yaklaşmak için çaba sarf edilmektedir.

03. Gıdalarda Bulunan Mikotoksinler ve Üretici Fungusları

Mikotoksin sentezleme yeteneğinde olan fungus sayısı 350 civarındadır. Yine de bu sayı tüm funguslar içerisinde oldukça düşük bir sayıdır. Test edilen binlerce fungus türünden büyük çoğunluğu mikotoksin oluşturmamıştır. Burada en önemli mikotoksin üreticilerinden ağırlıklı olarak *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* cinsleri ve toksinleri üzerinde durulacaktır.

Çizelge 1' de bu dört cinsin oluşturduğu başlıca mikotoksinler görülmektedir. Aflatoksin gurubundaki derivatlar 18 civarındadır. Okratoksinler de strüktür benzerliği bulunan 7 bileşiği kapsamaktadır. Ancak en önemlisi OTA'dır. Trikotesenler 40 derivat içerirler, hatta bu gruba 150 bileşiğin dahil olduğu ileri sürülmektedir. *Alternaria* toksinleri de 30' un üzerinde farklı metabolit sergiler.

Çizelge 1' de, bugün 18 olduğu bilinen aflatoksin derivatlarından bazıları, 7 adet strüktür benzerliği bulunan okratoksinlerden yalnızca en önemli olan OTA verilmiştir.

Başlıca mikotoksin üreticilerinden *Alternaria* ve *Fusarium* cinsleri tarla küflerine, *Penicillium* ve *Aspergillus* ise depo küflerine girmektedir. Her ürünün yapısına, bileşimine, içerdiği nem oranına, bulunduğu klima koşullarına göre ürünün üzerinde gelişen küf cinsleri, türleri, oranları, oluşturdukları mikotoksin çeşitleri ve miktarları değişir. Bir örnek oluşturmak üzere tahıl ve diğer daneli bitkilerin (baklagillerin) ürünlerini küf popülasyonu ve mikotoksinler açısından incelediğimizde şöyle bir spektrumla karşılaşırız.

Tarla küfleri hasattan önce olgun danelere bulaşan, pas ve yanık etmenlerinin dışında kalan funguslardır. Tarladaki bu danelerden 70 küf cinsi ve 150 tür izole edilmiştir. Bunlar arasında dominant ve önemli olanlar; *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Stemphylium* ve *Verticillium* cinsleridir. Küflerin konidilerindeki sporlar rüzgâr ve su ile danelere taşınır veya bitkinin enfekte olmuş kısımları danelerle temas eder. Kontamine danelerde, sporların çimlenmesi ve küflerin üremesi sonucunda renk ve görüntü değişir, çimlenme kabiliyeti düşer, mikotoksinler oluşur. Bu ürünlere birinci derecede *Fusarium*' lar musallat olur, *Fusarium* toksinlerinden trikotesenler gurubuna giren deoksinivalenol, nivalenol, diasetoksisirpenol, HT-2 ve T-2 toksinleri oluşur. Ayrıca zearalenon ve fumonosin de sentezlenebilir. Ancak usulüne uygun bir depolamada, danelerdeki nem içeriği % 13.5 - 14' ü geçmeyecek şekilde kurutulup temizliği iyi yapılmış silolarda 10-15 °C de tutulurlarsa kontamine olmuş danelerdeki tarla küflerinin gelişmeleri ve toksin oluşturmaları önlenir. Ayrıca oluşmuş mikotoksinlerden trikotesenler depo koşullarında metabolize olur ve tamamen parçalanırlar. Silo içine alınan ürün sabit koşullar altına girdiğinden küf spektrumları da değişmeye başlar. Depo küflerinden önce geçiş (ara) fungus

florası oluşur. Örneğin *Epicoccum*, *Chatemium*, *Nigrospora*, *Rhizopus*, *Papullaria*, *Fusarium nivale*, *Trichothecium roseum* cins ve türleri ortaya çıkar. Uzun süre depolanmış hububat ve baklagil danelerinde ise *Eurotium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin dominant hale geldiği görülür.

Çizelge 1. Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler.

<i>Aspergillus</i> toksinleri	<i>Penicillium</i> toksinleri	<i>Fusarium</i> toksinleri	<i>Alternaria</i> Toksinleri
Aflatoksinler	Sitrinin	Zearalenon (F-2 toksin)	Alternariol
AFB ₁	Okratoksin A		Alternariolmono-
AFB ₂	Sitreoviridin	Trikotesenler	metil-eter
AFG ₁	Rubratoksin	A Deoksinivalenol	Altertoksin
AFG ₂	Rubratoksin B	Nivalenol	Tenuazonikasit
AFM ₁	Patulin	Diasetoksisirpenol	
AFM ₂	Penisilikasit	T-2 toksin	
AFB _{2a}	P-R (Pen. requeforti)-	HT-2 toksin	
AFG _{2a}	toksine	Tremortin,	
AFB ₃	Luteosikrin	Fusarin-C	
Aspertoksin	İzlanditoksin	Fumonisin B ₁	
Sitrinin	Ksantosilin-X	Moniliformin	
Sterigmatosistin	Siklopiazonikasit		
Okratoksin A	Sitromisetin		
Patulin	Rugulosin		
Penisilikasit	Ksantomegnin		
	Rugulovasin A		
	Rugulovasin B		
	Verrukulotoksin		
	Emodin		

Depo küfleri siloların yetersiz temizliği nedeniyle silolarda sürekli bulunur ve gelen ürünü kontamine eder. Ancak depo küflerinin danelere bulaşması asıl hasat zamanında olur. Kontaminasyonda toprak, sap, yapraklar öncelikli role sahip değildir. Buna karşın biçme yöntemi önemlidir. Elle (orakla) biçmeye oranla biçerdöverlerle yapılan hasatta *Penicillium* türleri ile kontaminasyon 250 kat fazla olmaktadır. Biçerdöverlerin elevatörleri ve depo tanklarının içi depo küflerinin kontaminasyon kaynaklarıdır. Hasat süresince danelerin tohum kabukları konidiosporlar ve miseller ile kontamine olur. Hasat edilen daneler mikroskop altında incelendiğinde henüz spor çimlenmesi görülmeyenler düşük kaliteli sayılmazlar, funguslar fark edilir duruma gelmişlerse daha depoya girmeden kalitelerinden kaybetmişlerdir. Türkiye gibi subtropik iklimlerde, soğuk-serin bölgeye oranla hasat mevsimine ve hava sıcaklığına bağlı olarak daha az sorun yaşanır. Avrupa ve Kanada'da tahılların ve daneli ürünlerin özel kurutma tesislerinde belli bir nem oranı sağlanana kadar kurutulması büyük önem taşır.

Danede % 13.8-14.3 nem içerecek şekilde kurutulan buğdaylar depolandıklarında buğday embriyosunun yalnızca *Eurotium halophilicum*' la kontamine olduğu belirlenmiştir. Bu fungus ağır geliştiği için fazlaca önemsenmez. Danede nem % 14-15 oranında ise kserofil özellikte primer işgalci funguslar ortaya çıkar. Bunlar *Aspergillus restrictus*, *Wallemia sebi*, *Eurotium amstelodamii*, *Eur. chevalieri*, *Eur. herbariorum*, *Eur. rubrum* türleri olup ürettikleri

kleistotesien (cleistothecien, kapalı askokarplar) nedeniyle danelerin sarı renkle kaplanmasına neden olurlar. Depolanan danelerde nem içeriğinin % 15.5-16 olması halinde *Asp. candidus*, *Asp. achraceus* görülür. Nem içeriğinin % 17 civarında oluşu *Eurotium* cinsinin *Aspergillus*' un diğer türleri ile birlikte ortama hakim olmasına neden olur, ancak kleistotesien üretimi geriler. Danelerin nem içeriği % 17-19 aralığında ise *Asp. flavus* gelişmeye başlar. % 20 veya daha fazla nem içeriğinde ürünün depo küfleri spektrumunda *Asp. flavus* % 50 ağırlıklı duruma geçer. Ayrıca *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. terreus* gibi filamentli funguslar da ortaya çıkar.

Havadaki bağıl nem % 85, danelerdeki nem oranı % 18 ise ve ürün düşük derecelerde depolanıyorsa en fazla *Penicillium* cinsi görülür. Tahıllarda *Pen. aurantiogriseum*, *Pen. verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*), *Pen. corylophilum*, *Pen. rugulosum*, *Pen. piceum*, *Pen. purpurogenum*, *Pen. glabrum* ve *Pen. dangeardii* öne çıkan türlerdir.

Tahılların depolanmasında geçiş dönemi küflerinden; *Chatemium globosum*, *Fusarium nivale*, *Trichothecium roseum*, depolamada koşullara göre ortaya çıkan depo küflerinden; *Eurotium amstelodamii*, *Eur. harbariorum*, *Eur. rubrum*, *Aspergillus candidus*, *Asp. achraceus*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. terreus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Pen. verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*), *Pen. rugulosum*, *Pen. purpurogenum*, önemli mikotoksin üreticileri olarak tehlikelidir.

Gıdalarda bulunan önemli mikotoksinler ve üreticileri Çizelge 2' de Weidenbörner' e göre verilmiştir. Çizelge 3. ise Müller ve Weber' e göre tarım ürünleri ve gıdalarda rastlanan mikotoksinleri, üreticilerini ve bu mikotoksinlerin en fazla görüldüğü gıdalar ile memeli hayvanlar üzerindeki etkilerini göstermektedir. Bir başka kaynakta ise mikotoksin üreten en önemli 10 küf cinsi önem sırasına göre; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Pithomyces*, *Phoma*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Diplodia* olarak sıralanmıştır.

Çizelge 2. Gıdalarda bulunan önemli mikotoksinler ve üreticileri (Weidenbörner 1999)

Mikotoksinler	Önemli toksin üreticileri
Aflatoksin	<i>Asp. flavus</i> , <i>Asp. parasiticus</i> , <i>Asp. nomius</i>
Alternaria toksinleri: - Alternariol - Alertoksin - Tenuazonikasit	<i>Alt. alternata</i> , <i>Alt. tenuissima</i>
Sitrinin	<i>Asp. terreus</i> , <i>Pen. expansum</i> , <i>Pen. citrinum</i> , <i>Pen. citreonigrum</i> , <i>Pen. verricosum</i>
Siklopiazonikasit	<i>Asp. flavus</i> , <i>Asp. tamarii</i> , <i>Pen. camambertii</i> , <i>Pen. griseofulvum</i> , <i>Pen. puberulum</i>
Fusarium toksinleri: - Trikotesen - Zearalenon - Fusarin C	<i>Fus. culmorum</i> , <i>Fus. equiseti</i> , <i>Fus. graminearum</i> , <i>Fus. moniliforme</i> , <i>Fus. poae</i> , <i>Fus. sambucinum</i> , <i>Fus. sporotrichioides</i> , <i>Fus. verticillioides</i>

Mikotoksinler	Önemli toksin üreticileri
- Fumonisin	
Okkratoksin A	<i>Asp. ochraceus</i> Gr., <i>Asp. alutaceus</i> , <i>Asp. fresenii</i> , <i>Eur. herbariorum</i> , <i>Pen. verrucosum</i> Chemotyp I ve II
Patulin	<i>Asp. clavatus</i> , <i>Asp. terreus</i> , <i>Bys. fulva</i> , <i>Bys. nivea</i> , <i>Pae. variotii</i> , <i>Pen. griseofulvum</i> , <i>Pen. expansum</i> , <i>Pen. roquefortii</i> Chemotyp II
Penisilikasit	<i>Asp. alutaceus</i> , <i>Pen. aurantiogriseum</i> , <i>Pen. roquefortii</i> Chemotyp II, <i>Pen. simplicissimum</i> , <i>Pen. raistrickii</i> , <i>Pen. viridicatum</i>
Sterigmatosistin	<i>Asp. versicolor</i> , <i>Emer. nidulans</i> , <i>Eurotium</i> spp. (iz miktarda)

Bazı yanlış anlamaları önlemek amacıyla burada bazı önemli mikotoksin üreticilerinin sinonimlerinin verilmesi gerekli görülmüştür. *Byssochlamys fulva* (sin. *Paecilomyces variotii*), *Penicillium patulum* (sin. *Pen. urticae*, *Pen. griseofulvum*), *Pen. expansum* (sin. *Pen. terrestre*), *Pen. aurantiogriseum* (sin. *Pen. cyclopium*), *Pen. commune* (sin. *Pen. palitans*), *Pen. equinum* (sin. *Pen. terrestre*), *Pen. verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*), *Alternaria alternata* (sin. *Alt. tenuis*) sinonimlerine rağmen birçok literatürde ayrı türler olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 3. Önemli mikotoksinler, üreticileri, etkileri ve buldukları ürünler (Müller ve Weber 1996)

Mikotoksin	Toksini üreten fungus türleri	Memeli hayvanlara etkileri	Bulunduğu ürünler
Aflatoksin	<i>Asp. flavus</i> , <i>Asp. parasiticus</i>	hepatotoksik, kanserojen, teratojen (AFB ₁).	yer fıstığı, fındık vb. yem, süt, peynir
Bisoklamikasit	<i>Byssochlamys fulva</i> (<i>Paecilomyces variotii</i>)	kanama.	meyve suları
Sitrinin	<i>Pen. citrinum</i> , <i>Asp. terreus</i>	nefrotoksik, nörotoksik.	pirinç, arpa ve unları, fasulye
Siklopiazonikasit	<i>Pen. aurantiogriseum</i> (<i>Pen. cyclopium</i>), <i>Pen. griseofulvum</i> , <i>Asp. flavus</i>	hepatotoksik, kanserojen.	un, fasulye, yem, et ürünleri
İzlanditoksin	<i>Pen. islandicum</i>	hepatotoksik.	pirinç
Luteoksikrin	<i>Pen. islandicum</i> .	hepatotoksik, kanserojen.	pirinç, yem
Maltorisin	<i>Asp. oryzae</i>	hepatotoksik.	malt embriyosu
Okkratoksin	<i>Asp. ochraceus</i> , <i>Asp. alutaceus</i> , <i>Pen. verrucosum</i> (<i>Pen. viridicatum</i>), <i>Pen. aurantiogriseum</i> (<i>Pen. cyclopium</i>)	nefrotoksik, hepatotoksik, teratojen, immunosupresif.	tahıllar, sebzeler, domuz eti, balık ürünleri, malt
Patulin	<i>Pen. expansum</i> , <i>Pen. patulum</i> , <i>Asp. clavatus</i> , <i>Asp. giganteus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	nörotoksik, hücreye toksik.	meyveler, meyve suları, malt embriyosu

Mikotoksin	Toksini üreten fungus türleri	Memeli hayvanlara etkileri	Bulunduğu ürünler
Penisilikasit	<i>Pen. martensii</i> , <i>Pen. viridicatum</i> , <i>Pen. aurantiogriseum</i> , <i>Asp. alutaceus</i>	Hepatotoksik, nefrotoksik, teratojen.	pirinç, pirinç unu
Psoralen	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	dermatoksik, mutajen, nekroz oluşumu.	sebze (kereviz)
Rubratoksin	<i>Pen. rubrum</i> , <i>Pen. purpurogenum</i>	Hepatotoksik, teratojen.	tahıllar
Sporidesmin	<i>Pithomyces chartarum</i>	Hepatotoksik, dermatoksik.	delice otu
Sterigmatosistin	<i>Bipolaris species</i> , <i>Eur. amstelodamii</i>	kanserojen.	buğday, yer fıstığı
Triketesenler (Diasetoksisirpenol, T-2 Toksin, Nivalenol)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fus. graminearum</i> , <i>Myrothecium roridum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichothecium roseum</i>	Alimentary Toxic Aleukia (ATA), düşük dozlarda kusma, lökopeni, deri nekrozları.	tahıllar, fasulye, meyve ve sebzeler
Zearalenon (F-2 Toksin)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fus. culmorum</i> , <i>Fus. equiseti</i>	östrojen benzeri etki.	mısır, buğday, fasulye, pirinç, yem.

Yukarıda şekil 1' de gıdalarda ve yemlerde en sık görülen filamentli funguslar, sistematikteki yerleri belirtilerek gösterilmiştir. Bu küflerin bir kısmı bozulmaya neden olurken bir kısmı da oluşturdukları mikotoksinlerden dolayı önemlidir. Gıdalarda rastlanan tüm fungus cinsleri; Zygomycota, Ascomycota ve Deuteromycota (Fungi imperfecti) bölümleri içinde bulduklarından doğal olarak burada Mycobiota aleminin Oomycota ve Basidiomycota bölümleri yer almamıştır. Küflerde eşeysiz çoğalma seksüel çoğalmaya göre daha fazla önemlidir. Seksüel çoğalma ve oluşturulan seksüel organ ve oluşumlar ise onların taksonomik sınıflamalarında büyük değer taşır.

Zygomycota' da seksüel çoğalma; erkek gamet ve dişi gamet olarak diferensiye olmuş aynı tür içindeki suşların hiflerinin teması (kopulasyonu) sonucu zigot oluşumu ile gerçekleşir. Her iki gametangiumun temas ettiği yerde hücre duvarı erir ve oluşan zigot daha sonra kalın duvarlı zigospora dönüşür. Ascomycota' da erkek gamet (antheridium) ve dişi gameti (trichogyne) içeren askogon denilen bir seksüel organ oluşur ve bu askogon olgunlaşarak askokarpiuma dönüşür. Askokarpium içinde dişi ve erkek gamet çekirdeklerinin karyogami yoluyla birleşmesinin ardından meyo bölünme ile 8 askospor içeren askus meydana gelir. Askospor sayısı 2 veya 4 adet de olabilir. Deuteromycota ise seksüel üreme şekli saptanamamış küflerin topladığı bir gruptur.

Ascomycota' nın değişik familyalarında mikotoksin üreticisi funguslardan; *Byssochlamys*, *Emerciella*, *Eurotium* (Eurotiaceae), *Sclerotinia* (Sclerotinaceae), *Chaetomium* (Chaetomiaceae), *Diplodia* (Botryosphaeriaceae), *Phomopsis* (Valsaceae), *Claviceps* (Clavicipiaceae) cinsleri yer almaktadır. Deuteromycota içinde mikotoksin üreticilerinin büyük çoğunluğu (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paelomyces*, *Myrothecium*, *Pithomyces*, *Trichoderma*, *Trichothecium*) Hypomycetes sınıfının Moniliaceae familyasında bulunur.

Sınıflamayı kolay anlaşılır kılmak için alemden başlayarak türe kadar giden bir örnek aşağıda sunulmuştur.

Alem – Mycobiota
Bölüm – Deuteromycota
Sınıf – Hyphomycetes
Takım - Hyphomycetales
Familiya – Moniliaceae
Cins – *Aspergillus*
Tür – *Asp. flavus*

04. Mikotoksinlerin Canlılara Etkileri

Mikotoksinler içinde yüksek organizmalara en etkili olanlar; aflatoksinler, *Fusarium* türlerinin oluşturduğu trikotesenler, fumonisinler ve okratoksin A' dır. Canlılarda alınan mikotoksin dozuna bağlı olarak iki farklı etki görülebilir. Yüksek dozda alındıklarında akut toksik etki meydana gelir ve gıda veya yemin tüketilmesinin ardından kısa sürede ölüm görülebilir. Bazı mikotoksinler ölümden önce çok az belirgin semptomlar gösterirler. Bir kısmı ise deri nekrozları, lökopeni (kanda lökosit sayısının azalması) ve immunosupresif (bağışıklık sisteminin baskılanması) etkiler ile belirginleşirler ve ağır hastalıklara neden olurlar. Daha az dozların uzun süre alınmaları sonucunda kronik hastalıklar görülür. Bunlar; özellikle karaciğer, böbrek gibi organlarda hastalıklar, dejenerasyonlar, bağışıklık sisteminde bozukluklar, kusurlu ve eksik organ oluşumları, deri nekrozları, üremede azalma ve kilo kaybı gibi bozukluklardır. Akut toksik etkiye bireyin duyarlılığı, genetik ve fizyolojik özellikleri ve çevresel faktörler etkindir.

Mikotoksinlerin insanlar üzerindeki etkilerini net olarak söyleyebilmek olanaklı değildir. İnsanlar üzerinde direk araştırmalar yürütülemediğinden toksisite denemeleri en duyarlı hayvan olan ördek yavruları, fareler ve ratlar kullanılarak genellikle oral dozlarla bazen de subkutan yolla (deri altı enjeksiyonları ile) yapılır. Bir mikotoksinin toksisitesi belli bir hayvan türü için onun letal dozu (LD₅₀ değeri) ile belirtilir. Bu değer hayvanlarda kg başına, bazen de birey başına düşen doz (mg, µg, ng) olarak verilir. Hayvan denemelerinde akut ve kronik etkileri saptanan mikotoksinlerin insanlar için de tehlikeli olacağından kuşku duyulmamalıdır. En azından bu mikotoksinlerin gıdalarda ve yemlerde bulunması tolere edilmemelidir.

Mikotoksinlerin vücutta etkili oldukları organ ve dokulara göre veya etki mekanizmalarına bağlı olarak çeşitli etkilerinden söz edilir. Karaciğere etki edenler "hepatotoksik", deriye etkili olanlar "dermatoksik", böbreklerde toksik etki yapanlar "nefrotoksik", sinir sistemine etki edenler "nörotoksik", bağışıklık sistemini etkileyenler "immunotoksik" veya "immunosupresif" olarak tanımlanırlar. Toksik etkilerinden başka; mutajenik, kanserojenik, teratojenik, halusinojenik, östrojenik, tremorjen etkileri de görülebilmektedir. Mikotoksinler filamentli fungusların toksinlerini kapsadığından Basidiomycota içinde yer alan şapkalı mantarların toksinleri mikotoksinler grubuna dahil değildir.

Mikotoksinlerin çeşitli biyolojik etkileri onların reaksiyonca aktif kimyasal yapılarından ileri gelir. Küçük moleküllü bu bileşikler metabolizmada önemli işlevleri olan çok sayıdaki molekülün reseptörleri olarak davranırlar. DNA, RNA, fonksiyonel proteinler, enzim kofaktörleri, membrandaki kimyasal yapılar ile reaksiyona girerler, hormon aktivitelerine etkili olurlar, biyosentez yollarını ve enerji üretimini inhibe ederler. Örneğin difuran kumarin derivatı olan aflatoksin B₁ (AFB₁)' in kabul edilen etki mekanizması, toksin molekülünün

DNA'ya bağlanarak RNA-polimeraz enziminin çalışmasını inhibe ettiği şeklindedir. m-RNA sentezinin yapılamaması, protein sentezinin gerçekleşmesini engeller. Hepatotoksik ve kanserojen olan AFB₁'in karaciğer kanserine neden olması molekülün nükleik asitlere etkisinin sonucu olarak görülür.

05. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

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

Tahıllar, baklagil daneleri, yer fıstığı, fındık, ceviz, badem, yağlı tohumlar, baharat ve bazı meyveler doğal korunma sistemlerine sahiptirler. Bitkisel ürünlerin çoğu hasat işlemi ve proseslerden önce küf kontaminasyonlarından korunur. Çünkü biyolojik olarak dışarıdan kabuk, çekirdek veya tohum kabuğu ile çevrelenmişlerdir. Ayrıca eterik yağlar, antibiyotik etkili maddeler, fitositler dış dokuda lokalize olmuşlardır. Büyümekte olan ve % 25 su içeren yer fıstıkları küflerle kontamine olmazken, olgunlaşmış fıstıklar çok daha az su içeriğine karşın yerde bırakıldıklarında süratle küflerin hücumuna uğrarlar. Gelişmekte olan bitkide büyük olasılıkla bir savunma mekanizması bulunmaktadır.

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

05.01. Bağıl Nemin veya Su Aktivitesinin (A_S) Etkisi

Fungusların gıda maddeleri üzerinde gelişebilmeleri ve toksin oluşturmaları atmosferin bağıl nem oranı arttıkça kolaylaşır. Bir başka ifade ile fungusların gıdalarda gelişme ve toksin oluşturmaları gıdanın düşük su aktivitesi (A_S) değeri ile sınırlandırılabilir veya engellenebilir. A_S değeri mikroorganizmaların kullanımına yarayışlı, gıda içinde bağıl olmayan suyu ifade ettiğinden gıdanın mikrobiyel stabilitesine ilişkin % su içeriğine oranla daha fazla bilgi sunar ve daha çok kullanılır. Atmosfer bağıl nemi ile gıdanın A_S değeri arasında direk bir ilişki vardır. Bağıl nem arttıkça gıda üzerindeki su buhar basıncı da artar, buna bağıl olarak gıdanın A_S değeri yükselir. Atmosfer bağıl nem içeriği ve gıdanın A_S değeri denge nemine ulaşılan koşulda aynı durumu tanımlarlar ve birbirlerinin yerine kullanılabilirler. Ancak havanın bağıl nemi (gıdanın A_S değeri) ile sıcaklık dereceleri arasında etkileşimler olduğu unutulmamalıdır.

Funguslar bakterilerle kıyaslandıklarında daha düşük bağıl nemde gelişebilirler. Optimum gelişmeleri için min. A_S : 0.97 – 0.99 değerlerini talep etmelerine karşın min. A_S : 0.80 – 0.85 değerlerinde de rahatlıkla çimlenebilir ve gelişebilirler. Kserofilik *Eurotium* türleri ve *Monascus* (sin. *Xeromyces*) *bisporus* min A_S : 0.61 – 0.62 değerlerinde bile varlıklarını sürdürürler.

Aspergillus, *Penicillium* ve *Fusarium*' un min. A_S değerleri karşılaştırıldığında *Penicillium* ve *Fusarium*'ların daha yüksek min. A_S değerleri istedikleri, mikotoksin üreticisi bazı önemli *Aspergillus* türlerinin min. A_S : 0.80 değerlerinin altında, min A_S : 0.70 - 0.71 değerlerinde bile gelişebildikleri görülür. O nedenle *Aspergillus*' lar kserofilik küflerden sayılırlar. *Penicillium* cinsinden yalnızca *Pen. aurantiogriseum* min. A_S : 0.79 değeri gösterir (Çizelge 5). Mikotoksin üretimi için gereken min. A_S değerleri, gelişim için talep edilen min. A_S değerlerinden daha yüksektir. Her bir mikotoksin kendisini sentezleyen küf türüne bağlı olarak farklı A_S değerinde oluşturulur. Örneğin *Asp. clavatus* patulini sentezlemek için min. A_S : 0.99 değerini, *Pen. griseofulvum* ise min. A_S : 0.85-0.95 değerini talep eder. AFB₁ ve okratotoksin genel olarak min. A_S : 0.83-0.90 değerlerinde oluşturulur (Çizelge 5). Havanın bağıl neminin % 80' den % 86' ya yükselmesi veya daha fazla artması durumunda hem küf gelişimleri hızlanır, hem de mikotoksin sentezleri için min. A_S değerlerine ulaşılır. Aflatoksin üreticisi *Asp. flavus* ve *Asp. parasiticus*'un reçel ve marmelatlarda üreyememe nedenleri, yüksek miktarda bulunan şekerin suyu bağlayarak, bağılı olmayan, yarayışlı su miktarını düşürmesidir. Bu iki *Aspergillus* türü kserofilik özelliktedir, ancak ozmofilik karakterli değildir.

Nem içeriği % 13.2-14.0 olan kurutulmuş tahılların uzun süre depolanması sırasında *Asp. flavus* ve *Asp. parasiticus*' un gelişebilmesi için depoda bağıl nemin artması ve dane nem içeriğinin % 17-19' a kadar yükselmesi gerekir. Bazı durumlarda daha fazla kserofil olan *Asp. glaucus* grubu (sin. *Eurotium*) üyeleri tahıllar üzerinde gelişerek elektron transport sisteminde salgıladıkları H₂O ile nem düzeyini arttırırlar, aflatoksin ve diğer mikotoksin üreticilerine ortam hazırlarlar. Benzer öncü flora diğer gıda ve yemlerde de görülür.

05.02. Sıcaklığın Etkisi

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

Tahıl ve diğer bazı tarımsal ürünlerin OTA ile kontaminasyonunda; tropik ve subtropik iklimlerde *Asp. ochraceus* sorumlu tutulurken, serin ve soğuk iklimlerde *Pen. verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*) ağırlıklı olarak rol oynar. Soğukta kalmış ve A_S değeri oldukça yüksek tahıllarda *Fusarium*' lar ön plandadır ve trikotesen grubu mikotoksinleri oluştururlar. Uzun süre depolanacak tahıllarda özellikle soğuk ve serin iklimlerde danelerin % 13.5' a veya daha aşağı nem içeriğine kadar özel kurutma tesislerinde kurutulması ve 10-15 °C lerde depolanması küf gelişmesinin önlenmesi için önerilir. Depolama sıcaklığının daha düşük tutulması durumunda danelerin nem içeriği biraz daha yüksek olabilir.

05.03. Diğer Faktörlerin Etkisi

Mikotoksin oluşumuna pH' nın, atmosferdeki oksijenin, ışığın ve CO₂' in etkileri laboratuvar denemeleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu araştırmalar aflatoksin ve patulin üzerine yoğunlaşmıştır.

Fungusların gelişebilmek için daha fazla asit ortamları tercih ettikleri, bununla beraber pH 1.5 - 8.5 arasında gelişebildikleri bilinmektedir. Aflatoksin üreticileri pH 2.5 - 6.0 arasında toksin oluştururlar, ancak yüksek miktardaki üretimi pH 5.0' den başlayarak daha yüksek pH' larda gerçekleştirirler. Hypomycetes sınıfında bazı küflerin atmosfer oksijeni azaldığında üremelerinin yavaşladığı ancak durmadığı görülür. Enerjilerini oksidatif fosforilasyon ile sağlayan bu küfler, oksijen yokluğunda veya azalmasında alkol fermentasyonunu alternatif yol olarak kullanabildiklerinden gelişmelerini sürdürebilirler.

Laboratuvarlarda *Asp. flavus*' un besiyeri üzerinde gelişmesi ve toksin oluşturması üzerine ışığın etkisinin araştırıldığı denemelerde, aflatoksinin karanlıkta daha fazla sentezlendiği bulunmuştur. Bu etkinin doğal ortamlarda doğrulanması ve diğer mikotoksinler üzerinde de ışık etkisinin araştırılması çalışmalarına ihtiyaç olduğu kesindir. Pratiğe aktarılması zor olmayan ışıklandırmanın, aflatoksin miktarında önemli farklılığın kesin olarak ortaya konmasıyla anlam kazanacağı açıktır. Modifiye atmosferde kullanılan CO₂ belli bir oranda hem aflatoksin hem de patulin oluşumunu engellemektedir. Soğuk hava depolarında % 20-40 CO₂ içeren atmosfer, depolanan meyvelerde küf gelişimine ve patulin oluşumuna imkan vermez. *Asp. flavus* ile yürütülen bir çalışmada; % 99 bağıl nem, 30 °C sıcaklık ve % 20 CO₂ ortamında, küfün bol misel geliştirmesine karşılık, aflatoksin üretiminde önemli ölçüde azalma sağlanmıştır. CO₂ miktarı % 80' lere çıkarılsa bile misel oluşumunun engellenemediği ancak aflatoksin oluşumunun daha da azaldığı belirlenmiştir.

06. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyon Yolları

Gıdalara mikotoksin bulaşması çeşitli yollarla gerçekleşir. Gıdanın gözle fark edilir şekilde küflenmesi mikotoksinin direkt kontaminasyonuna neden olur. Bitkisel ürünlerden; tahıllarda, baklagil danelerinde (soya fasulyesi, fasulye vb), fındık, yer fıstığı, ceviz, Antep fıstığı, badem, ayçiçeği tohumu, pamuk tohumu gibi yağlı tohumlarda, meyvelerde ve baharatta mikotoksin kontaminasyonu direkt yolla ve önemli düzeyde meydana gelir. Gözle görülür şekilde tüm ürünün küflenmesi ürünün işlenmesini ve tüketimini olanaksız hale getireceğinden herhangi bir risk taşımaz. Ancak ürün partilerinin çok az bir kısmında başlayan küflenme özellikle depolanmada mikotoksin riskini artırır. Bitkisel ürünlerde mikotoksin kontaminasyonu tarlada olgunlaşma evresinden başlayarak, hasatta, kurutma aşamasında ve ağırlıklı olarak da depolanma evresinde meydana gelir. Yer fıstığı, fındık vb ürünlerde toksin kontaminasyonu hasat edilen ürünlerin kurutulma aşamalarında başlar. Kırılan, hasar gören fındık fıstık kabukları küf misellerinin iç daneye geçişine ve mikotoksin oluşturmasına olanak sağlar. Ayrıca nem oranında dalgalanmalara neden olur. İstatistiksel bilgilerden parti içindeki yer fıstıklarında 1:700 ve Antep fıstıklarında 1:4500 oranı ile aflatoksinle kontamine dane bulunduğu hesaplanmaktadır.

Direkt kontaminasyon ekmekte, meyvelerde, doğal küflerle olgunlaştırılan et ürünlerinde, süt mamullerinden özellikle peynirlerde görülür. Ancak mikotoksin içerikleri yüksek düzeyde olan küflenmiş ekmek, küflenmiş meyveler tüketilmeyecek görüntüde olduklarından direkt tüketim için risk oluşturmazlar. Dış ülkelerde geleneksel olarak üretilen çiğ sucuk benzeri

ancak küfle olgunlaştırılan mamuller büyük risk taşırlar. Bunların üretiminde belli bir *Penicillium* türü starter olarak kullanılmakla beraber, startersiz olarak doğal küf popülasyonundan yararlanılarak üretilen fermente et ürünleri de bulunur. Bunların yapımında mutlaka *Penicillium nalgiovense* biotyp 2' nin kullanılması önerilmektedir. Genel olarak etlerde fazla görülmeyen mikotoksinler, funguslar ile olgunlaştırılan Macar ve İtalyan tipi çiğ fermente sucuklarda, tuzlanarak kurutulmuş çiğ et jambonlarında, Tirol çiftlik usulü hazırlanan yağlı jambonlarda tehlike yaratırlar. Bu ürünlerde yaklaşık 10-11 mikotoksinin bulunabileceği hesaplanmalıdır. Spontan olarak olgunlaştırılan bu ürünlerden izole edilen *Penicillium*' ların % 80' inin potansiyel mikotoksin üreticisi olduğu ve sıklıkla görülen *Asp. versicolor*' un da sterigmatosistin oluşturduğu unutulmamalıdır.

Süt ürünlerinden değişik küflü peynirlerde çok sayıda mikotoksin gösterilmiştir. Ayrıca sert peynirlerin kabuklarında ve dış tabakalarında, yumuşak ve yarı sert peynirlerin, eritme peynirlerinin yüzeylerinde, bugüne değin aflatoksin, sitrinin, siklopiazonikasit, mikofenolikasit, OTA, patulin, penisilikasit, penitrem A, sterigmatosistine rastlanmıştır. Bununla beraber mikotoksinlerin kontaminasyon sıklığı ve konsantrasyonları düşüktür. Toksinlerin peynir kitlesine kabuktan veya yüzeyden itibaren birkaç cm derinliğe kadar difüze olabildikleri, sitrinin ve OTA' nın ise 8 cm derinliğe kadar inebildiği gösterilmiştir. Türkiye' de kaşar peyniri depolama örneklerinden izole edilen dominant floranın ağırlıklı olarak toksik küflerden oluştuğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Gıdaların mikotoksinlerle indirekt kontaminasyonu, mikotoksinle kontamine olmuş hammaddelerin veya katkı maddelerinin gıda üretiminde kullanılmasıyla meydana gelir. Patulinle bulaşık meyvelerin meyve suyu ve konsantrelerine işlenmesi, aflatoksin içeren incirlerden kuru incir ve incir ezmelerinin üretilmesi, yine kontamine yer fıstıklarının fıstık ezmesi vb ürünlerde kullanılması indirekt yolla kontaminasyonlara örnek oluşturur. *Penicillium expansum*, *Byssosclamyces* spp. ve *Aspergillus clavatus*' un oluşturduğu patulin elma sularında ve konsantrelerinde sıklıkla bulunur. Armut ve karışık meyve sularında da rastlanır. *Trichothecium roseum* tarafından oluşturulan trikotesenler bu küfle kontamine üzüm sularında görülür. Çeşitli gıdalarda tat ve aroma kazandırmak amacıyla kullanılan baharat (kırmızı toz biber, kırmızı pul biber, karabiber, zencefil, safran, kişniş) çoğunlukla mikotoksinlerle kontamine edilir. Baharat özellikle et ürünlerinde indirekt kontaminasyona neden olur. Tahıllarda ve baklagil danelerinde oluşan çeşitli mikotoksinler (OTA; aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂; penisilikasit, siklopiazonikasit, sterigmatosistin, ksantomegnin ve akraba kinonlar) değirmen ürünlerine, fraksiyonlara göre artan veya azalan oranlarda geçerler. Soğuk-serin iklim bölgelerinde bazı yıllarda iklime bağlı olarak buğdayda *Fusarium* küfleri daha fazla görülür ve normal yıllarda buğdayda görülen 0.15 mg.kg⁻¹ olan deoksinivolenol (DON) miktarı böyle yıllarda 0.30 mg.kg⁻¹ düzeyinin üzerine çıkar. DON ile kontamine buğdayların öğütülmesinden sonra yine fraksiyonlara bağlı olarak unlara % 55, % 47 ve % 34 oranında DON geçer. Aflatoksin ile bulaşık pirinçlerin pirinç unlarında toksin konsantrasyonu azalır, pirinç kepek unlarında ise 10 kat artar. Küflerin metabolitlerinin daha fazla danelerin dış tabakasında kalması, endosperme penetre olmaması buna neden olmaktadır.

Tahıl unlarında en sıklıkla görülen OTA kontaminasyonuna özellikle soğuk-serin iklimlerde yetiştirilen tahıllar üzerinde gelişen *Penicillium verrucosum* neden olur. Tahıllarda bulunan OTA miktarının yaklaşık % 50 oranıyla unlara geçtiği saptanmıştır.

Aflatoksin ile kontamine mısırların unlarında ise; aflatoksinin danedeki miktarına oranla fraksiyonlarda arttığı, embriyo fraksiyonunda da 2-3 katına ulaştığı görülür. Un, kepek, irmik gibi değirmencilik ürünlerinde veya fırıncılık ürünlerinde görülen aflatoksin, OTA, zearalenon vb mikotoksinler indirekt kontaminasyonlardır.

Gıdaların mikotoksinlerle kontaminasyonlarında "carry over" olarak adlandırılan üçüncü bir yol daha vardır. Çiftlik hayvanları mikotoksinlerle kontamine yemlerle beslendiklerinde toksinleri metabolize ederek, büyük kısmını idrar ve dışkı ile atarlar. Ancak metabolize formlara kanda, sütte, bazı organlarda hatta ender olarak yağlı kas dokularında rastlanır. Aflatoksin içeren yemlerin süt ineklerine yedirilmesi sonucu aflatoksin B₁ (AFB₁) ve aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin M₁ (AFM₁) ve aflatoksin M₂ (AFM₂)' ye dönüşerek kalıntı halinde sütte ortaya çıkar. Besi sığırlarında AFB₁ ve AFB₂ kalıntıları en fazla karaciğer ve böbreklerde bulunmuştur. Kaslarda aflatoksin derivatlarına hem daha ender hem de çok daha düşük miktarlarda rastlanır. Domuzlarda yemlerle alınan AFB₁'in % 71' inin 9 günde metabolize olarak dışkı ile atıldığı, kalıntının ise ağırlıklı olarak karaciğerde çok daha azının ise böbrek ve akciğerlerde biriktiği görülmüştür. Aflatoksin biriken karaciğer patolojik ve anatomik değişiklikler göstermeyebilir ve tüketilme olasılığı yüksektir. Kanatlılarda da AFB₁, AFM₁ ve AFB₁' in parçalanma ürünü olan aflatoksikol (AFL) karaciğer ve böbreklerde düşük düzeyde birikebilir. Tavuk yumurtalarında AFB₁ ve AFL gösterilebilirse de hayvanların çok yüksek dozda toksin (8000 µg AFB₁.g⁻¹) içeren yemlerle beslenmesi gerekir.

Okratoksin A içeren yemlerle beslenen hayvanlardan sığırların sütlerinde ve organlarında kalıntı OTA' ya rastlanmazken, domuzların ve kanatlıların organlarında değişik düzeylerde görülmektedir. Bu durum geviş getiren hayvanların işkembelerinde bulunan mikroorganizmaların OTA' yı metabolize edebilmeleriyle açıklanmaktadır. Tek mideli olan domuzların, en çok kanlarında olmakla beraber böbrek ve karaciğerlerinde de önemli düzeyde kalıntı OTA saptanmıştır. OTA domuzlarda nefropati ajanı olduğu gibi, insanlarda da endemik ve endemik olmayan nefropatilerin kaynağıdır. Hasta organlarında 2-104 µg.kg⁻¹ OTA kalıntısı belirlenen hayvanların % 25-35' inde nefropati saptanmıştır. Yapımında yasal düzenlemelerin öngördüğü oranda kan serumu, kan plazması veya kan plazma tozunun kullanıldığı sosis çeşitlerinden de OTA' nın izole edilmesi olanaklıdır.

Bugüne değin piyasadaki tavuk etlerinde ve yumurtalarında OTA belirlenememiş olmasına karşın OTA ile kontamine yemlerle beslenme denemelerinde kanatlılarda OTA' nın değişik düzeylerde kanda, ette, böbrek ve karaciğerde hatta yumurtada bulunabileceği gösterilmiştir.

Yemlerde bulunan *Fusarium* toksinlerinden zearalenon ve trikotesenler hayvanlarda çok hızlı metabolize olurlar. Hayvanların etlerinde ve sütlerinde zearalenon saptanmazken trikotesenlerden T-2 toksinine inek ve domuzların kaslarında ve sütlerinde rastlanmıştır. Kanatlıların da etlerine ve karaciğerlerine geçebilmekte, hatta yumurtalarında da görülebilmektedir.

07. Aflatoksin

07.01 Aflatoksin Oluşturan Funguslar ve Toksin Oluşum Koşulları

Aflatoksin filamentli funguslardan *Aspergillus* cinsine ait üç tür ve iki alt tür tarafından oluşturulur. Bunlar; *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, *Asp. nomius* türleri ve *Asp. flavus* var. *columnaris*, *Asp. parasiticus* var. *globosus* alt türleridir. Bunların dışında *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Streptomyces* cinsleri belirtilmişse de çok sayıda fungal izolatin taranması sonucu yalnızca iki *Aspergillus* türünün toksin üretmeye muktedir olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda üçüncü bir tür olarak *Asp. nomius* bunlara eklenmiştir. Aflatoksin oluşturduğu saptanan ilk fungus *Asp. flavus*' dur. Bu üç türün bütün suşlarının toksini sentezlemeleri söz konusu

değildir. Gıdalardan ve yemlerden izole edilen ve toksin üretimi açısından test edilen 3000 civarında *Asp. flavus* suşundan % 76' sının bu yeteneğe sahip olduğu gösterilmiştir. Türkiye' de yapılan iki ayrı çalışmada aflatoksin üretme yeteneği / test edilen *Asp. flavus* sayısı 3/18 ve 20/43 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç izole edilen ve tanılanan üç türe ait suşların aflatoksin oluşturma yeteneklerinin mutlaka tek tek test edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Asp. flavus bütün dünyada daha yaygın olarak bulunur. *Asp. parasiticus* ise daha fazla tropik ve subtropik iklim zonlarında görülür. Her ikisine de topraklarda sıklıkla rastlanır. Havada, canlı veya ölü hayvanlar ve bitkiler üzerinde de bulunurlar. Küflerin aflatoksin üretimleri; genetik potansiyel, çevre koşulları (A_S , sıcaklık, substrat, pH, redoks potansiyeli) ve fungusla substratın bulaşması gibi faktörlere bağlıdır.

Aspergillus' lar mezofilik karakterli olup 6-8 °C den 50-60 °C ye kadar gelişebilirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38 °C dir. 10-13 °C lerin altında ve 41-42 °C lerin üzerinde aflatoksin oluşumu sınırlanır. En yüksek toksin oluşumuna ise 25-30 °C lerde ulaşır. Yapılan denemelerle; belli bir sıcaklıkta ve sürede oluşan aflatoksin düzeyinin, dalgalı sıcaklıklarda ve aynı sürede oluşan aflatoksin düzeyinden çok daha az olduğu (1/4) gösterilmiştir. Buradan sıcaklıkların iklimle bağlı olarak iniş ve çıkışlarının aflatoksin sentezini stimüle ettiği sonucu çıkar.

Asp. flavus ve *Asp. parasiticus* diğer bazı *Aspergillus* türleri ile birlikte kserofilik küfler içinde yer alır. *Penicillium'* lar da birçok fungus cinsine oranla daha düşük min A_S değerlerinde gelişebildiklerinden kserotolerant funguslara dahildir. *Aspergillus'* ların optimum gelişmeleri için gereken A_S : 0.97-0.99 olmakla birlikte gelişmelerini A_S : 0.80 değerinin altında da sürdürebilirler. *Asp. parasiticus* gelişimi için min. A_S : 0.78-0.84 değerlerini talep ederken *Asp. flavus* min. A_S : 0.78-0.82 değerini ister. Toksin oluşumu için her ikisi de biraz daha yüksek min. A_S değerlerine gereksinirler (*Asp. parasiticus* min. A_S : 0.87, *Asp. flavus* min. A_S : 0.83-0.87). Aflatoksin oluşumu için fungus türüne göre farklılık gösteren min. A_S değeri, substrata göre daha da farklılaşır. Toksinin sentezlenebilmesi için min. A_S değerleri pirinçte 0.70-0.75, mısırdaki 0.80, yer fıstığında 0.85, salamda 0.94 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4 mikotoksin üreticisi kserofilik karakterli fungusların gelişmelerini ve mikotoksin sentezlemelerini sınırlayan min. A_S değerlerini göstermektedir.

Aflatoksin oluşturan küflerin en yüksek düzeyde aflatoksin oluşturmaları pH 5.0-6.0' da gerçekleşir. pH 4.0' ün altındaki ortamlarda gelişip toksin oluşturabilirlerse de hem misel gelişimi epey yavaşlar hem de toksin miktarı iyice azalır. Toksin sentezlenmesine en uygun substratlar glikoz, galaktoz ve sakkarozdur. Maltoz ve laktoz ikinci derecede elverişli, sorbitol ve mannitol ise elverişsiz substratlardır. Düşük tuz konsantrasyonlarının (% 1-3 NaCl) gelişimi ve toksin oluşumunu olumlu etkilediği, % 8 NaCl düzeyinin gelişmeye ve toksin oluşumuna fazlaca imkan vermediği % 14 NaCl konsantrasyonunda ise küf gelişiminin tamamen durduğu görülür. Aflatoksin oluşumu atmosferdeki O_2 konsantrasyonunun düşüşü veya CO_2 ve N_2 gazları konsantrasyonlarının modifiye atmosfer içinde artışı ile önemli düzeyde geriler.

Çizelge 4. Kserofil funguslar, mikotoksinleri ve minimum A_S değerleri (Weidenböner 1999)

Funguslar	Minimum A _S değerleri		Mikotoksinler
	Gelişme	Toksin oluşumu	
<i>Asp. clavatus</i>	0.85	0.99	patulin
<i>Asp. flavus</i>	0.78- 0.84	0.83- 0.87	AFB ₁ , aspergilikasit, aspertoksin
<i>Asp. fumigatus</i>	0.82	-	fumagilin, gliotoksin
<i>Asp. parasiticus</i>	0.78- 0.82	0.87	AFB ₁
<i>Asp. ochraceus</i>	0.76- 0.83	0.83- 0.87 0.80- 0.88	okratoksin A penisilikasit
<i>Asp. versicolor</i>	0.74- 0.78	-	sterigmatosistin
<i>Emer. nidulans</i>	0.78- 0.82	-	sterigmatosistin
<i>Eurotium spp.</i>	0.62- 0.74	-	fisikon, ekinulin, ksantosilin
<i>Pen. aurantiogriseum</i>	0.79- 0.85	0.97- 0.99 0.87- 0.90	penisilikasit okratoksin A, tremortin A ve B, penisilikasit, siklopiazonikasit
<i>Pen. expansum</i>	0.82- 0.85	0.99	patulin, sitrinin
<i>Pen. griseofulvum</i>	0.81- 0.85	0.85- 0.95	patulin
<i>Pen. islandicum</i>	0.83	-	izlanditoksin, sikloklorotin, luteosikrin
<i>Pen. patulum</i>	0.81- 0.85	0.95	patulin
<i>Pen. puberulum</i>	0.81	-	penisilikasit
<i>Pen. verrucosum</i>	0.81- 0.83	0.83- 0.90	okratoksin A
<i>Pen. viridicatum</i>	0.80- 0.81 0.83	-	sitrinin, okratoksin A penisilikasit

(-) = veri yoktur.

07.02 Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları ve Biyosentezi

Aflatoksinler (AF) kimyasal olarak bifuran halkası ve lakton bağı içeren kumarin derivatlarıdır. Bugün bu derivatların sayısı 18'e yükselmiştir. Önemli aflatoksinler olarak, AFM₁, AFM₂, AFG₁ ve AFG₂ görülmektedir. Kimyasal yapıları aşağıda verilen bu toksinlerden; AFB₂ toksini AFB₁' in, AFG₂ toksini AFG₁' in dihidro formlarıdır. AFM₁ ve AFM₂ ise AFB₁ ve AFB₂' nin OH içeren formlarıdır. Aflatoksinlere verilen bu harfler toksinlerin UV ışını altında verdikleri floresan renkleri belirtir. B₁ ve B₂ mavi, G₁ ve G₂ yeşil-mavi, M₁ mavi-viyole ve M₂ viyole renkli floresan yayar. AFM₁ ve AFM₂ toksinlerini direk sentezleyebilen *Asp. flavus* izolatlarının sayısı sınırlıdır. Bu toksinler, AFB₁ ve AFB₂ içeren yemlerle beslenen çiftlik hayvanlarında AFB₁ ve AFB₂' nin metabolize olarak OH içeren derivatlara dönüşmesi ve sütte salgılanması sonucu süt orijinine dayandırılarak M ile simgelenmiştir. Hayvan vücuduna alınan aflatoksinlerin büyük kısmı metabolize olur, idrar ve dışkı ile atılır. Giren toksinlerin % 2 kadarı AFM₁ ve AFM₂' ye dönüşerek sütte salgılanır. Toksinlere verilen rakamlar ise toksisite derecesini gösterir. 1 numara ile simgelenenler yüksek toksisiteyi, 2 numara ile gösterilenler daha düşük toksisiteyi ifade ederler. Kodlarında

2 numara içerenler bazı hayvanlara karşı etkili bulunmamıştır. AFB_{2a} ve AFB_{2b}' nin ise genelde aflatoksinlere en duyarlı hayvan olarak tanımlanan ördek yavrularına dahi toksik etkisinin olmadığı saptanmıştır. Aflatoksin derivatlarından aspertoksin, ksanton yapı taşı gösteren ve aflatoksin sentezinde ara metabolit olarak saptanan sterigmatosistine daha yakın bulunmuştur ve ilk kez 1968 yılında *Asp. flavus*' dan izole edilmiştir. *Asp. parasiticus* tarafından oluşturulan parasitikol ise 1970 yılında keşfedilmiş, UV ışını altında mavi floresan yayan bu derivata da renginden dolayı AFB₃ kodu verilmiştir. *Asp. flavus* ve *Asp. parasiticus* spp. suşlara bağlı olarak farklı kompozisyonda derivatları sentezlerler, ancak aflatoksin pozitif suşların tamamı tarafından AFB₁ oluşturulur. Aflatoksin oluşturan 3 türden *Asp. flavus* ve *Asp. parasiticus*' un tipik ürünleri genellikle AFB₁, AFB₂, AFG₁ AFG₂' dir. *Asp. nomius* ise ek olarak aspergilkasit, kojikasit ve tenuazonikasit sentezleyebilmektedir.

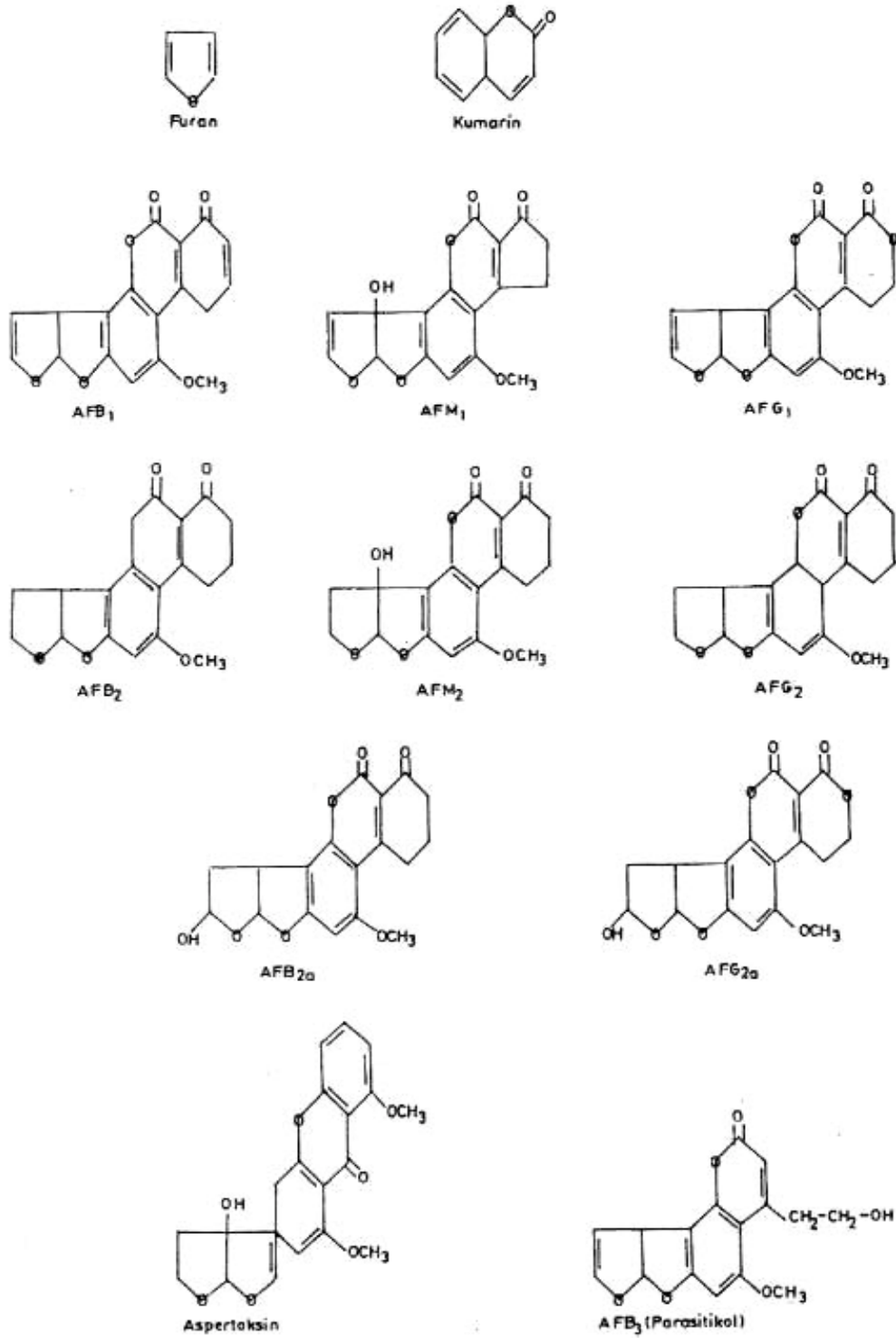
Aflatoksin B₁' in biyosentez yolu kısmen aydınlatılmıştır. Aflatoksinin yapısında bulunan furan ve kumarin halkaları, primer metabolitlerden olan asetikasit ve malonikasitten oluşmaktadır. Sekiz kademeli reaksiyon zincirinin son ürünü AFB₁' dir. Başka funguslar tarafından oluşturulan, özellikle bazı *Aspergillus versicolor* suşlarının yüksek düzeyde ürettiği sterigmatosistin, AFB₁ biyosentez yolunda bir ara metabolit olarak görülür.

Asetat → Norsolorinikasit → Averantin → Averufanın → Averufin → Versikonal hemiasetalasetat → Versikolorin-A → Sterigmatosistin → O-Metilsterigmatosistin → Aflatoksin B₁

07.03. Aflatoksinlerin Etkisi

Vücuda alınan aflatoksinin (özelikle AFB₁) neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden mikotoksikosis aflatoksikosis denir. Hayvanlar üzerinde yapılan çok sayıda araştırma toksinin kanserojen olduğunu da göstermiştir. At, sığır, domuz, koyun, keçi, köpek, maymun, rat, fare, hindi, tavuk, ördek, Gökkuşluğu alabalığı gibi hayvanlar aflatoksin duyarlıdır. İçlerinde en duyarlı hayvan ördek yavruları olduğundan aflatoksin ve derivatlarının toksisitelerinin belirlenmesinde genellikle bu hayvanlardan yararlanır. Çizelge 5' de ördek yavruları üzerinde aflatoksinlerin belirlenen LD₅₀ dozları verilmiştir. En yüksek toksisite AFB₁ ve AFB₃ (parasitikol)' e aittir, AFG₂ ve AFM₂ ise en düşük toksisiteyi gösterir. Tarımsal ürünlerde, gıdalarda ve yemlerde en sıklıkla görülen aflatoksinlerin toksisite sıralaması; AFB₁ > AFM₁ = AFG₁ > AFB₂ > AFG₂ > AFM₂ şeklindedir. Başka hayvanlar üzerinde belirlenen LD₅₀ dozlarından bu sıranın fazlaca değişmediği, bazı hallerde toksik sıralamada AFM₁' in AFG₁' in, AFM₂' nin de AFG₂' nin önüne geçtiği veya eşitliği koruduğu görülür.

Hayvanlarda akut seyreden aflatoksikosis vücutun direk etkilenen bölgesi karaciğerdir. Karaciğer paranzim hücrelerinin hasar görmesi yanında, karaciğer ve safra kanallarında proliferasyon (hücrelerin hızlı bir şekilde bölünmesi) başlar, kanamalar görülür, sinir sistemi etkilenerek fonksiyonlarını yerine getiremez. Kramplar, felçler, denge bozuklukları meydana gelebilir. Özellikle genç hayvanların yemden yararlanmaları azalır, gelişme durur ve hızlı bir kilo kaybının ardından toksik hastalık ölümle sonuçlanır.



Çizelge 5. Frank' a göre aflatoksin derivatlarının toksisiteleri (Müller ve Weber, 1996).

Toksin	LD ₅₀ (mg. kg ⁻¹)	Toksin	LD ₅₀ (mg. kg ⁻¹)
AFB ₁	0.36	AFM ₁	0.80
AFB ₂	1.70	AFM ₂	3.10
AFG ₁	0.80	Parasitikol (AFB ₃)	0.25
AFG ₂	2.50	Aspertoksin	0.70 (µg. yumurta)

Kronik toksisite uzun sürede çok daha düşük dozlarda AFB₁' in yemlerle tüketilmesi sonucunda karaciğer kanseri ve deformasyonları şeklinde ortaya çıkar. Gökkuşuğu alabalığında karaciğer kanserine neden olan günlük doz 0.5-2.0 µg.kg⁻¹, ratlarda tümörün ortaya çıkmasına kadar günlük doz 10-15 µg.kg⁻¹'dir. İnsanlarda AFB₁' in akut toksik etkisinden ziyade kronik dozlarla ortaya çıkan karaciğer kanserlerinin önemli olduğu düşünülmektedir. Karaciğer kanserlerinin yüksek oranda görüldüğü ülkeler veya bölgeler ile o ülke veya bölge insanların tükettikleri besin maddeleri ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Afrika' da Büyük Sahra' nın güneyinde kalan bölgeler ile Güneydoğu Asya' da hepatoselüler karsinomaların çok fazla olduğu, Mozambik' te karaciğer kanser olaylarının ABD'ye oranla 500 kez yüksek seyrettiği belirtilmiştir. Özellikle tropik zonda bulunan ülke ve topluluk halkları iklime ve beslenme biçimlerine bağlı olarak daha fazla aflatoksin içerikli gıdalar tüketirler.

Epidemiyolojik çalışmalar da aflatoksin içeren gıdalarla beslenen bölge insanların primer karaciğer kanserlerine ve karaciğer sirozlarına daha yüksek oranda rastlandığını gösterir. Danimarka' da primer karaciğer kanseri % 0.18, ABD beyaz Amerikalılarda % 1.7 iken sürekli yer fıstığı ile beslenen Bantus (Sudan) toplumunda bu oran % 14' dür. Ayrıca beslenmede protein eksikliğine bağlı olarak Afrika, Güney Amerika, Hint Adaları' nda çocuklarda görülen "Reye Sendromu" ve "Kwashior" çocuk hastalıklarının ortaya çıkmasında aflatoksin içerikli besinlerin rol oynadığı da ileri sürülmektedir. İnsanlarda aflatoksinin akut etkisine örnek oluşturabilecek olaylar da yaşanmıştır. Hindistan' ın 200 köyünde görülen ve 397 hastadan 106' sının ölümü ile sonuçlanan olaylarda, tüketilen gıdalarda *Asp. flavus*' un gelişmiş olduğu ve yüksek miktarda aflatoksin ürettiği belirlenmiştir.

AFB₁' in kanserojen etkisinin yanı sıra mutajen, teratojen ve immunosupresif etkilere sahip olduğu hayvan denemeleriyle gösterilmiştir. Immunosupresif etkisi nedeniyle aflatoksin hayvanlarda çeşitli aşılarla karşı iyi bir bağışıklık oluşmasını engellemekte, çeşitli enfeksiyonlara (salmonellosis, koksidiomikosis) karşı da direnci azaltmaktadır.

07.04. Aflatoksinle Kontamine Gıdalar

Aflatoksin en fazla bitkisel ürünlerde görülür. Yer fıstığı, fındık, Antep fıstığı, badem, çam fıstığı, çeşitli cevizler (Paraguay cevizi, Pekan cevizi, Hindistan cevizi) arasında yer fıstığı ve mamulleri en riskli gıdalardır. Tahıllardan buğday, mısır, çavdar, arpa, yulaf, pirinç aflatoksinle bulaşık olabilir ve bunların değirmencilik ve fırıncılık ürünleri de risk taşıyıcıdır. Çeşitli unlar, kepek, irmik, mısır gevreği (corn flakes), spagetti bu kapsamda düşünülmelidir. Baklagiller içerisinde soya fasulyesi öne çıkar, ancak fasulye, bezelye, börülce, mercimekte de görülebilir. Yağlı tohumlardan; pamuk, ayçiçeği, susam ve kolza tohumlarında sıklıkla rastlanır. Bu tohumlarda ve yağ içeriği fazla olan diğer ürünlerde daha fazla görülmesi, küflerin gelişimi için gerekli olan bağlı olmayan suyun oranının yüksek olmasıyla açıklanır. Hammaddeye bağlı olarak; fıstık ezmesi, fındık ezmesi, badem ezmesi, marzipan (badem veya kayısı çekirdeği ezmesi), persipan (şeftali çekirdeği ezmesi), yer fıstıklarından kıyılmış veya bütün halde şuruba batırılarak hazırlanan şekerlemeler (Groundnut Toffees) risk taşıyıcıdır. Sorgum, darı, mısır ve çeşitli küspeler (yer fıstığı, soya, pamuk, ayçiçeği tohumu küspeleri) gibi hayvan yemleri aflatoksin ile yüksek düzeyde kontamine edilir. Baharatlardan özellikle kırmızı toz biber, pul biber, karabiber ve kuru meyvelerden incir aflatoksin açısından önde gelen riskli ürünlerdir.

Genel olarak süt, süt tozu ve peynirlerin dışındaki hayvansal gıdalarda aflatoksin hem daha ender bulunur hem de konsantrasyonu daha düşüktür. Bununla beraber çiğ fermente sucuk ve salamalar, geleneksel yöntemle kurutulmuş kemikli jambonlar daha fazla risk taşırlar. Ayrıca kakao, kahve (çekirdek), bira, şarap gibi ürünlerde de aflatoksine rastlanır.

Çizelge 6' da çeşitli ürünlerde ve mamullerinde aflatoksin rastlanma sıklığı ve sınır değerleri aşan örneklerin oranları verilmiştir. Çizelgede yer alan rakamlar Almanya' da 1986-1992, parantez içinde yer alanlar ise 1974-1976 yıllarını kapsayan zaman dilimine aittir. Bunlar kıyaslandığında zaman içinde risk oranının gerilediği dikkat çekmektedir. Çizelge 7' de küflenmiş bazı gıda ve yemlerdeki aflatoksin miktarları ve tipleri görülmektedir. Tüketilemeyecek durumda olan bu ürünlerde aflatoksinlerin ulaştığı yüksek miktarlar fikir vermek üzere buraya alınmıştır. Çizelge 8, Türkiye' de 1990-1994 yılları arasında aflatoksin oluşumuna duyarlı ürünlerdeki tarama sonuçlarını ve Türkiye' de kabul edilen sınır değerleri aşan örnek oranlarını göstermektedir.

Fındıkların küf sepektrumunda *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri genellikle ağırlıklı olarak görülür. Ülkelere göre dominant küf cinsleri ve türleri farklılıklar gösterebilmektedir. Mısır kökenli fındıklarda *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ek olarak *Eurotium* ve *Cladosporium* türleri de yer alır. Alman gıda endüstrisinden sağlanan fındıklarda (n=126) dominant küfler; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* cinsleri ile *Rhizopus stolonifer*' dir. Türkiye kabuklu fındıklarından (n=61) başta *Asp. niger* olmak üzere *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. candidus* türleri ile *Penicillium*, *Trichothecium*, *Rhizopus* ve *Fusarium* türleri izole edilmiştir. *Asp. falvus* örneklerin yaklaşık % 18' inde belirlenmiştir.

Çizelge 6. Bazı ürünlerde ve mamullerinde aflatoksin kontaminasyon sıklığı (Weidenböner 1999).

Ürün	Kontaminasyon sıklığı (%)	Sınır değerinin üzerindeki (%)	Örnek sayısı (n)
Yer fıstığı ezmesi	20.3	3.4	59
Badem (çekilmiş)	17.9 (21.0)	0.4 (1.7)	229 (119)
Persipan	11.8	4.4	68
Fındık	9.9	0	91
Antep fıstığı	3.9 (8.1)	1.3	229
Paraguay cevizi	3.6	0	28
Marzipan	2.8	0	36
Yer fıstığı	2.4 (12.5)	0 (0.8)	124 (281)
Ceviz	0	0	29

Çizelge 7. Küflenmiş gıda ve yemlerde saptanan aflatoksin miktarları (mg.kg⁻¹) ve tipleri (Müller ve Weber 1996).

Ürün	Miktar	Aflatoksin	Ürün	Miktar	Aflatoksin
Şeftali çekirdeği	10	B ₁ , B ₂ , G ₁	Persipan	5	B ₁
Yer fıstığı (dane)	10	B ₁	Süt tozu	4	M ₁
Fındık (dane)	20-50	B ₁	Yaban hayvanı yemi	50	B ₁ , G ₁
Marzipan	2	B ₁ , B ₂	Buğday (kızılmış)	0.5	B ₁ , G ₁

Çizelge 6' da fındıkta % 9.9 oranında saptanan kontaminasyon sıklığına karşın aflatoksin miktarları sınır değerleri aşmamıştır. İngiltere' de de ticarete sunulan değişik orijinli ürünlerin (Virjinya yer fıstığı, Orta Afrika cevizi, Güney Amerika bademi, Brezilya cevizi, Hindistan yer fıstığı) perakende ve parti örneklerinde aflatoksin ve okratoksin rastlanmamıştır. Danelerdeki nem içeriğinin % 8' in altında oluşu ve uygun depolama koşulları mikotoksinlerin bulunmayışına gerekçe gösterilmiştir.

Yine değişik orijinli toplam 294 fındık örneğinde (n=99 ABD, n=99 Almanya, n=59 İsviçre, n=24 Kanada, n=13 Türkiye) aflatoksin saptanamamıştır. Buna karşılık 1976 yılına ait yabancı literatürde, Türkiye' nin ihraç ettiği fındıkların (n=142) % 8' inde aflatoksin bulunduğu ve ortalama $33 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde toksin belirlendiği ifadesi yer alır. Mısır kökenli fındık örneklerinin (n=20) de % 90'ında $25-175 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde aflatoksin bulunmuştur. Bu rakamlar endişe vericidir. Çünkü Almanya' da gıda endüstrisinden sağlanan, şekil bozuklukları ve renk değişimlerine göre selekte edilmiş, satış dışı fındık grubunda toplam aflatoksin içeriği $\geq 122 \mu\text{g.kg}^{-1}$; bireysel satış yerlerinden sağlananların satış dışı grubunda ise $12-74 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyindedir.

Türkiye' nin fındık konusunda geçmiş yıllara ait kötü deneyimleri vardır. 1967 yılında Kanada' ya ihraç edilen fındıklarımız aflatoksin gerekçesiyle iade edilmiştir. Ancak daha sonraki yıllara ait veriler memnun edicidir. 1987' de fındıkların (n=130) % 8' inde aflatoksine rastlanmakla beraber bu miktar $1.2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ı geçmemektedir. 1990-1994 yıllarını kapsayan zaman diliminde fındık ve mamullerinden (n=334) alınan sonuç daha da sevindiricidir. Aflatoksin kontaminasyon sıklığı % 0.3' dür ve sınır değerleri aşan örneğe rastlanmamıştır (Çizelge 8). Ancak fındık aflatoksin oluşumuna hassas ürün olduğundan aflatoksin kontrollerinin sürekli yapılmasında yarar vardır.

Yer fıstığı ve ürünleri bütün dünyada aflatoksin açısından belki de en riskli olanıdır. Daha eski yıllarda % 12.5 olan rastlanma sıklığının % 2.4' e düştüğü Çizelge 7' de görülüyorsa da yer fıstığı ezmelerinde her zaman problem vardır. 1982-1989 arası ABD' de analizi yapılan yer fıstığı mamullerinin (n=2510) % 74' ünün aflatoksin pozitif olduğu, % 10' unun da FDA' nın saptanmış olduğu limit değer olan $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ in üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. Bazı yıllarda limit değeri aşanların % 12.9 ve % 29.2 oranlarına ulaştığı saptanmıştır. 1976-1990 yıllarında Almanya' da test edilen çok sayıda yer fıstığı ve mamulünde (n=8081) aflatoksinle bulaşık olanların oranı % 6.2, limit değerleri aşanların oranı da % 2.8' dir. Bir başka veriye göre analizi yapılan yer fıstığı örneklerinden (n=2000) % 13.9' u $5 \mu\text{g} - 1600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ arasında AFB_1 içerir.

Türkiye' de İçel yöresi yer fıstıklarında kurutma sonu (n=20) ve depolama (n=20) örneklerinden yalnızca 2 depo örneğinde (2/20) 3 ve $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ miktarında AFB_1 belirlenmiştir. Beş yıl boyunca taranan yer fıstığı ve mamullerinin (n=514) ise % 19.8'lik bölümü aflatoksinle kontamine bulunmuştur. Örneklerin 79 adedi $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ değerinin üzerinde AFB_1 içerdiğinden sınır değeri aşan örnek sayısı % 3.4' dür (Çizelge 9). Yukarıda verilen rakamlar yer fıstığının bütün dünyada ne denli riskli bir ürün olduğunun kavranması için yeterlidir.

Türk insanı da yer fıstığı nedeniyle aflatoksin riski altındadır. Bunu şöyle bir örnekle açıklamak mümkündür; günde 25 g yer fıstığı yiyen 60 kg ağırlıktaki bir insan, fıstığın ortalama $12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde AFB_1 içermesi durumunda 300 ng aflatoksin ile yüklenir. Avrupa Topluluğu tarafından günlük kabul edilebilir doz (ADI) 0.014 ng/gün vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Buna göre 60 kg ağırlığındaki bir kişi günde en fazla 0.84 ng'a kadar

AFB₁ ile yüklenebilir. Görüldüğü gibi bu hesaba göre alınan doz tolere edilemeyecek düzeydedir.

Çizelge 8. Türkiye' de 1990-1994 yılları arasında çeşitli gıdalarda saptanan toplam aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) ve okratoksin A (OTA) sıklığı (Çoksöyler ve ark. 1996).

GIDA	Kontaminasyon sıklığı (%)		Sınır değerinin üzerindeki (%) *	Örnek sayısı (n)
	Aflatoksin	OTA		
Yer fıstığı ve mamulleri	19.8	1.95	15.4	514
Fındık ve mamulleri	0.3	0.60	0	334
Antep fıstığı	6.1	1.50	3.5	198
Susam ve Tahin	2.3	1.14	0	175
İncir	17.4	1.09	9.8	92
Kırmızı biber	66.7	33.30	46.7	60
Mısır ve mamulleri	0	0	0	41
Toplam örnek sayısı				1414

* Türkiye' nin kullandığı sınır değer

Büyük miktarda margarin üretiminde kullanılan yer fıstığı yağlarında aflatoksin riski bulunmaz. Bu yağlar toksin içeriği yüksek fıstıklardan üretilenler bile, proses sırasında alkali ekstraksiyon uygulaması ile sorun tamamen ortadan kalkar.

Antep fıstıklarında 1970' lerde görülen aflatoksin problemi azalarak da olsa devam etmektedir (Çizelge 6). Bunda ABD'nin 1970'li yıllarda ithal ettiği Antep fıstıklarında yüksek oranda görülen aflatoksin kontaminasyonu sonucu başlattığı sistematik analizlerin rolü olmuştur. 1971 yılında Türkiye' nin ABD' ye ihraç ettiği Antep fıstıkları da geri çevrilenler arasında yer almıştır.

Antep fıstıklarının fungal florası Türkiye fıstıklarında; *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. terreus* ve *Asp. ochraceus* olarak, İspanyol fıstıklarında; *Asp. niger*, *Asp. flavus* ve *Penicillium* spp. olarak belirlenmiştir. Bunlar içinde *Asp. flavus*' un aflatoksin üreticisi olarak önemi fazladır. Henüz olgunlaşmamış veya yeni hasat edilmiş danelerde küf kontaminasyonu pek görülmez. Antep fıstıklarında *Asp. flavus* enfeksiyonu sap sürgün bölgesinde başlar ve fıstığın dış kabuğunda ürer, aflatoksin kontaminasyonu ise iç danelerde kendini daha sonra gösterir. Fıstık içindeki aflatoksin miktarı kabuğa göre çok fazladır. Enfeksiyon ve toksin oluşumunun, yetersiz kurutma sonrası depolama aşamasında gerçekleştiği ve inokülasyon kaynağının depolar olduğu kabul edilir. Antep fıstıklarında yumuşak kabuk dokusunun altında bulunan henüz çatlamamış durumdaki sert kabukların *Asp. flavus* misellerinin iç daneye geçişine imkân vermeyeceği düşüncesi, floresan antikor tekniği kullanılarak yapılan bir çalışma ile zayıflamıştır. Yapay yolla *Asp. flavus* ile enfekte edilen, kabuğu çatlamamış Antep fıstıkları % 88 bağıl nem ve 29 °C de 3 hafta tutulduktan sonra iç danelerde 65 µg.kg⁻¹ düzeyinde AFB₁ ve AFG₁ belirlenmiştir. Mikroskopik incelemelerde fungus misel fragmentlerinin damarlar içerisinde görülmesi fungal invazyonun vasküler yolla (damarlardan) olduğunu gösterir.

Dünyada ihraç Antep fıstıklarında % 80' lere varan kontaminasyon oranları % 13 düzeylerine gerilemiştir. İhracat yapan ülkeler daha özenli bir hasat ve depolamanın yanı sıra otomatik aletlerle floresan veren danelerin ayırımına yönelmiş bu yolla aflatoksin içeriği % 50

düşürülebilmıştır. Buna karşılık İsviçre' de sertifika alan Antep fıstıklarında 8-61 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ AFB₁ bulunmuş, bazı örneklerde konsantrasyon 90 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a kadar yükselmiştir. Bunun üzerine 22 kg olarak alınan örneğin bile partiyi temsil edemiyebileceği tartışmaları başlamıştır.

Türkiye' de 1976 yılında üretim bölgelerindeki Antep fıstıklarında üretim ve depolama aşamalarında çıkarılan küf spektrumuna göre *Aspergillus niger*, *Asp. flavus* ve *Penicillium* spp. dominant eksternal küflerdir. Soyulan Antep fıstıklarında ve endospermde küf miselleri saptanmamıştır. Ancak depo fıstık örneklerinde ve depolanan binalardaki toz, toprak örneklerinde *Asp. flavus*, *Asp. ochraceus*, *Asp. niger* dominant küflerdir. İzole edilen 43 *Asp. flavus* suşunun yaklaşık yarısı aflatoksin oluşturma yeteneği göstermiş, 11 izolat da OTA sentezlemiştir. 1990-1994 yıllarını kapsayan periyotta Antep fıstıklarında (n=198) aflatoksin kontaminasyon sıklığı % 6.1 oranıyla hala oldukça yüksektir. Sınır değeri aşanların oranı % 3.5 olup aflatoksinin de oldukça yüksek düzeyde oluştuğuna işaret etmektedir (Çizelge 8).

Cevizlerde aflatoksin içeren danelerin 1/28250 oranı ile bulunduğu hesap edilmektedir. Bu oranın yer fıstıklarında 1/700, Antep fıstıklarında 1/4500 olarak hesaplandığı düşünülürse cevizlerin aflatoksinle kontaminasyon olasılığı daha azdır. Çok sayıda ticarete sunulan ve perakende ceviz örneğinde aflatoksin belirlenemezken, Mısır cevizlerinde (n=20) % 75 oranıyla aflatoksin bulunduğu, konsantrasyonunun da 15-25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde değiştiği belirlenmiştir. Kullanım alanı geniş olmadığı için çam fıstıkları riskli görülmemekle birlikte yapılan bir çalışmada; Tunus çam fıstıklarının (n=50) yaklaşık yarısı AFB₁ içerikli bulunmuş, AFB₁ konsantrasyonunun 25-2080 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde olduğu, AFG₁ içerenlerde de konsantrasyonun 56-4570 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ değerleriyle tehlike sinyalleri verdiği anlaşılmıştır.

Bademlerin aflatoksin ile kontaminasyon oranları değişik zamanlarda, farklı orijinli bademlerde; % 2.1 (n=327), % 2.3 (n=353), % 2.6 (n=78) ve % 6 (n=593)' dir. Cevizlerde olduğu gibi bademlerde de aflatoksinle kontamine dane oranı oldukça düşük (1/26500) hesap edilmektedir.

Tahıllarda aflatoksin kontaminasyonu tarlada olgunlaşma, hasat, kurutma ve depolamada meydana gelebilir. Tahıllar içinde mısır genel olarak mikotoksin, bu kapsamda aflatoksin kontaminasyonuna en fazla eğilim gösteren üründür. 1983 yılında ABD' de insan gıdası olarak kullanılan mısırlarda; güneydoğu bölgesi örneklerinde (n=109) % 45, güney bölgesi örneklerinde (n=28) % 43 ve diğer bölge örneklerinde (n=197) % 32 oranında aflatoksin bulunmuştur. Örneklerdeki aflatoksin içeriği de yüksektir. Ortalama değerler bölge sırasına göre; 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ve 77 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dir. Bir başka kaynağa göre analize alınan 1311 mısır örneğinin 35' inde (%2.7) 19 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ve üzerinde aflatoksin bulunmuştur. Yıllara ve hava koşullarına bağlı olarak aflatoksin kontaminasyonu mısırlarda oldukça farklı değerler gösterir. Özellikle kötü hava koşullarında mısırdaki aflatoksin içeriği 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyine çıkabilir. Kendi kendine kızıymış mısır partilerinde ise danelerin bir bölümü 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ AFB₁ ile kontamine edilmiştir.

Türkiye' de test edilen 41 adet mısır ve mısır mamulü örneğinde aflatoksine rastlanmamış olması, ayrıca okratoksin de bulunmaması (Çizelge 8) bu ürünün güvenli olduğunu gösterir. *Aspergillus flavus*' un mısırdaki özellikle kuraklık stresinde tarlada kolaylıkla enfekte edebildiği ve aflatoksin oluşumunun depolamadan çok önce başladığı düşünülürse Türkiye mısırlarının hiç risk taşıması önemli bir artı değerdir.

Aflatoksinle kontamine tarımsal ürünler kendi içlerinde risk açısından sınıflandırıldığında ilk sıraları; mısır, yer fıstığı, Paraguay cevizi, pamuk tohumu, Antep fıstığı ve kopra (kurutulmuş ve kıyılmış Hindistan cevizi içi) alır. Aflatoksin açısından ikinci derecede önem taşıyan ürünler; kuru incir, badem, Pekan cevizi, ceviz, kuru üzüm ve baharattır. Aflatoksin; darı çeşitlerinde, buğday, yulaf, arpa, pirinç, soya fasulyesi ve diğer baklagil danelerinde daha ender oluşmaktadır. Örneğin 1363 buğday, darı ve yulaf örneğinden sadece 9' u (% 0.66) aflatoksinle bulaşık bulunmuştur.

Türkiye buğdaylarının (n=613) hasat ve depolama döneminde belirlenen fungal enfeksiyon çalışmaları gerek hasat sonrası gerekse depolama aşamalarında depo funguslarının toplam fungal enfeksiyon içindeki payının çok düşük olduğunu ve danelerde nem içeriğinin de % 10.69' u aşmadığını göstermiştir. Türkiye' deki buğdaylar fungal bozulma ve mikotoksinler açısından riskli ürünler arasında değildir. Bulduğumuz klima ürünün yeterince kuru olarak depolanmasına elvermekte ayrıca ürünler de silolarda çok uzun süre beklememektedir. Tahıl ve baklagil danelerinin yeterince kuru olarak depoya girmeleri ve uygun koşulda depolanmaları aflatoksin riskini çok azaltır. Türkiye bulgurlarında, aflatoksin tarama çalışmaları sonucunda, aflatoksin olmadığı anlaşılmıştır. Bu üründe de düşük nem oranı aflatoksin kontaminasyonunu engeller.

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

Türkiye' de 1990-1994 yılları arasında yem maddeleri (çeşitli küspeler, mısır) ve karma yemler (n=1685) aflatoksin ve okratoksin içeriği açısından taranmıştır (Çizelge 9). Pamuk tohumu küspesi % 17.3 oranı ile aflatoksinin en sık rastlandığı yem maddesi olmakla beraber içerdiği aflatoksin miktarı sınır değerleri aşmamıştır. ABD' de hemen her bölgeye ait pamuk tohumlarında $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ üzerinde aflatoksin içeren örneklerin oranı % 7-67 olarak belirlenmiş, $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ değerini aşan örneklerin sayısı da oldukça yüksek bulunmuştur. Bir başka veri ise pamuk tohumlarında (n=151) yaklaşık % 28 oranında AFB₁, % 9 oranında da AFB₂ bulunduğu ilişkindir. Pamuk tohumu için verilen bu değerler bu yağlı tohumun aflatoksin oluşumuna ne denli uygun bir substrat olduğunu gösterir. Türkiye' deki pamuk tohumu küspesi örneklerinde (n=318) sınır değeri aşan aflatoksin bulunmaması sevindirici olmakla beraber görülen yüksek orandaki kontaminasyon sıklığı kontrollerin sürekli yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Avrupa ülkelerinde karma yemlerde aflatoksine rastlanma sıklığı % 11, Asya' da % 57, Avustralya' da % 42, Güney Afrika' da % 29 düzeyindedir. Türkiye karma yemlerinde (n=277) durumun vahim olmadığı, toplam yem hammaddelerinde (n=1408)' de % 11.6 oranıyla saptanan rastlanma sıklığının da tehdit oluşturmadığı söylenebilir. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğünün yürüttüğü kapsamlı çalışmaların sonucu olan bu veriler Türkiye'nin önemli tarım ürünleri ve yemlerdeki aflatoksin risk derecesini ortaya koymuştur. Benzeri çalışmaların sürdürülmesinin yararı açıktır.

Çizelge 9. Türkiye'de 1990-1994 yılları arasında yem maddelerinde saptanan toplam aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) ve okratoksin A (OTA) sıklığı (Çoksöyler ve ark. 1996).

Yem Maddeleri	Kontaminasyon sıklığı (%)		Sınır değerinin üzerindeki (%) *		Örnek sayısı (n)
	Aflatoksin	OTA			
Mısır	12.3	0.41	1.2		488
Ayçiçeği tohumu küspesi	5.8	3.95	0		380
Pamuk tohumu küspesi	17.3	0.32	0		318
Soya küspesi	11.7	1.35	0		222
Karma yem	13.7	1.08	1.8		277
Toplam örnek sayısı					1685

* Türkiye' nin kullandığı sınır değeri

Ayçiçeği tohumu ve soya küspeleri de sınır değeri aşan aflatoksin içermemektedir. Bunlarda aflatoksin görülme sıklığı % 5.8 ve % 11.7' dir.

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

Karabiber içerisinde Mısır karabiberleri (koyu ve açık renkli) kalitesiz bilinmektedir. Bu ülkenin karabiberlerinde *Asp. flavus* ve *Asp. parasiticus* dominant florayı oluşturur. İzole edilen *Asp. flavus* suşlarından farklı iki çalışmaya göre % 20' sinin ve % 100' ünün aflatoksin üretme yeteneğinde olduğu görülmüştür. Kaynağı bilinmeyen karabiber örneklerinde (n=23) hem koyu hem de açık renkli çeşitlerde aflatoksin saptanamazken, Mısır karabiberinde koyu renkli çeşitte 35 µg.kg⁻¹ ve açık renkli çeşitte 22 µg.kg⁻¹ AFB₁ belirlenmiştir. Aflatoksin oluşumu açısından kırmızı biber karabiberle kıyaslanamayacak ölçüde uygun bir substrattır. Kontrol amacıyla yapılan analizler, kırmızı biberlerin önemli düzeyde kontamine olduklarını gösterir. Arnavut biberi diye anılan acı biber, Hindistan, Etopya, Mısır ve Türkiye kökenli kırmızı biberler aflatoksin açısından oldukça kötü durumdadır. Almanya' da test edilen toz kırmızı biber örneklerinden (n=22) % 50' si aflatoksin pozitif olup % 18' i 8.4-24 µg.kg⁻¹ AFB₁ içermiştir. Yine Almanya piyasasında bulunan ve çoğu Türkiye' den ithal edilen kırmızı biber örneklerinin (n=2000) % 50' sinin sınır değerlerin üzerinde aflatoksin içerdiği belirlenmiştir. Türkiye' de Kahramanmaraş ve Gaziantep yöresinden toplanan kırmızı biber örneklerinde (n=60) aflatoksin kontaminasyonu % 66.7 ve OTA kontaminasyonu % 33.3 olarak belirlenmiş, sınır değeri aşan örnekler ise % 46.7 gibi yüksek bir oranda saptanmıştır (Çizelge 8).

Türkiye' de yapılan bir başka tarama çalışmasında kırmızı biber örneklerinin (n=141) % 32.6' sında 0.45-80.25 µg.kg⁻¹ AFB₁ belirlenmiştir. Başka bir kaynaktan ise kırmızı toz ve pul biberlerde aflatoksin ve okratoksin A' ya % 80-100 oranıyla rastlandığı belirtilmiştir. Bütün bu rakamlar kırmızı toz ve pul biberlerimizde aflatoksin riskinin ne denli yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Gerek Türkiye' de gerekse kırmızı biber ihraç eden ülkelerde kırmızı

biberlerin geleneksel olarak toprak zemin üzerine yayılarak 8-10 gün kurutulmaya bırakılması yüksek kontaminasyonun nedenidir. Çünkü ülkemizde yapılan bir çalışmada biberler yarılarak içindeki tohum ve plesanta çıkarılıp iç yüzey atmosferle temasa gelecek şekilde yayılır ve kurutulursa aflatoksin miktarında önemli redüksiyon sağlandığı gösterilmiştir. Bu uygulamada biberler 48 saat gibi kısa bir sürede sabit ağırlığa ulaşmakta, A_S değeri 0.70' in altına inmektedir. Sonuç olarak biberlerde fungal yük ve kolonizasyon azalmakta, aflatoksin oluşumu da önemli düzeyde engellenmektedir.

Kuru meyvelerde mikotoksin kontaminasyonuna ender olarak rastlanır. Kuru meyvelerin dayanıklılığı ürünlerde $A_S=0.75$ olduğunda en az 6 ay, $A_S=0.70$ veya altında olduğunda en az 1 yıl dayanma süresi hesap edilir. Tüm meyveler içinde incirin aflatoksin oluşumuna en uygun substrat olduğu görülür. İncirde aflatoksin *Aspergillus flavus*' la birlikte öncelikli olarak *Asp. parasiticus* tarafından oluşturulur. Eğer *Asp. ochraceus* ile de enfeksiyon gerçekleşmişse o zaman aflatoksin yanında OTA da meydana gelir. İncirin küf konidileri ile kontaminasyonu ağaç üzerindekiyken başlar. Meyveler tozlaşma sırasında incir ilek sinekleri (incir yaban arısı) aracılığıyla enfekte olurlar ve meyveler olgunlaşırken aflatoksin kontaminasyonu da başlar. Eğer hasattan sonra kontaminasyonun daha ileri boyutlara ulaşması engellenmek isteniyorsa meyveler 48 saat süre ile en az 60 °C de kurutulmalıdır. Türkiye incirlerinin aflatoksinle kontamine olduğuna ilişkin ilk sinyal 1973 yılında Danimarka' ya ihraç edilen kuru incirlerimizden gelmiştir. 1976' da Ege Bölgesi' nde; ağaç üzerindeki olgun incirlerden başlayarak kuru incir ve mamulleri işleme tesislerinde değişik işlem evrelerinden alınan ve çeşitli incir mamullerine (lokum, ezme vb) ait örneklerde (n=56) aflatoksin belirlenmemiştir. 1986-1987 yıllarında yine İsviçre ve Almanya' ya ihraç edilen kuru incirlerimizde aflatoksin bulunmuş ve parti geri çevrilmiştir. Bu ikinci uyarı üzerine Tarım ve Köyişleri Bakanlığı' nca başlatılan proje kapsamında incirlerin gerçekten yüksek düzeyde aflatoksin ve OTA içerdikleri belirlenmiştir.

UV lambası altında parlak sarı-yeşil renkte floresan veren kuru incirlerin seleksiyonu oldukça olumlu sonuçlar verir. Bu parlak sarı-yeşil renkli floresana incirde *Asp. flavus* grubu küflerin oluşturduğu aflatoksinin dışındaki bir metabolit (kojikasit) neden olur. Floresan veren örneklerle aflatoksin varlığı arasında korelasyon yüksektir. Floresan veren danelerin % 70' inin aflatoksin, aynı zamanda 6.9 g.kg⁻¹ düzeyinde kojik asit içerdiği belirlenmiştir. Yine bunlardan % 20' sinin 5 µg.-12 mg.kg⁻¹ düzeyinde OTA ile kontamine oldukları da gösterilmiştir. Ancak unutulmaması gereken nokta floresan vermeyen incirlerin de aflatoksinle kontamine olabilecekleridir.

1993 yılında İsviçre' de analizi yapılan Türkiye kökenli kuru incir örneklerinin (n=25) % 28 oranında AFB₁ ile 0.1-0.3 µg.kg⁻¹ düzeyinde kontamine oldukları saptanmıştır. Örneklerin birinde AFB₁ içeriği 2.2 µg.kg⁻¹ bulunmuştur. Almanya' da 1991-1993 yılları arasında araştırılan kuru incirlerde (n=343); ortalama 15.4 µg.kg⁻¹ konsantrasyonda aflatoksin içeren örneklerin oranı % 10 olarak belirlenmiştir. Kuru incir mamullerinde ise rastlanma sıklığı daha da yüksek bulunmuştur. Örneklerin (n=36) % 86' sının AFB₁ içerdiği belirlenmiştir. 1989-1992 yıllarını kapsayan 4 yıllık periyotta İsviçre ve Almanya' da test edilen kuru incirlerin (n=105) sınır değerleri aşan aflatoksin içerikli örnek oranı % 18.4 olarak saptanmıştır.

Türkiye' de 1990-1994 yıllarında taranan kuru incir örneklerinin (n=92) % 17.4' ü aflatoksinle kontamine bulunmuş, % 9.8' inin sınır değerleri aşan miktarda aflatoksin, % 1' ininde OTA içerdiği saptanmıştır (Çizelge 8). Türkiye için önemli bir ihraç ürünü olan ve iç pazarda da sevilerek tüketilen kuru incirde aflatoksin düzeyini aşağıya çekmek için daha fazla önlem

almak gerekmektedir. Çünkü basit bir hesapla bu ürünün de izin verilen günlük alımın çok üzerinde vücuda AFB₁ yükleyeceği açıktır.

Süt, süt tozu ve peynirler hayvansal ürünler içinde daha fazla aflatoksin riski taşırlar. Yine de bitkisel ürünlerle kıyaslandığında hem görülme sıklığı hem de aflatoksin konsantrasyonu daha düşüktür. Süt ürünlerinden peynirler birçok mikotoksin ile bu arada aflatoksine bulaşık olabilir. Küflerle kontaminasyon özellikle olgunlaşma süresi uzun sert peynirlerin kabuk bölgesinde gerçekleşir. Kabuk bölgesinde gelişen küfün türüne bağlı olarak oluşan mikotoksinler 6-8 cm derinliğe kadar difüze olabilirler. Peynirde iz miktarda saptanan aflatoksinin bile 1-2 cm derinliğe inebildiği görülmüştür. Aflatoksin 7-10 °C lerin altında sentezle- nemediğinden peynirlerin +4 °C de muhafazaları sonraki oluşumları engeller. Almanya' da araştırılan peynir örneklerinde (n=222) AFB₁ belirlenmiştir. Peynirlerdeki aflatoksin konsantrasyonları genellikle düşüktür, çok ender olarak 331 µg.kg⁻¹ düzeyinde görülebilir. Bir başka taramada peynir örneklerinden (n=558) % 42' si aflatoksine kontamine olmakla beraber bunların % 36.3' ü 250 ng.kg⁻¹ düzeyinin altında, % 5.7'si de bu düzeyin üzerinde aflatoksin konsantrasyonu göstermiştir. AFM₁ içeren sütler peynir yapımında kullanıldığında AFM₁' in hem peyniraltı suyuna (PAS), hem de telemeye geçtiği görülür. Peynirde AFM₁, süte oranla % 3.2-3.7 oranında zenginleşir. Süt tozunda ise AFM₁ konsantrasyonu 8 misline çıkar. Süt tozu örnekleriyle (n=166) yapılan bir çalışmada aflatoksine bulaşık örnek % 4.8 oranıyla belirlenmiş, toksin konsantrasyonu ise 0.67-2.0 µg.kg⁻¹ değerleri arasında bulunmuştur.

Tereyağlarında ve yayık ayranında (buttermilk) zaman zaman aflatoksin saptanabilirse de risk yaratacak düzeyde değildir. Bu miktar genellikle 25 ng.kg⁻¹ düzeyin altındadır. Kondanse sütler ise tamamen tehlikesizdir.

Türkiye' de 1980 yılında yapılan bir çalışmada süt örneklerinde (n=101) ve çoğunu Antakya küflü çökelek peynirlerinin oluşturduğu peynir örneklerinde (n=13) aflatoksin saptanamamıştır. 1992 yılında Konya ve çevresinde doğal flora ile üretilen küflü peynir örneklerinden (n=140) izole edilen fungus izolatlarının % 8.45' i *Asp. flavus* olarak tanımlanmasına karşın örneklerin hiç birinde toplam aflatoksin (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) ve penisilik asit belirlenmemiştir.

Hayvansal ürünlerde direk küf kontaminasyonu ile aflatoksin oluşumu pek olanaklı görülmez. Geleneksel yöntemle ev ve çiftliklerde üretilen, doğal küf florası ile olgunlaştırılmış çığ fermente sucuklar, tuzlanarak ve kurutulularak hazırlanan jambonlar dikkate alınmazsa, et ve ürünlerinde aflatoksin riski yok denecek kadar azdır. Suni yolla *Asp. flavus* ve *Asp. parasiticus* ile kontamine edilen taze et ve jambonlarda, 20 °C de 14 gün tutulmak koşuluyla önemli düzeyde aflatoksin oluşmuştur. Ancak piyasa taramaları et, salam ve sosislerde aflatoksin bulunmadığını ortaya koymuştur. Usulüne uygun işlenen, olgunlaştırılan ve depolanan etlerde aflatoksin bulunmadığı rahatlıkla söylenebilir.

Hayvansal gıdalardan süt, karaciğer, böbrek, yumurta "Carry over" yoluyla aflatoksine kontamine olur. Yemlerin kritik aflatoksin konsantrasyonlarında, toksin % 0.01-0.3 oranı ile organ ve dokulara geçmektedir. Çizelge 10 yemlerde bulunan AFB₁' in hayvan organ ve dokularına (hayvansal gıdalara) geçişiyle ilgili değerleri toplu halde göstermektedir. Her bir hayvan türü için yemdeki kritik aflatoksin miktarı farklıdır.

Süt ineklerinde AFB₁ % 0.3 oranında süte geçerek AFM₁ şeklinde ortaya çıkar, ancak en yüksek düzeyde karaciğer ve böbreklerde birikir. Hayvanların kaslarında aflatoksin ya hiç

bulunmaz veya çok düşük düzeyde ender olarak görülebilir. Hayvansal gıdalara yemlerden geçen AFB₁' in risk yaratmaması için hayvanların aflatoksin açısından öngörülen sınır değerleri aşmayan yemlerle beslenmeleri gerekir. Yer fıstığı, fındık, süt ve diğer gıdalarla alınan aflatoksin yanında ciğer, et ve yumurta tüketimi ile alınan aflatoksin önemsiz düzeydedir.

Çizelge 10. Leistner ve Eckhardt'a göre yemlerde bulunan aflatoksinin (AFB₁) hayvansal gıdalara geçişi (Weidenbömer 1999).

Hayvan türü	Gıda aflatoksin	/ Geçiş (%)	Yemde kritik kons. ppb (µg.kg ⁻¹)	Yemlerde sınır değerler ppb (µg.kg ⁻¹)
Süt inekleri	Süt (M ₁)	0,3	30	10 Yem maddesi Karma 20 yem
Domuz	Karaciğer (B ₁)	0,1	80	10 Yavru yemi 20 Domuz yemi
Tavuk	Karaciğer (B ₁)	0,1	100	10 Cıvciv yemi 20 Broyler yemi
Bıldırcın	Yumurta (B ₁)	0,1	100	20 Bıldırcın yemi
Tavuk	Yumurta (B ₁)	0,05	220	20 Tavuk yemi
Besi sığırları	Karaciğer (B ₁)	0,01	1400	10 Dana yemi 20 Sığır yemi

07.05 Aflatoksin Detoksifikasyonu

Aflatoksinle bulaşık gıdaların ve yemlerin detoksifikasyonu için akla gelebilecek her yöntem denenmiştir. Aflatoksin gıdalar içerisinde çok stabildir ve termoresistans özelliğinden dolayı pastörizasyon, buharda pişirme, fırında pişirme ve hatta sterilizasyon yöntemleri ile toksinin parçalanması olanaklı değildir. Pastörizasyonun etkisi AFB₁ ve AFG₁ içeren elma sularında denenmiş ve 120 °C gibi yüksek sıcaklıkta 10 dk tutulsalar bile toksinin % 10 oranında elma sularında kaldığı belirlenmiştir. Sütte bulunan AFM₁' in de pastörizasyonla yıkımının olanaksız olduğu açıktır. Yüksek sıcaklık uygulamaları en fazla yer fıstığı, ceviz, fındık veya yer fıstığı unu gibi ürünlerde denenmiştir. Pişirme ve fırınlama işlemleri yetersiz kalınca kavurma ve kombine işlemler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. 500 µg.kg⁻¹ aflatoksin içeren yer fıstığı yağı 160 °C de 60 dk ısıtıldığında toksin miktarı ancak 400 µg.kg⁻¹ a kadar düşürülürken, 1000 µg.kg⁻¹ aflatoksin içeren yer fıstıkları 160 °C de 30 dk kavrulduklarında aflatoksin miktarı 5 µg.kg⁻¹ düzeyine indirilebilmiştir. Bir başka denemede 150 °C de 90 dk kavru lan yer fıstıklarının AFB₁ miktarında % 60 oranında düşüş sağlanmıştır. Yer fıstıklarında yağda kavurma işlemi iyi sonuçlar verirken Peka n cevizleri ve fındıklarla yürütülen benzer çalışmalarda başarılı sonuçlara ulaşıl amamıştır. Yer fıstığı unlarına uygulanan kombine işlemd e fıstıklar, H₂O₂ varlığında pH 9.5' da ve 80 °C de 30 dk tutulduğunda toksinin tamamının detoksifikasyonu başarılmıştır.

Su, tuz çözeltileri ve organik çözücüler kullanılarak aflatoksinin ekstraksiyon yolu ile gıda ve yemlerden arındırılması genellikle çok iyi sonuçlar vermemekle birlikte bazı ürünlerde uygulanabilir bulunmuştur. Örneğin mısır ıslak öğütüldüğünde aflatoksin içeriğinin % 45' i suya geçmekte, % 35' i selüloz, % 15'i protein fraksiyonda, % 10'u da embriyoda kalmaktadır. Yağlı tohumlardan aflatoksinin arındırılması amacıyla denen en etanol ve prapanol ekstraksiyonlarının başarısı, toksin miktarının % 10 redüksiyonuyla sınırlı kalmıştır.

Aflatoksinin kimyasal yapısında bulunan lakton bağı onları alkalilere duyarlı kılar. Ayrıca oksidan maddelere karşı da aflatoksin stabilitesini koruyamaz. Pek çok kimyasal madde aflatoksinin inaktivasyonunu sağlar, içlerinde en etkili olanları; amonyak, klor gazı, hidrojenperoksit, sodyumhipoklorit ve ozondur. Bu maddelerin kullanılması ile detoksifikasyon sağlanabilirse de gıdalarda ve yemlerde istenmeyen değişiklikler meydana geldiğinden veya bazı maddelerin besin değeri azaldığından, özellikle gıda sektöründe kullanılmaları olanaklı değildir. Yemlerin detoksifikasyonunda bir dereceye kadar alkali uygulamasından yararlanılabilir. Yem maddelerine NH₃ gazı verilmesi pratikte en fazla değer taşıyan yöntemdir. Bu türlü yemler hem çiftlik hayvanlarının beslenmesinde hem de Gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliğinde kullanılır. Pamuk tohumu ve yer fıstığı küspelerinden aflatoksinin detoksifikasyonunda amonyak uygulamasının başarısı diğer alkalilerden üstündür. Yer fıstığı ve pamuk yağlarında ekstraksiyon sonrası kalan az miktardaki aflatoksinin giderilmesinde de alkali ekstraksiyonundan yararlanılır.

Sıvı gıdalardan AFB₁' in uzaklaştırılmasında denenen bentonit ile adsorbsiyon yöntemi veya aflatoksinin parçalanmasını sağlayan UV veya iyonize ışınlarla ışınlama yöntemleri ile de aflatoksinin tamamına yakın kısmının detoksifikasyonu sağlanır. Ancak bentonit çok az gıdaya uygulanabilir olduğundan, ışınlama ise yüksek dozlarla (20-50 kGy) gereksindiğinden fazlaca ilgi çekmemiştir. Baharatın X ışınları ile sterilizasyonuna Belçika ve Danimarka' da izin verilmiştir. Ancak sterilizasyonda kullanılan 10 kGy doz bile FAO ve WHO tarafından sakıncalı görülmektedir.

Bazı mikroorganizmalar aflatoksini metabolize edebilme yeteneği gösterirler ve toksini daha az toksik bileşiklere çevirirler. Sayıları çok sınırlı olan bu mikroorganizmalar içinde sadece *Aspergillus niger* grubundan bazı küfler yer alır. Bu küfler toksik olan AFB₁ ve AFG₁' i, çok daha az toksik olan AFB_{2a} ve AFG_{2a} derivatlarına çevirebilirler. Bakterilerden de *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184 suşu, test edilen yaklaşık 1000 mikroorganizma içinde aflatoksini adsorbsiyon yolu ile elemine eden yegane bakteridir. Bu bakteri kullanılarak süt, yerfıstığı yağı, yerfıstığı, tahıllar 20 °C de 12 saat inkübasyon sonunda detoksifiye edilmiştir. Bakterinin adsorbe ettiği toksin, hücrelerin ölmesi ile tekrar hiçbir değişikliğe uğramadan ortama salındığından ve uygulamanın getirdiği başka zorluklar nedeniyle biyolojik detoksifikasyon yöntemi günümüzde kullanılmamaktadır. Denenen çok çeşitli, özellikle de kimyasal yöntemlerle istenilen sonuçlara ulaşılamaması, fiziksel yöntemlerden seleksiyona ağırlık verilmesine neden olmuştur. İşlevsel ve kolay uygulanabilir olan bu yöntem ne yazık ki sadece bazı daneli tarım ürünleri için uygundur. Danelere bulaşan küfler burada gelişerek renk değişimine neden olduklarından bunların elle seleksiyonu olanaklıdır. Özellikle UV lambaları altında floresan veren Antep fıstığı, fındık ve incirlerin otomatik aletlerde ayrımı ile üründe aflatoksin içeriği % 50' ye varan oranlarda azaltılabilir.

07.06. Gıdalarda ve Yemlerde Sınır Değerler

Aflatoksin içerikli gıdaların detoksifikasyonunda çok başarılı yöntemlerin bulunamaması, birçok tarımsal ürün ihraç eden ülke ürünlerinin mikotoksinlerle bulaşık olması gıdaların ve en az onlar kadar da yemlerin kontrol edilmesini gerekli kılmıştır. İlk olarak WHO, FAO gibi organizasyonlar, gıdalarda tolere edilebilecek aflatoksin miktarını 30 µg.kg⁻¹ olarak belirlemişler ve bu miktardan fazla aflatoksin içeren gıdaların ithal edilmemesi kararını almışlardır. Bu sınır değerler zaman içerisinde düşürülmüştür. Aynı tarihlerde bazı Avrupa ülkeleri WHO ve FAO normlarından daha düşük miktarları benimsemiş, UNICEF gibi kuruluşların da çocuklar tarafından tüketilecek gıda maddelerinde daha düşük sınır değerlerin

saptanmasında katkısı olmuştur. Günümüzde 60 kadar ülke aflatoksin, okratoksin A, sitrinin, patulin, zearalenon, deoksinivalenol, T-2 toksin, fumonisin gibi mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek en yüksek düzeylerini yasal olarak belirlemiştir.

Avrupa Birliği' ne üye ülkelerin saptadıkları aflatoksin sınır değerleri bile büyük farklılıklar göstermektedir. Bu ülkelerin bir kısmı sınır değerleri tüm gıdalar için verirken, bir kısmı da gıdaları gruplandırarak veya süt ürünlerini kendi içlerinde ayırarak sınır değerler belirlemiştir. Ürünler bazında limitler hazırlayan ve sınır değerleri en düşük olan ülkelerin başında Almanya, Avusturya, İsviçre, İngiltere gelmektedir. Bazı ülkeler ise sınır değerleri yasal olarak belirlememiş, öneri olarak sunmuştur. Sınır değerler tartışılabilir, eleştirilebilir gerektiğinde de değiştirilebilir değerlerdir. Önemli olan uluslararası tarımsal ürün, gıda ve yem ticaretinde ortak normlara yaklaşılması, dolayısıyla ticarete rekabet koşullarının bozulmasının önlenmesi ve tüketicilerin özellikle de çocukların çok iyi korunmasıdır. Her ülkenin, kendi koyduğu limit değerleri zaman içinde Avrupa Birliği ülkelerinin belirlediği değerlere yaklaştırma çabası içinde olması gerekir.

Türkiye'de de 1990-1991 yıllarında gıda ve yem maddelerinde bulunabilecek aflatoksin miktarlarıyla ilgili sınır değerler yasal olarak belirlenmiştir (Çizelge 11). En toksik olan AFB₁'in gıda ve yemlerdeki sınır değerleri ayrı bir öneme sahiptir. Tüm tarım ürünleri ve gıdalarımızda 5 µg.kg⁻¹ AFB₁' in üzerinde AFB₁ bulunmasına izin verilmez. Aynı sınır değer; İspanya, Hollanda, Rusya ve Çekoslovakya tarafından da tüm gıdalar için kullanılmaktadır. Macaristan ve İrlanda' da AFB₁ miktarı tüm gıdalarda 5 µg.kg⁻¹ olarak benimsenmekle birlikte bu sınır değer yasal zorunluluk değil, önerilen değerdir. Bu ülkelere karşılık Federal Almanya gıdalarda ancak 2 µg.kg⁻¹, bebek ve çocuk gıdalarında ise 0.05µg.kg⁻¹ düzeyinde AFB₁' e izin vermiştir. İngiltere incirlerde 2 µg.kg⁻¹ ; Fransa yer fıstığı, Antep fıstığı, badem ve yağlı tohumlarda 1 µg.kg⁻¹ ; Avusturya ikiye ayırdığı gıda gruplarında 1 ve 2 µg.kg⁻¹ gibi en düşük AFB₁ sınır değerlerini kabul etmişlerdir.

Çizelge 11. Türkiye'de gıda ve yemlerde aflatoksinlere ait limit değerler (Anonymous 1990 b, Anonymous 1991).

GIDA VE YEM TÜRÜ	AFB ₁ ppb (µg.kg ⁻¹)	AFB ₁ + AFM ₁ ppb (µg.kg ⁻¹)	Toplam Aflatoksin B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂ ppb (µg.kg ⁻¹)
Gıda maddeleri	5	–	20
Tarım ürünleri	5	–	20
Çocuk mamaları	–	–	2
Süt ve Süt Ürünleri	–	0.5	–
Yem maddeleri	50	–	–
Geviş getiren hayvanlar Karma yem (kuzu ve buzağı yemi hariç)	50	–	–
Kümes kanatlıları karma yem (genç kanatlı yemi hariç)	20	–	–
Diğer karma yemler	10	–	–

[Bu konuda Türk Gıda Kodeksindeki son değişikliği izlemek için tıklayın.](#)

Diğer taraftan Portekiz yer fıstıklarında $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$, diğer tüm gıdalarda da $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ AFB₁ yasal sınır değerleriyle Avrupa' da çıtayı en yüksek tutan ülke konumundadır. Türkiye' nin kabul ettiği yasal limitler arasında çocuk mamalarında gerek AFB₁ gerekse AFM₁ açısından bir düzenlemeye gidilmemiştir. Yalnız çocuk mamalarında toplam aflatoksinin $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ üzerinde olmaması konusunda yasal sınırlama getirilmiştir.

Ülkemizde süt ve her türlü süt ürünü için tolere edilebilir AFM₁ miktarı $0.5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dir. Almanya' da süt için $0.05 \mu\text{g.kg}^{-1}$, bebek ve küçük çocukların süt bazlı hazır mamaları içinse $0.01 \mu\text{g.kg}^{-1}$ AFB₁'e izin verilmektedir. Çekoslovakya ve Bulgaristan' da süt ve ürünlerinde bizdeki aynı sınır değer kullanılmaktadır. Diğer ülkelerin sınır değerleri hayli düşüktür.

Toplam aflatoksin miktarı için; İran ve İrlanda' nın tüm gıdalar için önerdikleri $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ve İtalya' nın yer fıstıkları için yine öneri olarak benimsediği $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ değerlerinin dışında, Türkiye' nin kabul ettiği $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ toplam aflatoksine ilişkin yasal değer Avrupa ülkeleri arasında en yüksek değerdir. Almanya, İngiltere başta olmak üzere birçok ülkede toplam aflatoksinde $4-5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ değerlerinin üzerine çıkılmamaktadır. Yalnız Yunanistan ve Fransa $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ toplam aflatoksin sınır değerini kullanmaktadır. Ancak Almanya, Avusturya, İsviçre gibi Fransa da çocuk hazır mamalarında ve diet gıdalarda çok düşük miktarlarda (0.02 , 0.01 , $0.1 \mu\text{g.kg}^{-1}$) toplam aflatoksine izin vermektedir.

Yem maddeleri ve yemlerde yalnızca AFB₁ dikkate alınmıştır. Yavru hayvanların karma yemlerinde genelde ergin hayvanların yemlerinde öngörülen sınır değerlerin yarısına izin verilmiştir. Avrupa Birliği ülkelerinde her bir yem maddesinde $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ AFB₁, karma yemlerde de 10 ve $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a izin verilmiştir. Türkiye' de yemler için kabul edilen yasal sınır değerler gıdalarla kıyaslandığında Avrupa normlarına daha fazla uymaktadır. Ülkemizde aflatoksin dışında herhangi bir mikotoksine ilişkin sınır değer belirlenmemiştir.

08. Okratoksin

Okratoksin A (OTA)' nın da içinde bulunduğu, yapı benzerliği bulunan yedi metabolit okratoksin grubunda yer alır. *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsine giren türler tarafından oluşturulan metabolitlerin en toksik olanı okratoksin A' dır. *Asp. ochraceus*' un oluşturduğu OTA ilk kez 1965 yılında laboratuvar denemeleri sırasında bulunmuştur. OTA' nın önceleri sadece *Asp. ochraceus*, *Asp. melleus* ve *Asp. ostianus* ve *Asp. petrakii* tarafından oluşturulduğu sanılmışsa da daha sonra *Penicillium* cinsine giren bazı türlerin de OTA sentezledikleri saptanmıştır. Bunlar arasında özellikle *Pen. verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*) ayrı bir öneme sahiptir. Diğer önemli OTA üreticileri olarak *Asp. alutaceus*, *Pen. aurantiogriseum* (sin. *Pen. cyclopium*) ve *Pen. commune* (sin. *Pen. palitans*) sayılabilir. Ancak OTA üreten türler bunlarla sınırlı değildir. Okratoksin gıdalarda genellikle sitrinin ve penisilik asitle veya başka mikotoksinlerle beraber görülür, çünkü okratoksin üreticisi *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri yan metabolitler olarak birkaç mikotoksini daha eş zamanlı sentezlerler (Çizelge 12).

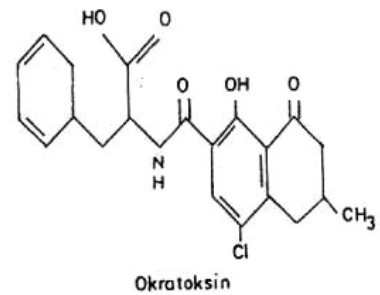
Aflatoksinde olduğu gibi okratoksin de üretici türün tüm suşları tarafından oluşturulmaz. Örneğin test edilen 48 *Asp. ochraceus* suşundan 8' i (% 16.7) toksin üretme yeteneği göstermiştir.

Çizelge 12. Okratoksin üreten fungusların oluşturdukları diğer mikotoksinler ve etkileri (Weidenbömer 1999).

OTA üretici fungus türü	Mikotoksin
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Kojikasit ¹ , penisilikasit ²
<i>Asp. glaucus</i> (<i>Eurotium</i> spp.)	Kojikasit
<i>Asp. melleus</i>	Penisilikasit
<i>Asp. ochraceus</i>	Penisilikasit, viomellein ² , ksantomegnin ²
<i>Asp. ostianus</i>	Penisilikasit
<i>Asp. petrakii</i>	Penisilikasit
<i>Asp. sclerotiorum</i>	Penisilikasit
<i>Asp. sulphureus</i>	Penisilikasit
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Patulin ³ , penisilikasit, penisilin ⁴
<i>Pen. puberulum</i>	Penisilikasit
<i>Pen. crustosum</i>	Viomellein, ksantomegnin
<i>Pen. aurantiogriseum</i>	Siklopiazonikasit ⁵ , patulin, sitrinin ² , penisilikasit, viomellein, ksantomegnin, rugulosin ⁶
<i>Pen. palitans</i>	Sitrinin, penisilikasit, penitrem A ⁷
<i>Pen. purpurescens</i>	Sitrinin, penitrem A
<i>Pen. purpurogenum</i>	Rubratoksin A, rubratoksin B ^{2,6}
<i>Pen. variabile</i>	Patulin, rugulosin ⁸
<i>Pen. viridicatum</i>	Penisilikasit, sitrinin, viomellein, ksantomegnin, siklopiazonikasit, penitrem A, griseofulvin ⁹
<i>Pen. verrucosum</i>	Penisilikasit

1: hafif mutajen, 2: nefrotoksik, 3: hücreye toksik, 4: antibiyotik, 5: nörotoksik, 6: kanserojen, 7: tremorjen (titremeye neden olan), 8: hepatotoksik, 9: antimikotik *Pen. viridicatum* ve *Pen. verrucosum* sinonim kabul edilmemiştir.

Okratoksin A; suda çözünen, renksiz bir bileşiktir. UV ışınları altında mavi renkte floresan verir. Kimyasal yapısında fenilalanin, Cl ve OH içeren dihidroizokumarin bulunur. Okratoksin A' nın Cl içermeyen derivatı okratoksin B, etilester derivatı ise okratoksin C'dir. Bu iki derivat gıdalarda görülseler de düşük konsantrasyonda bulduklarından fazlaca önem taşımazlar.



Asp. ochraceus' un optimum gelişme sıcaklığı 28 °C dir. OTA oluşturabilmek için de 20 - 30 °C sıcaklığa gereksinir. Maksimum düzeyde toksini 30 °C de % 95 bağıl nemde üretir. Sıcaklık derecesi azalırda daha yüksek bağıl nem ihtiyacı doğar. Örneğin 15 °C de % 99 bağıl nem gerekir. *Penicillium* türleri ise düşük sıcaklıklarda toksin oluşturabilirler. *Pen. verrucosum* 5-10 °C sıcaklıkta okratoksin üretir. Sıcak iklimlerde yetiştirilen tahıllarda OTA kontaminasyonunun-dan sorumlu küf *Asp. ochraceus*, Kanada, İskandinav ülkeleri gibi soğuk-serin kuşakta yetiştirilen tahıllarda OTA'dan sorumlu küfler *Pen. aurantiogriseum* ve *Pen. verrucosum*' dur. Bu iki tür -2 °C de bile gelişimlerini ağır da olsa sürdürebilir. *Asp. ochraceus* kserofilik küflerden sayılır. Spor çimlenmesi ve gelişimi için min.su aktivite değeri $A_S=0.76-0.83$ ' tür. Tahıllarda ürünün nem içeriği % 15-16 olduğunda gelişebilir. Optimum gelişme sıcaklığının altında OTA miktarı azalır ancak penisilik asit miktarı artar. *Pen. aurantiogriseum* ve *Pen. verrucosum*' un da min. su aktivite değerleri oldukça düşüktür ($A_S = 0.79; 0.80-0.81$). OTA oluşumu için bütün türlerin daha yüksek A_S değerlerine ihtiyaçları vardır. Özellikle *Pen. aurantiogriseum* min. $A_S = 0.97-0.99$ değerlerini talep eder (Çizelge 4). Okratoksin A kuvvetli nefrotoksik etkili, teratojen, immunosupresif ve kanserojen bir bileşiktir. Toksinin akut ve kronik toksik etkisi bulunmaktadır. Akut toksisite dozu erkek ratlarda $LD_{50} = 29 \text{ mg.kg}^{-1}$ ve dişi ratlarda $LD_{50} = 22 \text{ mg.kg}^{-1}$ dır. Teratojenik etki özellikle civciv ve farelerde kafa bozuklukları, gaga hataları ve göz gelişiminin engellenmesi şeklinde izlenir.

İnsanlar üzerindeki etkisine ilişkin somut kanıtlar olmamakla beraber Bulgaristan, Romanya, Yugoslavya ve Tuna nehri kıyısı kırsal kesiminde görülen Balkan nefropatisi (kronik böbrek hastalığı) ile ilişkisi konusunda kuvvetli bulgular vardır. OTA geniş getiren hayvanlardan daha fazla tek mideli olan domuzlarda ve kümes hayvanlarında ağır böbrek hastalıklarına neden olur. Hayvanların yemlerine kritik konsantrasyonun ($200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) üzerinde OTA katıldığında; yumurta tavuklarının böbrek, karaciğer, et, kan ve hatta yumurtalarında değişik oranlarda kalıntı OTA belirlenmiştir. Domuzlarda ise en çok kanda olmak üzere böbrek ve karaciğerde, daha az miktarda da yağlı kas dokularında gösterilmiştir. Avrupa' da test edilen insan kan serum örneklerinde % 7-76 arasında değişen oranlarda OTA varlığı saptanmıştır. Endemik nefropati görülen bölgelerde kanda OTA' ya rastlanma sıklığı ve OTA konsantrasyonu oldukça yüksektir. Hayvan ve insan OTA pozitif kan örneklerinde toksinin biyolojik yarı değerine inme süresinin oldukça uzun olmasına neden olarak toksinin serum albümini ile bağ oluşturması gösterilir. Orta yaşlı erkeklerde kan serumunda $0.1-8.4 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$, orta yaşlı kadınlarda ise $0.2-7.2 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ OTA konsantrasyonu saptanmış ayrıca anne sütlerinde (n=36) % 9 oranıyla $0.02-0.03 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ düzeyinde OTA bulunmuştur.

Bitkisel ürünler içerisinde tahıllar (buğday, arpa, yulaf, çavdar, mısır, pirinç) OTA'yı yüksek konsantrasyonda içerdiklerinden hem insanlar hem de hayvanlar için kontaminasyon kaynağıdır. Yulaf ve arpalarda genellikle OTA konsantrasyonu daha düşük olmakla beraber ekstrem durumlarda yulafda 27.5 mg.kg^{-1} düzeyinde görülür. Danimarka' da böbrek hastalığı görülen domuzların yem olarak tükettikleri arpalarda da OTA yüksek konsantrasyonda bulunur.

Dış ülkelerde taranan tahıl örneklerinde (n=765) % 3.1 oranı ile OTA kontaminasyon sıklığı saptanmış, ortalama OTA konsantrasyonu $11.8 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde belirlenmiştir. OTA pozitif örneklerin çoğunda (13/18) $0.07-80 \text{ mg.kg}^{-1}$ düzeyinde sitrinin de bulunmuştur. Yugoslavya mısır örneklerinde (n=191) OTA pozitif örnek sayısı % 26' dır. Ortalama 0.49 mg.kg^{-1} toksin konsantrasyonu bazı örneklerde 5.1 mg.kg^{-1} değerine kadar yükselmiştir. Amerikan mısırlarında da önemli düzeyde OTA ve yanında penisilik asit görülür.

Tahıllar değirmencilik ürünlerine dönüştüğünde eğer tüm dane öğütülürse tahılda bulunan OTA'nın tamamı unda geri alınır. Kepeği ayrılan unlarda OTA'nın yaklaşık % 50' si kalır. Sert buğday beyaz unlarında OTA'nın 1/3' ü, yumuşak buğdayların beyaz unlarında ise 2/3' ü tekrar bulunmuştur. Alman buğday unlarında $0.06 \mu\text{g.kg}^{-1}$, çavdar unlarında $0.58 \mu\text{g.kg}^{-1}$, karışık unlarında $0.43 \mu\text{g.kg}^{-1}$, İsviçre unlarında $0.05-0.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, İngiliz unlarında $0.27-0.46 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde OTA belirlenmiştir. Çeşitli ülkelerin buğday ve çavdar kepek unlarında ise genellikle $0.5-0.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde OTA'ya rastlanır.

İnsanlara geçen OTA'nın asıl kaynağının hayvansal ürünler olduğu konusunda birçok otorite hemfikirdir. Hayvan yeminde kritik konsantrasyon olan $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinin üzerindeki değerler hayvan organ ve dokularında OTA kalıntısının düzeyini arttıracığından tehlikelidir.

Türkiye' de araştırılan çeşitli küspe, mısır ve karma yem örneklerinde (n=1685) yalnız 24 adedinin (%1.4) OTA içerdiği, maksimum değerin $45 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Karma yem örneklerinde (n=277) ise sadece 3 örnek (% 1) OTA içermiş, maksimum değer de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde bulunmuştur (Çizelge 10). Üretim koşulları çok farklı fabrikaların karma yem örneklerinde (n=194) OTA pozitif örnek sayısının sadece 5 (%2.6) oluşu da olumlu bir göstergedir. Bütün bu tarama çalışmaları sonuçları Türkiye' de tarımsal ürünlerin OTA açısından tehdit oluşturmadığını göstermektedir. Ancak ne yazık ki gerek kuru incirlerimiz gerekse toz ve pul biberlerimiz yüksek düzeylerde OTA içeren ürünlerimizdir.

Türkiye' de gıdalarda bulunabilecek maksimum OTA değerleri belirlenmemiştir. Birçok ülke kendisi için önemli bulduğu gıdalara OTA sınır değerleri koymuştur. Danimarka yasal düzenleme çerçevesinde; domuz böbreklerinde $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ve üzerinde OTA saptanması halinde tüm hayvan karkasının ve organlarının tüketimini, $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ve üzerinde OTA belirlenmesi durumunda da böbrek, karaciğer ve diğer organların tüketimini yasaklamıştır. Tahıllarda bulunabilecek maksimum OTA miktarı İsviçre' de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Hollanda' da $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Fransa ve Avusturya' da $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, İngiltere' de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ olarak benimsenmiştir. Yunanistan kahve için $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Macaristan ve Çek Cumhuriyeti de tüm gıdalar için $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ OTA konsantrasyonu sınır değerlerini kullanmaktadır.

Fransa çocuklar için sütlerde $0.03 \mu\text{g.kg}^{-1}$, Çek Cumhuriyeti de tüketime hazır çocuk gıdalarında $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ OTA sınır değerini yasal olarak kabul etmiştir. Avrupa birliği ise çok toksik bulunduğu bu madde için gıdalarda $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ sınır değerini önermiştir.

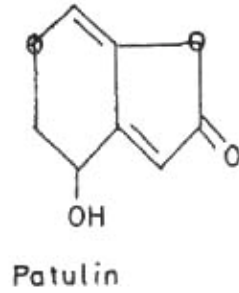
09. Patulin

Patulin oluşturan funguslar *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssochlamys* cinslerine giren türlerdir. Patulin ilk kez 1943 yılında *Pen. patulum* (sin. *Pen. urticae*, *Pen. griseofulvum*)' dan izole edilmiştir. Gıdalar için en önemli olanlar *Pen. expansum* (sin. *Pen. leucopus*) ve *Pen. patulum*' dur. Bunların dışında *Asp. terreus*, *Asp. giganteus*, *Asp. clavatus*, *Pen. aurantiogriseum* (sin. *Pen. cyclopium*), *Pen. equinum* (sin. *Pen. terrestre*), *Pen. melinii*, *Pen. claviforme*, *Bys. nivea*, *Bys. fulva* (sin. *Paelomyces variotii*), *Pen. requeforti* chemotyp II türleri de patulin üretirler. Bu küflerden izole edilen her bir metabolit uzun zamandan beri bilinmekle beraber, kimyasal yapıları çok daha sonra aydınlatıldığından, ayrı isimlerle tanımlanmıştır. Bugün klavasin, klaviformin, klavatin, ekspansin, gigantikasit, penisidin, mikoin C vb metabolitlerin patulinin sinonimleri olduğu anlaşılmıştır. Patulinin

antimikrobiyel etkiye sahip olması, Gram pozitif ve negatif bakterilerin gelişmelerini engelleyen geniş bir spektrum göstermesi onun bir süre antibiyotik olarak kabul edilmesine neden olmuştur. Hatta sulu çözeltileri gönüllü hastalarda nezle tedavisinde kullanılmıştır. Ancak kısa süre sonra hem memelilerde hem de bitkilerde toksik etkisi gösterilmiş ve antibiyotikler grubundan çıkarılarak mikotoksinlere dahil edilmiştir.

Patulin sentezleyen küfler sıklıkla meyve ve meyve sularında görülürler. Bunlar aynı zamanda meyve ve sebzeler üzerinde görülen bozulma etmeni funguslardır. Özellikle *Pen. expansum* elma, armut, ayva, şeftali, kayısı ve domateslerde kahverengi çürümenin sorumlusudur. Elmalardan izole edilen 60 adet *Pen. expansum* suşundan tamamının patulin üretebildiği gösterilmiştir. Çürümüş meyve dokusunda patulin 1g.kg^{-1} düzeyinde veya üzerindedir.

Patulinin kimyasal adı anhidro-3-hidroksimetilen-tetrahidro-1,4-piron-2-karboksilik-asittir. Patulinin kimyasal yapısı 1949 da aydınlatılmış ve doymamış lakton yapıda olduğu belirlenmiştir. Laktonların stabil yapılar olmamasına karşın patulin γ lakton olduğundan ve stabil 5. halkası oluştuğundan daha dayanıklı bir yapıya sahiptir. Aside dirençli olan bu bileşik saf halde çok stabil olmamasına karşılık meyve sularında stabilitesini korur. Patulin suda, etanolde, metanolde, kloroformda, petrol eteri hariç birçok organik çözücüde iyi çözülür.



Yalnız suda ve metanolde hafif bir inaktivasyon söz konusudur. $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ ye kadar olan sıcaklıklara dirençlidir. Patulinin pH 3.3-6.3 arasında stabilitesini koruduğu, elma ve üzüm sularının $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de kısa süreli (10-20 dk) ısıtılması halinde aktivitesini yitmediği, pH 2' de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 15 dk ısıtıldığında bile inaktif hale geçmediği araştırmalarla gösterilmiştir. Patulin sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek derhal inaktive olur. SH-gruplarının doymamış lakton (-CO-CH=CH-) grubuna katıldığı düşünülmektedir. Elma ve üzüm sularında oldukça stabil olan patulinin portakal sularında ve unda stabilitesini süratle kaybetmesi, bu ürünlerin yüksek miktarda sülfidril bileşikleri içermesine ve patulinle reaksiyona girmesine bağlanır. Patulin bulunan ortamlara askorbik asit veya SO_2 katılması toksin miktarında önemli azalmalara neden olur. Alkali ortamda patulin aktifliğini kaybeder.

Patulin sentezine primer metabolitlerden 1 mol asetil-CoA ve 3 mol malonil-CoA katılır. Bunların bileşmeleri ve ardından redüksiyon ve dekarboksilasyon reaksiyonları sonucunda ara metabolit olan 6-metilsalisilik asit meydana gelir. Son kez gerçekleşen karboksilasyonla patulin oluşur.

Gıdalarda patulin oluşumuna; patulin sentezi yapan türlerin suş farklılıkları, ortam sıcaklığı, substratın A_S değeri, ortam pH' sı, süre, ortamda bulunan besin maddeleri ve ozmotik basınç etkindir. Patulin üreticilerinin özel beslenme istekleri yoktur. Ancak proteince fakir, karbonhidrat içerikleri ve A_S değerleri yüksek bitkisel ürünler patulin sentezi için daha uygundur. Patulin oluşturan suşlar türlere göre farklılıklar göstermekle birlikte oldukça geniş bir sıcaklık aralığında ($0-42\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelişirler. Patulin sentezi ise $0-31\text{ }^{\circ}\text{C}$ ler arasında meydana gelir. Besiyeri çalışmaları; *Pen. patulum* 'un $4-31\text{ }^{\circ}\text{C}$, *Pen. expansum* 'un $0-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve *Asp. clavatus* 'un $12-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ler arasında patulin sentezlediklerini göstermiştir. Optimum gelişme sıcaklığı $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ olan ve $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ de patulin oluşturabilen *Pen. expansum* düşük derecelerde meyvelerin depolanmasında bile, biraz daha uzun süreye gereksinme göstererek, ürünü patulin açısından riskli hale getirir. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 4-6 günde $300\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ patulin oluşurken $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 36 günde $190\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ patulin sentezlenir. Patulin üretici küfler genellikle optimum gelişme

sıcaklıklarının altında, türlere göre değişmekle beraber serin-soğuk koşulda daha fazla miktarda patulin oluştururlar. Bu küfler içinde en düşük min.su aktivitesi değerleri *Asp. terreus* ($A_S=0.78$) ve *Pen. aurantiogriseum* ($A_S=0.79-85$)' a aittir. Diğerleri gelişimleri için biraz daha yüksek min. A_S değerlerine sahiptir. *Asp. clavatus*, *Pen. expansum* ve *Pen. platulum* min. $A_S=0.81-0.85$ değerlerinde gelişebilirler, patulin oluşumu için ilk iki tür min. $A_S=0.99$ ve sonuncusu da minimum $A_S=0.95$ değerlerini talep eder. Patulin pH 3.0-6.5 sınırları arasında meydana gelir.

Reçel ve marmelat denemelerinde katılan şeker oranına göre A_S değerindeki düşüğe bağlı olarak patulin konsantrasyonu da azalır. Laboratuvar koşullarında sıvı besiyerinde 6-8 gün sonra patulin saptanmasına karşın meyve sularında 14 gün sonra belirlenmiştir. Yine denemeler patulin sentezi için glikoz ve maltozun en uygun karbonhidrat, nitratin da uygun azot kaynağı olduğunu göstermiştir.

Patulin hem yüksek organizmalara hem de yaşayan canlı hücreye toksik etki yapar. Akut toksik etkisi fare, rat, civciv, tavşan ve balıklarda görülür. Farelerde oral dozlarla alım sonucu toksisite; $LD_{50}=35 \text{ mg.kg}^{-1}$, subkutan uygulamada $15-25 \text{ mg.kg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Patulin hücrede solunum sistemine, kromozomlara ve membran üzerine olumsuz etkiler yapar. Makromoleküllerin sentezini inhibe eder, yüksek organizmada bağışıklık sistemini bozar, kas ve ekstremitelerde istem dışı hareketlere, titremelere, kontrolsüz reflekslere neden olur. Patulin deri altı enjeksiyonu ile verildiğinde hayvanlar huysuzlaşır, nefes almakta zorlanır, deri altı dokularında, karında, göğüs boşluğunda su birikmesi olur. Böbrekte tıkanıklık, idrar yollarında dejenerasyon ve idrarda azalma görülür. Ciğerde su birikmesi iyice artar ve akut toksik etki ölümle sonuçlanır. Genel otopsi bulguları; dalak, karaciğer, akciğer ve böbreklerde kan toplanması, beyin ve akciğerde ödemler olarak belirlenmiştir.

Hayvan denemeleriyle toksinin kanserojen, mutajen ve teratojen etkileri de gösterilmiştir. Ratlarda uzun süre belli aralarla tekrarlanan subkutan uygulama ile kanser dokusu oluşur. Lakton yapısı gösteren bileşiklerin kanserojen oldukları genel bir saptamadır. Bununla birlikte oral yolla alınan dozlarla patulinin kanser oluşturduğu gösterilememiştir.

Patulinin fitotoksik etkisi çeşitli denemeler sonucu pekişmiştir. Patulin varlığında elma polenlerinin germinasyonu engellenmiş, kültüre alınan soya fasulyesi hücre süspanسیونunda gelişim inhibe olmuş, domates bitkisinde plazma akışı durmuştur. Tarlada anızlar üzerinde gelişen *Pen. patulum*' un oluşturduğu patulin toprağa karışarak burada yetişen mısırların bodur kalmasına ve gelişmemesine neden olmuştur.

Patulin en fazla yüksek asitli meyve, sebze ve bunların mamullerinde bulunur. Patulin üreticilerinden *Asp. clavatus*, *Asp. giganteus*, *Asp. terreus*, *Pen. claviforme*, *Pen. expansum* türleri, OTA ve sitrinin üreticisi *Pen. verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*) ile birlikte depolanan tahıllarda görülürler ve patulin oluşturanlar olarak değerlendirilirler. Ancak tahıllarda patuline rastlama olasılığı azdır. Patulin içerikli malt çiminin veya yem maddelerinin (tahılların) neden olduğu hayvan zehirlenme olayları ender olarak görülür. Tahıllarda olduğu gibi un ve unlu mamullerde de ara sıra görülürler. Küflenmiş meyve ve sebzeler tüketici tarafından reddedildiğinden risk taşımazlar. Ancak patulin suda çözünür ve aside dayanıklı olduğundan preslemede meyve suyuna geçer, dolayısıyla hem meyve sularında hem de konsantre ve pulplarda uzun süre stabilitesini korur. En sıklıkla elma sularında görülür. Elmalar meyve suyu işletmesinde uzun süre yığınlar halinde depolandığından küflü meyve miktarı oldukça fazladır. Doğal yolla küflenmiş meyve örneklerinin ($n=61$) yaklaşık yarısının 6.02-17.70 mg/elma düzeyinde patulin içerdiği saptanmış, 2/3 ünden *Pen. expansum* izole edilmiştir.

İsveç' te satışı sunulan elma sularının (n=66) yine yarısına yakın kısmı $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ dan fazla patulinle kontamine bulunmuştur. Maksimum değer $54 \mu\text{g.l}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Finlandiya' da ithal elma suyu konsantresi örneklerinde (n=64) patulinle kontamine örnek sayısı % 2.5 oranı ile saptanmış, patulin konsantrasyonu da $50-59 \mu\text{g.l}^{-1}$ arasında belirlenmiştir. Evde üretilen elma sularında (n=20) ise patulin $30-16400 \mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde ve % 40 oranında görülmüştür. Türkiye' de yapılan bir taramada; kayısı, şeftali, çilek, erik nektarları ile armut, elma, üzüm sularından oluşan örneklerde (n=260) patulin kontaminasyonu gösteren örnek sayısı 24 (% 9.2) olarak belirlenmiş ancak elma ve üzüm sularında patulin bulunmamıştır. Oysa 1998 yılında Türkiye' de üretilen elma suyu konsantrelerinin (n=215) tümünde $7-376 \mu\text{g.l}^{-1}$ düzeyinde patulin saptanmış, örneklerin yarısına yakın kısmı (% 46) $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ düzeyinin üzerinde patulin içermiştir. Örnekler çoğaltılabilir, çünkü bu konuda dünyada yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Genel bir ifade ile ve özetle meyve sularında ve konsantrelerinde patulin içeren örnek sayısı % 0-100 arasında değişir. Toksinin konsantrasyonu ise genelde $30-300 \mu\text{g.l}^{-1}$ sınırları arasındadır.

Kaliteli hammadde kullanılması durumunda da meyve suyu konsantrelerinin veya pulplarının tanklarda depolanması sırasında küfler uygun koşulları yakalarlarsa yüzeyde gelişebilir ve patulin oluşturabilirler. Direk yolla kontaminasyonun meydana geldiği bu tanklarda küflü kısmın yüzeyden uzaklaştırılması işe yaramaz. Çünkü suda çözünen patulin konsantreye geçmiştir. Elma şarabı gibi fermente ürünlerde hammadde patulin içerse bile fermentasyon ve SO_2 uygulaması ile patulin parçalandığından patulin sorunu yaşanmaz.

Salçalarda, etlerde, marmelatlarında patulin bulunmamıştır. A_S değerleri yüksek olan et ve mamulleri küflenmiş olsalar dahi patulin içermezler. Bunun nedeni SH gruplarını içeren miyosin, aktin, aktinomyosin, sistein, glutation maddelerinin etteki varlığına bağlanmaktadır. İnaktive olan glutation-patulin bileşiği, patulinin LD_{50} değerine göre toksik bulunmamıştır. Bir çok hayvan denemesiyle bu saptama kesinleşmiştir.

Elma ve diğer meyve sularındaki patulin kontaminasyonunun asıl kaynağı hammaddedir. Patulin riskini azaltmak için meyvelerin ayıklanması ve üretimde kullanılmaması en iyi yoldur. Şeftali, domates ve sulu armutlarda çürüyen bölgeden intraselüler odacıklar aracılığıyla sağlam dokuya patulin difüze olduğu halde elmalarda difüzyon görülmez. Elmada hücreler arası boşluklarda bulunan gazlar difüzyonu engeller. Çürük kısımların kesilip atılması ve basınçlı su püskürtülerek temizlenmesiyle patulinin neredeyse tamamının (% 95-100) dekontaminasyonu sağlanır. Meyveleri muhafazada kullanılan soğuk hava depolarının atmosferindeki CO_2 oranını % 20-40 arasında yükselterek de küflerin gelişimi ve patulin oluşumu önlenir. % 3-5 O_2 , % 3-6 CO_2 ve gerisi N_2 gazından oluşan modifiye atmosfer yeterli bir önlem olarak önerilir.

Gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum patulin miktarının yasal düzenleme ile belirlenmesi de patulin riskini azaltan, üründe kaliteyi arttıran bir önlemdir. Bir çok ülke WHO' nun da önerisi olan $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ patulin sınır değerini kabul etmiştir. Kimi ülkeler sadece elma sularında veya elma suyu ve şıralarında, kimi ülkeler meyve sularında, kimileri de tüm gıdalarda bu sınır değeri kullanmaktadır. Belçika, Fransa, İsviçre, Finlandiya, Macaristan ve Yunanistan $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ patulin sınır değerini yasal olarak Norveç, İsveç ve Avusturya ise öneri olarak benimsemiştir. Romanya bu sınır değeri öneri olarak da olsa $30 \mu\text{g.l}^{-1}$ patulin değerine düşürmüştür. Çek Cumhuriyeti ise küçük çocukların gıdalarında $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ patulin sınırını yasal zorunluluk olarak getirmiştir.

[Bu konuda Türk Gıda Kodeksindeki son değişikliği izlemek için tıklayın.](#)

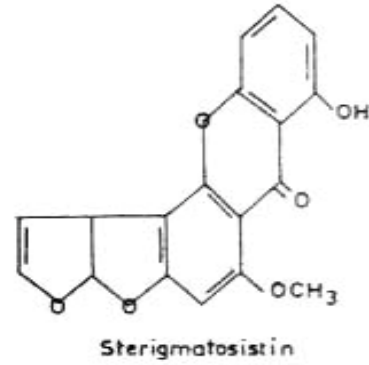
10. Diğer Önemli *Aspergillus* ve *Penicillium* Toksinleri

Ağırlıklı olarak *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tarafından üretilen ancak bir kaçını başka cinslerin de oluşturabildiği önemli mikotoksinler; sterigmatosistin, ksantomegnin, viomellein, penisilikasit, siklopiazonikasit, sitrinin, sitreoviridin, luteosikrin, izlanditoksin, rugulosin, rubratoksin A, B, roquefortin, PR-toksin' dir.

10.01. Sterigmatosistin

Sterigmatosistin en önemli üreticisi *Aspergillus versicolor*'un belli suşlarıdır. *Emerciella nidulans*, *Asp. sydowii*, *Eurotium amstelodamii*, *Bipolaris spec.* de bu mikotoksini oluşturabilir. Aflatoksin biyosentezinde de ara ürün olarak görülen sterigmatosistin bir endotoksin olup suda çözünmez ve ortama salgılanmaz. Ancak misellerin parçalanması veya otoliz sonucu ortama geçer. Aflatoksine benzer bir yapı göstermesine karşılık toksin kumarin bileşiği değildir. Molekül ksantona bağlı bifurandan oluşur ve furofuranenler grubuna dahildir. Bileşik UV ışınları altında brik rengi floresan verir.

Asp. versicolor 4-40 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişir. Optimum gelişme sıcaklığı 25-30 °C olan fungus sterigmatosistini 15-32 °C lerde sentezler. *Asp. versicolor* kserofil funguslardandır ama ozmofil karakterli değildir. Gelişmek için $\min. A_5=0.74-0.78$ değerini gereksinir. Bu değer altında gelişemez, $A_5=0.84$ ün altında ise konidilerinin çimlenmesi engellenir. Reçel, konfitür, marmelat gibi ürünlerde % 30 oranında şeker bulunması sterigmatosistin oluşumunu engeller.



Sterigmatosistin hepatotoksik, kanserojen ve teratojen etkileri saptanmıştır. Bununla beraber AFB₁ ile kıyaslanırsa hem daha az toksiktir hem de kanserojen etkisi daha zayıftır. Farelerde saptanan akut toksik doz LD₅₀=800 mg.kg⁻¹, ördek yavruları için LD₅₀=1 µg/yumurta olarak belirlenmiştir. Bazı küfler tarafından çok yüksek miktarda oluşturulduğundan tehlikeli kabul edilir.

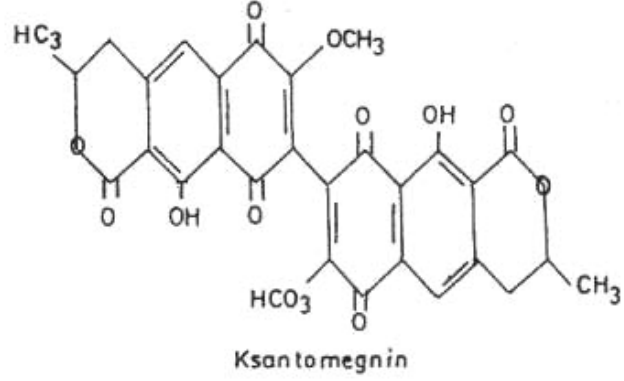
Tahıllardan pirinç ve buğdayda, yeşil kahve çekirdeğinde ve yer fıstığında görülür. Baharattan izole edilen çok sayıda küf izolatının (n=150) yarısından fazlası sterigmatosistin üretmiştir. Sert peynir örneklerinden (n=39) %23 ünün *Asp. versicolor* ile kontamine olduğu ve dış yüzeyde gelişen küflerin 5-600 µg.kg⁻¹ düzeyinde toksin oluşturdukları belirlenmiştir. Süt ineklerinde sterigmatosistinle kontamine yemlerden toksinin süte geçmesi mümkündür.

10.02. Ksantomegnin

İlk kez *Trichophyton megnii*'den izole edilen sekonder metabolite ksantomegnin denmiştir. Aynı metabolitin daha sonra *Asp. melleus* ve *Asp. ochraceus* tarafından da oluşturulduğu saptanmıştır.

Önemli üreticiler olarak *Pen. aurantiogriseum* (sin. *Pen. cyclopium*), *Pen. crustosum* ve *Pen. viridicatum* önde gelir. Bunlar ksantomegnin ürettikleri gibi yanında viomellein de sentezlerler. Ksantomegninin kimyasal yapısı binaftokinon' dur. Toksinin hepatotoksik ve nefrotoksik etkisi belirlenmiştir.

Danimarka' da domuz yemi olan arpalarda ksantomegnin saptandığından domuzlarda görülen nefropati ile toksin ilişkilendirilmiştir. OTA ile kontamine tahılların % 50 'sinde ksantomegnin görülür. Ancak tahıllarda küflenme yok ise ksantomegnin bulunmaz. Küflenmiş yemlerle beslenen hayvanların etlerinde ve et ürünlerinde bu toksine rastlanır.

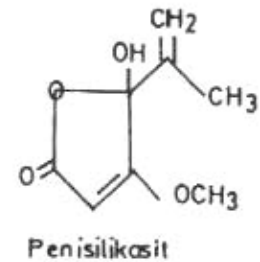


10.03. Penisilikasit

Penisilik asit ilk kez 1913 yılında *Pen. puberulum* ile enfekte olmuş mısırlardan izole edilmiştir. Çok sayıda *Penicillium* ve *Aspergillus* türü tarafından oluşturulur. Önemli üretici tür *Pen. aurantiogriseum* (sin. *Pen. cyclopium*)' dur. Penisilikasit üreten diğer türler; *Asp. alliaceus*, *Asp. melleus*, *Asp. ochraceus*, *Asp. ostianus*, *Asp. petrakii*, *Asp. sclerotiorum*, *Asp. sulphureus*, *Pen. verrucosum* (sin. *Pen. viridicatum*), *Pen. simplicissimum*, *Pen. raistrickii*, *Pen. roquefortii* chemotyp II, *Pen. smithii*, *Pen. thomii*' dir. Ayrıca *Eupenicillium* ve *Petromyces* cinsi üyeleri tarafından da oluşturulur (Çizelge 4 ve 12).

Penisilikasidin kimyasal yapısı laktondur. UV ışığında mavi floresan veren bir bileşiktir. Penisilikasit üretici küfler tarafından 15-32 °C sıcaklıklarda sentezlenir. Maksimum toksin düzeyine 15-20 °C lerde ulaşılır. Bu metabolit de patulin ve sitrinin gibi antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Patulinde olduğu gibi sülfidril gruplarıyla derhal reaksiyona girer ve inaktif hale geçer. O nedenle buğday unlarında yüksek düzeyde bulunmaz.

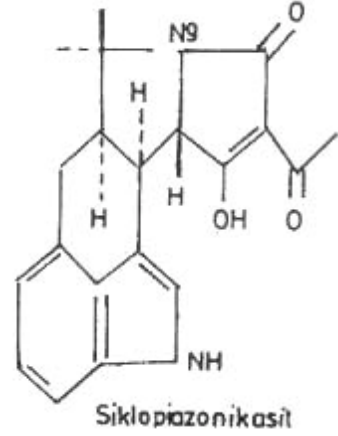
Toksinin hepatotoksik ve nefrotoksik etkileri belirlenmiştir. Kümes hayvanları için belirlenen toksik doz LD₅₀=90 mg.kg⁻¹, farelerde oral yolla toksik doz LD₅₀=35 mg.kg⁻¹ dır. Penisilikasit gıdalarda daha fazla OTA ile birlikte bulunur. Unlarda, unlu gıdalarda, pirinçte, kuru fasulyede, ABD kökenli mısırdan ve çeşitli yemlerde görülür.



10.04. Siklopiazonikasit

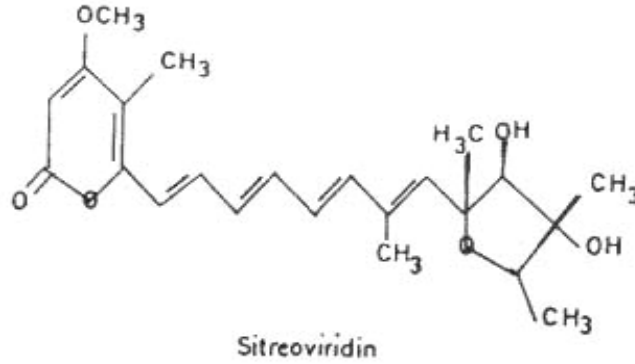
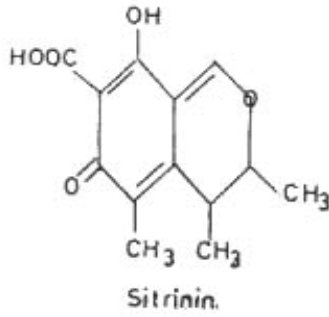
Siklopiazonikasit *Asp. flavus* grubu üyeleri ve bazı *Penicillium* türleri tarafından sentezlenir. En önemli üretici türler; *Asp. flavus* ve *Pen. aurantiogriseum*' dur.

Diğer üreticiler; *Asp. tamarii*, *Pen. viridicatum*, *Pen. camabertii*, *Pen. puberulum* vb dir. *Asp. flavus* toksininin neden olduğu hindilerde görülen "Turkey X Disease" hastalığında ortaya çıkan semptomlarda aflatoksin yanında siklopiazonikasidin de etkili olduğu düşünülmüştür. Bu metabolitin toksik etkisinden başka hepatotoksik, kanserojen, nörotoksik etkileri de bilinir. Cıvcıvlar için akut toksik doz $LD_{50}=19 \mu\text{g.kg}^{-1}$, ratlar için $36-63 \text{mg.kg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu toksine unlarda, kuru fasulyede, yem maddelerinde ve et ürünlerinde rastlanır.



10.05. Sitrinin ve Sitreoviridin

Sitrinin ilk kez 1931' de *Penicillium citrinum*'un metaboliti olarak izole edilmiştir. *Pen. citreoviride*, *Pen. aurantiogriseum*, *Pen. palitans*, *Pen. purpurescens*, *Pen. expansum*, *Pen. verrucosum*, *Pen. citreonigrum*, *Asp. terreus*, *Asp. candidus* tarafından da oluşturulur. Kimyasal yapısı bir piran türevi olup benzopiran karbonikasittir. Patulin gibi yüksek antibakteriyel aktivitesi nedeniyle antibiyotik olarak kabul edilmiş, ancak memelilerde nefrotoksik, hepatotoksik, mutajen ve teratojen etkileri saptanınca mikotoksinlere dahil edilmiştir. Bu etkiler arasında nörotoksik etkisi önde gelmektedir. Farelerde toksik doz $LD_{50}=35 \text{mg.kg}^{-1}$, tavşanlarda $LD_{50}=19 \text{mg.kg}^{-1}$ dir.



Sitrininin hedef aldığı organ böbreklerdir, burada suyun absorpsiyonunu engeller. Danimarka' da görülen domuz nefropatisinden OTA ile birlikte sitrinin de sorumlu tutulur. Endemik Balkan nefropatisindeki rolü ise henüz aydınlanmamıştır. Sitrinine en çok mısır, pirinç, buğday, çavdar, arpa, sorgum ve yer fıstığında rastlanır.

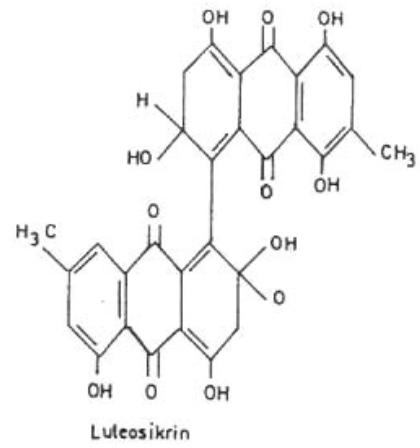
Uzakdoğu ve Japonya' da ortaya çıkan sarı pirinç hastalıklarına neden olan kontamine pirinçler üzerinden *Pen. islandicum*, *Pen. rugulosum*' un yanı sıra *Pen. citrinum* ve *Pen. citreoviride* de izole edilmiştir. Sitrinin ile *Pen. citreoviride*' nin metaboliti olan sitreoviridin hastalığa diğer toksinlerle birlikte etkindir. Sitreoviridini oluşturan diğer önemli küfler; *Asp. terreus*, *Pen. manginii*, *Pen. smithii* ve *Eup. ochrosalmoneum*' dur. Toksinin farelere etkili toksik dozu $LD_{50}=29 \text{mg.kg}^{-1}$, ratlara ise 3.6mg.kg^{-1} dir. Nörotoksik etkili olan sitreoviridin eksi seyri paralizle (felçle) sonuçlanır. Toksin merkezi sinir sistemi, adrenal korteks, karaciğer

ve böbreklerde lokalize olur. Pirinçlerde çok görülen sitreoviridin daha sonra et ürünlerinden de izole edilmiştir.

10.06. Luteosikrin ve Diğerleri

Pen. islandicum sarı pirinç toksinleri olarak bilinen toksinlerden luteosikrin ve izlanditoksini eş zamanlı oluşturur. İzlanditoksinin bir siklopeptid olmasına karşılık luteosikrin diantrokinon yapıda bir renk maddesidir ve yağda çözünür. Her iki toksin de kuvvetli hepatotoksik etkiye sahiptir, karaciğerde tahribat ve kanamaya neden olur, ayrıca pankreas üzerine de etkilidir. İzlanditoksinin fareler için subkutan olarak saptanan LD₅₀ değeri 338 µg.kg⁻¹ dir. Luteosikrin farelere oral verildiğinde toksik doz LD₅₀=221 mg.kg⁻¹ dir.

Pen. islandicum Avrupa' da gıdalarda ender rastlanan bir fungustur. Bununla beraber yemlerde sıklıkla görülür. İngiltere' de ise toksik arpalardan izole edilmiştir. Denemelerle *Pen. islandicum*' un çok çeşitli gıdalarda gelişebildiği ve toksin oluşturduğu gösterilmiştir. Luteosikrine benzer bir toksin de rugulosindir. Bu metabolit *Pen. rugulosum* tarafından oluşturulur. Pirinçlerin sıklıkla bu küf ve mikotoksinle bulaşık olduğu görülür. Özellikle çiftlik hayvanlarından atlar ve domuzlar üzerinde çok etkili olan ve ölümlere sebebiyet veren rubratoksin B ise esas olarak *Pen. rubrum* tarafından oluşturulur. *Pen. purpurogenum*' un da toksini üretebildiği belirtilmiştir.



Küflenmiş yemlik mısırlardan *Asp. flavus* yanında *Pen. rubrum* da izole edilmiş, denemelerde *Pen. rubrum* ile bulaşık mısırlarla beslenen sığır, at, domuz, keçi, köpek ve farelerde toksik etkiler görüldüğü gibi, 3-5 gün içinde hayvan ölümleriyle de karşılaşmıştır. Rubrotoksinin etkisi genel olarak organlarda su birikmesi, tıkanmalar ve kanamalar şeklindedir. Beyin ve omurilikteki ödem doku yumuşamasına da neden olur. Rubratoksinin hepatotoksik ve teratojen etkileri gösterilmiştir. LD₅₀ değerleri hayvanların türüne ve toksinin oral veya intraperitoneal (periton boşluğu içerisine) enjeksiyonla verilmesine göre LD₅₀=3.75 - 200 mg.kg⁻¹ değerleri arasında değişir. En çok mısırlar olmak üzere tahıllarda bulunur. Yukarıda adı geçen bu toksinlere ilişkin Avrupa Birliği üye ülkelerinde veya diğer Avrupa ülkelerinde sınır değerler bulunmamaktadır.

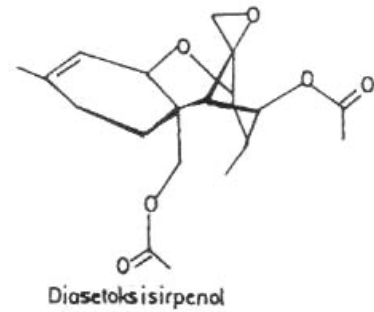
11. Fusarium Toksinleri

Tarla küflerine dahil olan *Fusarium*' lar saprofit ve fitopatogen karakterli türleri içerirler. Tarımsal ürünlerde çürüme etmeni olan saprofitlere oranla fusarioza neden olan fitopatogen olanlar çok daha önemlidir. Fitopatogen *Fusarium*' ların bugüne kadar saptanan mikotoksinleri arasında trikotesenler, zearalenon, fuzarin C, fumonisin ve moniliformin bulunmaktadır.

11.01. Trikotesenler

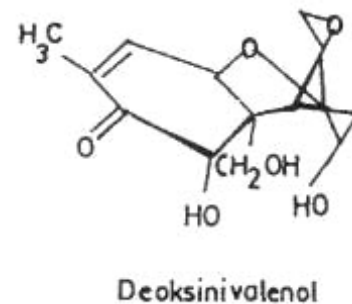
Fusarium toksinleri arasında trikotesenler önemli ve büyük bir gruptur. Bilinen 40 derivatının olduğu, ancak 150 civarında farklı bileşiğin bu grupta toplandığı ifade edilmektedir. Hepsinin ortak özelliği tetrasiklik yapı göstermeleridir. Trikotesenler kimyasal yapıları nedeniyle tetrasiklik terpenoidler grubuna girerler. Bu denli fazla derivata karşın tarım ürünlerinde doğal kontaminant olarak saptananlar 4 adedi geçmez. Bunlar; diasetoksisirpenol, T-2 toksin, nivalenol, deoksinivalenol ve T-2 toksinin parçalanma ürünü olan toksik metabolit HT-toksin'dir. 1940 yılında Rusya'nın Orenburg bölgesinde kışlatılan buğdaylardan yapılan un ve ekmeklerin tüketilmesiyle ortaya çıkan ve çok sayıda insanın ölümüyle sonuçlanan "ATA" ya *Fusarium* toksinlerinden trikotesenlerin neden olduğuna ilişkin iddialar giderek bilimsel destek bulmuştur. Bu toksik hastalıkta deride nekrozlar, kemik iliğinde hasarlar meydana gelir ve lökosit sayısı düşerek lökopeni oluşur.

Trikotesen grubuna ait metabolit ilk kez *Trichothecium roseum*'dan izole edildiği için trikotesen adını almıştır. Bu gruba giren derivatları birçok cins oluşturursa da en fazla *Fusarium*'lar tarafından üretilir. *Fus. sporotrichoides*, *Fus. sambicinum*, *Fus. graminearum*, *Fus. culmorum*, *Fus. poae*, *Fus. tricinctum*, *Fus. nivale*, *Fus. solani* ve diğer *Fusarium* türleri yanında *Trichoderma viride*, *Myrothecium roridum* ve *Trichothecium roseum* da trikotesen üreticileridir.



Toprak veya tarla küfleri olan *Fusarium*'lar düşük sıcaklıklarda gelişirler. Bazıları 0 °C nin altında da gelişmelerini sürdürebilir. Min. sıcaklık istekleri -7 °C olan türlere rastlanır. *Fus. poae* çok geniş sıcaklık aralığında mikotoksin oluşturmakla beraber optimum mikotoksin üretimi 5-8 °C lerde gerçekleşir. *Fusarium*'larda trikotesenler genellikle 15-20 °C arasında yüksek düzeyde sentezlenir. Birçok *Fusarium* türü yüksek sıcaklığa (22 °C) oranla düşük sıcaklıkta (8 °C) daha fazla trikotesen oluşturur. Ayrıca soğuk şoklar toksin sentezini stimüle eder. Laboratuvar denemeleri 22 °C de 3 hafta süre ile inkübe edilen *Fusarium* kültürüne oranla 6. gün 8 °C de bir süre tutulup soğutulan kültürde 3 misli fazla mikotoksin oluştuğunu ortaya koymuştur. Bu da tarlada kışlatılan buğdayların yüksek toksin içeriklerine açıklama getirmektedir.

Trikotesenlerin toksisiteleri yüksektir. Hücre içindeki etkisi protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Canlıya 30 µg.ml⁻¹ düzeyinde verildiğinde protein sentezi durur. Molekül spesifik olarak terminatör bölgeleri yakalar, aynı zamanda ribozomlarda polipeptid-transferaz enzimini bloke eder. Metabolizmada SH-grubu içeren önemli enzim veya koenzimlerle reaksiyona girerek reaksiyonları durdurur. T-2 toksininin ratlara oral yolla verilerek belirlenen toksisitesi LD₅₀=3.8 mg.kg⁻¹, diasetoksisirpenolün toksisitesi LD₅₀=7.3 mg.kg⁻¹ dir.



Fusarium türlerinin geliştiği darıları tüketen insanlarda ağız, burun, sindirim sistemi ve böbreklerde kanamalar ve sonuçta ölüm görülmüşse de bu etkilerin sırf trikotesenlerden olduğunu söylemek zordur. İnsan ve hayvanlarda akut dozun altındaki dozlar kusmaya neden olur. Deney hayvanlarında gözlenen en önemli etkileri, deri nekrozları, kusma, lökopeni ve yemden yararlanma kabiliyetinde düşüştür.

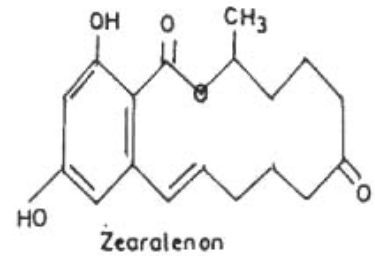
Fusarium' lar tahıllarda (buğday, yulaf, arpa, çavdar, mısır, pirinç), sorgum, fasulye, meyve ve sebzelerde görülür. Avrupa ve Amerika gibi soğuk-serin kuşak iklim bölgelerinde *Fusarium*' lar iyi gelişirler. Özellikle bu klimada trikotesen içerikli yemler hayvan zehirlenmelerine ve ölümlerine neden olur ve yaşanan olaylar çok seyrek değildir. Böyle yemlerde diğer toksinlerin yanı sıra T-2 toksini 2 mg.kg^{-1} düzeyinde bulunmuştur. Yem mısırlarında trikotesenler oldukça fazla görülür. Dioksisirpenol miktarı 31.5 mg.kg^{-1} düzeyine kadar çıkabilmektedir. Türkiye tahıl ve yem maddeleri bulunduğu iklim kuşağı nedeni ile trikotesenler açısından risk altında değildir.

Avrupa Birliği ülkeleri ve diğer Avrupa ülkeleri içinde; Avusturya tolere edilebilir deoksinivalenol miktarını buğday ve çavdar için $500 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ tavsiye edilen değer olarak belirlemiş, Rusya ise durum buğdayları için $1000 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$, diğer buğdaylar için de $500 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ deoksinivalenol sınır değerlerini yasal olarak kabul etmiştir.

11.02. Zearalenon

Fusarium' lar tarafından oluşturulan ve lakton yapıya sahip bir diğer sekonder metabolit zearalenondur. F-2 toksin de zearalenona dahildir.

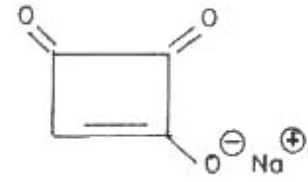
Fus. graminearum, *Fus. culmorum*, *Fus. equiseti*, *Fus. avenaceum*, *Fus. nivale*, *Fus. oxysporium* türleri tarafından oluşturulan zearalenon ölümlerle sonuçlanan zehirlenmeler yerine östrojenik etkisiyle karakterizedir. Bu mikotoksin en fazla domuzlar duyarlıdır. Sığırlar da zaman zaman etkilenirler ancak kanatlılar üzerinde etkisi belirlenmemiştir.



Domuzlarda kısırılık, yavru atma ve hormonal bozukluklar meydana getiren toksin en fazla serin-soğuk iklimde yetiştirilen tahıllarda görülür. Birçok mikotoksinde olduğu gibi mısır zearalenon oluşumu için en uygun substrattır. Buğday, pirinç, fasulye ve özellikle yem maddelerinde görülür. Yemlerde 0.12 mg.kg^{-1} düzeyinde bulunduğu kronik toksik etki meydana gelir. Ratlarda iskelet oluşumunda eksiklikler ve düşük olayları gözlenir. İnsanlar üzerindeki etkisine ilişkin bilgi bulunmamaktadır. Zearalenonun gıdalarda bulunabilecek miktarları bazı ülkeler tarafından belirlenmiştir. Macaristan tüm gıdalarda bulunabilecek miktarı $50 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ olarak yasal düzenleme ile sınırlarken Avusturya buğday ve çavdar için $60 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ değerini öneri olarak, Fransa tahıllar, mısır, darı ve bitkisel yağ için $200 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ sınır değerini yasal düzenleme ile benimsenmiştir. Rusya' daki yasal sınır değer; tüm daneli ürünler ve yağlı tohumlar için $1000 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ zearalenondur. Ayrıca T-2 toksinine de yine aynı ürünler için $1000 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ sınırlamasını getiren tek Avrupa ülkesi Rusya' dır.

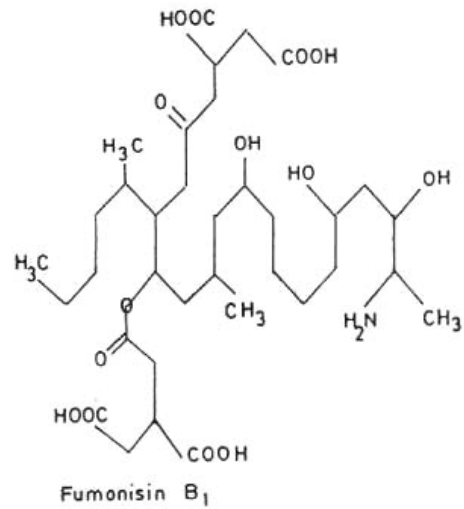
11.03. Fumonisin ve Moniliformin

Fumonisin ve moniliformin ağırlıklı olarak mısırlarda görülür. Ayrıca arpa ve durum buğdayları moniliforminle kontamine olabilir. Fumonisin ilk olarak 1988 yılında *Fusarium moniliforme*'nin metaboliti olarak izole edilmiştir. Moniliformin ise aynı küfün alt türü olan *Fus. moniliforme* var. *subglutinans* tarafından oluşturulmakla birlikte daha sonra diğer bazı *Fusarium* türlerinin de bu metaboliti sentezlediği tespit edilmiştir.



Moniliformin

Fumonisin in 6 tipi ayırt edilmiştir. Fumonisin B₁(FB₁)' in en toksik etkili olduğu düşünülmektedir. Fumonisin in ratlar üzerindeki etkisi; hayvanın ağırlık artışının engellenmesi ve karaciğerinin kanser benzeri değişimlere uğramasıdır. Toksik dozu ördek yavrularında LD₅₀=3.6 mg.kg⁻¹ olarak belirlenen moniliformin ise hayvanlarda barsak kanallarında ödem ve kanamalara neden olur. Her iki mikotoksinin de özellikle Güney Afrika ve Çin' de yemek borusu ve yutak kanserlerinde rolü olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca fumonisinin karaciğer kanserlerini de oluşturabileceği kabul görmektedir. Fumonisin ile kontamine yemlerle beslenen atlarda ölümle sonuçlanan lökoensofalit (beyin iltihabı) hastalığından bu toksin sorumlu tutulmaktadır. Avrupa ülkeleri içinde bir tek İsviçre mısır ve ürünlerinde 1000 µg.kg⁻¹ fumonisin B₁+B₂ sınırlamasını getirmiştir.

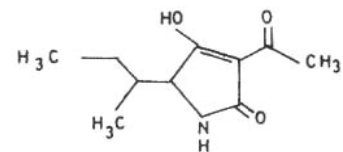


Fumonisin B₁

12. Alternaria Toksinleri

Tarla küflerinden olan *Alternaria* cinsinin saprofit ve fitopatogen yaklaşık 50 türü bulunur. Canlı bitkilerde ve hasat sonrası ürünlerde sıklıkla görülen bu cinsin bazı türleri 30 dan fazla sekonder metabolit oluşturur. Bunlar içinde; tenuazonikasit, alternariol, alternariol monometileter, altertoksin önemlileridir. En fazla *Alt. alternata* (sin. *Alt. tenuis*) ve *Alt. tenuissima* tarafından oluşturulurlar.

Toksinlerden tenuazonikasidin toksik dozu fareler için LD₅₀=125 mg.kg⁻¹ saptanmıştır. Maymunlar için 50 mg.kg⁻¹ üzerinde doza ihtiyaç vardır. Bu toksinlerle kontamine gıdalar olarak; domates ketçapları, Pekan cevizi, ayrıca tütün ve darı saptanmıştır. Pekan cevzinde danenin rengini tamamen değiştirip karartması nedeni ile seçilmesini kolaylaştırır.



Tenuazonikasit

13. Mikotoksinlerin Belirlenmesi

Mikotoksinlerin gıda ve yemlerde belirlenmesi için günümüzde hassas ve güvenli birçok yöntem bulunmaktadır. Mikotoksinler içinde en önemli konumda olan aflatoksinlerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin bile tümünü bütün detaylarıyla burada anlatmak olanaksızdır. Kaldı ki zaman içinde her mikotoksinin kendi özelliklerinden yola çıkılarak geliştirilen özel analiz yöntemlerinin de sayısı az değildir. O nedenle burada aflatoksinin klasik olarak ince tabaka kromatografisi ile analizinden ve son yıllarda mikotoksinler için geliştirilen immunokimyasal test kitlerinden (Çizelge 14) ve hızlı testlerden (Çizelge 15) söz edilecektir.

Aflatoksinin belirlenmesinde; ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemlerinden ve tekniğe bağlı olarak mass spektrometreden yararlanılır. Kromatografi; bir karışımda bulunan maddelerin, sabit faz ile onun üzerinde hareket eden bir faza olan affinitelerinin farklılıkları nedeni ile hareketli fazda farklı hızda taşınmalarına bağlı olarak birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir. Kromatografide kullanılan sabit ve hareketli fazın sıvı, katı veya gaz olmalarına göre; sıvı/sıvı, katı/sıvı, katı/gaz veya sıvı/gaz fazlı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. İnce tabaka kromatografisinde katı/sıvı fazlar kullanılır.

Aflatoksin ister rutin olarak, isterse HPLC gibi gelişmiş aletlerde kantitatif olarak belirlensin belli ön işlemler yapılmasını gerektirir. Numune almadan başlayarak saptanan aflatoksinin doğrulanmasına kadar her aşama önemlidir. Aflatoksin belirlenmesinde şu işlemler sırayla yapılmalıdır.

Numune alma → Yağdan arındırma → Ekstraksiyon → Ekstrakt temizleme → Konsantrasyon → Kromatografik ayırım → Teşhis, Tayin → Doğrulama

Ürünün yapısına bağlı olarak bu işlemlerin hepsi gerekebilir veya bazı basamaklar kullanılmayabilir ya da ek işlemlere gereksinme duyulabilir. Öncelikle numunenin doğru alınması ve işleme hazırlanması gerekir. *Asp. flavus* enfeksiyonunun düzensiz oluşu, fıstık ve hububat gibi daneli ürünlerde partilerin yüksek konsantrasyonlu aflatoksin kontaminasyonu içeren cepler oluşturması temsili numune alımını zorlaştırır. Akış halindeki üründen örnek alımı daha kolaydır. Aynı partiden alınan örneklerde yapılan aflatoksin analizleri birbirinden çok farklı sonuçlar gösterir. O nedenle özellikle yer fıstığının örnekleme yöntemi üzerinde çok çalışılmıştır. Numunenin hacmi ve tüm partiyi temsil etmesi çok önemlidir. İyi bir örnekleme planına göre ürünün cinsine bağlı olarak 0.5-20 kg arasında örnek alınır. Analize alınan örneğin miktarı ise 50-100 g arasında değişir. Ender olarak özel nedenlerle bu miktar 1 kg' a kadar yükselebilir. Partiden alınan numunenin homojen hale getirilmesi ve analiz için ayrılan miktarın tüm numuneyi temsil etmesi de büyük önem taşır. % 5' in üzerinde yağ içeren öğütülmüş ve homojen hale getirilmiş örneğin yağdan arındırılması gerekir. Yalnız bazı yöntemlerde toksin ekstraksiyonu sırasında yağ da aynı anda ekstrakte olduğundan bu basamağa gerek kalmayabilir. Aflatoksinin gıdadan alınması organik bir solvent ile ekstraksiyonu sonucunda mümkün olur. Bu amaçla uygun çözücü olarak yöntemle bağlı olarak kloroform, diklorometan, metanol, aseton veya asetonitril kullanılır. Ekstraksiyonda diatome torağından yararlanan yöntemler de vardır. Böyle bir yöntemle göre numune, damıtık su, diatome toprağı ve metanol birlikte mekanik bir çalkalayıcıda yaklaşık 30 dk kadar ekstrakte edilir. Ekstraksiyon süresinin sonunda süzülerek kloroform fazı ayrılır.

Kloroformla ekstrakte edilmişse süzülen kloroform fazının, diğer çözücüler kullanılmışsa o çözücü fazların pigmentlerden, floresan veren yabancı maddelerden veya yağdan arındırılması gerekir. Aksi takdirde bu maddeler kromatografik ayırım ve tayin aşamasında sorun ve yanlışlıklara neden olurlar. Ekstrakt temizlenmesinde kolon kromatografileri, sıvı-sıvı dağılımı ve çöktürme yöntemleri kullanılabilir. Kolon kromatografisi ile temizlemede önce kolonun dip kısmına gevşek olarak cam pamuğu yerleştirilir. Silikajel doldurulmadan önce silikajele taban olmak üzere bir miktar sodyum sülfat konur, kolon önce kloroform ile yıkanır sonra yarısına kadar kloroform ile doldurulur ve silikajel kolona boşaltılır. Kolon kenarları tekrar kloroform ile yıkanır ve silikajel karıştırılarak çökmesi (oturması) için bırakılır. Silikajel daima kloroform içinde olacak şekilde akış sürdürülür. Silikajelin çökmesinden sonra kolona önce sodyumsülfat ilave edilir, sonra temizlenecek olan örnek ekstraktı (süzülen kloroform fazı) konur ve zamanı geldiğinde hegzan kolona dökülür. Son olarak da dietileter ilave edilir. Eterin akışı bittikten sonra kolondan temizlenmiş aflatoksinleri almak için kloroform-metanol karışımı kullanılır. Temizlenen ekstrakt kolonun musluğundan alınır ve su banyosunda buharlaştırılarak kurutulur. Tekrar kloroformla yıkanarak bir vial içerisine alınıp ağzı sıkıca kapatılarak buzdolabında ince tabaka kromatografi plakalarına uygulanmak üzere saklanır.

Kromatografide itina ile hazırlanmış silikajel kaplı plakalar veya hazır kromatografi plakaları kullanılabilir. Vial içindeki aflatoksin içerdiği düşünülen ekstrakt plaka üzerinde önceden işaretlenmiş olan yerlere şırınga ile belli miktarlarda (2.5; 5.0; 10 µl) tatbik edilir. Rezolusyon referans standardı ve AFB₁ başta olmak üzere aflatoksin standartları da uygulanır. Plak, kromatografi tankında içinde kloroform-aseton çözücü solvent içinde, tankın ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında 40 dk geliştirilir (R_f=0.4-0.7 değerlerine ulaşacak sürede). Tanktan alınan plaka (kromatogram) oda sıcaklığında kurutulur ve UV lambası altında incelenir. Plaka üzerindeki benekler azalan R_f değerlerine göre B₁, B₂, G₁ ve G₂ toksinleridir. B₁ ve B₂ mavi floresan verirken G₁ ve G₂ yeşilimsi renkte floresan verir. Standart beneklerin numune ekstraktında bulunan maddelerle örtülmesi deneyin tekrarına neden olur. Tekrarlanan analizde yabancı floresan veren maddelerin uzaklaştırılması amacıyla plaka önce susuz dietileterde, eterin uçurulmasının ardından normal çözücü (Kloroform-aseton) kullanılarak aynı yönde tekrar geliştirilir. Bu da yeterli olmazsa iki boyutlu ince tabaka kromatografisi uygulanır. Numuneye ait aflatoksin olduğu tahmin edilen benek ile standarda ait benek üst üste geldiğinde tek benek oluşmalıdır. Standartla aynı R_f değeri ve aynı renk floresan veren benegin tespiti ile aflatoksin kalitatif olarak belirlenmiş olur. Aflatoksinleri mevcut olabilecek diğer floresan maddelerden ayırabilmek için kimyasal doğrulama testi yapılır. Bunun için genellikle beneklerin üzerine % 25' lik H₂SO₄ ince zerrecikler halinde püskürtülür. Şüpheli benekler standartlar gibi UV altında parlak sarı renge dönüşmelidir. Triflorikasitle de AFB₁ ve AFG₁' in doğrulanması ayrı bir uygulama ile yapılabilir.

Kantitatif analizde, analizde kullanılan standart hacmi ve konsantrasyonu, numune ekstraktının son seyrelti hacmi ve tatbik edilen hacmi, vial içindeki ekstrakta eşdeğer numune miktarı dikkate alınarak formülden hesaplanır.

$$AFB_1 (\mu\text{g.kg}^{-1}) = (S.Y.V) / (E.M)$$

S = Bilinmeyene eşdeğer AFB₁ standardı (µl)

Y = AFB₁ standardı konsantrasyonu (µg.µl⁻¹)

V = Numune ekstraktının son seyreltildiği hacmi (µl)

E = AFB₁ standardına eşdeğer miktarda floresan yoğunluğu gösteren numune benegi için tatbik edilen numune ekstraktı (µl)

M = Vial içindeki ekstrakta eşdeğer olan numune (g).

Aflatoksin analizinde ayrıca rutin taramalar için geliştirilmiş olan kısa sürede (kurulu bir laboratuvar düzeninde 15-20 dk) sonuç veren minikolon veya fluorisil yöntemleri de bulunmaktadır. Fluorisil tüp yönteminde fluorotoksinmetre aletine ihtiyaç vardır. Aletin bulunmadığı laboratuvar da kolon uzun dalga boylu 360 nm UV ışığı altında incelenip değerlendirilir.

Bazı ürünler için kullanılan efektif bir yöntem ise; 365 nm de UV ışığı altında tohum ve danelerin incelenerek parlak yeşilimsi ve sarı yeşilimsi floresan renk verenlerin ayrılmasıdır. Bu yöntem için otomatik aletler de geliştirilmiştir. Parlak yeşilimsi-sarı renge üründe bulunan kojik asit neden olur. Ancak aflatoksin üreten *Aspergillus* suşlarının % 90' dan fazlası eş zamanlı olarak kojik asit ürettiğinden, parlak floresan renk ile aflatoksin kontaminasyonu arasında yüksek korelasyon saptanmıştır. Aflatoksinin varlığını indirekt gösteren bu yöntem yer fıstığı ve pirinç için uygun bulunmamıştır. Ancak unutulmaması gereken husus floresan vermeyen danelerin de düşük konsantrasyonda olsa bile aflatoksin kontaminasyonu gösterebileceğidir.

Fiziksel-kimyasal yöntemlerin dışında çok çeşitli firmaların geliştirdikleri immunokimyasal test kitleriyle de aflatoksinleri ve diğer önemli mikotoksinleri kalitatif ve kantitatif olarak saptamak olanaklıdır. Mikrotitre-plaka test kitleri kompetitif ELISA esasına dayalı olarak geliştirilmişlerdir. Değişik firmalarca piyasaya sunulan bu kitler ile; AFB₁, AFM₁, toplam aflatoksin (B₁+B₂+G₁+G₂), OTA, zearalenon, T-2 toksin, deoksinivalenol ve fumonisin miktarları belirlenir. Bu testlerde ortalama tekrar bulma oranı % 70-90 arasındadır (Çizelge 13). Süt gibi sıvı gıdalarda örnek mikrotitre-plağına direk konurken katı örneklerde sadece metanol ekstraksiyonu yapılır. Hazırlık aşamasından sonra analiz süresi 1-3 saattir. Metodun avantajı ön işlemlerin çok azaltılmış olması, işlemin kısa sürmesi, 1 µg.kg⁻¹ mikotoksin veya altındaki miktarların saptanabilmesidir.

Çizelge 13. Mikotoksinlerin belirlenmesinde mikrotitre-plaka test kitleri (Kompetitif ELISA testleri) (Becker ve Märthbauer 1994).

Mikotoksin	Test kiti	Gıda, Ürün, Materyal	Duyarlılık (ppb)*	Üretici firma
AF M ₁	Ridascreen	Süt, Peynir	0.005 - 0.1	R-Biopharm, De
	ELISA	Süt	0.005	Riedel-de Häen, De
AF B ₁	Ridascreen	Hububat, yem	0.625	R-Biopharm, De
	ELISA	Hububat, yem	0.4	Riedel-de Häen, De
	Aflatoksin B ₁	Hububat, yem	0.055 (0.1)**	Diffchamb, Fr
AF (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	Biokit	Hububat	0.016	Cortecs, UK
OTA	Ridascreen	Hububat, yem	0.4	R-Biopharm, De
	Biokit	Domuz serumu, Bira	0.1	
		Hububat	0.05	Cortecs, UK
Zearalenon	Ridascreen	Hububat, yem	0.125	R-Biopharm, De
		Bira	0.25	
		Serum, idrar	0.05	
T-2 toksin	Ridascreen	Hububat	5	R-Biopharm, De
Deoksinivalenol	Ridascreen	Hububat, bira	1.25	R-Biopharm, De
Fumonisin	Ridascreen	Mısır	9	R-Biopharm, De

* : Üretici firmanın bildirimini ** : Tüp testi ; De :Almanya, Fr: Fransa, UK: İngiltere

Bu duyarlılıktaki testlerle Avrupa ülkelerinde yasal veya öneri olarak benimsenmiş sınır değerleri kontrol edilebilmektedir. Ayrıca test sonuçları fiziksel-kimyasal yöntemlerle saptanan değerlerle korelasyon gösterir. Yöntemin dezavantajı ise bazı hallerde yarı kantitatif sonuçların alınmasıdır. Ön işlemlerdeki basitleştirme ile yeterince saflık sağlanamadığından gerek monoklonal gerekse poliklonal antikolar, toksinle kimyasal yapı benzerliği olan bileşiklerle çapraz reaksiyona girerler. Böyle durumlarda metanol ekstraksiyonundan başka ayırma-saflaştırma yöntemlerinin denenmesi çözüm olabilir.

ABD firmalarınca üretilen ve bu ülkede kullanılan hızlı test yöntemleri ise daha az duyarlı immunofiltrasyon esaslı yöntemler olup Avrupa' da pek kabul görmemektedir (Çizelge 14). Bu testlerin analiz süresi sadece 10 dk. dır. Hızlı testlerle yarı kantitatif veya kalitatif sonuçlar alınabilmektedir. Avrupa mikotoksin sınır değerlerinin kontrolüne uygun duyarlılıkta değildir. Bununla beraber çok çeşitli tarım ürününün seri taranmasında başarıyla kullanılır.

Çizelge 14. Mikotoksinlerin belirlenmesinde hızlı testler (Becker ve Märtlbauer 1994).

Mikotoksin	Test kiti	Test prensibi	Gıda, Ürün	Duyarlılık (ppb)*	Üretici firma
AF B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	AflaCup EZ-Scr. Cite Prb.	İmmf. İmmf. İmmf.	Mısır, pamuk toh., yem Tahıl, fındık vb. soya Mısır	10 / 20** 5 / 20*** 5 / 20***	Romer Labs, Union ABD Diagnostic (Editec), Kanada Idexx, Westbrook, ABD
AF B ₁ , G ₁	Agri-Scr. Field Kit	Tüp testi	Mısır, pamuk tohumu. Yer fıstığı, yem	15	Neogen Lansing, ABD
AF M ₁	Cite Prb	İmmf.	Süt	0.5	Idexx, Almanya
T-2	EZ-Scr.	İmmf.	Tahıl	50	Diagnostic (Editec), Kanada
OTA	EZ-.Scr.	İmmf.	Tahıl	20	Diagnostic (Editec), Kanada
Zearalenon	EZ-Scr.	İmmf.	Tahıl	100	Diagnostic (Editec), Kanada

İmmf : İmunofiltrasyon * : Üretici firmanın bildirimini ** : Deney tutanağına bağlı olarak *** : Üretici firma tarafından iki varyasyon sunulmuştur.