İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPERGİLLUS FLAVUS VE *ASPERGİLLUS TAMARİİ* SUŞLARININ SİKLOPİAZONİK ASİT ÜRETME POTANSİYELERİNİN BELİRLENMESİ VE SİKLOPİAZONİK ASİT ÜRETİMİNE SICAKLIK VE SÜRE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz DİNÇER

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

HAZİRAN 2012

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPERGİLLUS FLAVUS VE *ASPERGİLLUS TAMARİİ* SUŞLARININ SİKLOPİAZONİK ASİT ÜRETME POTANSİYELERİNİN BELİRLENMESİ VE SİKLOPİAZONİK ASİT ÜRETİMİNE SICAKLIK VE SÜRE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz DİNÇER
(506101504)

Gıda mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek HEPERKAN

HAZİRAN 2012

ÖNSÖZ

Lisans ve Lisansüstü eğitimim boyunca ve tez çalışmam sırasında; araştırmalarımın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında; hem bilimsel hem de hayat tecrübesi ile her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Funda Karbancıoglu-Güler'e; hem asistan hem de çalışma arkadaşı olup, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen, her zaman yanımda olan Ceren Daşkaya ve Sibel Ertuğrul'a teşekkür ederim. Eğitimimin her aşamasında yanımda olan, beni her zaman destekleyen aileme sevgi ve saygılarımla teşekkürlerimi iletirim.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK), yüksek lisans eğitimim boyunca sağladığı maddi desteğinden ötürü saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2012 Deniz DİNÇER

(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....v
İÇİNDEKİLER.....vii
KISALTMALAR.....ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....xi
ŞEKİL LİSTESİ.....xiii
ÖZET.....xv
SUMMARY.....xvii
1.GİRİŞ 1
2.MİKOTOKSİNLER 3
3.SİKLOPİAZONİK ASİT VE ÖZELLİKLERİ 11
3.1 Siklopiazonik Asit Üreticisi Küfler.....11
3.2 Siklopiazonik Asitin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....14
3.3 Gıdalarda Siklopiazonik Asit Varlığı.....15
3.4 Siklopiazonik Asitin Sağlık Üzerine Etkileri.....17
3.5 Siklopiazonik Asit ile İlgili Yasal Düzenleme ve Limitler.....19
3.6.Siklopiazonik Asit Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemler 19
4.METARYEL VE METOT.....21
4.1 Küf İzolatları.....21
4.2 Küf İzolatlarının Maksimum Mikotoksin Oluşturma Potansiyelleri İçin Optimum Sıcaklarının Belirlenmesi.....21
4.2.1 Spor süspansiyonlarının hazırlanması.....21
4.2.2 HPLC ile siklopiazonik asit tayini.....21
4.2.2.1 Siklopiazonik asit standartlarının hazırlanması.....22
4.2.2.2 Geri kazanım oranlarının belirlenmesi.....23
4.2.2.3 Siklopiazonik asit ekstraksiyonu.....23
4.2.2.4 Siklopiazonik asit analizi HPLC koşulları.....23
4.3 Küf İzolatlarının Besiyerinde Siklopiazonik Asit Oluşturma Potansiyellerinin Faklı Sıcaklık Derecelerinde 7 Gün İnkübasyonu ile Belirlenmesi ve 2 Saat Farklı Sıcaklık Derecelerinde Bekletilip Optimum Sıcaklık Derecesinde İnkübasyonun Tamamlanmasının, İnhibasyon Etkisinin Belirlenmesi.....24
4.3.1 Küf izolatlarında siklopiazonik asit tayini.....24
4.4 İstatistiksel Analiz.....24
5.BULGULAR VE TARTIŞMA.....25
5.1 *A.flavus* ve *A. tamarii* izolatlarının Maksimum Mikotoksin Oluşturma Potansiyelleri için Sıcaklık Derecesinin Belirlenmesi.....25
5.2 *A.flavus* ve *A.tamarii* Suşlarının Optimum Sıcaklıkta 7 Gün Süre ile Siklopiazonik Asit Oluşturma Potansiyelinin İncelenmesi.....30

5.3 *A.flavus* ve *A.tamarii* Suşlarının 25 °C Sıcaklıkta 1, 3 ve 7 Gün Süre ile Siklopiazonik Asit Oluşturma Potansiyelinin İncelenmesi……..….32
5.4 *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarının 2 Saat Farklı Sıcaklık Derecelerinde Bekletilip Optimum Sıcaklık Derecesinde 7 Gün İnkübasyonun Tamamlanmasının CPA üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi…….35
6.SONUÇ ve ÖNERİLER……45
KAYNAKLAR……..47
ÖZGEÇMİŞ……..57

KISALTMALAR

A.	**:** Aspergillus
AB	**:** Avrupa Birliği
ABD	**:** Amerika Birleşik Devletleri
CPA	**:** Siklopiazonik asit
CYA	**:** Czapek Yeast Agar
EC	**:** Avrupa Komisyonu
GC	**:** Gaz Kromatografisi
GC-MS	**:** Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
HPLC	**:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Kob	**:** Koloni oluşturan birim
LC-MS	**:** Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LC-MS/MS	**:** Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (2)
MEA	**:** Malt Extract Agar
NOEL	**:** Etkinin gözlenmediği en yüksek düzey
P.	**:** Penicillium
Ppb	**:** Parts per billion
Ppm	: Parts per million
TLC	**:** İnce tabaka kromatografisi

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 : Toksinler ve üretici küfleri, etkiledikleri gıda ürünleri, yasal düzenlemeler ve sağlık üzerine etkileri (Köppen ve diğ., 2010)..... 6
Çizelge 3. 1 : Siklopiazonik asit üreticisi bazı küfler.....11
Çizelge 3. 2 : Gıdalarda siklopiazonik asit varlığı 16
Çizelge 4. 1 : CPA kalibrasyon çözeltileri ve içerdikleri toksin miktarları.....22
Çizelge 5. 1 : Farklı sıcaklık değerlerinde *A.flavus'*un ürettiği CPA miktarları.....25
Çizelge 5. 2 : Farklı sıcaklık değerlerinde *A.tamarii'nin* ürettiği CPA miktarları.....25
Çizelge 5. 3 : *A.flavus* suşunun 30 °C'de 1,3,5 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları 30
Çizelge 5. 4 : *A.tamarii* suşunun 30 °C'de 1,3,5 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları. 30
Çizelge 5. 5 : *A.flavus* suşunun 25 °C'de 1,3 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları 32
Çizelge 5. 6 : *A.tamarii* suşunun 25 °C'de 1,3 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları. 33
Çizelge 5. 7 : 2 saat farklı sıcaklıklarda bekletilip 30 °C'de 7 gün inkübasyonu tamamlanan *A.flavus* ve *A.tamarii* suşunun CPA üretim miktarının tablosu.....35
Çizelge 5. 8 : Kontrol grubu (30°C) ile Dunnet Karşılaştırma Testinin Sonuçları. ...36
Çizelge 5. 9 : 2 saat farklı sıcaklılarda bekletilip inkübasyonu 30 °C'de tamamlanan petrilerin ürettiği CPA miktarlarının birbiri ile karışlaştırmasının istatistiki sonuçları. 37

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3. 1 : Siklopiazonik asitin kimyasal yapısı (Burdock ve Flamm, 200)…….14
Şekil 5. 1 : Farklı sıcaklık derecelerinde 7 gün süre ile inkübe edilen edilen *A.flavus* ve *A.tamarii* suşları……..……...28
Şekil 5. 2 : *A.flavus*'un sıcaklığa bağlı CPA üretim miktarları değişim grafiği…….29
Şekil 5. 3 : *A.tamarii*'nin sıcaklığa bağlı CPA üretim miktarları değişim grafiği…..29
Şekil 5. 4 : *A.flavus* ve *A.tamarii'*nin 30 °C'de 7 günlük gelişmelerine ait petri görüntüleri……..…….31
Şekil 5. 5 : 30 °C sıcaklıkta *A.flavus* suşunun günlere göre CPA üretim miktarı grafiği…….32
Şekil 5. 6 : 30 °C sıcaklıkta *A.tamarii* suşunun günlere göre CPA üretim miktarı grafiği……32
Şekil 5. 7 : *A.flavus* ve *A.tamarii'*nin 25 °C'de farklı günlerde ki petri görüntüleri..34
Şekil 5. 8 : 25 °C sıcaklıkta *A.flavus* suşunun günlere göre CPA üretim miktarı…..35
Şekil 5. 9 : 25 °C sıcaklıkta *A.tamarii* suşunun günlere göre CPA üretim miktarı…35
Şekil 5. 10 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarının 30 °C kontrol grubuyla 5 ve 10 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri……..……..…38
Şekil 5. 11 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarına ait 30 °C kontrol grubu ile 15 ve 20 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri……..……..39
Şekil 5. 12 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarına ait 30 °C kontrol grubu ile 25 ve 35 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri……..……..39
Şekil 5. 13 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarına ait 30 °C kontrol grubu ile 40 ve 45 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri……..……..40
Şekil 5. 14 : *A.flavus* suşuna ait CPA üretiminin optimum koşul ile 2 saat beklemeli sonuçlarının sütün grafiği üzerinde gösterimi…….41
Şekil 5. 15 : *A.tamarii* suşuna ait CPA üretiminin optimum koşul ile 2 saat beklemeli sonuçlarının sütün grafiği üzerinde gösterimi……...42
Şekil 5. 16: Tasarlanan deney sonucunda *A.flavus* suşunun ürettiği CPA miktarları……..43
Şekil 5. 17 : Tasarlanan deney sonucunda *A.tamarii* suşunun ürettiği CPA miktarları…….....43

ASPERGİLLUS FLAVUS VE *ASPERGİLLUS TAMARİİ* SUŞLARININ SİKLOPİAZONİK ASİT ÜRETME POTANSİYELERİNİN BELİRLENMESİ VE SİKLOPİAZONİK ASİT ÜRETİMİNE SICAKLIK VE SÜRE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Mikotoksinler, küfler tarafından üretilen, ikincil metabolit olarak adlandırılan toksik bileşiklerdir. Bu bileşikler insan ve hayvanlar için toksik özellik taşırken; tarım ürünlerinde verim kayıpları oluşturarak büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadırlar. *Aspergillus* ailesine ait olan *Aspergillus flavus*, sıklıkla rastlanan küftür. Ürettiği metabolitler içerisinde başta aflatoksin olmak üzere siklopiazonik asit de yer almaktadır. Aflatoksin, gıda ürünlerinde ve hayvan yemlerinde sıklıkla kontamine olarak bulunmaktadır. Fındık, mısır ve pamuk ürünlerinde gelişmesinin ardından bu ürünler tüketilemez hale gelmektedir. *Aspergillus tamarii*; siklopiazonik asit (CPA), tenuazonik asit ve kojik asit üreten *Aspergillus* ailesine ait olan bir küftür. *A.flavus* ve *A.tamarii* aynı aileden gelmesinin yanı sıra siklopiazonik asit üretme özelliği, ortak özellikleridir.

Siklopiazonik asit indole-tetramik asit olan; *Penicillium cyclopium Westling, P. patulum, P. viridicatum, P. puberulum, P. crustosum, P. camemberti, Aspergillus flavus, A. versicolor, A. Oryzae* ve *A.tamarii* gibi küfler tarafından üretilen ikincil bir metabolittir. Karaciğer ve sindirim sistemi dokularında nekroza; iskelet kaslarında ve böbreklerde lezyon oluşumuna sebep olur. Siklopiazonik asit doğal kontaminasyon sonucunda bulunduğu gıdalara örnek olarak yerfıstığı, mısır, peynir, süt, domates ve domates püresi verilmektedir.

Çalışmanın ilk aşamasında *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarının hangi sıcaklıkta maksimumum miktarda CPA ürettiğini bulmak amacıyla 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarda 7 gün süre ile Czapek Yeast Agar (CYA) besi yerinde inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerden ekstrakte edilen CPA, HPLC-DAD kullanılarak miktar tayini yapılmış ve istatistiksel açıdan sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu sonuçlardan, 30 °C'nin her iki suş içinde maksimum miktarda CPA üretimi sağladığı bulunmuştur. Bu sonuca ek olarak; her iki suş için de 5 ve 45 °C'de gelişim gözlenmediği belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşaması olarak 2 saat farklı sıcaklıkta bekletilen petrilerin, 30 °C'de 7 gün inkübasyonlarını tamamlamasının ardından, ürettikleri CPA miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı CPA üretimine sıcaklığın etkisinin belirlenmesidir. Bu amaç ile *A.flavus* ve *A.tamarii* suşları ayrı ayrı olmak üzere 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 °C'de sıcaklıkta 2 saat bekletildikten sonra (optimum sıcaklık) 30 C°'de sıcaklıkta 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerden ekstrakte edilen CPA, HPLC-DAD kullanılarak miktar tayini yapılmış; sonuçlar istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar; kontrol grubu olan 30 °C'de 7 gün süre ile inkübe edilen suşların ürettiği CPA miktarları ile karşılaştırılmıştır. *A.flavus* suşu için en az CPA ürettiği deney tasarısı; 35 °C'de 2 saat bekletilip 30 °C'de inkübasyonunun tamamlanmasının ardından elde edilmiştir. İstatistiki açıdan % 95

güven aralığında değerlendirilen sonuca göre 2 saat 25 veya 35 °C'de bekletilen petrilerin ürettiği CPA miktarları arasında fark bulunamamıştır. *A.tamarii* suşu için en az CPA ürettiği deney tasarısı; 25 °C'de 2 saat bekletilip 30 °C'de inkübasyonunun tamamlanmasının ardından elde edilmiştir. İstatistiki açıdan % 95 güven aralığında değerlendirilen sonuca göre 2 saat 25 veya 35 °C'de bekletilen petrilerin ürettiği CPA miktarları arasında fark bulunamamıştır. Her iki suş için kontrol grubu ile yapılan ikili karşılaştırma sonucunda; *A.flavus* suşu için 10 °C ve *A.tamarii* suşu için 15 °C'de dışında ki deneyde kullanılan her sıcaklık derecesi için; α=0,05 olmak üzere, önemli derecede kontrol grubu ile arasında fark bulunmuştur.

Bu çalışmalara ek olarak 30 °C'de 1, 3, 5 ve 7. günlerde üretilen CPA miktarları *A.flavus* ve *A.tamarii* suşları için incelenmiş, günlere göre CPA üretim miktarları belirlenmiştir. Her iki suşunda ilk günden itibaren CPA üretime başladığı ve 7. güne kadar artış gösterdiği bulunmuştur. Belirli sıcaklıkta farklı günlerde CPA miktarının belirlenmesine yönelik başka bir çalışma da 25 °C için yapılmıştır. 25 °C'de 1, 3 ve 7. günlerde üretilen CPA miktarları *A.flavus* ve *A.tamarii* suşları için incelenmiş, günlere göre CPA üretim miktarları belirlenmiştir. 30 °C'de olduğu gibi, 25 °C'de de ilk günden itibaren CPA üretimi her iki suş içinde tespit edilmiştir.

DETERMINATION OF CYCLOPIAZONIC ACID PRODUCTION ABILITY OF *ASPERGILLUS FLAVUS* AND *ASPERGILLUS TAMARII* AND INVESTIGETION OF HEAT AND TIME EFFECT ON CYCLOPIAZONIC ACID PRODUCTION BY *ASPERGILLUS FLAVUS* AND *ASPERGILLUS TAMARII*

SUMMARY

Mycotoxins are the secondary metabolites produced by specific fungi. They are toxic to human and animals, at the same time they cause significant reductions in crop yield and cause economic losses. Aflatoxin, ohcrotoxin, patulin, fumonisin, cyclopiazonic acid, zearalenone, deoxynivalenol are example of the some mycotoxins. Althought having many researches and the introduction of good manufacturing practices in the food production, storage, and distribution chain, mycotoxins still continue to be a problem, hence their presence still important topic. Some mycotoxins can also be metabolized by animals fed contaminated grains and excreted into, for example, milk, or accumulated in eggs, meat, and/or other tissues, thus these food commodities are re-entering the food chain. In addition to that some mycotoxins' chemical structures are changed, then conjugated forms are occurred. So, they can not detect due to differences in polarity between the native precursors and their metabolites. These unexpected conjugated forms of mycotoxins are called "masked mycotoxins". Masked or modified mycotoxins are usually bounded mycotoxins with a more polar substance such as glucose, amino acid and sulfates. The most well-known substances within the group of fungal conjugates are 3-acetyl deoxynivalenol (3ADON) and 15-acetyl deoxynivalenol (15ADON), and also zearalenone 4-sulfate (Z4S). In plant conjugates; DON is converted to DON-3-glucopyranoside (D3G) and ZON can be altered to ZON-4-glucopyranoside (Z4G).

Aspergillus flavus is the member of *Aspergillus* section *flavi*. Some type of *A.flavus* can produce aflatoxin (AF), and cyclopiazonic acid. When these fungi grow in commodities such as peanuts, corn and cottonseed, the resulting contamination with aflatoxins often makes the commodities unsuitable for consumption. *Aspergillus tamarii* is the member of *Aspergillus* section, too. Cyclopiazonik acid, tenuazonic acid and kojic acid is produced by *A.tamarii*. Besides *A.flavus* and *A.tamarii* come from same family, the ability of production of CPA is common behavior of them.

Cyclopiazonic acid is a mycotoxin wtih an indole tetramic acid structure produced by *Penicillium cyclopium Westling, P. patulum, P. viridicatum, P. puberulum, P. crustosum, P. camemberti, Aspergillus flavus, A. versicolor, A. Oryzae* ve *A.tamarii.* It causes necrosis of liver or gastrointestinal tissue and necrotic changes in skeletal muscle and kidney. In addition to that, CPA causes weight loss, diarrhea, degeneration and necrosis of the muscles and viscera, and convulsion and death in rodents, birds, dogs and swine. CPA causes two mycotoxicoses, first one is "Kodua posining" caused by consuming Kodua millet drink infected by high concentration of CPA, and the second one is "Turkey X" disease together with AF. "Kodua poisoning" is characterized by vomiting and nausea in human. And also, generally it

can be seen on man. The "Turkey X" disease was concluded by killing of 100.000 poultry. In the beginning of the search, AF was found only responsibility of this disease. However, finding the neurological semptoms on the poultry, CPA found the second responsibility of it.

CPA is produced by different kind of fungies that is the reason of it can be seen different food products. CPA has been found to occur naturally in several products such as peanuts, corn, cheese, milk, tomato paste, puree and figs.

When human consume a large range of contamined food commodities, the risk of exposure to CPA is arising, hence the determination of CPA in food samples represents an important aspect of food safety. However, still there is no regulation of CPA in Europe and USA.

To detect and evaluate level of CPA in food commodities several different methods are used. As an example, immunoassay, capillary electrophoresis, and chromatography have been reported. There are some problems can affect the results. The problem is to removing the interference from the sample matrix. In addition to that CPA has a low pKa (3.5), that it can be reason of some acidic dissolvations in the extract, needs be consider carefully when deciding the method. As generally used in other mycotoxins analyses, chloroform and dichloromethane, which are toxic to human) are used. Recent studies show that they are searching less toxic solvents, easy and quick extraction methods and high recovery results.

In the first part of study, to find the optimum temperature where the maximum CPA production was occurred, different temperatures were evaluated. These temperatures were 5, 10, 15, 20, 25, 30, 30, 35, 40 and 45 °C. The fungal strains were used in this study were *A.flavus* and *A.tamarii*, obtained from Istanbul Technical University, Food Microbiology Laboratory. All cultures were maintained on malt extract agar (MEA). Spore concentration was determined by thome lame. The concentration of spores was 1-5x10^6 cfu/ml was used by single point cultivation. These strains were incubated on Czpek Yeast Agar (CYA) for 7 days at different temperatures mentioned before. After the incubation CPA was extracted by using methanol. The quantification of CPA was determined by HPLC-DAD by reverse-phase NH_2 columns with ammonia in the mobile phase. Data analyzes was run using the statistical package MiniTab 15.

30 C° was chosen from the result for optimum temperature to obtain the maximum production level of CPA for *A.flavus* and *A.tamarii*. In addition to that, there were not any growing at 5 C° and 45 C° for all strains.

In the second part of the study to find out heat effects on CPA production, 2 hours waiting in the different temperatures in the beginning of incubation was used. After 2 hour waiting in 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 or 45 C°, *A.flavus* and *A.tamari* were continued to incubation at 30 C° until end of 7^{th} days. CPA was extracted and then was quantified by HPLC-DAD. Data analyzes was run using the statistical package MiniTab 15. The result was compared with control group (optimum condition: incubation at 30 C° for 7 days).

The minimum CPA production of *A.flavus* was obtained by 2 hours waiting at 35 C°. If the result with compare 95 % confidence limit, there was no differences between waiting 25 and 35 C°. In addition to that, the minimum CPA production of *A.tamarii* was obtained by 2 hours waiting at 25 C°. If the result with compare 95 % confidence limit, there was no differences between waiting 25 and 35 C°. Except 10

C° for *A.flavus* and 15 C° for *A.tamarii*, all 2 hours waiting temperatures had important differences from control group.

In addition to these studies, the effects of incubation days (1.3.5 and 7) at 30 C° on CPA production by *A.flavus* and *A.tamarii* was investigated. . The strains were incubated on CYA at 30 C° for 1, 3, 5 and 7 days. As it mentioned before CPA was extracted by methanol, and then analyzed by HPLC-DAD.

CPA production was determined in the beginning of the incubation (1st day) and continued by increasing rate to end of the 7th day. The results of CPA production by *A.flavus* were 1.83, 30.56, 66.95 and 133.01µg/ml by following incubation days. The results of CPA production by *A.tamarii* were 0.82, 3.07, 4.09 and 9.29 µg/ml by following incubation days.

Another study at the constant temperature with different incubation days was examined. 25 C° was used for constant temperature and the incubation days were 1, 3 and 7. *A.flavus* and *A.tamarii* were incubated on CYA, and then CPA was extracted by methanol.

The result of HPLC-DAD showed that CPA production was started in the beginning of the incubation (1st day) and increased to end of the incubation period. The results of CPA production by *A.flavus* were 2.13, 53.443 and 76.43 µg/ml by following incubation days. The results of CPA production by *A.tamarii* were 0.28, 1.09 and 5.9 µg/ml by following incubation days.

This research is the first that shows different temperatures' effect on production of CPA by *A.flavus* and *A.tamarii*. Our results show that *A.flavus* and *A.tamarii* start to produces CPA after the 1st incubation at 25 C° and 30 C°. In addition to that, incubating 2 hours at different temperatures and put 30 C° for 7 days incubation can be a protection method, and also can be clue of optimization of harvest hours from field. For example, our result show that if there is small changing in the temperature (20-25-30-35 C°), the negative effect of it on the CPA production will be higher. So, if the working conditions are considered, there is a chance to reduce of production of CPA. As a conclusion this research has a lots of important outgoings makes its first research in their topic.

1.GİRİŞ

Mikotoksinler küfer tarafından oluşturulan ikincil metabolitlere verilen isimdir. Bu maddeler insan ve hayvanlar tarafından alındığında mikotoksinin tipine bağlı olarak karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkiler göstermektedir (Kuiper-Goodman, 2004; Gümüş ve Yılmaz, 2006).

Siklopiazonik asit akut etkiye sahip olmayıp, etkisi kroniktir. Bu sebeple, insanlar üzerinde doğum kusurlarına sebep olabileceği düşünülmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucundan yola çıkılarak, insan üzerinde teratojenik etkiye sahip olabileceği ve böbrek, dalak, kalp damar sistemi, merkezi sinir sistemi üzerinde hasar oluşturabileceği düşünülmektedir (Burdock ve Flamm, 2000).

Bu çalışmanın ilk kısmında siklopiazonik asit üreticisi *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus tamarii* suşlarının farklı sıcaklarda ki siklopiazonik asit üretme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 °C'de 7.gün süre ile inkübe edilen petrilerin ürettikleri siklopiazonik asit miktarları HPLC-DAD ile belirlenmiştir. En yüksek miktarda siklopiazonik asit üretimi gözlenen sıcaklık, her iki suş için de, 30 °C belirlendikten sonra, bu sıcaklık için 1, 3, 5 ve 7. gün sonunda ürettikleri siklopiazonik asit miktarları belirlenmiştir. Bu veriler sonucunda 7 gün inkübasyon süresinde siklopiazonik asit miktarının nasıl değiştiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Benzer bir çalışma olarak her iki suş için 25 °C'de 1, 3 ve 7. gün sonunda üretilen siklopiazonik asit miktarları ve inkübasyon süresi içiersinde ki değişimi belirlenmiştir. Çalışmanın devamında; sıcaklık ve sürenin siklopiazonik asit üretme potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple farklı sıcaklıklarda (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 °C) 2 saat süre ile bekletilen petriler, inkübasyonlarına optimum koşullarda devam ettirilmiş, 7.gün sonunda ürettikleri siklopiazonik asit miktarları HPLC-DAD ile belirlenmiştir.

2.MİKOTOKSİNLER

Mikotoksinler, küfler tarafından üretilen ve küflerin ikincil metabolitleri olan doğal kontaminantlardır (Turner ve diğ., 2009). Mikotoksinlerin sıklıkla gıda ve yemde yer alması insan ve hayvan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Bu tehdit kontamine olmuş gıdaların direk tüketilmesi ile olduğu gibi, kontamine olan yemlerle beslenen hayvanların etlerinden, yumurtasından ve sütlerinden de gelebilmektedir (Hussein ve Brasel, 2001). Mikotoksinler bireysel olarak genotoksik, mutajenik, karsinojenik, teratojenik ve östrojenik olabilmektedirler. Mikotoksinli ürünlerin insanlar ve hayvanlar tarafından tüketilmesinden sonra ortaya çıkan bu toksisite olgusuna mikotoksikosiz adı verilmektedir (Van Egmond ve diğ., 2007).

Mikotoksin (mycotoxin) teriminde ki "myco"; yunanca bir terim olan ve küfleri tanımlamak için kullanılan "mykes" terimden gelirken, "toxin" kısmı ise Latincede ki zehir anlamına gelen "toxicum" dan gelmektedir. Genellikle küfler tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı maddeler için kullanılırlar (Köppen ve diğ., 2010). Şekil 2.1'de bazı küf metabolitleri ve molekül ağırlıkları yer almaktadır.

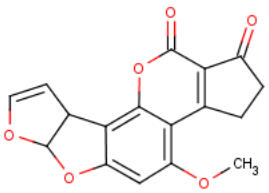
Çok eski zamanlardan beri küf ve mayalar peynir, ekmek, bira ve şarap üretimde kullanılmaktadır. Bilinen en eski gıda yönetmeliği Babiller ve Hittitler zamanındadır ve insan sağlığının korunması ve gıdada sahtekarlık konularını içermektedir. 1961 yılına kadar küflerin metabolitleri tanımlanmamış ve olası sağlık tehditleri belirlenmemiştir. 1963 yılında ortaya çıkan aflatoksin ile kontamine olan ithal yerfıstığını tüketen 100 000 kümes hayvanının ölmesiyle sonuçlanan "Turkey X" hastalığı ile bu konu gündeme gelmiştir (Asao ve diğ., 1963). Bunun yanı sıra biyolojik silah olarak kullanıldıklarıa dair şüpheler de vardır. 1974 ve 1981 yılları arasında; Laos, Afganistan ve Kamboçya'da hava saldırıları sıranda trikotesenlerin bırakıldığını ifade eden görgü tanıkları vardır. Fakat hala "sarı yağmur" olarak adlandırılan bu olay bilinmez olarak kalmıştır (Köppen ve diğ., 2010).

Aspergillus, Penicillium, Fusarium ve *Alternaria* yaygın olarak bulunan mikotoksin üreticisi küflerdir (Moss 1992; Sweeney and Dobson 1998). Aflatoksin, okratoksin, fumonisin, patulin, deoksinivalenol (DON) ve türevleri, zeralenon (ZON) ve türevleri, *Alternaria* toksinleri gibi toksinler ticari, ekonomik ve toksikolojik bakımdan öneme sahiptirler (Bennett ve Klich, 2003). Bu toksinler, üretici küfleri, etkiledikleri gıda ürünleri, yasal düzenlemeler ve sağlık sorunları Çizelge 2.1'de yer almaktadır.

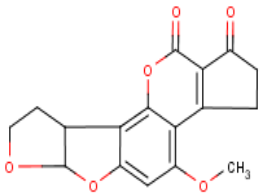
Günümüzde yer alan düzenlemeler, bilimsel otoriteler tarafından belirlenmektedir. Bu kuruluşlara FAO/WHO (Gıda/Tarım Örğütü-Dünya Sağlık Örğütü), JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations), EFSA (European Food Safety Authority, Avrupa Gıda Sağlık Örğütü) gibi kuruşlar yardımcı olmaktadırlar. Bunların yan ısıra doğru örnek hazırlama ve analitik metotların geliştirilmesi üzerine çalışan AOAC (Association of Analytical Communities), ISO (International Organisation for Standardization), CEN (The European Committee for Standardization) ve IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) gibi profesyonel örgütler vardır (Gilbert ve Anklam, 2002; Van Egmond ve diğ., 2007).

Mikotoksin analizlerinde önemli olan bir diğer konu ise örneklemedir. Mikotoksinler gıdada homojen bir şekilde dağılmaz. Doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuç elde edilmesi iyi bir örnekleme yapılmasına bağlıdır (Miraglia ve diğ., 2005). Bu amacın yerine getirilmesi için tek yasal düzenleme EC (European Commission, Avrupa Komisyonu) tarafından hazırlanan, "gıdada ki miktoksin analizleri için örnekleme ve performans kriterleri" adlı EC 401/2006'dır. Bilimsel tabanlı örnekleme sistemleri diğer ülkeler tarafından da, örneğin Amerika birleşik Devletleri tarafından fındıkta aflatoksin analizi için geliştirilmiş (FDA, 2002).

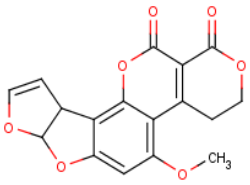
Mikotoksinler depolama ve işlemler sırasında parçalanmadan kalabilecek kimyasal yapıya sahiptirler. Toksinler düşük konsantrasyonda da tehlikeli olabildikleri için mikotoksin analizlerinin nasıl yapıldığı ve hangi metodun kullanıldığı önem taşımaktadır (Turner ve diğ., 2009). Bu sebeple mikotoksin analizlerinde örnekleme, örnek hazırlama, tokin eldesi, temizleme ve son olarak da tanımlama ve miktar tayinini gibi birçok işlem uygulanmaktadır (Köppen ve diğ., 2010).



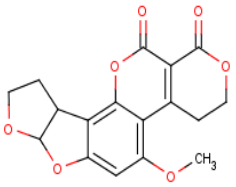
Aflatoksin B_1
Molekül ağırlığı: 312,3



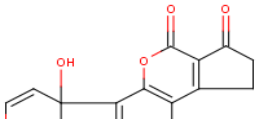
Aflatoksin B_2
MA:314,3



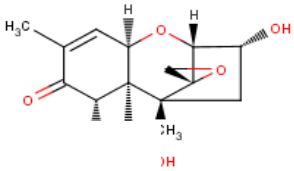
Aflatoksin G_1
MA: 328,3



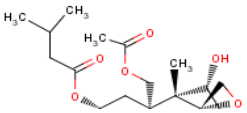
AflatoksinG2
MA: 330,3



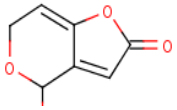
Aflatoksin M_1
MA:328,3



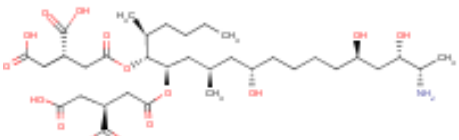
Deoksinivalenol
MA: 296,3



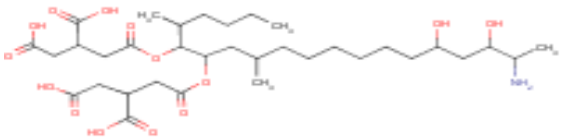
HT-2 toksini
MA:424,5



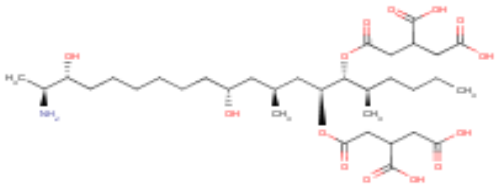
Patulin
MA: 154,1



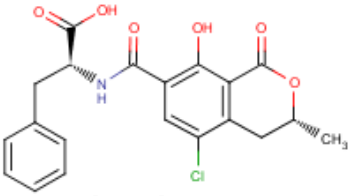
Fumonisin B_1
MA: 721,8



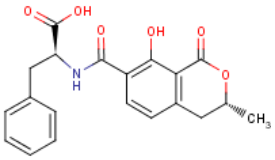
Fumonisin B_2
MA: 705,8



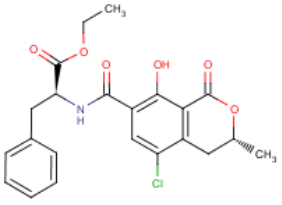
Fumonisin B_3
MA: 705,8



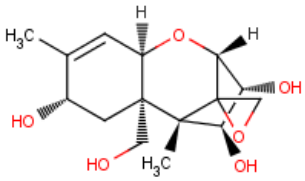
Okratoksin A
MA: 403,8



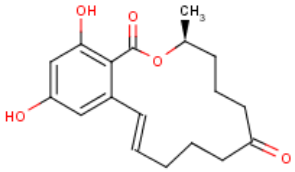
Okratoksin B
MA: 369,4



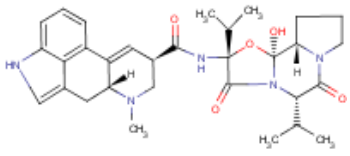
Okratoksin C
MA: 431,9



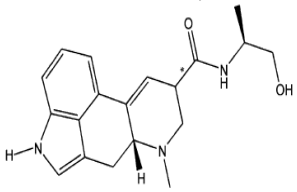
T-2 toksini
MA: 466,5



Zearelonon
MA:318,4



Ergokornine
MA: 561,7



Ergometrine
MA: 325,4

Şekil 2. 1 : Bazı küf metabolitleri ve molekül ağırlıkları (CTD, 2012; Köppen ve diğ., 2010).

Çizelge 2. 1: Toksinler ve üretici küfleri, etkiledikleri gıda ürünleri, yasal düzenlemeler ve sağlık üzerine etkileri (Köppen, 2010).

Mikotoksinler	**Küf Türleri**	**Gıda Ürünleri**	**Avrupa Birliği Yasal Limitleri (EU) µg/kg**	**Sağlık Üzerine Etkileri**
Aflatoksin (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, AFM_1, AFM_2)	*Aspergillus flavus, A.nomius, A.parasiticus, A.arachidicola, A.bombycis, A.psedotamarii, A.minisclerotigenes, A. rambelli, Emericella astellata, E. venezuelensis*	Mısır, buğday, pirinç, baharat, sorgum, yerfıstığı, fındık, badem, süt, yağlı tohum, kuru meyveler, peynir, yumurta, et	Toplam AF: 4 (kuru meyve, hububat ve fındık) -15 (yerfıstığı) AFM_1:0,025(bebek ve diyet ürünler)-0,05(süt) AFB_1: 0,1(yerfıstığı)-0,8 (diet ürünler,işlenmiş hububat ve bebek maması	Karsinojenik, mutojenik, teratojenik, hepatotoksik, nefrotoksik, bağışıklık sistemini önleyici, bağırsak ve böbreklerde kanama, akciğer kanseri
Fumonisin (FB_1, FB_2, FB_3)	*Alternaria alternate, Fusarium anthophilum, F. moniliforme, F. dlamini, F. napiforme, F.nygamai,F.verticilliodies*	Mısır ve mısırlı ürünler, küspe, sorgum, pirinç, kuşkanmaz, süt	Toplam FB_1 ve FB_2: 200 (işlenmiş mısır ve mısır ürnlerinde, bebek maması)-4000 (işlenmemiş mısır)	Karsinojenik , akciğer tümörü, hepatotoksik, beyin ödemi, nekroz oluşumu, immunotoksik
Tip A trikotosen (T-2 ve HT-2 toksinleri, diacetokycirpenol, neosolaniol)	*Fusarium sporotrichioides F. poae, F. acuminatum, F. culmorum, Cephalosporium sp., Myrothecium sp., Trichoderma sp., Phomopsis sp., Stachybotrys sp.*	Hububat ve hububat ürünleri	Mevcut bir limit yoktur, tartışmalar devam etmektedir.	Bağışıklık bozucu, mutajenik, gastrol kanama, nerotoksik
Tip B trikotosen (nivalenol, deoksinivalenol, 3-acetylDON, 15-acetylDON,fusarenonX)	*F. graminearum, F. culmorum, F. sporotrichioides, F. cerealis, F. lunulosporum*	Hububat ve hububat ürünleri	DON: 200 (işlenmiş hububat ve bunu içeren gıdalar, bebek maması)- 1750 (işlenmemiş durum buğdayı ve yulaf, işlrnmiş ve işlenmemiş mısır/ürün	Bağışıklık bozucu, mutajenik, gastrol kanama, nerotoksik
Zearalenon (ZON)	*F. graminearum, F. culmorum, F. crookwellense, F. equiseti, F. sporotrichioides*	Arpa, yulaf, buğday pirinç, sorgum, susam, soya fasülyesi, hububat ürünleri	20(işlenmiş hububat ve ürünleri, işlenmiş mısır içeren bebek maması-400 (rafine mısır yağı)	Ostrojenik etki (kısırlık, organsal problemler, erkeklerde dişilik)

Çizelge 2. 1 (Devam) : Toksinler ve üretici küfleri, etkiledikleri gıda ürünleri, yasal düzenlemeler ve sağlık üzerine etkileri (Köppen, 2010) .

Mikotoksinler	**Küf Türleri**	**Gıda Ürünleri**	**Avrupa Birliği Yasal Limitleri (EU) µg/kg**	**Sağlık Üzerine Etkileri**
Okrotoksin (OTA, OTB, OTC)	*Aspergillus alutaceus, A.alliaceus, A.auricomus, A.glaucus, A. niger, , A. citrus , A.carbonarius, A. melleus, A. albertensis, A. flocculosus, A. fonsecaeus, A. lanosus, A. ochraceus, Penicillium viridicatum, P. verrucosum, P. cyclopium, P. carbonarius*	Hububat, kurutulmuş şaraplık üzüm, şarap, kahve, yulaf, buharat, çavdar, kuş üzümü, üzüm suyu	0,5 (işlenmiş hububat ve ürünleri ve bebek maması)-10 (kuru şaraplık üzüm ve hazır kahve)	Karsinojenik, mutojenik, hepatotoksik teratojenik, bağışıklık bozucu, nefrotoksik, boşaltım sistemi tömürü, protein sentez önleyicisi
Patulin	*A.Clavatus, A. longivesica, A.terreus, P. expansum, P. griseofulvum, Byssochlamys sp*	Elma, elma suyu, kiraz-vişne, tahıl tohumu, üzüm, yabanmersini	10 (elma suyu, elma, bebek maması)- 50 (elma ve elme suyu içeren alkolsüz içeçekler,meyve suları	Bağışıklık sistemi bozucu, akciğer ve beyin ödemi, mide bulantısı, gastirit, sinir zedelenmesi felç, kasılma, damar hasarı, karsinojenik
Ergot alkaloitleri (ergocornine / inine, Ergocristin/inine, Ergocryptine/inine, Ergosine/inine, Ergotamine/inine)	*Claviceps africanana, C. purpurea, C. fusiformis, C. paspalii, Neothyhodium coenophialum*	Buğday, çavdar, yemlik ot, arpa, darı,yulaf, sorgum	Tartışmalar devam etmekte 500 mg/kg ergot, insan tüketimi için olan tahıllarda, -1000 mg/kg yemlerde	Kangren formu:damar büzülmesi, bacaklarda ödem, tendomlarda kangren. Kasılma formu: gastrol sorunlar, bulantı, kusma, merkezi sinir sitemi hasarları
Alternaria mikotoksinleri (Altenuene, alternariol, alternariol monomethil eter, altertoksin I, altertoksin II, altertoksin III, tenuazonik asit)	*Alternaria alternate, Alternaria dauci, A. cucumerina, A. solani, A. tenuissima, A. citri*	Buğday, pirinç, çavdar, zeytin, sorgum, tütün, elma, biber, ayçiçeği çekirdeği, kolza çekirdeği, pecan cevizi, domates, mandalin	Yasal limit bulunmamaktadır.	Teratojenik, mutojenik, karsinojenik, sitotoksik

Mikotoksinin üründen ekstrakte edilmesi ve safsızlıkların temizlenmesi için sıvı-sıvı ekstrasyon, süper kritik sıvı ekstraksionu ve katı faz ekstraksiyonu kullanılmaktadır. *Sıvı-sıvı ekstraksiyon* toksinin organik faz ya da sıvı fazda çözünmesinden kaynaklanan farklılıktan ileri gelen bir ayırma yöntemidir. Üründe yer alan yağ ve kolestrollerden, bu şekilde toksin ayrılabilmektedir (Krska ve diğ., 2008). *Süper kritik sıvı ekstraksionu* ise örneğin CO_2 gazının kullanıldığı yöntemlerdir (Turner ve diğ., 2009). Rutin analizlerde maliyeti yüksek ve özel cihazlar gerektirdiğinden daha az tercih edilmektedir (Holcomb ve diğ., 1996). *Katı faz ekstraksiyonu*, çalışma prensibi olarak kromatogramlara benzemektedir. Bir kolon gibi içi silika veya tutucu madde ile doldurulmuş, sabit faza sahiptir. Belirli şartlar altında kolona verilen toksin ve yabancı maddelerden oluşan karışım, kolonun özelliğine göre mikotoksin sabit faza tutunabilirken, yabancı maddelerde sabit faza tutunabilir. Böylece mikotoksin ayrılması, yani temizlenmesi işlemi gerçekleşmiş olur. Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan sistemlere; silika jeller, C-18 kolonları, fenil, aminopropil, iyon değişim kolonları (SCX, SAX) ve iyonik ve katyonik kolonlar (immino affinity kolonlar) örnek olarak verilebilir (Krska ve diğ., 2008; Turner ve diğ., 2009).

Ekstraksiyon metodunun ve toksinin safsızlardan temizlenmesi; gıda ve yem maddesinin doğal yapısından kaynaklanabilecek hataların önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. *Doğal yapı etkisi* (matrix effect), ilgilenilen mikotoksin dışında diğer madde ve bileşiklerin etki göstermesi sonucu oluşan ve analitik metodu etkileyen etki olarak tanımlanmaktadır. Bu etki analizlenen iyonların ektisini artırabileceği (enhance) gibi azalabilmektedir (suppress). Bunun sonucunda ise analiz metodunun tekrar edilebilirliği ve doğruluğu önemli derecede etkileneceği için, doğal yapı etkisinin ortadan kaldırılması ya da engellenmesi gerekmektedir (Sulyok ve diğ., 2006; Jessome ve Volmer, 2006; Cappielle ve diğ., 2008; Ediage ve diğ., 2011).

Mikotoksinlerin ayrılmasında ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), enzim immüno bağlama (ELİSA) sistemleri en çok kullanılan cihazlardır (Köppen ve diğ., 2010; Turner ve diğ., 2009). Son yıllarda geliştirilen floresans polarization immunoassay (FPI), surface plasmon resonance (SPR) ve Fourier transform mid-infrared spekroskopi (MIR-ATR) ile de mikotoksin analizleri yapılabilmektedir (Krska ve Molinelli, 2007). Fakat aynı anda

toksin analizi yapabilen, yüksek hassasiyet, kullanım kolaylığı ve yüksek doğruluk sağlayan LC-MS/MS en çok dikkat çeken cihazdır. Bu cihaz ile geliştirilen yöntemler sayesinde aflatoksin B_1, B_2, G_1, G_2 ve M_1, okratoksin A, patulin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisin B_1 ve B_2, HT-2 ve T-2 toksinlerini tek seferde analiz edebilmek mümkündür (Krska ve diğ., 2008).

Fakat ekstraksiyon yönteminde ki polarite farklılıkları, önceden tahmin edilemeyen bulaşma ve kimyasal dönüşümler nedeniyle mikotoksin analizlerinde gözden kaçan bir durum vardır. *Maskelenmiş mikotoksinler (masked mycotoxins)* olarak adlandırılan, genellikle kendisinde daha polar maddelere, glikoz, amino asitler ve sülfatlar gibi maddelere bağlı olarak bulunan mikotoksinlerdir. Maskelenmiş mikotoksinlerin fark edilişi 1980 yılında gözlenen mikotoksikoziz vakasının görüldüğü hayvanların yemlerinde yapılan analiz sonucunda çıkan düşük mikotoksin konsantrasyonudur. Bu sonuç ile birlikte semptomları gözlenen fakat yemlerde düşük çıkan konsantrasyonun sebebi incelenmiş ve mikotoksinlerin olası konjugasyonun sebep olabileceği düşünülmüştür (Berthiller ve diğ., 2005). Bu toksinler rutin analizlerde, mikotoksinler ve metabolitleri arasında ki polarite farkından dolayı analizlenememekte ve bu sebeple; masked (maskelenmiş, saklanmış, bağlı, konjuge) mikotoksinler olarak adlandırılmaktadırlar (Berthiller ve diğ., 2009).

Konjuge mikotoksinler küf kaynaklı, bitki kaynaklı, memeli kaynaklı ve gıda işleme kaynaklı olabilmektedirler. Küf kaynaklı bilinen masked mikotoksinlere, *Fusarium* bulaşmış hububat ürünlerinde rastlanan 3-asetil deoksinivalenol (3ADON) and 15-asetil deoksinivalenol (15ADON) (Vendl ve diğ., 2010) ve *Fusarium* metabolitlerinde tanımlanan zearalenone 4-sülfat (Z4S) (Plasencia, 1991) örnek olarak verilebilir. Bitkiler, karışlaştıkları mikotoksinleri kendi organel ve dokularında başka formlar dönüştürebilirler. Bitki kaynaklı konjuge mikotoksinlere DON'nun DON-3-glucopyranoside (D3G) ve (Sewald ve diğ., 1992; Berthiller ve diğ., 2005), ve ZON'nun ZON-4-glucopyranoside (Z4G) dönüştürülmesi (Vendl ve diğ., 2010) örnek olarak verilebilir. Gıda işleme sırasında oluşan masked mikotoksinler ise bira üretiminin farklı işlem basamaklarında incelenmiş ve D3G farklı oranlarda bulunmuştur (Lancova ve diğ.., 2008; Berthiller ve diğ., 2009; Kostelanska ve diğ., 2011).

3.SİKLOPİAZONİK ASİT VE ÖZELLİKLERİ

3.1 Siklopiazonik Asit Üreticisi Küfler

Siklopiazonik asit (CPA) ilk olarak 1968 yılında Holzapfel tarafından *Penicillium cyclopium* küfünün metaboliti olarak izole edilmiştir (Holzapfel, 1968). *Penicillium commune, P. griseofulvum, P.camemberti, P.crustosum, P.verrucosum* ve *Aspergillus flavus, A.oryzae, A.tamarii, A.versicolor* CPA üreticisi olan küflerdir (Bhatnagar ve Garcia, 2001; Scott, 2004; Barkai-Golan, 2008). Çizelge 3.1'de CPA üreticisi bazı küfler gösterilmektedir.

Çizelge 3. 1 : Siklopiazonik asit üreticisi bazı küfler.

Küf Türü	**Kaynak**
A. flavus	Luk ve diğ., 1977; Cole ve Cox, 1981; Hermansen ve diğ., 1984; Resnik ve diğ., 1996, Cvetnic ve Pepeljnjak, 1998; Vinokurova ve diğ., 2007
A.oryzae	Orth, 1977; Luk ve diğ., 1977; Hermansen ve diğ., 1984; Vinokurova ve diğ., 2007
A.tamarii	Dorner, 1983; Goto ve diğ., 1996, Horn ve diğ., 1996, Ito ve diğ., 1999, Dorner, 2002
A.versicolor	Luk ve diğ., 1977; Cole ve Cox, 1981; Dorner, 2002; Monaci ve diğ., 2002
A.fumigatus	Vinokurova ve diğ., 2007
A.phoenicis	Vinokurova ve diğ., 2007
P.commune	Hermansen ve diğ., 1984; Lund ve diğ., 1995; Pitt ve diğ., 1986; Larsen ve diğ., 2002; Monaci ve diğ., 2002
P.crustosum	Hermansen ve diğ., 1984; Monaci ve diğ., 2002
P.cyclopium westling	Cole ve Cox, 1981
P.patulum	Hermansen ve diğ., 1984
P.camemberti	Monaci ve diğ., 2002

Aspergiilus spp. hem aflatoksin üretimden hem de siklopiazonik asit üretiminden sorumlu olduğundan dolayı bu iki mikotoksin gıdalarda bir arada bulunabilmektedir (Resnik ve diğ., 1996; Oliveira ve diğ., 2008, Riba ve diğ., 2010). Mısır, fıstık ve pamuk çekirdeği, ve bunlardan elde edilen ürünlerde CPA ve aflatoksin birlikte görülmektedir (Lansden and Davidson 1983; Martins and Martins 1999; Vaamonde ve diğ., 2003). CPA'nin aflatoksin ile bulunmasının ilk bildirimi 1978 yılında Gallagher ve arkadaşları tarafından *A.flavus* kontaminasyonu bulunan mısır örneklerinden elde edilmiştir (Gallagher ve diğ., 1978). Bu sebeple 1960 yılında ortaya çıkan "Turkey X" hastalığının aflatoksine ek olarak siklopiazonik asitin de sebep olduğu düşünülmektedir (Frishvad ve diğ., 2006).

Vinokurova ve diğ., (2007) yaptığı çalışma; *A.flavus* izolatlarının % 61'nin, *A. oryzae* izolatlarının % 83'nün ve *A.tamarii* izolatlarının hepsinin CPA üreticisi olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada *A.fumigatus* ve *A.phoenicis* küflerinin de CPA üreticisi olduğu belirtilmiştir (Vinokurova ve diğ., 2007). Amerikanın farklı bölgelerinden alınan topraklardan izole edilen *A.flavus* suşlarında yapılan çalışmaya göre, L suşlarının CPA oluşturma miktarları S suşlarından daha fazla olduğu belirtilirken, aynı zamanda suşların %8'inin CPA üreticisi olduğu da belirtilmiştir (Horn ve Dorner, 1999). Başka bir çalışmada mısır örneklerinden izole edilen suşların % 61'i yalnızca CPA üretebilirken, *A.flavus* suşlarının % 35'i hem aflatoksin hem de CPA üretebilmektedir (Giorni ve diğ., 2007).

Penicillium ve *Aspergillus* suşlarının besiyerinde CPA üretme potansiyelleri üzerine yapılan çalışmada, *P.griseofulvum* ve *P.camemberti* izolatlarının, submerged yöntemi ile inkübelerinin sonucunda, en yüksek verimde CPA ürettiği tespit edilmiştir (Hermansen ver diğ., 1984).

Cezair'de buğday ve ürünlerinden izole edilen 150 izolatın 144 tanesinin *A.flavus* ve 6 tanesinin *A.tamarii* olduğu belirlenmiştir. Aflatoksin ve CPA üretimleri incelenen 150 izolatın % 6'sının hem aflatoksin hem CPA üretirken, sadece % 4'ü CPA ürettiği tespit edilmiştir (Riba ve diğ., 2010).

Astoreca ve arkadaşlarının 2011 yılında 35 tavuk yeminde yaptıkları araştırma sonucunda, yemlerde ki hakim küfün A. flavus olduğunu belirtmişlerdir. İzolatların

% 51'i hem aflatoksin B1 hem de CPA üretirken, % 29'unun sadece CPA ürettiği tespit edilmiştir. CPA ortalama üretim miktarları 5 ile 138 µg/kg arasında değiştiği belirlenmiştir (Astoreca ve diğ., 2011).

2006 yılında Hindistan'da yapılan çalışmada, yerfıstığından izole edilen 150 *A.flavus* izolatının 52 tanesinin aflatoksin ve CPA'yı birlikte üretirken, 32 tanesinin yalnızca CPA, 33 tanesinin yalnızca aflatoksin ve 33 tanesinin ise hiçbir toksin üretmediği belirtilmiştir (Pushvinder ve Desai, 2006). Arjantin'deki farklı tarımsal ürünlerde yapılan bir çalışmada ise; yerfıstığından izole edilen *A.flavus* izotlatlarının %94'ü, buğdaydan izole edilenlerin % 93'ü ve soya fasulyesinden izole edilenlerin ise % 73'ünün CPA üreticisi olduğu belirtilmiştir (Vaamonde ve diğ., 2003). 25-36 ppm düzeyinde CPA oluşturan *A.flavus* suşlarının kuru fasulyeden izole edildiği belirtilmiştir (Cvetnic, 1994). İncir tarlasından izole edilen *A.flavus* izolatlarının aflatoksin ile CPA üretirken, izole edilen *A.tamarii* suşlarının ise yalnızca CPA ürettiği belirtilmiştir (Doster ve diğ., 1996). Fakat bunun yanı sıra, şaraplık üzümlerden elde edilen *A.flavus* suşlarının ise sadece CPA ürettiği de belirtilmiştir (Barkai-Golan, 2008). Süt ürününden elde edilen *A.versicolor* suşunun 26-140 ppm aralığında CPA ürettiği belirtilmiştir (Monaci ve diğ., 2002).

A.flavus, A.parasiticus ve *A.nominous* suşlarının aflatoksin ve CPA üretimlerini YES besiyerinde inceleyen bir çalışmada, *A.flavus* suşlarının %50'nin aflatoksin ve CPA üretemez iken, suşların % 22.4'nün CPA ürettiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada diğer literatür sonuçları ile uyum gösteren, *A.parasiticus* ve *A.nominus* için CPA üretiminin olmadığı tekrar gösterilmiştir (Razzaghi-Abyaneh ve diğ., 2006).

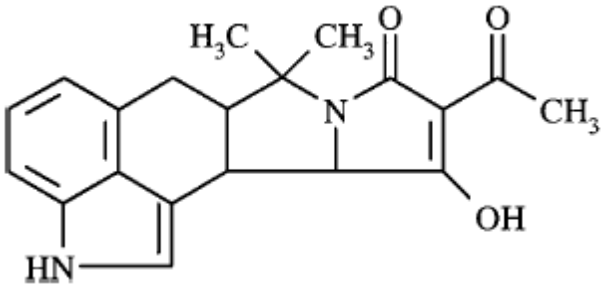
İlk olarak Goto ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile *A.tamarii* suşunun aflatoksin B1, B2 ile birlikte CPA ürettiği tespit edilmiştir (Goto ve diğ., 1996). 1992 yılında incir bahçelerinin topraklarınd izole edilen 12 tane *A.tamari* suşlarının hepsinde CPA üretimi görülmüştür. Aynı çalışmada 1992 ve 1993 yıllarında yapılan izolasyonlarda, L *A.flavus* izolatlarının sırası ile 22 izolatın 20'sinde ve 21 izolatın 15'inde CPA üretimi görülürken, S *A.flavus* izolatlarının sırası ile 8 de 8'inde ve 7'de 7'sinde CPA üretimi görülmüştür (Doster ve diğ., 1996).

Penicillium cyclopium tarafından en yüksek CPA üretiminin Czapek besi yerinde 25 ºC'de 7 gün çalkalamalı etüv kullanılarak elde edildiği belirtilmiştir (Holzapfel, 1970). Yapılan bir başka çalışmada ise *A.flavus*'un en yüksek CPA üretimi, CYA

besiyerinde 25 ºC'de yapılan inkübasyon sonucunda elde edilmiştir (Gqaleni ve diğ., 1997). Aflatoksin ve CPA üretimine, sıcaklık ve su aktivitesinin etkisinin belirlenmesi için yapılan yerfıstığından elde edilen besiyerinde ki çalışmada düşük su aktivitesi (0.87) ve değişen sıcaklar için CPA üretiminde azalma görülürken, yüksek su aktivitesinde (0.94) 20 ºC'de yüksek miktarda CPA üretimi elde edilmiştir (Vaamonde ve diğ., 2006).

3.2 Siklopiazonik Asitin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Siklopiazonik asit çok sık rastlanan Aspergillus ve Penicillium küfleri tarafından üretilen, toksik bir indol tetramik asit olan ikincil bir metabolittir (Holzapfel, 1970; Lomax ve diğ., 1984). Bir siklopiazonik asit molekülü; bir molekül triptofan aminoasiti, bir molekül mevalonik asit ve iki molekül asetik asitten meydana gelmektedir (Betina 1989; Burdock ve Flamm, 2000). CPA'nın kapalı formülü; $C_{10}H_{20}N_2O_3$ olup, molekül ağırlığı 336,15'dir (Burdock ve Flamm, 2000). CPA'nın kimyasal yapısı Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3. 2 : Siklopiazonik asitin kimyasal yapısı (Burdock ve Flamm, 200).

CPA renksiz ve kristal yapıda bir bileşiktir. Kloroform, methanol, asetonitril ve sodyum bikarbonatta kolaylıkla çözünebilen CPA floresans verme özelliğine sahip değildir ve 284 nm'deki maksimum UV absorpsiyonu spesifik değildir (Yu and Chu, 1998).

2010 yılında CPA'nin stabilitesi üzerine yapılan son çalışma göstermektedir ki; askorbik asit kullanımı CPA'nın sıcaklığa mahruz kalmasıyla oluşabilecek parçalanmayı engellemektedir. Aynı çalışmada CPA'nın bulunduğu tüpün hava boşluğunda kalan oksijenin de CPA'nın parçalanmasını teşvik ettiği bulunmuştur. Ortam havasında bırakılan CPA standartlarındaki CPA miktarılarında yüksek azalma görülürken, hava kabarcığından kaynaklanan miktar azalmaları daha az olmaktadır.

Oksijenden kaynaklanan CPA parçalanmasının önlenmesi için askorbik asit eklenmesi önerilmektedir. Sonuç olarak, hazırlanan CPA standartları +4 C'de birkaç gün bekletildikten sonra önemli derecede CPA konsantrasyonunda azalma olduğu belirtilmiştir. Yer alan diğer sonuçlara göre, CPA standartları cam tüplerde su ve organik çözgenlerle asit eklenmeden hazırlanmalı ve içerisinde hava olmayacak şekilde depolanmalıdır. CPA'nın düşük pKa (3,5) (Monaci ve diğ., 2002) değerinden dolayı oluşabilecek asit parçalanmalarının önlenmesi için en az bir birim büyük pKa değerinde asit kullanılması önerilmekte ve susuz amonyok kullanımı ile kolonda oluşan CPA birikimi önlenebilmektedir (Diaz ve diğ., 2010).

CPA'nın *Penicillium cyclopium* küfü tarafından üretimi üzerine yapılan çalışmalar göstermektedir ki; siklopiazonik asit ile birlikte β-siklopiazonik asit ve siklopiazonik asit imine olmak üzere iki bileşen daha üretilmektedir. β-siklopiazonik asit, CPA'nın öncü bileşiğidir, gelişmenin ilk günlerde yüksek miktarda iken, 5-7 gün arasında miktarı azalmakta ve buna karşılık CPA'nin miktarı artmaktadır. Siklopiazonik asit imine ise fermantasyonun ileriki basamaklarında şekillenmektedir (Holzapfel, 1968; Burdock ve Flamm, 2000).

3.3 Gıdalarda Siklopiazonik Asit Varlığı

CPA'nın ilk olarak 1978 yılında mısırda doğal olarak bulunduğu belirlenmiştir (Bryden ve diğ., 2004). Doğal olarak varlığı tespit edilen diğer ürünler ise; başta mısır olmak üzere (Urano ve diğ., 1992; Hayashi ve Yoshizawa, 2005), yer fıstığı (Lansden ve Davidson, 1983; Urano ve diğ., 1992; Fernandez-Pinto ve diğ., 2001), peynir (Le Bars, 1979; Zambonin ve diğ., 2001), darı (Rao ve Husain, 1985), mısır gevreği (Aresta ve diğ., 2003), domates ezmesi ve püresi (Da Motta ve Valente Soares, 2001), kuru incir (Heperkan ve diğ., 2012) ve ayçiçeği tohumu (Ross ve diğ., 1991) yer almaktadır. Çizelge 3.2'de siklopiazonik asitin gıdalarda doğal olarak varlığının araştırıldığı son yıllara ait çalışmalar listelenmiştir.

CPA, okratoksin A ve tenuazonik asit'in mısır gevreklerinde araştırıldığı bir çalışmada; örneklerin siklopiazonik asit ve tenuazonik asit ile sırası ile 72 ppb ve 25 ppb konsantrasyonlarında kontamine olduğu belirlenmiştir (Aresta ve diğ., 2003).

Peynirde yapılan CPA miktar tayini analizinde, CPA konsantrasyonun peynir örneklerinde 20 ile 80 ppb arasında olduğu tespit edilmiştir (Zambonin ve diğ.,

2001). *Penicillium camamberti*'nin peynir üretimde starter kültür olarak kullanılmasından kaynaklanan, peynirde CPA varlığı 2007 yılında araştırılmış ve CPA konsantrasyonun 5 mg/kg olduğu bulunmuştur (Duran ve diğ., 2007).

Çizelge 3. 2 : Gıdalarda siklopiazonik asit varlığı.

Ürün	**Pozitif Örnek Sayısı/ Toplam Örnek Sayısı**	**Miktar (ppb)**	**Kaynak**
Süt	2/48	6,4-9,7	Oliveira ve diğ.,2006
Süt	3/50	6,4-9,1	Oliveira ve diğ.,2008
Yer fıstığı	2/50	493-4300	Fernandez-Pinto ve diğ., 2001
Yer fıstığı	17/83	1-10	Mphande ve diğ., 2004
Yer fıstığı	8/30	260-600	Gonçalez ve diğ., 2008
Mısır gevreği	-	72	Aresta ve diğ., 2003
Peynir	6/6	20-80	Zambonin ve diğ., 2001
Domates ürünleri	8/44	36-178	Da Motta ve Valente Soares, 2001

2008 yılında Brazilya'da yapılan yerfıstığında ki mikotoksin üretiminin su aktivitesi ve sıcaklığa göre incelenmesini içeren çalışmada, en yüksek CPA miktarının (600 µg/kg) yerfıstığının tam olmuş safhasında, su aktivitesi ve sıcaklığının sırası ile 0,94 ve 27 °C'de olduğu zamanda üretildiği bildirilmiştir (Gonçalez ve diğ., 2008).

CPA'nin sütün işlenmesinde ve depolanması sırasında stabilitesini incelen bir araştırmada, 1 ppm düzeyinde CPA ile kontamine edilmiş süt toplama, sınıflandırma ve taşıma işlemlerini içeren 4 günün sonunda, CPA konsantrasyonu % 1,4 oranında azalmıştır. Aynı oranda kontamine edilen süt 4 ºC'de 21 gün süre ile bekletildiğinde ise % 5,8 oranında CPA kaybı gözlenmiştir. Sütün işlenmesi sırasında yapılan incelemelerin sonucunda; 100 ºC'de konsantre edilen sütün CPA miktarı % 39,7 azalırken; 60 ºC'de yapılan işlem sonucunda sadece % 0,7'lik bir azalma görülmüştür. Püskürtmeli kurutucu kullanılarak yapılan süt tozu işlemlerinde ise CPA azalması gözlenmemiştir (Prasongsidh ve diğ.,1998). Süte uygulunan ısıl işlem sonunda ki CPA miktar değişimlerini inceleyen bir çalışmada, 1 ppm düzeyinde CPA ile kontamine edilmiş süt 60, 80 ve 100 ºC'de 15-60 dakika arasında işleme bırakıldığında sırası ile % 3-9, % 14-18 ve % 25-30 oranında CPA kaybı tespit

edilmiştir. Aynı sıcaklıklarda 2 saat ısıtıldıktan sonra ise CPA kayıpları sırası ile % 9-17, % 20-34 ve % 49-50 oranları arasında olmaktadır. 120 ºC'de 30 dakika süre ile yapılan sütün otoklavlanması ya da konserve sütün ısıtılması işlemlerinde ise CPA kaybı % 33-36 oranında hesaplanmıştır (Prasongsidh ve diğ., 1997).

CPA'nın gıda işleme süresindeki stabilitesini izlemek için yapılan çalışmalarda; sütten dondurma üretimi Prasongsidh ve arkadaşları tarafından incelenmiştir (1999a). Süt 1 ppm düzeyinde CPA ile kontamine edilmiş ve dondurma üretim basamakları sonunda %12-14 oranında azalma olduğu ve depolamanın 4. Haftasında % 9 ve 9. Haftasında ise % 12 oranında azalma olduğu belirtilmiştir (Prasongsidh ve diğ., 1999a). Benzer bir başka çalışmada; 1 ppm düzeyinde kontamine edilen sütten yağ ve krema eldesi işlemleri sonunda; yağ üretime % 5 CPA geçerken kremada bu oranın % 50 ile 59 arasında olduğu bulunmuştur (Prasongsidh ve diğ., 1999b).

3.4 Siklopiazonik Asitin Sağlık Üzerine Etkileri

"Turkey X Disease", salgınından sonra yemlerde yapılan araştırma sonucunda, yemlerde *A.flavus* varlığı tespit edilmiştir. *A.flavus* hem aflatoksin hem de CPA üretme özelliğine sahiptir. Hastalığın genel sebebi olarak aflatoksin görülse de yapılan araştırma göstermiştir ki, salgın başlangıcında ki nörolojik semptomlar CPA ile açıklanabilmektedir. Bu sebep ile her iki toksinin de bu hastalığa sebep olduğu düşünülmektedir (Duran ve diğ., 2007).

"Kodo zehirlenmesi", sığır ve erkeklerde toksik etkiler gösteren, özellikle Hindistan'da yaygın olan bir hastalıktır. Hastalığın belirtileri; bulantı, kusma, çılgınlık, depresyon ve bilinç kaybıdır. Kabuğu ayrılmış tahıl, darı genellikle pirinç yerine kullanılmakta veya ekmek olarak tüketilmektedir. Kodo millet (darı) örneklerinden izole edilen küflerden elde edilen siklopiazonik asitin, koda zehirlenmesi ile olan ilişkisini inceleyen çalışmada; örneklerden izole edilen küflerin *A.flavus* ve *A.tamarii* olduğu tanımlanmıştır. Bu küflerden elde edilen CPA, düzenli olarak farelere uygulanmış ve sığır ve erkeklerde gözlenen aynı semptomlara kısa süre rastlanılmıştır. CPA ile koda zehirlenmesinin ilişkisinin ilk olarak kanıtlandığı bu çalışmada, *A.tamarii*'nin mikotoksikozis etkisi de bulunmuştur (Rao ve Husain, 1985). 2001 yılında Weidenbörner tarafından yapılan çalışmada da benzer semptomların CPA'dan kaynaklandığı bulunmuştur (Weidenbörner, 2001). Kuzey

Hindistanda darı örneklerinde yapılan çalışma göstermiştir ki, *A.tamarii* Kita yüksek oranda örneklerde yer almaktadır (Antony ve diğ., 2003).

CPA'nın toksisite özelliğinin, yapısında ki teramik asiti nedeniyle katyon metallerini (kalsiyum, magnezyum ve demir) şelatlamasıyla oluştuğu düşünülmektedir (Devegowda ve Murthy, 2005).

CPA'nın klinik semptomları kas dokusunda şekillenen titreme ve kasılmalardır. Hücre içine Ca^{+2} alımının inhibitörü olarak görev yapar ve sarkoplazmik ve endoplazmik retikulumda kalsiyuma ihtiyaç duyan ATPaz enzimini inhibe ederek, kalsiyum seviyesinin azalmasına ve kasılmalara neden olmaktadır (Burdock ve Flamm, 2000).

CPA bir nörotoksindir ve başlıca hedef organları; karaciğer, böbrekler ve sindirim sistemidir. Oluşan lezyonlar sindirim sistemi, karaciğer, böbrekler, dalak, pankreas, tükürük bezleri, kalp ve iskelet kaslarında şekillenmektedir (Devegowda ve Murthy, 2005). CPA kronik bir etkiye sahiptir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki; CPA insanlar üzerinde teratojenik etkiye sahip olabilir ve böbrek, dalak, kalp damar sistemi ve merkezi sinir sistemi üzerinde hasara sebep olabilir (Burdock ve Flamm, 2000).

İlk deneysel çalışma 1971 yılında farelerde oral ve interperitonal LD_{50} dozlarının belirlenmesi amacıyla yapılmış ve domuz, tavuk, tavşan, köpek ve maymun gibi birçok memeli üzerinde devam etmiştir (Purchase, 1971). 2001 yılında yapılan çalışmada, domuzun CPA'ya çok hassas olduğu belirlemiş ve gözlenen semptomların; kilo kaybı, ishal, kusma, dehidrasyon, depresyon, konvulziyon, optistotonus ve sonunda ölüm olduğu tespit edilmiştir (Bhatnagar ve Garcia, 2001).

CPA'nın sebep olduğu karaciğer hasarı ile aflatoksinin sebep olduğu karaciğer hasarı farklılık göstermektedir (Vinokurova ve diğ., 2007). CPA, aflatoksin kadar toksik ve kansorejen olmasa da, AFB_1 ile birlikte alınmasından dolayı önemlidir. Yapısı tümör oluşumunu tetikleyen thapsigargin'e benzediği için, kötü huylu tümör oluşumunu tetiklemekte ve AF ile bu etkinin arttığı bilinmektedir (Riley ve Petska, 2005).

CPA'nın toksik etkileri cinsiyet, tür ve doza bağlıdır. CPA'nın akut oral LD_{50} dozu erken sıçanlar için 36 mg/kg v.a. , dışı sıçanlar için ise 63 mg/kg v.a. olarak

belirlenmiştir. İnterperitonal LD_{50} dozu ise erkek sıçanlar için 2,3 mg/kg v.a.'dır. Tavuklar için oral LD_{50} dozu 12 mg/kg v.a. olarak belirlenmiştir (Desphande, 2002).

3.5 Siklopiazonik Asit ile İlgili Yasal Düzenleme ve Limitler

Ülkemizde ve dünyada CPA ile ilgili herhangi bir yasal düzenleme mevcut değildir.

Gıda Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Teşkilatının Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) domuzlarda herhangi bir toksik etkinin görülmediği (No Effect Level-NOEL) değerini 1 mg/kg/gün kabul ederek, günlük alınabilecek limiti (Acceptable Daily Intake- ADI) 10 µg/kg vücüt ağırlığı olarak belirlemiştir (Burdock ve Flamm, 2000). Fakat 2009 yılında köpekler üzerinde yapılan çalışmanın sonuçlarına göre; 0,5 ve 1 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde beslenen köpeklerin hiçbiri 90 gün süre ile yaşayamamıştır. Bu sonuçta daha düşük bir NOEL değerinin hesaplanması gerektiğini göstermektedir (Chang ve diğ., 2009).

3.6.Siklopiazonik Asit Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemler

Siklopiazonik asit için herhangi bir standart metot mevcut değildir. CPA'nın floresans verme özelliğinin olmaması ve maksimum absorpsiyonu verdiği 284 nm'nin özgün olmaması sebebiyle, CPA tayininde güçlükler yaşanmaktadır (Yu ve Chu, 1998).

CPA'nın tayininde kullanılan yöntemler; ince tabaka kromotografisi (TLC) (Lansden, 1986), kolorimetrik yöntemler (Rao ve Husain, 1987), ve spektrofotometrik (Chang-Yen ve Bidasee, 1990) yöntemler olarak sayılabilir. Oksalit asit silika jel tabaka ile yapılan TLC methodu, TLC metodlarının içinde en başarılı ve en çok kullanılanıdır (Lansden, 1986; Le Bars, 1979). Düşük konsantrasyonlarda yüksek doğruluktaki sonuçlar yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak elde edilmekte ve günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır (Scott, 1980; Matsuda ve Sasaki, 1995). HPLC metodları üç kısma ayrılır; ilki ters fazlı (RF) HPLC (Lansden, 1984), ikincisi mobil fazı amonyak içeren normal fazlı HPLC (Goto ve diğ., 1987) ve son olarak ise mobil fazı çinko (Zn) içeren ters fazlı HPLC (Urano ve diğ., 1992)'dir. Son yıllarda yüksek hassasiyette olan HPLC-UV/DAD (Zambonin ve ark., 2001) ve amino-bonded silika bazlı HPLC/UV (Monaci ve diğ., 2002) geliştirilmiştir. Bu yöntmelerin yanı sıra immoassay (ELISA) (Hahnau ve

Weiler, 1991; Yu ve Chu, 1998) ve kapilari elektorofroz (CE) (Prasonggsidh ve ark., 1997) yöntemi ile de CPA analizi yapılmaktadır. Eş zamanlı toksin analizleri içinde geliştirilen yöntemler mevcuttur. CPA ve aflatoksin eş zamanlı tayin analizi için gaz kromatografisi (GC) (Goto ve diğ., 1996) ve CPA ile tenuazonik asitin domateslerde ki tayini için HPLC-DAD (Diode array detection) (Da Motta ve Valente Soares, 2000) örnek verilebilir. Günümüzde hızla artan, tek seferde birçok mikotoksin analizi isteği, yüksek hassasiyet, kısa süre, işlem kolaylığı, doğruluk ve tekrar edilebilir özellikleri ile LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry), HPLC-MS/MS, UPLC-MS/MS (Ultraperformans liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry) metotlarının geliştirilmesi ile mümkün olmaktadır. Bu multi-analiz sistemlerinde toksin tanımla ve ayırma işlemi atmosferik basınç altında kimyasal iyonlaştırma (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI, electrospray ionization) ile tek seferde gerçekleştirilmektedir (Köppen ve diğ., 2010).

4.MATERYAL ME METOT

4.1 Küf İzolatları

Çalışmada materyal olarak 2 adet *Aspergillus* section *Flavi* üyesi küf suşu kullanılmıştır. Suşlardan birisi *A. Flavus* (6Z2*)* küf suşu iken diğeri *A. Tamarii* (59D4*)*'dir. Bu suşlar Ege Bölgesi'nde kurutma aşamasında toplanan kuru incir örneklerinden izole edilmiştir. İzolatlar çalışma süresince yatık Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerinde +4ºC'de saklanarak kullanılmıştır.

4.2 Küf İzolatlarının Maksimum Mikotoksin Oluşturma Potansiyelleri için Optimum Sıcaklarının Belirlenmesi

A.flavus ve *A. tamarii* suşlarının maksimum siklopiazonik asit (CPA) ürettiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla 20 ºC, 25 ºC, 30 ºC ve º35 ºC'de 7 gün süre ile Czapek Yeast Agar (CYA) besiyerinde inkübe edilmiştir. Suşların CPA oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır.

4.2.1 Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması

MEA yatık besiyerinde bekleyen saf kültürlerinden alınmış ve MEA yatık besiyerine pasajlama yapıldıktan sonra 25 ºC'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Daha önceden hazırlanmış steril 10 ml % 0,05 Tween 80 çözeltisi içeren tüplere inkübasyon sonunda ki tüplerden, steril bir öze yardımıyla agarı zedelemeden küf sporları aktarılmış ve tüpler tüp karıştırıcıda homojen hale getirilmiştir. Küf sporları Thoma lamı kullanılarak mikroskopun 40'lık objektifi altında sayılmıştır. Spor süspansiyoları 1-5x10^6 cfu/ml olacak şekilde hazırlanmış ve CYA besiyerine tek nokta ekimi olacak şekilde aseptik koşullar altında pipet kullanılarak ekilmiştir.

4.2.2 HPLC ile Siklopiazonik Asit Tayini

Besiyerinde CPA oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi için, CPA üretimini en iyi şekilde destekleyen Czapek Yeast Agar (CYA) besiyeri kullanılmıştır (Bragulat ve diğ., 2001). 55 mm çaplı petrilere 5 ml CYA besiyeri dökülerek hazırlanan

besiyerlerine 3.1'de anlatıldığı gibi spor süspansiyonu hazırlanarak, merkezi tek nokta olacak şekilde ekim yapılmış ve 5 ºC, 10 ºC, 15 ºC, 20 ºC, 25 ºC, 30 ºC, º35, 40ºC ve 45ºC'de 7 gün süre ile Czapek Yeast Agar (CYA) besiyerinde inkübe edilmiştir.

4.2.2.1 Siklopiazonik Asit Standartlarının Hazırlanması

Metanol ilave edilerek hazırlanmış CPA stok çözeltisinin konsantrasyonu spektrofotometre kullanılarak tespit edilmiştir. CPA'nın metanol içerisinde çözünmüş, 282 nm' de ki ε değeri 20417 kabul edilmiştir (Trucksess and Pohland, 2000). Stok çözeltisinin 285 nm'de Absorbansı (A) 0,925 ölçülmüştür (Chitachi U-0080D UV spectrophotometer, scan; 190-1100 nm). Çözeltinin konsantrasyonu µg CPA/ml= (Axmolekül ağırlığı(CPA)x1000)/ε formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denkleme göre stok çözeltinin konsantrasyonu 15,2 µg/ml hesaplanmıştır. CPA stok çözeltisi karanlıkta ve -18ºC'de muhafaza edilmiştir.

2. aşama standart çözeltilerinin hazırlanması için; enjeksiyon çözgeni olan asetonitril:0,05 M amonyum asetat tampon çözeltisi (80:20, HA) kullanılarak 10 µg/ml'lik CPA stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılarak 7 farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon çözeltilerinin içerdikleri CPA miktarları Çizelge 4.1'de görülmektedir. Hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonları 3 paralel olarak yapılmıştır. Lineer regrasyon y=ax+b kullanılarak kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2) 0,99815 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 1 : CPA kalibrasyon çözeltileri ve içerdikleri toksin miktarları.

Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonu(µg/ml)	Çalışma standartından alınan miktar (µl)	Enjeksiyon çözgeni miktarı (µl)
50	5	995
100	10	990
200	20	980
500	50	950
750	75	925
1000	100	900
5000	500	500

4.2.2.2 Geri Kazanım oranlarının belirlenmesi

CPA'nın besiyerinde gerikazanım oranlarının belirlenmesi amacıyla 2 farklı konsantrasyonda hazırlanan toksin çözeltileri besiyerlerine ilave edilmiş ve 25ºC'de bir gün süre ile karanlıkta bekletildikten sonra analize alınmıştır (Bragulat ve diğ., 2001). Örnekte 50 ng/ml ve 500 ng/ml konsantrasyon düzeyinde CPA olucak şekilde standart ilave edilmiştir.

4.2.2.3 Siklopiazonik asit Ekstraksiyonu

Siklopiazonik asit ekstaksiyonunda kullanılan yöntem, son yıllarda küf izolatlarının besiyerlerinden elde edilen toksinler için kullanılan en yaygın metodudur. Bu yöntemde Bragulat ve diğ. (2001) yılında okratoksin üzerine yaptıkları çalışma esas alınarak metanol ile ekstraksiyon yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemde; steril cam bir pastör pipeti yardımıyla 6 mm'lik merkezi 3 disk kesilmiştir. Daha önce darası alınmış cam tüplerin içerisine 3 disk eklenmiş ve tekrar tartım işlemi gerçekleştirilmiştir. Cam tüplere 1 ml HPLC kalitesinde metanol ilave edilerek 1 saat süre ile 300 rpm devrinde mekanik çalkalayıcıda karıştırılmış ve ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesi beklenmiştir. Daha sonra filtreli santrifüj tüplerine (milipore ultrafree-mc) alınan örnekler 5000g devrinde 4 dakika süreyle santrifüz (Eppendorf Centrifuge 5804R, Almanya) edilmiştir. Cam tüplere alınan örneklerin aynı gün içerisinde HPLC enjeksiyonları yapılmıştır. Örneklerde seyreltme yapılması gerekliği olduğunda enjeksiyon çözgeni ile seyreltme yapılmıştır.

4.2.2.4 Siklopiazonik asit analizi HPLC Koşulları

Siklopiazonik asit analizlerinde kullanılan Agilent 1260 serisi HPLC cihazının özellikleri ve koşulları şöyledir. Analiz mobil fazı olarak asetonitril: amonyum asetat buffer (0,05, pH:5) (80:20, HA); DAD dedektör (282 ±2 nm), Lichrossorb-NH_2 250 mmx4,6 mm, 5 µm partikül çaplı kolon (Supelcosil) kullanılarak 1 ml/dak akış hızı ile 25 ºC'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum asetat buffer'ın pH'sı asetik asit veya amonyak kullanılarak ayarlanmıştır. Örnek enjeksiyon hacmi 20 µl'dir. Kolonda alıkonma süresi yaklaşık 7 dakikadır. Veriler Chemstation 3D yazılım programınayla değerlendirilmiştir. Miktar hesabı ise denklem 4.1'de verildiği gibi hesaplanmıştır.

$$\mu g\ CPA/ml = (XxTv)/(1000xM) \qquad \textbf{(4.1)}$$

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

Tv: Ekstraktın çözüldüğü çözgen miktarı (ml)

M: Ektrakt ağırlığı (gr)

4.3 Küf İzolatlarının Besiyerinde Siklopiazonik Asit Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi ve Farklı Sıcaklık Derecelerinde Bekletmenin CPA oluşumuna Etkisinin incelenmesi

Aspergillus flavus ve *Aspergillus tamarii* suşlarının siklopiazonik asit (CPA) oluşturma potansiyelinin en yüksek olduğu optimum sıcaklık derecelerinin bulunmasıyla farklı sıcaklık derecelerinde ki CPA oluşturma potansiyellerinin ve zamanın etkisinin belirlenmesi amacıyla aşağıda ki çalışma gerçekleştirilmiştir.

- *A.favus* ve *A.tamarii* suşları 3 paralelli olmak üzere CYA besi yerinde 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 Cº'de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir.
- *A.favus* ve *A.tamarii* suşları 3 paralelli olmak üzere CYA besiyerinde 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 Cº'de 2 saat süre ile bekletildikten sonra 30 Cº'de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir.
- Gelişme görülen bütün petrilerin CPA analizi gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 Küf İzolatlarında Siklopiazonik Asit Tayini

Gelişme gözlenen bütün petrilerin CPA tayini 1.2.2'de anlatıldığı gibi HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4 İstatistiksel Analiz

Küf izolatlarının siklopiazonik asit oluşturma özellikleri tek yollu varyans analizi (ANOVA) testi ile incelenmiştir. İstatistiksel analizler Minitab programı (Versiyon 15) kullanılarak yapılmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1 *Aspergiilus flavus* ve *Aspergillus tamarii* izolatlarının Maksimum Mikotoksin Oluşturma Potansiyelleri için Optimum Sıcaklarının Belirlenmesi

Aspergillus flavus ve *A. tamarii* izolatların maksimum sikolapiazonik oluşturduğu optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla CYA besiyerinde 20 ºC, 25 ºC, 30 ºC ve 35 ºC'de 7 gün süre ile inkübe edilmiş, sonra ekstraksiyon ve takiben HPLC-DAD ile CPA miktarları belirlenmiştir. Çizelge 5.1'de *A.flavus* ve Çizelge 5.2' de A.*tamarii'*nin farklı sıcaklıklarda oluşturdukları CPA miktarları ve istatistiksel açıdan farklılıklar verilmiştir.

Çizelge 5. 1 : Farklı sıcaklık değerlerinde *A.flavus'*un ürettiği CPA miktarları ve istatistiksel farklılık.

Sıcaklık	**15 °C**	**20 °C**	**25 °C**	**30 °C**	**35 °C**	**40 °C**
CPA (µg/ml)	43,63	89,77	90,26	136,44	51,26	62,5
α=0,05 önem derecesinde farklılık	A	AB	AB	B	A	A

Aspergillus flavus 'un CPA üretiminin maksimum olduğu sıcaklık derecesi 30 ºC dir, 5, 10 ve 45 Cº'de gelişme gözlenmemiştir. Gelişme gözlenmediği için toksin üretimi olmamıştır.

Çizelge 5. 2 : Farklı sıcaklık değerlerinde *A.tamarii'nin* ürettiği CPA miktarları ve istatistiksel farklılık.

Sıcaklık	**15 °C**	**20 °C**	**25 °C**	**30 °C**	**35 °C**	**40 °C**
CPA (µg/ml)	3,46	3,89	5,62	9,29	4,82	6,28
α=0,05 önem derecesinde farklılık	A	AC	BC	D	ACE	BE

*Aspergillus tamarii'*nin de CPA üretiminin maksimum olduğu sıcaklık derecesi 30 ºC dir. *A.flavus*'a benzer şekilde 5, 10 ve 45 Cº'de gelişme gözlenmemiş ve CPA üretimi olmamıştır.

Her iki suş içinde CPA üretiminin maksimum olduğu sıcaklık derecesi 30 ºC olduğundan farklı sıcaklıklarda bekletmenin CPA oluşumuna etkisinin incelendiği çalışmanın ikinci kısmına bu sıcaklık derecesi ile devam edilmiştir.

Sancez-Hervas ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmada, kakao örneklerinden izole edilen 120 adet *A.flavus* suşunun 25 ºC'de, CY (Czapeck Agar) besiyerinde 14 gün sonunda ki CPA üretimleri 33,3 ile 240,7 µg/g arasında değişirken, 94 adet *A.tamarii* suşunun aynı koşullarda ki CPA üretimleri ise 28,62 ile 253,3 arasında değişmektedir. 25 ºC'de ki (7 gün inkübasyon) sonuçlar karşılaştırıldığında *A.flavus* için bulunan sonuç yapılan çalışma ile uyum göstermektedir. Buna karşılık *A.tamarii* tarafından üretilen CPA miktarının diğer çalışmaya göre oldukça düşük miktarlarda olduğu belirlenmiştir. Küflerin farklı sıcaklıklarda inkübasyonu sonunda elde edilen görüntüleri Şekil 5.1'de yer almaktadır.

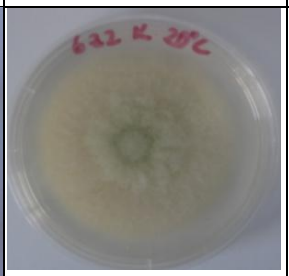
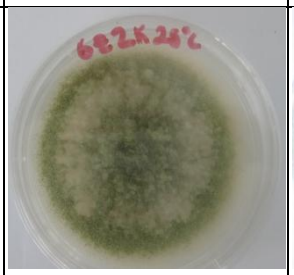
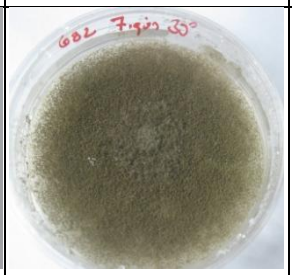
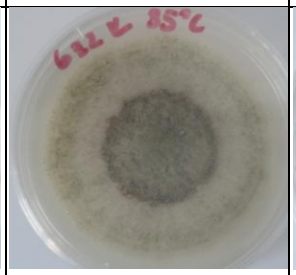
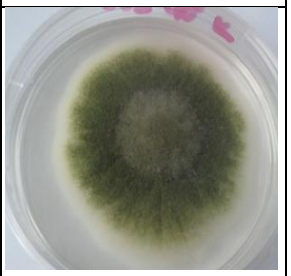
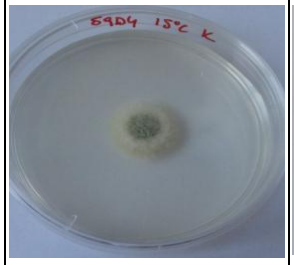
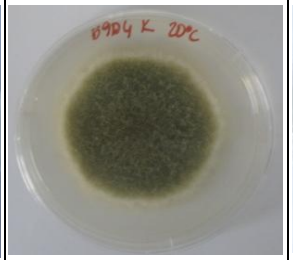
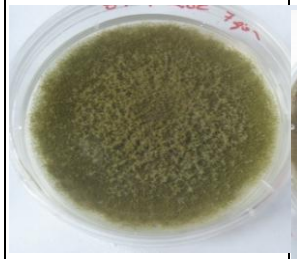
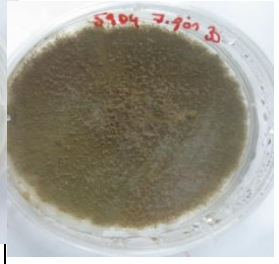
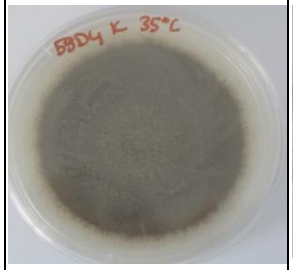
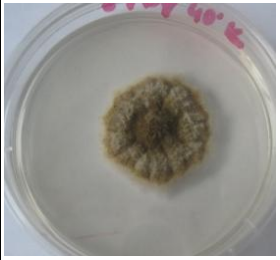
Çizelge 5.1 ve 5.2'den görüldüğü gibi suşların en iyi geliştiği sıcaklık 30 °C'dir. İstatistiksel açıdan farklılığın belirlenmesi amacıyla tek yollu annova testi uygulanmış ve HPLC-DAD tarafından belirlenen CPA miktaları karşılaştırılmıştır. 30 °C'de *A.flavus* tarafından üretilen CPA miktarı 15, 35 ve 40 °C'de üretilen CPA miktarından α=0,05 önem düzeyinde farklılık göstermektedir. 20 ile 25 °C arasında α=0,05 önem düzeyinde önemli bir farklılık gözlenmez iken 30 °C ile benzerlik göstermektedir. Resnik ve diğ. yaptığı *A.flavus* suşunun sıvı ve mısır besi yerindeki 7 gün 28 °C'de inkübasyon sonuçları incelendiğinde CPA üretimi sırası ile 3,1-62,5 µg/ml ve 0,83-10 µg/ml arasında olduğu bulunmuştur (Resnik ve diğ., 1996). Bu sonuç ile yukarıda ki sonuçlar karşılaştırıldığında, sonuçlarımız tutarlı fakat CPA miktarı daha yüksektir. Bu farklılığın sebebi, çalışmalarda kullanılan besi yerlerin farklı olmasından ileri gelebilir. Kuzey İtalya'da mısırdan izole edilmiş *Aspergillus* section *Flavi* izolatları ile yapılan çalışimada, izolatlar 30 °C'de CYA'da 14 gün süre ile inkübe edilmiştir. Suşların % 61 'i CPA üretebilirken, bunların % 20'si 2000 ng/g'ın üstünde CPA üretebilmiştir (Giorni ve diğ., 2007). Bu sonuç, çalışma ile uyum göstermektedir. Fakat, Gqaleni ve arkadaşlarının yaptığı *A.flavus* suşunun sıcaklık, süre, su aktivitesi ve besi yerinin değişimine bağlı olarak ürettiği CPA miktarının incelenmesi çalışmasında, optimum CPA üretimi 25 °C'de CYA besi yerinde, su aktivitesi 0,996 (gliserol eklenmemiş) olduğunda ve 15 gün sonunda elde edilmiştir. Bu çalışma CPA üretimin farklı koşullarda incelenmesini içeren ilk çalışmadır ve sadece *A.flavus* üzerinde çalışılmıştır. Sonuçların birbiri arasında istatistiksel bakımından kıyaslaması olmadığı gibi, maksimum CPA miktarı için 6,25

µg/ml olarak belirtilmiştir (Gqaleni ve diğ., 1997). Bu sonuç kıyaslandığında, çalışmamızda kullanılan *A.flavus* suşunun daha fazla CPA üretme kapasitesinin olduğu görülmüş ve ileri gelen farklılığın önemli olup olmadığının anlaşılması için, daha çok veriye ihtiyaç olduğuna karar verilmiştir.

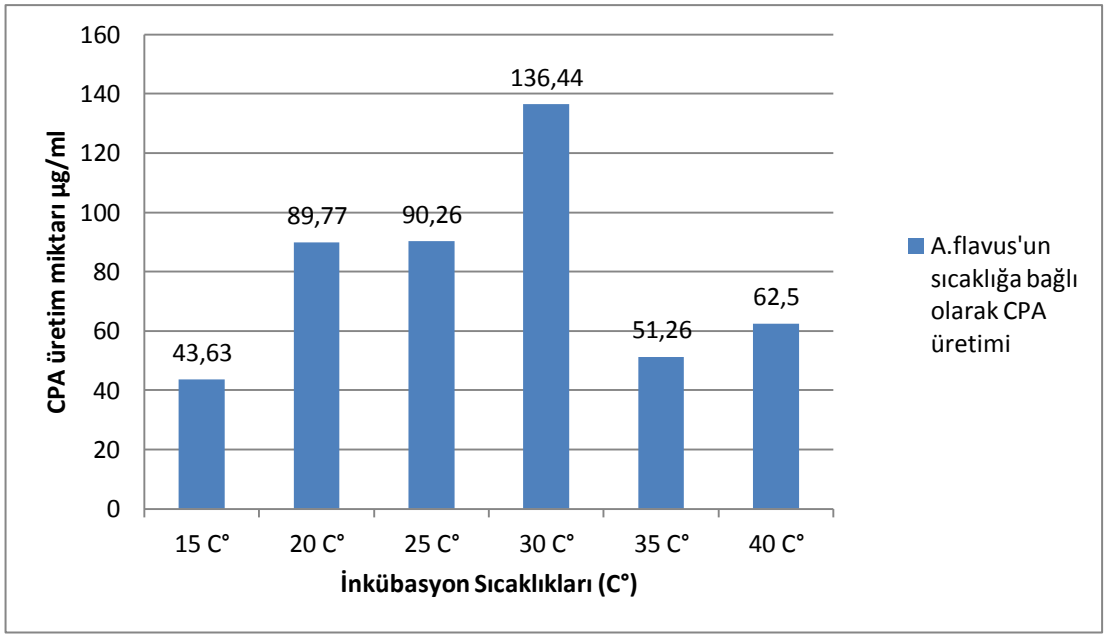
Çizelge 5.2'den çıkan sonuçlar göstermektedir ki α=0,05 önem düzeyinde 30 °C'de üretilen CPA miktarı *A.tamarii* için diğer tüm sıcaklık derecelerinden farklılık göstermektedir. 15 ve 20 °C önem düzeyi içersinde benzerlik gösterirken, 35 ve 40 °C'de CPA üretimleri bakımından benzerlik göstermeketdir. Aynı zamanda 20, 25 ve 35 °C kendi içinde farksız iken 30 °C'den α=0,05 önem düzeyinde farklılık göstermektedir. CPA tayinin basit yöntemini araştırmak için yapılan bir çalışmada, *A.tamarii* suşu sıvı ve buğday ile desteklenmiş katı besi yerinde 30 °C'de inkübe edilmiştir. Sonuçlar sıvı besi yerinde 40,9 µg/g iken buğday ile desteklenmiş katı besiyerinde ise 6,3 µg/g olarak bulunmuştur (Matsudo ve Sasaki, 1995) . Bu sonuçlar ile kendi çalışmamız karşılaştırıldığında katı besi yerinde ki sonuçlarımız uyum içerisindedir.

A.flavus tarafından üretilen CPA'nın sıcaklığa bağlı olarak nasıl değiştiğinin anlaşılması amacıyla Şekil 5.2'de ki grafik ve *A.tamarii* için ise Şekil 5.3'de ki grafik oluşturulmuştur. Sıcaklığa bağlı CPA üretim grafiğinde (Şekil 5.2) artan sıcaklığa bağlı olarak toksin miktarında artış gözlenmektedir. Bu artış 30 °C'ye kadar devam etmekte; sonrasında ise CPA miktarında azalma başlamaktadır. İstatistiksel olarak elde edilen verilerde Çizelge 5.2'de olduğu gibi, 15 °C ve 40 °C arasında fark bulunamamıştır.

Literatür incelemesi sıcaklık, süre, su aktivitesinin küf gelişimi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur (Asteroca ve diğ., 2012). Fakat *A. flavus* ve *A.tamarii* suşlarının değişen sıcaklık derecelerinde ürettikleri CPA miktarlarının incelenmesi içeren çalışmalara ratslanmamıştır. Bu sebep ile çalışmanın bu kısmı, CPA üretim miktarlarının sıcaklığa göre dağılımını gösteren ilk çalışma olması açısından literatüre katkı sağlamaktadır.

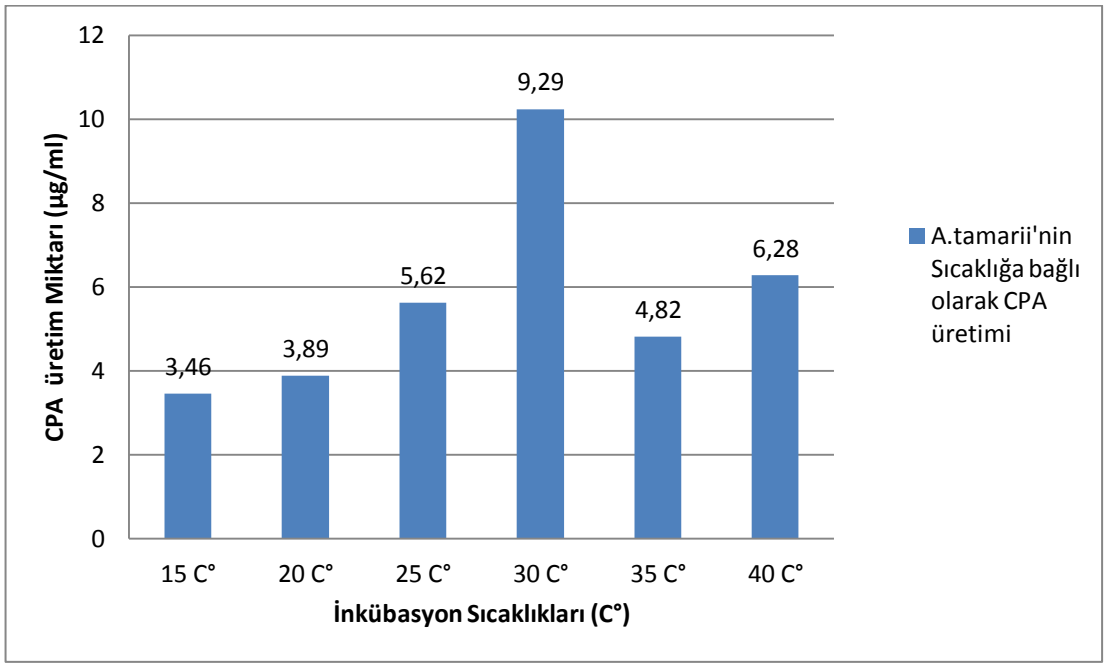
Sıcaklık / Küf	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
Aspergillus flavus						
Aspergillus tamarii						

Şekil 5.1 : Farklı sıcaklık derecelerinde 7 gün süre ile inkübe edilen *A.flavus* ve *A.tamarii* suşları.



Şekil 5. 1 : *A.flavus*'un sıcaklığa bağlı CPA üretim miktarları değişim grafiği.

Şekil 5.3'teki sıcaklığa bağlı CPA üretim grafiğinde artan sıcaklığa bağlı olarak toksin miktarında artış gözlenmektedir. Bu artış, *A.flavus*'ta olduğu gibi 30 °C'ye kadar devam etmekte; sonrasında ise CPA miktarında azalma başlamaktadır.



Şekil 5. 2 : *A.tamarii*'nin sıcaklığa bağlı CPA üretim miktarları değişim grafiği.

Yapılan çalışmalar sonucunda *A.favus* ve *A.tamarii* için en uygun gelişim sıcaklığının 30 °C olduğu bulunmuştur.

5.2 *A.flavus* ve *A.tamarii* Suşlarının Optimum Sıcaklıkta 7 Gün Süre ile Siklopiazonik Asit Oluşturma Potansiyelinin İncelenmesi

İki suş için 30 °C'nin optimum sıcaklık olarak belirlenmesinden sonra, bu sıcaklıkta farklı günlerde sonlandırılan inkübasyonda ki CPA üretim miktarları incelenmiştir. Her iki suş 30 °C'de 1, 3, 5 ve 7 gün süre ile inkübe edilmiş, ektraksiyon yönteminden sonra HPLC-DAD ile miktar tayini yapılmıştır. Çizelge 5.3'te *A.flavus* ve Çizelge 5.4'te *A.tamarii* için CPA üretim miktarları ve tek yollu annova testinin sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 5. 3 : *A.flavus* suşunun 30 °C'de 1,3,5 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları.

Günler (30 °C	**1. Gün**	**3. Gün**	**5. Gün**	**7. Gün**
CPA (µg/ml)	1,83	30,56	66,95	133,01
α=0,05 önem derecesinde farklılık	A	AB	B	C

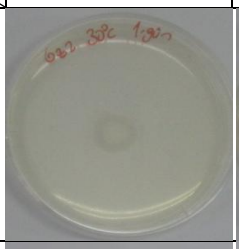
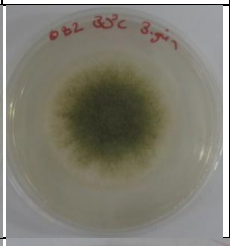
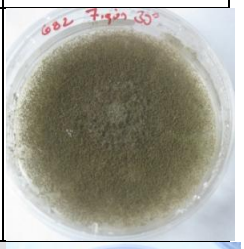
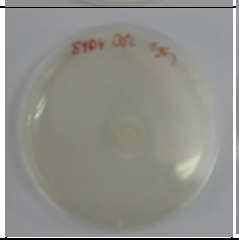
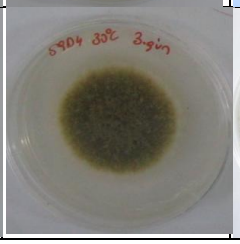
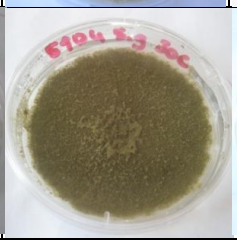
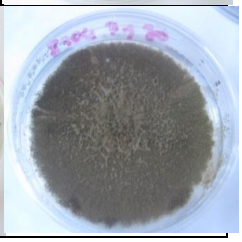
A.flavus suşu ilk günden itibaren CPA üretmektedir. Toksin miktarında düzenli artış görülmekte ve en yüksek değerine 7. gün sonunda ulaşmaktadır. α=0,05 önem derecesinde CPA üretim miktarları değerlendirildiğinde; 1 ve 3. gün kendi içinde benzerlik gösterirken, 3 ve 5. günler de benzerlik göstermektedir. Fakat 7. gün de üretilen CPA miktarı diğer günlerde üretilen CPA miktarından α=0,05 önem derecesinde farklılık göstermektedir.

Çizelge 5. 4 : *A.tamarii* suşunun 30 °C'de 1,3,5 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları.

Günler (30 °C)	**1. Gün**	**3. Gün**	**5. Gün**	**7. Gün**
CPA (µg/ml)	0,82	3,07	4,09	9,29
α=0,05 önem derecesinde farklılık	A	B	B	C

A.tamarii'nin 30 °C sıcaklıkla farklı günlerde ki CPA üretimi incelendiğinde, ilk günden itibaren CPA üretiminin başladığı belirlenmiştir. *A.flavus*'ta olduğu gibi inkübasyon süresi artıkça CPA üretimi artmış ve en yüksek toksin üretimi 7. gün sonunda gözlenmiştir. Tek yollu annova kullanılarak yapılan ve aralarındaki farklılığı ortaya koyan bu testin sonucuna göre; α=0,05 önem derecesinde 7. günde üretilen CPA miktarı diğer günlerde üretilen CPA miktarından farklıdır. Aynı önem

derecesinde 3 ve 5. gün arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Her iki küfünde gelişimlerini gösteren petri görüntüleri Şekil 5.4'te yer almaktadır.

Günler / Küfler	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Aspergillus flavus				
Aspergillus tamarii				

Şekil 5. 3 : *A.flavus* ve *A.tamarii'*nin 30 °C'de 7 günlük gelişmelerine ait petri görüntüleri.

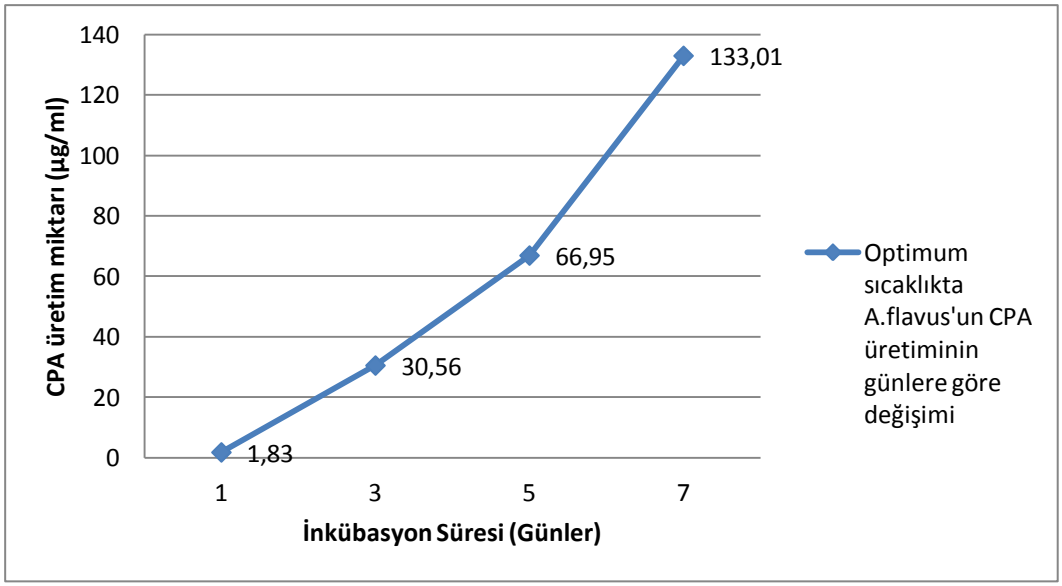
Her iki küf içinde 5. gün ve sonrasında petrinin tamamen küf ile kaplı olduğu görülmektedir. Görsel olarak 5 ve 7. günde petrilerde fark olmamasına rağmen miktar analizlerine uygulanan istatistik sonucunda % 95 güven aralığında 5 ve 7.günlerde üretilen CPA miktarlarının farklı olduğu bulunmuştur.

Optimum sıcaklıkta inkübe edilen suşların, günlere bağlı olarak değişen CPA üretim miktarlarını gösteren grafik *A.flavus* için Şekil 5.5'te *A.tamarii* için ise Şekil 5.6'da yer almaktadır.

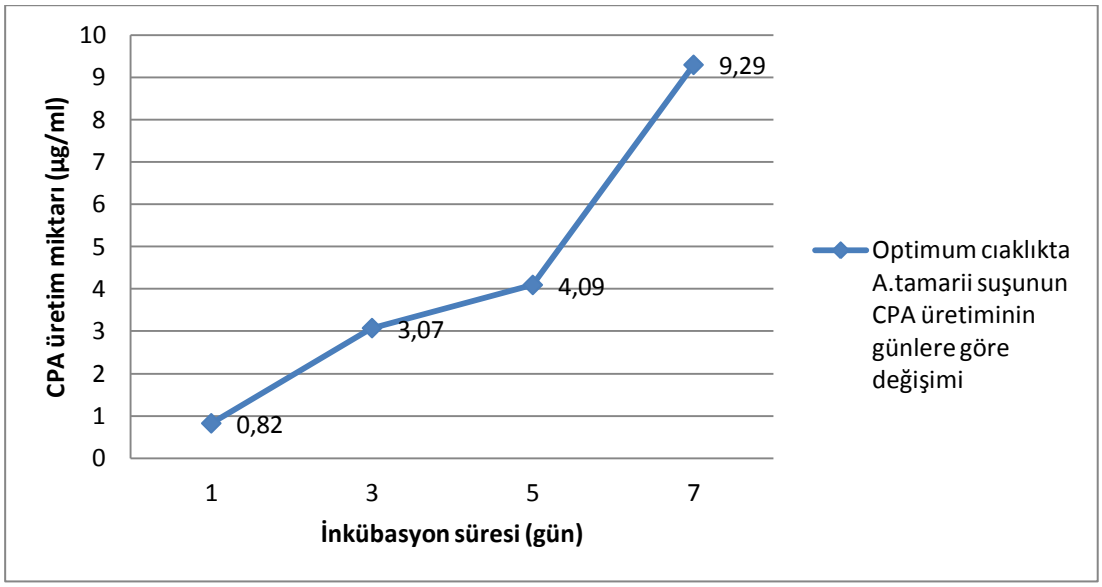
Literatürde bu sonuçlara karşılaştırma olabilecek bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

5.3 *A.flavus* ve *A.tamarii* Suşlarının 25 °C Sıcaklıkta 1, 3 ve 7 Gün Süre ile Siklopiazonik Asit Oluşturma Potansiyelinin İncelenmesi

25 °C'de, CPA üretiminin günlere göre olan değişimini incelemek amacıyla, 1, 3 ve 7.günde ki CPA üretim miktarları; her iki suş için de hesaplanmıştır. Her iki suş 25 °C'de 1, 3 ve 7 gün süre ile inkübe edilmiş, ektraksiyon yönteminden sonra HPLC-DAD ile miktar tayini yapılmıştır. Çizelge 5.5' de *A.flavus* ve Çizelge 5.6'da *A.tamarii* için CPA üretim miktarları ve tek yollu annova testinin sonuçları yer almaktadır.



Şekil 5. 4 : 30 °C sıcaklıkta *A.flavus* suşunun günlere göre CPA üretim miktarının grafiği.



Şekil 5. 5 : 30 °C sıcaklıkta *A.tamarii* suşunun günlere göre CPA üretim miktarının grafiği.

Çizelge 5. 5 : *A.flavus* suşunun 25 °C'de 1,3 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları.

Günler (25 °C)	**1. Gün**	**3. Gün**	**7. Gün**
CPA (µg/ml)	2,131	53,443	76,432
α=0,05 önem derecesinde farklılık	A	B	B

A.flavus suşu ilk günden itibaren CPA üretmektedir (Çizelge 5.5). Toksin miktarında düzenli artış görülmekte ve en yüksek değerine 7.gün sonunda ulaşmaktadır. α=0,05

önem derecesinde CPA üretim miktarları değerlendirildiğinde; 3 ve 7. günde istatistiksel olarak farklılık gözlenmez iken; 1. günde üretilen CPA miktarı 3 ve 7. günde üretilen CPA miktarından farklıdır.

A.tamarii'nin 25 °C sıcaklıkta farklı günlerde ki CPA üretiminin gösterildiği Çizelge 5.6 incelendiğinde, ilk günden itibaren CPA üretiminin başladığı belirlenmiştir. *A.flavus*'ta olduğu gibi inkübasyon süresi artıkça CPA üretimi artmış ve en yüksek toksin üretimi 7. gün sonunda gözlenmiştir. Tek yollu annova kullanılarak yapılan ve aralarındaki farklılığı ortaya koyan bu testin sonucuna göre; α=0,05 önem derecesinde 7. günde üretilen CPA miktarı, *A.flavus* suşunun ürettiğinin aksine, diğer günlerde üretilen CPA miktarından farklıdır. Aynı önem derecesinde 1 ve 3. gün arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Genel olarak *A.tamarii* suşunun 25 °C'de ki CPA üretim miktarı % 95 güven derecesinde incelendiğinde, 1 ve 3. gün kendi içinde farklılık göstermez iken 7. günde üretilen CPA miktarı diğerlerinden farklılık göstermiştir.

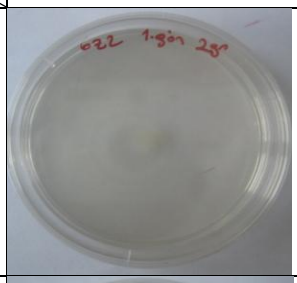
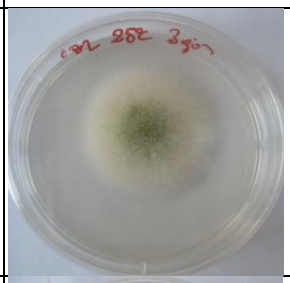
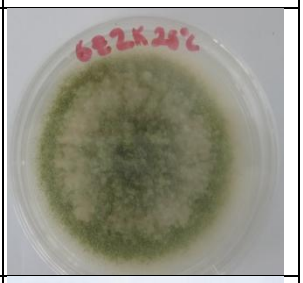
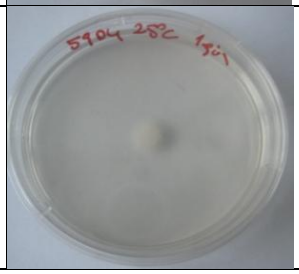
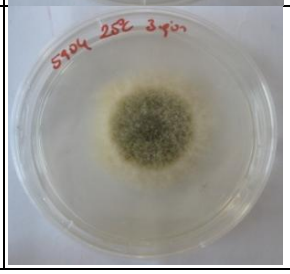
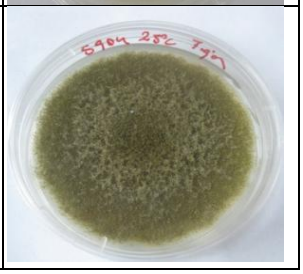
Çizelge 5. 6 : *A.tamarii* suşunun 25 °C'de 1,3 ve 7. gün inkübasyonu sonucunda üretilen CPA miktarı ve tek yollu annova testinin sonuçları.

Günler (25 °C)	**1. Gün**	**3. Gün**	**7. Gün**
CPA (µg/ml)	0,28	1,09	5,9
α=0,05 önem derecesinde farklılık	A	A	B

Her iki küfün 25 °C'de ki gelişimlerini gösteren petri görüntüleri Şekil 5.7'te yer almaktadır.

Şekil 5.7'de yer alan petri görüntülerinde, her iki küf içinde 1. gün de dahil olmak üzere küf gelişiminin gözlendiği görülmektedir. Görsel olarak *A.flavus* petrilerinin 3 ve 7. gün resimleri farklı olmasına rağmen % 95 güven aralığında CPA üretim miktarları benzer çıkmıştır. *A.tamarii* suşunda ise 1 ve 3. gün görsel olarak benzemez iken istatistiksel olarak benzer çıkmıştır. Her iki suş için de gelişimin ve CPA üretimin en fazla olduğu gün 7. gün olarak belirlenmiştir.

25 °C sıcaklıkta inkübe edilen suşların, günlere bağlı olarak değişen CPA üretim miktarlarını gösteren grafik *A.flavus* için Şekil 5.8'te *A.tamarii* için ise Şekil 5.9'da yer almaktadır.

Günler / Küfler	1. Gün	3. Gün	7. Gün
Aspergillus flavus			
Aspergillus tamarii			

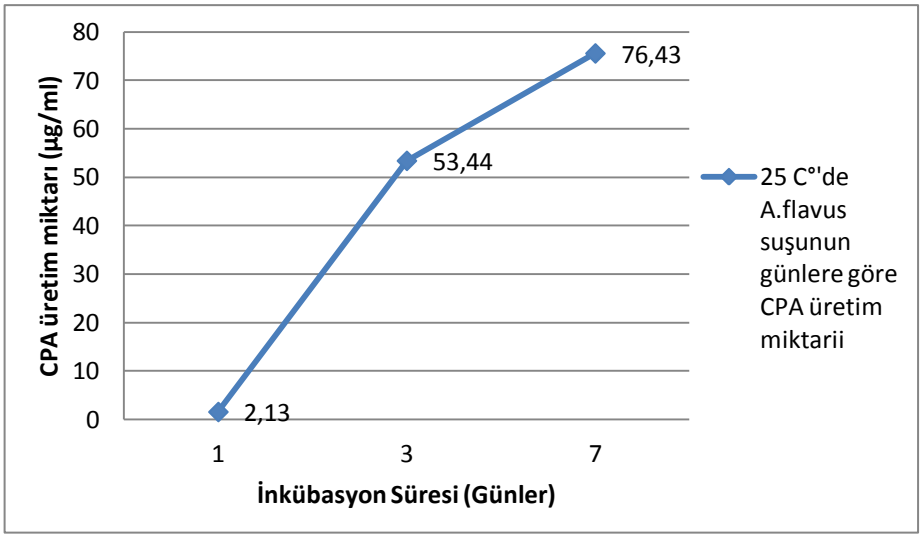
Şekil 5. 6 : *A.flavus* ve *A.tamarii*'nin 25 °C'de farklı günlerde ki petri görüntüleri.

Şekil 5.8 ve 5.9'da gösterildiği gibi her iki suş için inkübasyon süresi artıkça CPA üretim miktarı da artmıştır. En yüksek CPA üretimi 7. gün sonunda hesaplanmıştır. *A.tamarii* suşu için 3.günden sonra hızlı bir yükseliş ile CPA üretim miktarında artış gözlenmiştir. Bu artış yaklaşık olarak 5 katı kadardır. *A.flavus* suşunda ki 7. güne artış ise 3.günde üretilen CPA miktarının yaklaşık olarak 2 katıdır.

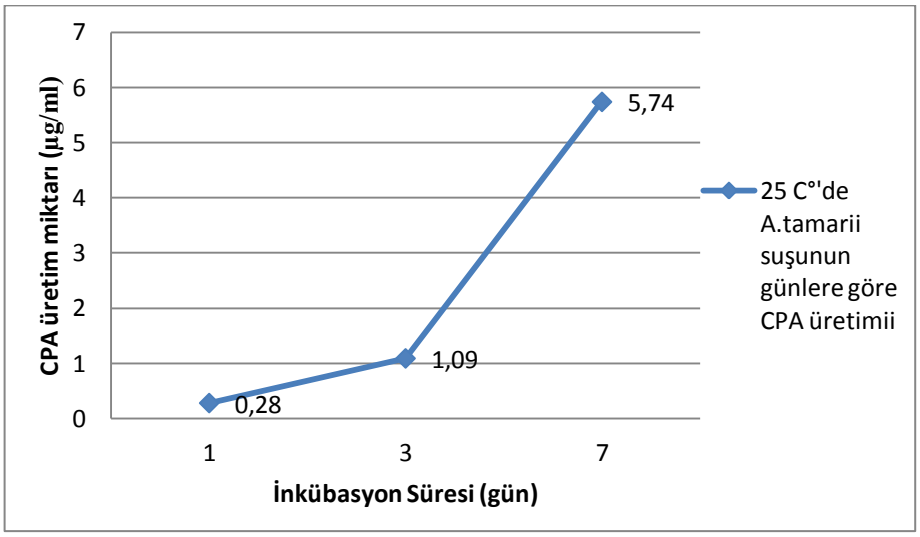
Literatürde bu sonuçlara karşılaştırma olabilecek bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

5.4 *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarının 2 Saat Farklı Sıcaklık Derecelerinde Bekletildikten Sonra 30 °C'de 7 Gün İnkübasyonun CPA üretimine Etkisinin İncelenmesi

A.favus ve *A.tamarii* suşlarına ait petriler ayrı ayrı 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 Cº'de 2 saat süre ile bekletildikten sonra 30 Cº'de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Ekstraksiyon yönteminden sonra HPLC-DAD ile CPA miktarları hesaplanmıştır. Kontrol grubu olan 30 °C sıcaklıkta üretilen CPA miktarı ile 2 saat farklı sıcaklıklarda bekletildikten sonra 30 °C de 7 gün inkübe edilen petrilerdeki CPA üretim sonuçları karşılaştırılmıştır. Böylelikle 2 saat süre ile uygulanan farklı sıcaklık derecelerinin CPA üretimi üzerine etkisi gözlenmiştir. Çizelge 5.7'de *A.flavus* ve *A.tamarii* suşunun farklı sıcaklık derecelerinde 2 saat bekletilip sonrasında 30 °C 'de 7 gün inkübasyonun tamamlanmasının ardından üretilen CPA miktarları yer almaktadır.



Şekil 5. 7 : 25 °C sıcaklıkta *A.flavus* suşunun günlere göre CPA üretim miktarı.



Şekil 5. 8 : 25 °C sıcaklıkta *A.tamarii* suşunun günlere göre CPA üretim miktarı.

Çizelge 5. 7 : 2 saat farklı sıcaklıklarda bekletilip 30 °C'de 7 gün inkübasyonu tamamlanan *A.flavus* ve *A.tamarii* suşunun CPA üretim miktarının tablosu.

Sıcaklık / Küfler	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	35 °C	40 °C	45 °C
A. flavus	80,87	88,87	54,18	42,62	40,72	36,29	62,05	69,26
A. tamarii	4,95	3,16	7,36	3,89	2,46	2,66	5,83	3,22

30 °C'de 7 gün inkübe edilen *A.flavus* ve *A.tamarii* suşunun ürettiği CPA miktarı kontrol grubu olarak seçilmiştir (Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3). 30 °C'de *A.flavus* tarafından üretilen CPA miktarı 136,44 µg/ml iken *A.tamarii* için bu üretim 9,29 µg/ml 'dir. Çizelge 5.7'de verilen CPA üretim miktarları ile bu kontrol miktarları

Dunnett Testi kullanılarak kıyaslanmıştır. Karşılaştırma sonucunda; hangi sıcaklıkta 2 saat beklemenin CPA üretime etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Dunnett Testinin sonucu kontrol grubu ile "Fark vardır." ya da "Fark yoktur." şeklindedir. Çalışmada uygulanan bu test, % 95 güven aralığında hesaplanmıştır. Çizelge 5.8'de Dunnett testin,her iki suş içinde sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 5. 8 : Kontrol grubu (30 °C) ile Dunnet Karşılaştırma Testinin Sonuçları.

Sıcaklık / Küf	**30 °C**	**5 °C**	**10 °C**	**15 °C**	**20 °C**	**25 °C**	**35 °C**	**40 °C**	**45 °C**
A.flavus	KONTROL	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Var
A.tamarii	KONTROL	Var	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	Var

Dunnet Karşılaştırma testi (Çizelge 5.8) sonuçlarına göre; ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırılan sonuçlardan; *A.flavus* için 10 °C ve *A.tamarii* için 15 °C'de 2 saat bekletilip 30 °C sıcaklıkta 7 gün inkübasyonu tamamlanan petrilerin ürettiği CPA miktarı, bekletilmeden 7 gün süre ile 30 °C'de inkübe edilen suşların ürettiği CPA miktarları ile arasında fark bulunamamıştır. CPA üretiminin artması ya da azalması için belirtilen suşlarda belirtilen sıcaklıklarda bekletilmesinin istatistiksel olarak, optimum koşullarda gelişen küflerin ürettiği CPA miktarından fark yoktur. *A.flavus* için 10 °C hariç, diğer (5, 15, 20, 25, 35, 40 ve 45 °C) sıcaklılarda 2 saat bekletildikten sonra 30 °C'de inkübasyonu tamamlanan petrilerin, CPA üretimi üzerine etkisinin olduğu; yani kontrol grubunda üretilen CPA miktarlarından farklı oldukları bulunmuştur. Aynı şekilde, *A.tamarii* için 15 °C hariç, diğer (5, 15, 20, 25 ,35, 40 ve 45 °C) sıcaklılarda 2 saat bekletildikten sonra 30 °C'de inkübasyonu tamamlanan petrilerin, CPA üretimi üzerine etkisinin olduğu; yani kontrol grubunda üretilen CPA miktarlarından farklı oldukları bulunmuştur. Sonuç olarak 2 saat farklı sıcaklıklarda yapılan bekletme işleminin CPA üretimi üzerine etkisinin olduğu, farklılık yarattığı bulunmuştur.

Çizelge 5.9'da yer alan sonuçlara bakıldığında, farklı miktarlarda CPA üretimi görülmektedir. Bu farklı miktarlarda ki CPA üretimlerinin birbiri ile olan farklılıklarının belirlenmesi amacı ile tek yollu annove testi % 95 güven aralığında uygulanmıştır. Testin sonuçları Çizelge 5.9'de yer almaktadır. Bu testin yapılmasının amacı, farklı sıcaklıklarda bekletilen petrilerden elde edilen CPA miktarların birbiri arasında ki farkı belirlemek ve daha kullanışlı veriler elde edilmesini sağlamaktır.

Böylelikle hangi sıcaklıkta yapılan bekletmenin CPA üretimi açısından daha etkili olduğu belirlenebilmektedir.

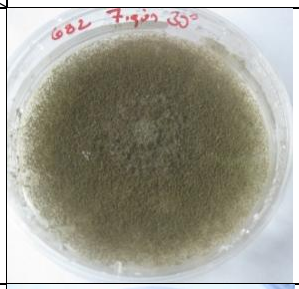
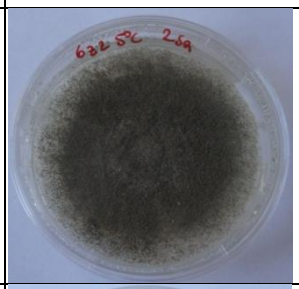
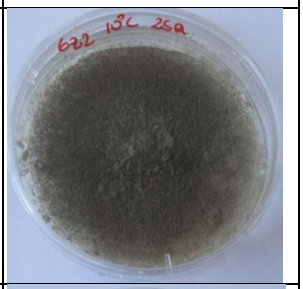
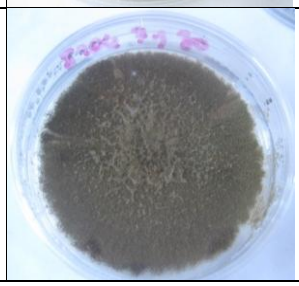
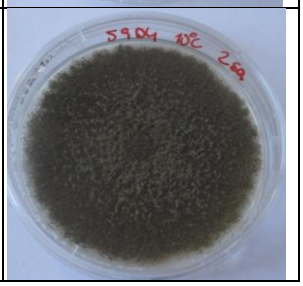
Çizelge 5. 9: 2 saat farklı sıcaklılarda bekletilip inkübasyonu 30 °C'de tamamlanan petrilerin ürettiği CPA miktarlarının birbiri ile karışlaştırmasının istatistiki sonuçları.

	CPA (µg/ml)/İstatistiksel Analiz							
	5 °C	**10 °C**	**15 °C**	**20 °C**	**25 °C**	**35 °C**	**40 °C**	**45 °C**
A. flavus	80,87	88,87	54,18	42,62	40,72	36,29	62,05	69,26
	AB	A	ABC	BC	CD	CD	ABD	ABD
A. tamarii	4,95	3,16	7,36	3,89	2,46	2,66	5,83	3,22
	ABC	AC	B	AC	C	C	AB	AC

A.flavus incelenirse; 25 ve 35 °C sıcaklıkta 2 saat bekletilen suşun ürettiği CPA miktarının en az olduğu görlmektedir (Çizelge 5.9). 25 ve 35 °C'de 2 saat bekletilip inkübasyonu 30 °C'de tamamlanan *A.flavus* suşunun ürettiği CPA miktarları % 95 güven aralığında istatistiksel açıdan aynıdır. 25 ve 35 °C ile istatistiksel açıdan 15 ve 20 °C'de de fark yoktur. Fakat CPA miktarlarına bakıldığında 25 ve 35 °C'de üretilen CPA miktarı az olduğu için; 25 ve 35 °C'de pratikte kullanılabilecek sıcaklıklardır. Böylelikle inkübasyonun ilk aşamasında sıcaklığın 25 ya da 35 °C'ye 2 saat süre ile getirilmesi, önemli derece CPA miktarında azalmaya sebep olmuştur.

A.tamarii 'den elde edilen sonuçların da *A.flavus* suşuna benzer özellik gösterdiği açıkça belli olmaktadır. 25 ve 35 °C'de 2 saat bekletilip 30 °C'de inkübasyonu tamamlanan suşların ürettiği CPA miktarları % 95 güven aralığında istatistiki açıdan aynıdır (Çizelge 5.9). Aynı çizelgeden diğer sıcaklıların da kendi içerisinde benzerlikleri ve farklılıkları ifade edilmektedir. Pratik olarak kullanılabilirliği *A.flavus* suşunda olduğu gibi *A.tamarii* suşu için de 25 ve 35 °C'dir. Bu sıcaklıklarda 2 saat bekletilip, 30 °C'de inkübasyonu tamamlanan suşların ürettiği CPA miktarı 30 °C ile karışlaştırıldığı önemli miktarda azalma olduğu istatistiki olarak kanıtlanmıştır.

A.flavus ve *A.tamarii* suşlarının 5 ve 10 °C'de 2 saat bekletilip, 30 °C'de inkübasyonun tamamlamasının ardından petri görüntüsü ile kontrol olan 30 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda ki petri görüntüleri Şekil 5.10'da yer almaktadır.

Sıcaklık / Küfler	KONTROL 30 °C	5 °C	10 °C
Aspergillus flavus			
Aspergillus tamarii			

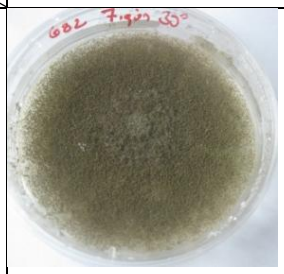
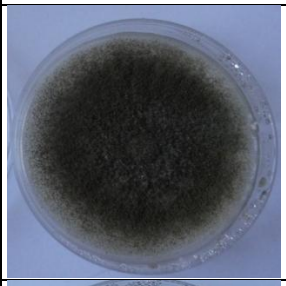
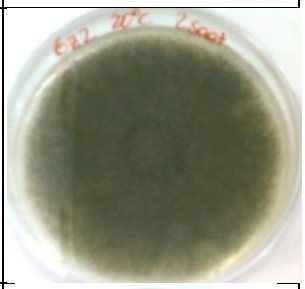
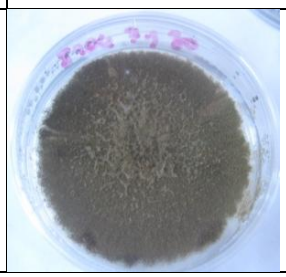
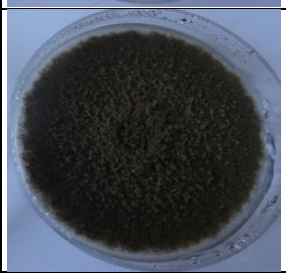
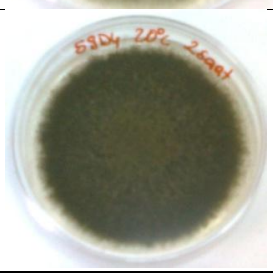
Şekil 5. 9 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarına ait 30 °C kontrol grubu ile 5 ve 10 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri.

A.flavus ve *A.tamarii* suşlarının 15 ve 20 °C'de 2 saat bekletilip, 30 °C'de inkübasyonun tamamlamasının ardından petri görüntüsü ile kontrol olan 30 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda ki petri görüntüleri Şekil 5.11'da yer almaktadır.

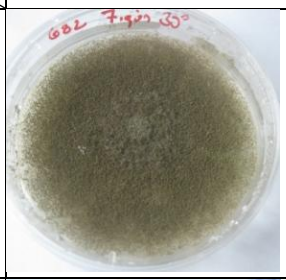
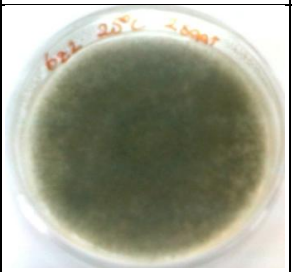
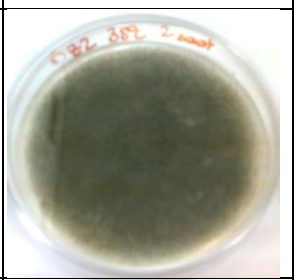
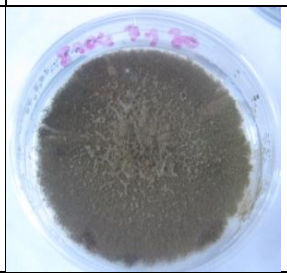
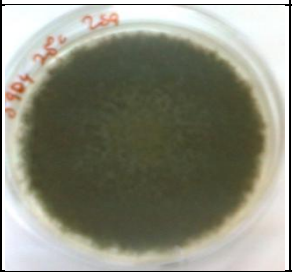
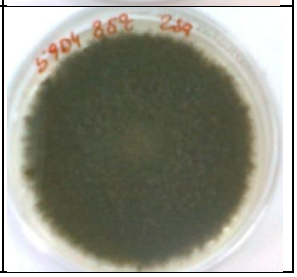
A.flavus ve *A.tamarii* suşlarının 25 ve 35 °C'de 2 saat bekletilip, 30 °C'de inkübasyonun tamamlamasının ardından petri görüntüsü ile kontrol olan 30 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda ki petri görüntüleri Şekil 5.12'da yer almaktadır.

A.flavus ve *A.tamarii* suşlarının 40 ve 45 °C'de 2 saat bekletilip, 30 °C'de inkübasyonun tamamlamasının ardından petri görüntüsü ile kontrol olan 30 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda ki petri görüntüleri Şekil 5.13'da yer almaktadır.

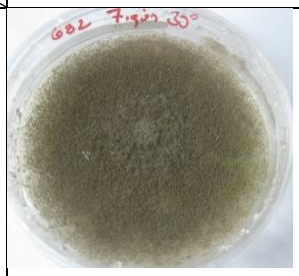
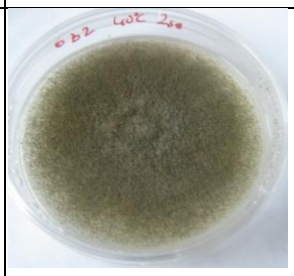
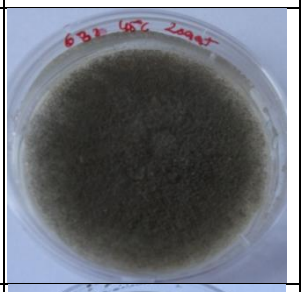
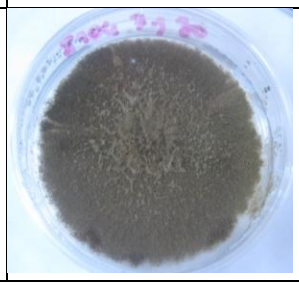
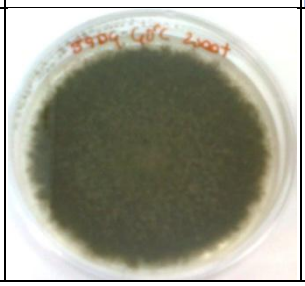
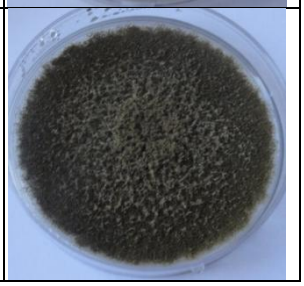
Tasarlanan deneyin sonuçlarının daha iyi anlaşılması için Şekil 5.14'te *A.flavus* suşuna ait, ikili karşılaştırma sütün grafikleri yer almaktadır. *A.flavus* suşunun 2 saat süre ile farklı sıcaklıklarda bekletilmesinin ardından 30 °C'de inkübasyonu tamamlananlarla, 30 °C'de 7 gün süre ile inkübasyonu gerçekleştirilen suşların ürettikleri CPA miktarları karşılaştırılmıştır.

Sıcaklık / Küfler	KONTROL 30 °C	15 °C	20 °C
Aspergillus flavus			
Aspergillus tamarii			

Şekil 5. 10 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarına ait 30 °C kontrol grubu ile 15 ve 20 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri.

Sıcaklık / Küfler	KONTROL 30 °C	25 °C	35 °C
Aspergillus flavus			
Aspergillus tamarii			

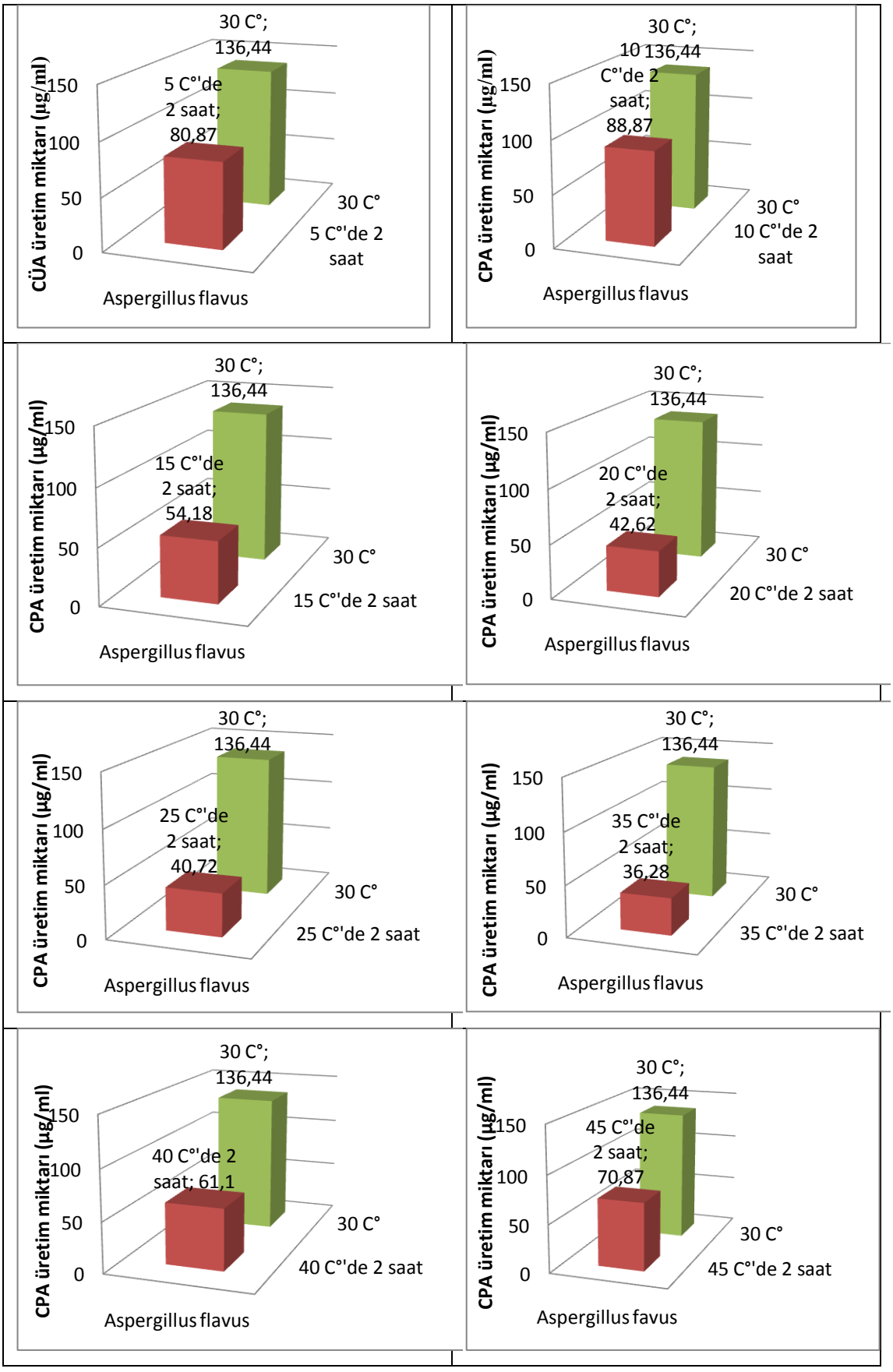
Şekil 5. 11 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarına ait 30 °C kontrol grubu ile 25 ve 35 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri.

Sıcaklık / Küfler	KONTROL 30 °C	40 °C	45 °C
Aspergillus flavus			
Aspergillus tamarii			

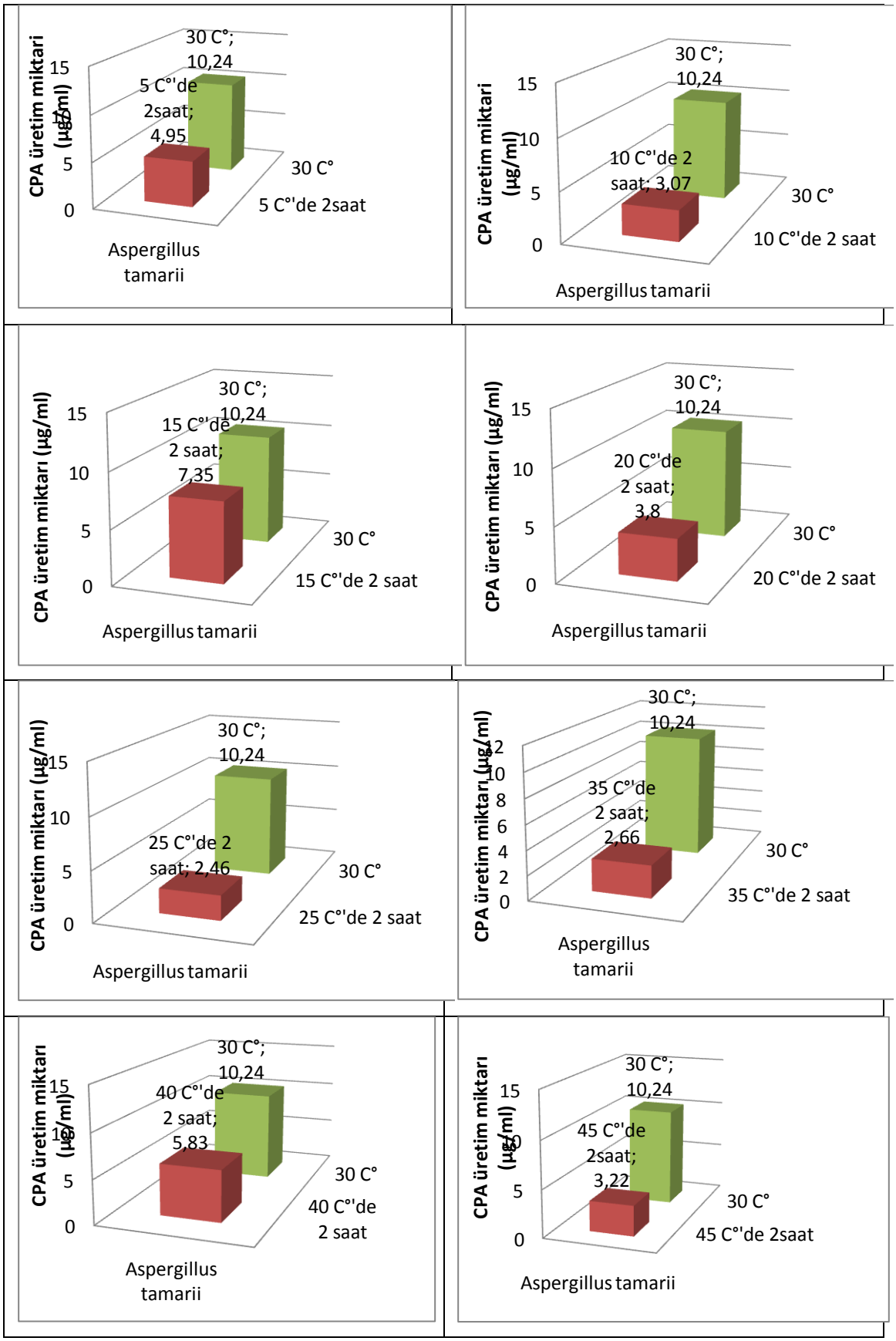
Şekil 5. 12 : *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarına ait 30 °C kontrol grubu ile 40 ve 45 °C'de 2 saat bekletilip optimum koşullarda inkübasyonu tamamlanan petrilerin görüntüleri.

Tasarlanan deneyin sonuçlarının daha iyi anlaşılması için Şekil 5.15'te *A.tamarii* suşuna ait, ikili karşılaştırma sütün grafikleri yer almaktadır. *A.tamarii* suşunun 2 saat süre ile farklı sıcaklıklarda bekletilmesinin ardından 30 °C'de inkübasyonu tamamlananlarla, 30 °C'de 7 gün süre ile inkübasyonu gerçekleştirilen suşların ürettikleri CPA miktarları karşılaştırılmıştır.

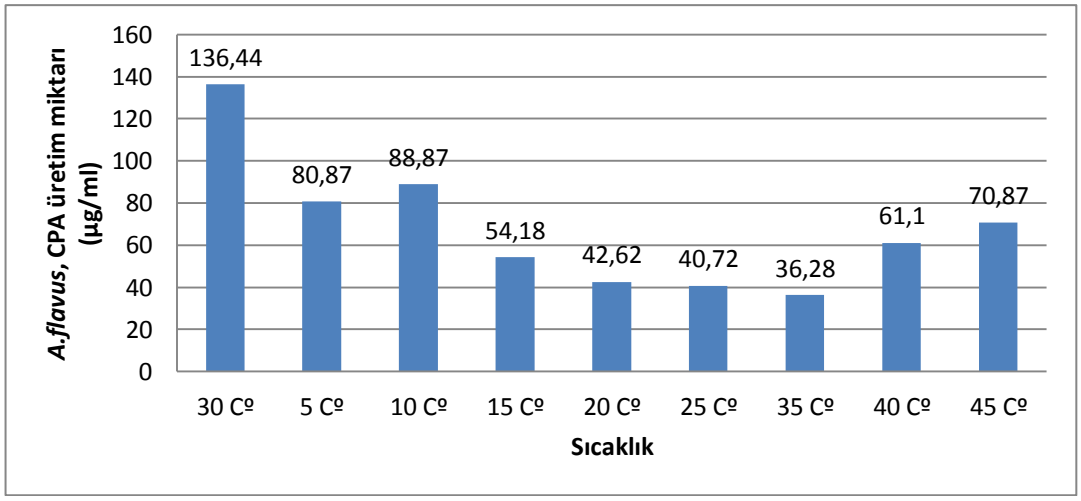
Şekil 5.16'da, tasarlanan deney için *A.flavus*'un suşunun ürettiği CPA miktarı gösterilmiştir. Grafk; 30 °C'de kontrol grubu olan ve 7 günün sonunda *A.flavus* tarafından üretilen CPA miktarını göstermektedir. 5 °C'den başlayıp 45 °C'ye kadar giden sıcaklık dereceleri ise; inkübasyonun başlangıcında 2 saat beklemenin yapıldığı sıcaklık dereceleridir. Tasarlanan deneye göre bu farklı sıcaklıklarda ayrı ayrı 2 bekletilen petriler, sonrasında 30 °C'de 7 gün inkübasyonlarının tamamlanmasını beklemiş ve ürettikleri CPA miktarları, bekletilen sıcaklık derecesinin karşısına yazılmıştır. CPA üretim miktarları kıyaslandığında en fazla düşüşün olduğu, yani en az CPA üretiminin olduğu sıcaklık derecesi 35 °C olup, grafikdenden de açıkça görülmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 25 °C ile 35 °C arasında % 95 güven aralığında fark bulunamamıştır.



Şekil 5. 13 : *A.flavus* suşuna ait CPA üretiminin optimum koşul ile 2 saat beklemeli sonuçlarının sütün grafiği üzerinde gösterimi.

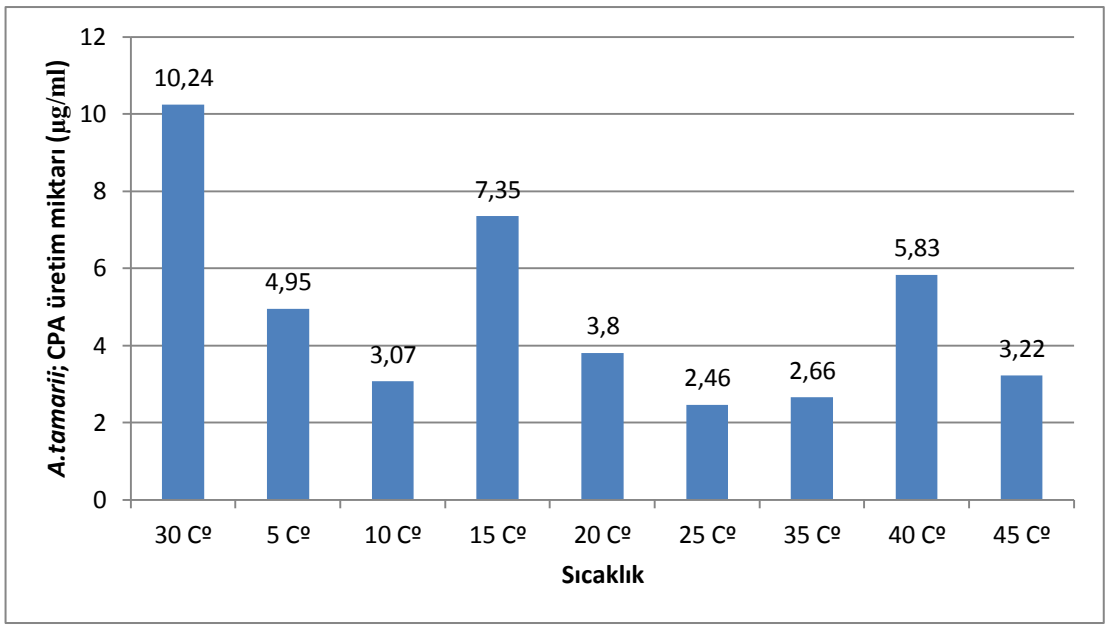


Şekil 5.15: *A.tamarii* suşuna ait CPA üretiminin optimum koşul ile 2 saat beklemeli sonuçlarının sütün grafiği üzerinde gösterimi.



Şekil 5. 14: Tasarlanan deney sonucunda *A.flavus* suşunun ürettiği CPA miktarları.

A.tamarii suşunun tasarlanan deneyde ürettiği CPA miktarının kontrol ve diğer sıcaklıklara göre değişimi şekil 5.17'de verilmiştir. Grafikte yer alan CPA üretim miktarları, kontrol sıcaklığı olan 30 °C ile karışlaştırıldığında, 25 °C'de 2 saat bekletmenin CPA üretimini önemli derecede azalttığı görülmektedir. Deney tasarısına göre, 5 °C'den 45 °C'ye kadar *A.tamarii* suşu içeren petriler ayrı ayrı 2 saat süre ile bu sıcaklıklarda bekletilmiş, ardından 7 gün süre ile 30 °C'de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda üretilen CPA miktarları, kontrol grubu olan 30 °C'nin sonunçları ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz sonuçları 25 ve 35 °C arasında % 95 güven aralığında fark olmadığını göstermiştir.



Şekil 5. 15 : Tasarlanan deney sonucunda *A.tamarii* suşunun ürettiği CPA miktarları.

Literatürde bu çalışmaya karşılaştırma olucak bir çalışma yer almamakatdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada siklopiazonik üretisi olan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus tamarii* suşlarının farklı sıcaklardaki siklopiazonik asit üretme potansiyelleri belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda 2 saat süre ile bekletilip inkübasyonuna optimum koşullarda(30 °C) devam ettirilen petrilerin ürettikleri CPA miktarlarının belirlenmesi amaçlanarak sıcaklık süre etkisinin CPA üretimine etkisi incelenmiştir.

Değişen sıcaklılarda (5-10-15-20-25-30-35-40 ve 45 °C) 7 gün süre ile CYA besi yerinde inkübe edilen *A.flavus* ve *A.tamarii* suşlarının CPA üretme potansiyelleri belirlenmiştir. En yüksek miktarda CPA üretimi her 2 suş için de 30 °C de yapılan inkübasyon sonucunda elde edilmiştir. En düşük sıcaklık olan 5 °C ile en yüksek sıcaklık olan 45 'de gelişme gözlenmemiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, CPA üretiminde sıcaklığın önemli olduğu görülmekte ve uygun gelişme sıcaklığında CPA üretim miktarının yüksek olduğu sonucuna varılmştır.

Çalışmanın devamında yer alan, 2 saat farklı sıcaklıklarda bekletilip inkübasyonu 30 °C'de tamamlanan petriler için, sıcaklık-süre etkisinin CPA üretimine olan etkisi incelenmiştir. Bu sonuçlar da 2 saat farklı sıcaklıkta bekletilen petrilerin hepsinde CPA üretim miktarlarında, 30 °C kontrol grubuna göre azalma olduğu için, sıcaklık-süre etkisinin CPA üretimi üzerine etkisi olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, inkübasyon süresi içinde belirli bir süre için sıcaklık değişimine maruz kalan petrilerin ürettikleri CPA miktarlarında azalma olduğunu göstermektedir.

Gıda güvenliği açısından elde edilen veriler yorumlanırsa; CPA üretme riski olan gıda ürünlerinin tarladan toplanma süresi 2 saat ve 25 °C ve ya 35 °C hava sıcaklığı seçilirse, depolama koşullarında daha az CPA üretimi gerçekleşmesi sağlanabilmektedir. Bu sonuçlara ek olarak gıdanın yapısı ve özelliklerini dikkate alınarak, 30 °C dışında depolama sıcaklığı belirlenen ürünlerin CPA üretme miktarlarında azalma sağlanabilmektedir. 30 °C'nin üzerinde ki sıcaklıklarda CPA üretimi azalırken, uygulamada depo sıcaklığı için bu sıcaklıkların uygun olmadığı düşünülmektedir. 30 °C'nin altında ki sıcaklıklar CPA üretimini azalmaktadır. Pratik

açıdan düşük sıcaklıkta toplama örneğin 20 °C ve daha düşük sıcaklıklar CPA üretiminin azalması için kullanılabilcek depo sıcaklıklarıdır.

KAYNAKLAR

Antony, M., Shukla, Y. and Janardhanan, K.K. (2003). Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **87,** 211-214.

Aresta, A., Cioffi, N., Palmisano, F. and Zambonin, C.G. (2003). Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic acid, mycophenolic and tenuazonic acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51,** 5232-5237.

Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. , Wogan, G. N. (1963). Aflatoxins B and G.*J. Am. Chem. Soc.*, **85** (11), 1706–1707.

Astoreca, A.L., Dalcero, A.M., Fernández Pinto, V., and Vaamonde, G. (2011). A survey on distribution and toxigenicity of Aspergillus section Flavi in poultry feeds. *International Journal of Food Microbiology*, **146**, 38–43.

Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A.J., Marín, S. (2012). Modelling the effect of temperature and water activity of Aspergillus flavus isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology*, **156,** 60–67.

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

Bennett, J.W. and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Rewievs*, **16**(3), 497-516.

Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M.,, Adam, G. and Krska, R. (2005). Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53,** 3421-3425.

Berthiller, F., Schuhmacher, R. , Adam, G., Krska, R. (2009). Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal Bioanal Chem*, **395**, 1243–1252.

Betina, V. (1989). *Mycotoxins, chemical, biologial and environmental aspects.* New York: Elsevier Science.

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

Bragulat, M.R., Abarca, M.L. and Cabanes, F.J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. International Journal of Food Microbiology, **71,** 139-144.

Bryden, W.L., Suksupath, S., Taylor, D.J. and Prasongsidh, B.C. (2004). Cyclopiazonic acid: Food chain contamination in *Poisonous Plants and Related Toxins* pp. 134-139, Eds. Acamovic T., Stewart C.S and Penntcott T.W., CAB International, Wallingford, U.K.

Burdock, G.A and Flamm, W.G. (2000). Rewiev article: Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. *International Journal of Toxicology,* **19**(3), 195-218.

Cappielle, A., Famiglini, G., Palma, P., Pierini, E., Termopoli, V. and Trufelli, H. (2008). Overcoming matrix effect in liquid chromatogtaphy-mass spectrometry. *Anal. Chem*. **80,** 9343-9348.

Chang, P.K., Horn, B.W. and Dorner, J.W. (2009). Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus flavus, Fungal Genetics and Biology,* **46,** 176-182.

Chang-Yen, I., and Bidasse, K. (1990). Improved spectrophotometric determination of cyclopiazonic acid, *Journal of AOAC International,* **73,** 257-259.

Cole, R.J. and Cox, R.H. (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites,* Academic Press, New York, USA.

Cvetnic, Z. (1994). Cyclopiazonic acid and aflatoxin production by cultures of *Aspergillus flavus* isolated from dried beans and maize, *Nahrung,* **38,** 21-25.

Cvetnic, Z. and Pepeljnjak, S. (1998). Production of cyclopiazonic acid by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus, Nahrung,* **42**(5), 321-323.

Da Motta, S. and Valente Soares, L.M. (2000). Simultaneous determination of tenuazonic acid and cyclopiazonic acid in tomato products. *Food Chemistry,* **71**, 111-116.

Da Motta, S. and Valente Soares, L.M. (2001). Survey of Brazilian tomato products alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Additives and Contaminants,* **18,** 630-634.

Desphande, S.S. (2002). *Handbook of Food Toxicology.* Marcel Dekker, Inc. NY.

Devegowda, G. and Murthy, T.N.K. (2005). Mycotoxins: effects on poultry performance and health, In *The Mycotoxin Blue Book.* Ed. D. Diaz. Nottingham University Press Nottingham United Kingdom, 31.

Diaz, G.J., Thompson, W. and Martos, P.A. (2010). Stability of cyclopiazonic acid in solution. *World Mycotoxins Journal,* **3**(1), 25-33.

Dorner, J.W., (1983). Production of Cyclopiazonic acid by *Aspergillus tamarii Kita. Applied and Environmental Microbiology*, **46**(6), 1453-1437.

Dorner, J.W. (2002). Recent advances in analytical methodology for cyclopiazonic acid, in *Mycotoxins and Food Safety,* pp. 107-116, Eds. DeVries, J.M. Trucksess, M.W. and Jackson, L.S., Kluwer Academci/Plenum Publishers, New York.

Doster, M.A., Michaillides, T.J. and Morgan, D.P. (1996). *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from Californian orchards. *Plant Disease,* **80,** 484-489.

Duran, R.M., Cary, J.W. and Calvo, A.M. (2007). Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. *Applied Microbiological Biotechnology,* **73,** 1158-1168.

Ediage, E.N., Mavungu, J.D.D., Monbaliu, S., Van Peteghem, C. And De Saeger, S. (2011). A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantificaiton of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,***59,** 5173-5180.

FDA (U.S. Food and Drug Administiration). (2002).

Fernandez-Pinto, V., Patriarca, A., Locani, O., Vaamonde, G. (2001). Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additives and Contaminants,* **18,** 1017-1020.

Frishvad, J., Thrane, U., Samson, R. and Pitt, J. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. In *Advance in Food Mycology,* pp.3-31, Eds. Hocking, A., Pitt, J., Samson, R. and Thrane, U., Springer, New York, USA.

Gallagher, R.T., Richard, J.L., Stahr, H.M and Cole, R.J. (1978). Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus, Mycopathologia,* **66**, 31-36.

Gilbert, J. and Anklam, E. (2002). Validation od analytical methods for determining mycotoxins in foodstuff. *Trac. Trends Anal. Chemistry,* **21,** 468-486.

Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. And Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy, *International Journal of Food Microbiology,* **113,** 330-338.

Gonçalez, E., Nogueria, J.C.H., Fonseca, H., Felicio, J.D., Pino, F.A., and Correa, B. (2008). Mycotoxigenic fungi in peanuts from different geographic regions in Brasil. *International Journal of Food Microbiology,* **123,** 184-190.

Goto, T., Shinshi, E., Tanaka, K. and Manabe, M. (1987). Analysis of cyclopiazonic acid by normal phase high-performance liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemisrty,* **51,** 2581-2582.

Goto, T., Wicklow, D.T. and Ito, Y. (1996). Aflatoxin and cyclopiazonic production by a scleratium-producing *Aspergillus tamarii* strain. *Applied and Enviromental Microbiology*, **62**(11), 4036-4038.

Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. and Gettinby, G. (1997). Effects of temperature, water activity and incubation time on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by an isolate of Aspergillus flavys in surface agar culture, *Applied and Enviromental Microbiology*, **63**(3), 1048-1053.

Gümüş, T. ve Yılmaz, İ. (2006). Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri, 9. Gıda Kongresi, Bolu, s.293-296, 24-26 Mayıs.

Hahnau, S. and Weiler, E.W. (1991). Monoclonal antibodies for enzyme immunoassay of the mycotoxin cyclopiazonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **41**(7), 1076-1080.

Hayashi, Y. and Yoshizawa, T. (2005). Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method, *Food Chemistry,* **93,** 215-221.

Heperkan D, Somuncuoglu, S., Karbancioglu-Güler, and Mecik, F. N. (2012). Natural contamination of cyclopiazonic acid in dried figs and co-occurrence of aflatoxin. *Food Control,* **23,** 82-86.

Hermansen, K. Frisvad, J.C., Emborg, C. and Hansen, J. (1984). Cyclopiazonic acid production by submerged cultures of *Penicillium* and *Aspergillus* strains. *FEMS Microbiology letters*, **21**(2), 253-262

Holcomb, M., Thompson, H.C., Cooper, W.M. (1996). SFE Extraction of Aflatoxins (BI, B2, G1, and G2)from Corn and Analysis by HPLC, *The Journal of Supercrical Fluids*, **9,** 118-121.

Holzapfel, C.W. (1968). The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* westling. *Tetrahedron*, **24,** 2101-2119.

Holzapfel, C.W., Hutchison, R.D., Wilkins, D.C. (1970). The isolation and structure of two new indole derivatives from *Penicillium cyclopium* westling. *Tetrahedron*, **26,** 5239-5246.

Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W., Powel, J.H. and Layton, R.C. (1996). Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatability groups in *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus and A. tamarii. Mycologia,* **88,** 574-587.

Horn, B.W. and Dorner, J.W. (1999). Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a tranect within the United States. *Applied Environmental Microbiology,* **65,** 1444-1449.

Hussein, S. and Brasel J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167,** 101–134.

Ito, Y., Peterson, S.W. and Goto, T. (1999). Properties of *Aspergillus tamarii, A. caelatus* and related species from acidic tea fiel soils in Japan. *Mycopathologia,* **144**, 169-175.

Jessome, L.L and Volmer, D.A. (2006). Ion Suppression: A major concern in mass spectrometry. *LC-GC North America,***24**(5), 499-510.

Kostelanska, M., Zachariasova, M., Lacina, O., Fenclova, M., Kollos, A. and Hajslova, J. (2011). The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realized by UPLC-TOFMS method. *Food Chemistry,* **126**, 1870-1876.

Köppen, R., Kock, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. and Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in food: current state of analytical methods and limitations. *Appl. Microbial Biotechnol* **86,** 1595-1612.

Krska, R. And Molinelli, A. (2007). Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Anal Bioanal. Chemistry,***387**, 145–148.

Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. and Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure& Risk Assessment,* **25**(2), 152-163

Kuiper-Goodman, T. (2004). Risk assesment and risk management of mycotoxins in food in *Mycotoxins in fod, detection and control*, pp 7, Eds. N. Magan, M. Olsen, Woodhead pıblishing limited, Cambridge, UK.

Lancova, K., Hajslovaa, J., Poustkaa, J., Krplovaa, A., Zachariasovaa, M., Dostalekb, P. and Sachambula, L. (2008). Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives and Contaminants,* **25**(6), 732–744.

Lansden, J.A. and Davidson, J.I. (1983). Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. *Applied Environmental Microbiology,* **45,** 766-769.

Lansden, J.A. (1984). Liquid chromatographic analysis system for cyclopiazonic acid in peanuts. *Journal-Association of Official Analytical Chemists***.**

Lansden, J.A. (1986). Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography, *Journal of AOAC,* **69,** 964-966.

Larsen, T.O., Gareis, M. And Frisvad, J.C. (2002). Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondry metabolite production by common *Penicillia* on cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **50,** 6148-6152.

Le Bars, J. (1979). Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural accurrence of the mycotoxin in cheese. *Applied and Environmental Microbiology,* **38**(6), 1052-1055.

Lomax, L.G., Cole, R. J. and Dorner, J. W. (1984). The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. *Vet. Pathol*. **21,**418–424.

Luk, K.C., Kobbe, B. and Townsend, J.M. (1977). Production of cyclopiazonic acid by Aspergillus flavus link. Applied Environmental Microbiology, **33,** 211-212**.**

Lund, F., Filtenborg, O. and Frisvad, J.C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiolog,* **12,** 173-180.

Martins, M.L. and Martins, H.M. (1999). Natural and vitro co-productiion of cyclopiazonic acid and aflatoxins. *Journal of Food Protection,* **62**(3), 292-294.

Matsudo, T. and Sasaki, M. (1995). Simple Determination of Cyclopiazonic acid. *Bioscience Tech. Biochemi.,* **59**(3), 335-357.

Miraglia, M., Debegnach, F. and Berra, C. (2005). Mycotoxins: detection and control, In *Pesticide, Veterinary and other residue in food.* Eds. David H., Watson. CRC Woodhead publihing, Cambridge, England. pp 642-643.

Monaci, L., Aresta, A., Palmisanoi F., Visconti, A. and Zambonin, C.G. (2002). Amino-bonded silica as stationary phase for liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in fungal extracts. *Journal of Chromatography A,* **955**(1), 79-86.

Moss, M.O. (1992). Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology and Symposium Supplement,* **84**, 62-102.

Mphande, F.A., Siame, B.A. and Taylor, J.E. (2004). Fungi, Aflatoxins and Cyclopiazonic acid Associated with Peanut Retailing in Botswana. *Journal of Food Protection,* **67**(1), 96-102.

Oliveira, C.A.F., Sebastiao, L.S., Fagundes, H., Rosim, R.E. and Fernandes, A.M. (2008). Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants; Part B- Surveillance Communications.* **1**(2), 147-152.

Oliveira, C.A., Rosmaninho, J. and Rosim, R. (2006). Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants,* **23**(2), 196-201.

Orth, R. (1977). Mycoroxins of *Aspergillus oryzae* strains for use in food industry as startes and enzyme producing molds, *Ann. Nutr. Alim.*,**31**, 617-624.

Pitt, J.I., Cruickshank, R.H. and Leistner, L. (1986). *Penicillium commune, P. Camembertii,* the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology,* **3,** 363-371.

Plasencia, J., and Mirocha, C.H. (1991). Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Applied and Environmentl Microbiology,* **57**(1), 146.

Prasongsidh, B.C., Kailasapathy, K., Skurray, G.R., and Bryden, W.L. (1997). Stability of cyclopiazonic acid during storage and processing of milk, *Food Research ınternational,* **30**(10), 793-798.

Prasongsidh, B.C., Kailasapathy, K., Skurray, G.R., and Bryden, W.L. (1998). Analysis of cyclopiazonic acid in milk by capillary electrophoresis, *Food Chemistry,* **61,** 515-519.

Prasongsidh, B.C., Kailasapathy, K., Sturgess, R., Skurray, G.R., and Bryden, W.L. (1999a). Influence of manufacturing and stroring of ice cream on cyclopiazonic acid. *Milcwissenchaft,* **54,** 141-144.

Prasongsidh, B.C., Sturgess, R., Skurray, G.R., and Bryden, W.L. (1999b). Partition behaviour of cyclopiazonic acid in cream and butter. *Milcwissenchaft,* **54,** 272-274.

Purchase, I.F. (1971). The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* **18,** 144-123.

Pushvinder, R. and Desai, S. (2006). Variability among isolates of *Aspergillus flavus* from groundnut for aflatoxin and cyclopiazonic acid production. *Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry,* **5**(4), 1458-1463.

Rao, B.L. and Husain, A. (1985). Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (Paspalum scrobiculatum) causing poisoning in man and its production by associated fungi. *Mycophatologia,* **161,** 183-192.

Rao, B. L. ve Husain, A. (1987). A simple colorimetric method for screening cyclopiazonic acid in agricultural commodities. *Mycopathologia,* **97**, 89-92.

Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H. And Rezaee, M. (2006). A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in cron field soils in Iran: populations patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycophatologia,* **161,** 183-192.

Resnik, S.L., Gonzales, H.H.L., Pacin, A.M., Viora, M., Caballero, G.M. and Gros, E.G. (1996). Cyclopiazonic acid and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotoxin Research,* **12,** 61-66.

Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F. and Lebrihi, A. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology,* **48**(10), 2772-2777

Riley, R.T and Petska, J. (2005). Mycotoxins: metabolism, mechanisims and biochemical markers in *The Mycotoxin Blue Book*, pp-280-282, Ed. D. Diaz, Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Ross, P.F., Rice, L.G., Casper, H.H., Crenshaw, J.D. and Richards, L.J. (1991). Novel occurrence of cyclopiazonic acid in sunflower seed. *Vet. Hum. Toxicol.,* **33,** 284-285.

Sanchez-Hervas, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramon, D., Martinez-Culebras, P.V. (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology,* **125,** 336-340.

Scott, P.M., and Kanhere, S.R. (1980). Liquid chromatographic determination of tenuazınic acid in tomato paste. *Journal of AOAC International*, **63**(3).

Scott, P.M. (2004). Other mycotoxins in *Mycotoxins in Food, Detection and Control*, pp. 406-440, Eds. Magan N. & Olsen, M., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

Sewald, N., Lepschy von Gleissenthall, J., Schuster, M., Muller, G., Aplin, R.T., (1992). Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol. *Tetrahedron,* **3**,953–960.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R. and Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **20**(18), 2649-2659.

Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W. (1998). Mycotoxins production by *Aspergillus, Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology,* **43,** 141-158.

Turner, N.W., Subrahmanyam, Screenath. and Piletsky, S.A. (2009). Analatical methods for determination of mycotoxins: A rewiev, *Analytca Chimica Acta*, **632**(2), 168-180.

Trucksess, M.W., and Pohland, A.E. (2000). Mycotoxin protocols. Totowa, N.J. : Humana Press.

Urano, T., Trucksess, M.W., Matusik, J. and Dorner, J.W. (1992). Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts, *Journal of AOAC International,* **75,** 319-322.

Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Comerio, R. and Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrate in Argentina. *International Journal of Food Microbiology,* **88,** 79-84.

Vaamonde, G., Patriarca, and Pinto, V. (2006). Effect of water activity and temperature on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* in peanuts, in *Advances in Food Mycology*, pp. 225-235, Eds. Hocking, A.D., Pitt, K.I., Samson, R.A. and Thrane, U., Springer, New York.

Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C. and Jonker, M.A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food. *Anal. Bioanal. Chemistry,* **389,**147–157.

Vendl, O., Crews, C., MacDonald, S., Krska, R., & Berthiller, F. (2010). Occurrence of free and conjugated Fusarium mycotoxins in cereal-based food. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. **27(**8), pp: 1148–1152.

Vinokurova, N.G., Ivanushkina, N.E., Khmelnitskaya, I.I. and Arinbasarov. M.U. (2007). Synthesis of α-cyclopiazonic acid by fungi the genus of *Aspergillus, Applied Biochemistry and microbiology*, **43**(4), 435-438.

Weidenbörner, W. (2001).Aflatoxins In *Encyclopedia of FoodMycotoxins,*Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Yu, W. and Chu, F.S. (1998). Improved direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for cyclopiazonic acid in corn, peanuts, and mixed feed, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **46,** 1012-1017.

Zambonin, C.G., Monoci, L., and Aresta, A. (2001). Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid-phase microextraciton and high performance liquid chromatography, *Food Chemistry,* **75,** 249-254.

CTD(Comparative Toxicogenomics Database). Alındığı tarih 12.02.2012, adres: http://ctdbase.org/

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Deniz Dinçer

Doğum Yeri veTarihi: Uzunköptü- 05/03/1987

Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisli, 2005-2010.

Yayın Listesi:

- Altay, F., **Dinçer, D**., Dengiz, D., Heperkan D., 2010. Zeytinler için kullanılan zeytin yaprağı özütü içeren film çözeltilerinin antimikrobiyal ve reolojik özellikleri. *VI. Uluslararası Ambalaj Kongresi, 16-18 Eylül 2010, Cilt 1, s: 99.*
- **Dinçer, D**., Heperkan, D., 2011. Comparison of the different extraction methods of in vitro aflatoxin production. MYCORED ISM Conference, 15 - 18 November, 2011, Mendoza/Argentina.