

**MISIR VE ÜRÜNLERİNDE PROSESİN *FUSARIUM*
TOKSİNLERİNE ETKİSİ**

**THE EFFECT OF PROCESSING ON *FUSARIUM* TOXINS IN
CORN AND ITS PRODUCTS**

EREN NUMANOĞLU

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Hamit KÖKSEL

Üye (Danışman) :.....
Doç. Dr. Ümran UYGUN

Üye :.....
Prof. Dr. Vural GÖKMEN

Üye :.....
Prof. Dr. Berrin ÖZKAYA

Üye :.....
Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

MISIR VE ÜRÜNLERİNDE PROSESİN *FUSARIUM* TOKSİNLERİNE ETKİSİ

Eren Numanoglu

ÖZ

Bu tez çalışmasında, çeşitli mısır ürünlerinin üretiminde uygulanan ısı işlemlerin bazı *Fusarium* mikotoksinleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda ilk olarak, Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan mısırlarda başlıca *Fusarium* toksinlerinin varlığı belirlenmiştir. Mısırlarda bulunan toksinler ve düzeyleri dikkate alındığında, çok az örnekte bulunan T-2 ve HT-2 toksinlerinin ürünlerde incelenmesine gerek görülmemiştir. Mısır ürünlerinde deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZEA), fumonisin B₁ (FB₁) ve fumonisin B₂ (FB₂) toksinleri üzerine işleme tekniklerinin etkisi araştırılmıştır. Çalışma boyunca doğal yollarla kontamine olmuş mısır örnekleri kullanılmıştır. Mısır için mevcut olan toksin analiz yöntemleri, mısır ve ürünleri için modifiye edilerek kullanılmıştır.

ZEA ve DON'un ısıya dayanıklılığı ve termal bozunma kinetiği, geleneksel tipte mayasız mısır ekmeğini temsil edecek şekilde hazırlanan kabuk-model örnekleri üzerinde incelenmiştir. İzotermal kabul edilebilecek şartlarda ve 100-250°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilen ısı işlemler sonucu toksinlerin bozunma hız sabitleri, bozunma aktivasyon enerjileri ve yarılanma süreleri belirlenmiştir. Özellikle düşük sıcaklıklarda ZEA'nın DON'a göre ısıya karşı daha stabil olduğu ve her iki toksinin de artan sıcaklıkla daha fazla yıkıma uğradığı belirlenmiştir. Elde edilen kinetik özelliklerin geçerliliği deneysel olarak belirlenen azalmalar üzerinden doğrulanmış ve bu özelliklerin doğal kontamine undan benzer bileşimde üretilen ürünlerde toksin yıkımının tahmini için uygulanabilir olduğu belirlenmiştir. Deneysel sonuçlara göre 250°C'de 70 dakika pişirilen ekmeğin içinde hiçbir azalma gözlenmezken, kabuğunda ZEA ve DON için sırasıyla %13.5 ve 9.9 oranında azalmalar kaydedilmiştir. Diğer taraftan, ekstrüde ürün benzeri genleştirilmiş mısır ürünlerinin üretiminde uygulanan farklı sıcaklıklarda da ZEA ve DON belli oranlarda kayba uğramıştır. Bu proses sırasında da ZEA'nın daha stabil olduğu ve yüksek sıcaklığa ek olarak basınç uygulamasının toksin azalmasında etkili olduğu belirlenmiştir.

Karadeniz Bölgesi'ne özgü geleneksel mısır ürünleri olan kuymak ve helva üretimi sırasında fumonisin miktarlarında meydana gelen azalmalar / değişimler araştırılmıştır. Helva yapımı sonucunda matrisle bağlı fumonisinlerin miktarında artış gözlenmiştir. Mısırdaki toksinin önemli bir bölümünün (FB₁'in %38'i ve FB₂'nin %51'i) Maillard benzeri reaksiyonlara girdiği ve yeni bileşiklere dönüştüğü tahmin edilmektedir. Diğer taraftan, yüksek miktarda süt içeren kuymakta, hammaddedeki tüm bağlı fumonisinler serbest formlarına dönüşmüş ancak toksin miktarında hiçbir azalma gerçekleşmemiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: deoksinivalenol, zearalenon, fumonisin, termal bozunma kinetiği, mısır ekmeği, genleştirilmiş mısır ürünü, kuymak, helva

Danışman: Doç. Dr. Ümran UYGUN, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

THE EFFECT OF PROCESSING ON *FUSARIUM* TOXINS IN CORN AND ITS PRODUCTS

Eren Numanoglu

ABSTRACT

In this study, the effects of heat treatments on some *Fusarium* toxins in various corn products were investigated. Within this scope, firstly the natural occurrence of major *Fusarium* mycotoxins in corn samples collected from different regions of Turkey were determined. Considering the presence and levels of the toxins in corn samples, products were not analysed for T-2 ve HT-2 toxins. The effect of processing was investigated for deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), fumonisin FB₁ (FB₁) and fumonisin FB₂ (FB₂). Naturally contaminated corn samples were used as raw material throughout the study. Mycotoxin analysis methods for corn were modified for corn and corn products.

The thermal stability and degradation kinetics of ZEA and DON were studied on crust-like model samples, representing traditional unfermented corn bread. Under isothermal heating conditions in the temperature range of 100-250°C, thermal degradation rate constants, activation energies for degradation and half lives of the toxins were determined. Particularly at low temperatures, ZEA was found to be more heat stable than DON and degradation of both toxins increased with increasing temperature. The validity of the derived kinetic parameters was confirmed by some experimental studies and it was concluded that these parameters can be used in the prediction of toxin degradation in similar corn-based products, prepared from naturally contaminated flour. According to the experimental results, after baking bread at 250°C for 70 minutes, no reduction was observed in the crumb while in the crust ZEA and DON was reduced by 13.5 and 9.9%, respectively. On the other hand, ZEA and DON losses were also recorded during production of extruded-like expanded corn products at different temperatures. ZEA was again found to be more stable during this process and pressure was found to have an effect on the reduction of toxins in addition to high temperature.

Fumonisin reductions / transformations during processing of corn into “kuymak” and “helva”, which are traditional products of Black Sea region, were also investigated. Helva production resulted in an increase of the amount of matrix-bound fumonisins. A significant percentage of the toxin in corn (38% of FB₁ and 51% of FB₂) was supposed to be converted into new products by Maillard type reactions. On the other hand, in kuymak which contains a high amount of milk, all the bound fumonisins in the raw material were converted into their free forms but no toxin reduction occurred.

KEYWORDS: deoxynivalenol, zearalenone, fumonisin, thermal degradation kinetics, corn bread, expanded corn product, kuymak, helva

Advisor: Doç. Dr. Ümran UYGUN, Hacettepe University, Department of Food Engineering

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve yürütülmesi aşamalarında değerli görüşleri ile bana ışık tutan, her zaman ve her konuda ilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen, uluslararası alanda da deneyim kazanmamın yolunu açan tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Sayın Ümran UYGUN'a,

Tez İzleme Komitesi üyeleri olarak; tezimin her aşamasında değerli önerileri ile bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Sayın Hamit KÖKSEL'e, çalışmalarımın yönlendirilmesinde büyük katkılar sağlayan ve laboratuvar olanaklarını kullanmama imkân tanıyan hocam Prof. Dr. Sayın Vural GÖKMEN'e,

Tez çalışmalarımın bir bölümü için 08 D07 602 001 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Model sistemde sıcaklık ölçümleri konusundaki yardımları için Dr. Özge ÇETİNKAYA AÇAR'a, Genleştirilmiş ürünlerin üretimini gerçekleştiren İNOVA Gıda Ltd. Şti.'ye ve bu konudaki yardımları için Abdulkadir TURAN'a,

Sağladığı öğrenci değişim bursu ile, tez kapsamındaki çalışmalarımın bir bölümünü İtalya'da bulunan Ulusal Araştırma Konseyi (CNR) bünyesindeki Gıda Üretim Bilimleri Enstitüsü (ISPA)'nde gerçekleştirmem için maddi destek veren Avrupa Komisyonu 6. Çerçeve Programı MoniQA NoE projesi (Kontrakt No. FOOD-CT-2006-36337) yürütücüsü ve yetkililerine,

6 ay süreyle CNR-ISPA'da araştırmalar yapmam için imkân ve maddi destek sağlayan Enstitü Başkanı Dr. Angelo VISCONTI'ye, bu enstitüdeki danışmanlığımı yürüten ve her zaman çok büyük ilgi ve desteğini gördüğüm Dr. Michele SOLFRIZZO'ya ve gerek laboratuvardaki çalışmalarım sırasında ve gerekse günlük hayatta yardımsever, canayakın ve misafirperver tutumları ile hep yanımda olan başta Annalisa DE GIROLAMO olmak üzere Mikotoksin Araştırma Grubu'ndaki tüm arkadaşlarıma,

Her zaman arkadaşça yaklaşımları ile yanımda olan ve bana güç ve destek veren değerli hocalarım Doç.Dr. Arzu BAŞMAN ve Doç.Dr. Ali TOPÇU'ya,

Laboratuvar çalışmalarım sırasındaki değerli yardımları için Dr. Arda SERPEN, Seda KILMANOĞLU, Pınar YILMAZ, Aslıhan ÜNÜVAR ve Arş. Gör. Sine YENER'e ve dostluklarından güç aldığım sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. İlnur GÖNENÇ, Arş. Gör. Tuğba BULAT, Arş. Gör. Seher GÜMÜŞ, Arş. Gör. Burcu GÜVEN ve tüm H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma Görevlileri ve Uzmanlarına,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmam sırasında da sonsuz sevgi, ilgi, destek ve fedakârlıklarıyla bana güç veren sevgili annem, babam, ablam ve enişteme

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eren NUMANOĞLU

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Mikotoksinler	4
2.1.1. <i>Fusarium</i> cinsi küfler ve oluşturdukları mikotoksinler	5
2.1.1.1. Trikotesenler.....	6
Deoksinivalenol (DON).....	8
T-2 ve HT-2 toksin.....	10
2.1.1.2. Zearalenon (ZEA)	11
2.1.1.3. Fumonisinler	13
2.2. Çeşitli Proseslerin Mikotoksinler Üzerine Etkileri	16
2.2.1. Isıl işlemlerin DON üzerine etkisi.....	17
2.2.2. Isıl işlemlerin ZEA üzerine etkisi.....	23
2.2.3. Isıl işlemlerin fumonisinler üzerine etkisi	26
2.3. Mikotoksin Analiz Yöntemleri	33
3. MATERYAL ve METOD	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Mısır örnekleri.....	38
3.1.2. Kimyasallar ve malzemeler.....	39
3.2. Metot.....	40
3.2.1. Model sistem	40
3.2.1.1. Örnek hazırlama	40
3.2.1.2. Isıl işlem.....	40
3.2.1.3. Sıcaklık ölçümleri	41
3.2.2. Mısır ekmeği üretimi	42
3.2.3. Genleştirilmiş mısır ürünlerinin üretimi	42
3.2.4. Helva üretimi	43

3.2.5. Kuymak üretimi.....	44
3.2.6. Mikotoksin analiz yöntemleri.....	45
3.2.6.1. DON analiz yöntemi	45
3.2.6.2. T-2 ve HT-2 toksin analiz yöntemi	47
3.2.6.3. ZEA analiz yöntemi	48
3.2.6.4. Fumonisin analiz yöntemleri	50
Fumonisinlerin HPLC ile analizi.....	50
Fumonisinler ve doğal hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile analizi.....	52
Bazik hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile analizi.....	55
3.2.7. Kurumadde analizi.....	55
3.2.8. Geri kazanım çalışmaları.....	56
3.2.9. İstatistiksel analizler	57
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA.....	58
4.1. Mikotoksin Analizlerinin Optimizasyonu	58
4.1.1. DON analizinde ekstraksiyon veriminin artırılması	58
4.1.2. Fumonisinler ve doğal hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile analizi..	63
4.2. Mısır Örneklerinin Mikotoksin Düzeyleri.....	64
4.3. ZEA ve DON'un Kabuk-Model Sisteminde Termal Bozunma Kinetiği.....	69
4.3.1. Model sistemde sıcaklık ölçümleri	70
4.3.2. ZEA'nın termal bozunma kinetiği.....	72
4.3.3. DON'un termal bozunma kinetiği.....	78
4.4. Mısır Ekmeğinde Toksinlerin Yıkımı ve Kinetik Modele Uygunluğu	82
4.4.1. Mısır ekmeğinde ZEA yıkımı ve modele uygunluğu	83
4.4.2. Mısır ekmeğinde DON yıkımı ve modele uygunluğu	86
4.5. Genleştirilmiş Ürünlerde ZEA ve DON Bozunması	90
4.6. Helva ve Kuymak Üretiminin Fumonisinler Üzerine Etkisi.....	94
4.6.1. Helva üretiminin etkisi	95
4.6.2. Kuymak üretiminin etkisi.....	102
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	106
KAYNAKLAR.....	110
EKLER.....	122
ÖZGEÇMİŞ	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Çeşitli A grubu trikotesenlerin kimyasal yapıları.....	7
Şekil 2.2. Çeşitli B grubu trikotesenlerin kimyasal yapıları.....	7
Şekil 2.3. ZEA'nın kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.4. ZEA'nın bazı metabolitlerinin kimyasal yapıları.....	12
Şekil 2.5. Fumonisinlerin kimyasal yapıları.....	15
Şekil 2.6. DON ve DON-3-glukozidin kimyasal yapıları.....	20
Şekil 2.7. Bazı DON türevlerinin kimyasal yapıları; (a) 3-keto DON, (b) izoDON, (c) de-epoksi DON, (d) norDON A, (e) norDON B, (f) norDON C.....	23
Şekil 2.8. ZEA-4G'nin yapısı.....	25
Şekil 2.9. HFB ₁ 'in oluşumu ve kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.10. Bağlı-FB ₁ 'in oluşum yolları.....	29
Şekil 2.11. Isıl işlem koşullarında oluşan FB ₁ parçalanma ürünlerinin yapıları.....	31
Şekil 2.12. NCM-FB ₁ oluşumunun şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan mısır örneklerinin sağlandığı bölgeler...	38
Şekil 3.2. (a) 250°C'de 15 dak, (b) 200°C'de 30 dak, (c) 150°C'de 3 saat ve (d) 100°C'de 3 saat ısıtım uygulanan model sistem örnekleri.....	41
Şekil 3.3. Genleştirilmiş ürünlerin üretiminde kullanılan cihaz.....	43
Şekil 3.4. Genleştirilmiş mısır ürününün görüntüsü.....	43
Şekil 3.5. Mısır helvası.....	44
Şekil 3.6. Kuymak.....	44
Şekil 3.7. DON analizi için çok basamaklı ekstraksiyonun şematik gösterimi.....	46
Şekil 4.1. (a) Yüksek, (b) orta ve (c) düşük düzeyde DON içeren unlar için ekstraksiyon verilerinin grafiksel ifadesi.....	60
Şekil 4.2. Ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilebilir DON miktarına etkisi.....	62
Şekil 4.3. Mısır örneklerinin DON düzeyleri.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.4. Mısır örneklerinin T-2 ve HT-2 düzeyleri.....	66
Şekil 4.5. Mısır örneklerinin ZEA düzeyleri.....	67
Şekil 4.6. Mısır örneklerinin FB ₁ , FB ₂ ve FB ₃ düzeyleri.....	67
Şekil 4.7. (a) 100°C'de 3 saat (b) 150°C'de 3 saat (c) 200°C'de 30 dak ve (d) 250°C'de 15 dak süreyle ısıtma sırasında fırında ve disklerde ölçülen sıcaklıklar.....	71
Şekil 4.8. Hamur disklerinin 250, 200 ve 150°C'de ısıtılması sonucu ZEA seviyesindeki % azalmalar.....	73
Şekil 4.9. Model sistemde ZEA için 250°C, 200°C ve 150°C'de termal bozunma hız sabitlerini (k) veren grafikler.....	74
Şekil 4.10. ZEA'nın termal bozunma reaksiyonu için Arrhenius grafiği.....	76
Şekil 4.11. Hamur disklerinin 250, 200 ve 150°C'de ısıtılması sonucu DON seviyesindeki % azalmalar.....	79
Şekil 4.12. Model sistemde DON için 250°C, 200°C ve 150°C'de termal bozunma hız sabitlerini (k) veren grafikler	80
Şekil 4.13. DON'un termal bozunma reaksiyonu için Arrhenius grafiği.....	81
Şekil 4.14. ZEA analizleri için kullanılan ekmeğin pişirme sıcaklık profilleri.....	83
Şekil 4.15. ZEA için (a) ekmek içi ve (b) kabuğunda zamana karşı kısmi yüzde bozunma grafikleri.....	85
Şekil 4.16. DON analizleri için kullanılan ekmeğin pişirme sıcaklık profilleri.....	87
Şekil 4.17. DON için (a) ekmek içi ve (b) kabuğunda zamana karşı kısmi yüzde bozunma grafikleri.....	87
Şekil 4.18. Helva yapımı sırasında ölçülen ortalama sıcaklık değerleri....	95
Şekil 4.19. Mısırın helvaya işlenmesi sonucu FB ₁ ve FB ₂ 'nin serbest ve bağlı formları arasındaki dönüşümleri ve reaksiyona girme oranlarının şematik gösterimi.....	101

ŒEKİLLER DİZİNİ (devam)

	<u>Sayfa</u>
Œekil 4.20. Kuymak yapımı sırasında ölçölen ortalama sıcaklık değerleri.	102
Œekil 4.21. Mısırın kuymağa işlenmesi sonucu FB_1 ve FB_2 'nin serbest ve bağlı formları arasındaki dönüşömlerinin Œematik gösterimi...	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Mısır örnekleri.....	39
Çizelge 3.2. DON için çok basamaklı ekstraksiyon denemesindeki koşullar.....	46
Çizelge 3.3. DON analizi için HPLC koşulları.....	47
Çizelge 3.4. T-2 ve HT-2 analizi için HPLC koşulları.....	48
Çizelge 3.5. T-2 ve HT-2 analizi için HPLC'de uygulanan lineer gradiyen programı.....	48
Çizelge 3.6. ZEA analizi için HPLC koşulları.....	49
Çizelge 3.7. FB ₁ ve FB ₂ analizi için HPLC koşulları.....	51
Çizelge 3.8. FB ₁ ve FB ₂ analizi için HPLC'de uygulanan lineer gradiyen programı.....	51
Çizelge 3.9. MRM metodu ile mikotoksin dedeksiyonu için MS/MS parametreleri.....	54
Çizelge 3.10. LC-MS/MS'de uygulanan lineer gradiyen programı.....	54
Çizelge 4.1. Farklı düzeylerde DON içeren mısır unlarında her bir ekstraksiyon basamağında belirlenen DON düzeyleri (µg/kg) ve ekstraksiyon verimleri (%)......	59
Çizelge 4.2. Mısır unları için k_{ext} , E_{90} , N ve C_0 değerleri.....	61
Çizelge 4.3. FB'lerin LC-MS/MS ile analizinde iki farklı denemede elde edilen sonuçlar ve HPLC yönteminin sonuçları ile karşılaştırılması.....	63
Çizelge 4.4. Farklı sıcaklıklarda ısıtılan hamur disklerinde ZEA seviyeleri ve una göre meydana gelen % azalmalar (n=2). 72	72
Çizelge 4.5. ZEA için farklı sıcaklıklardaki termal bozunma verileri.....	75
Çizelge 4.6. Farklı sıcaklıklarda ısıtılan hamur disklerinde DON seviyeleri ve una göre meydana gelen % azalmalar (n=2). 78	78
Çizelge 4.7. DON için farklı sıcaklıklardaki termal bozunma verileri.....	81
Çizelge 4.8. Ekmek içi ve kabuğunda deneysel olarak belirlenen ve modelden tahmin edilen ZEA azalmalarının karşılaştırılması (n=2)......	85

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.9. Ekmek içi ve kabuğunda deneysel olarak belirlenen ve modelden tahmin edilen DON azalmalarının karşılaştırılması (n=3).....	88
Çizelge 4.10. Genleştirilmiş mısır ürünlerinde ZEA düzeyindeki azalmalar.....	91
Çizelge 4.11. Genleştirilmiş mısır ürünlerinde DON düzeyindeki azalmalar.....	92
Çizelge 4.12. Mısır için fumonisin analiz yöntemlerinin geri kazanımları (n=3).....	96
Çizelge 4.13. Helva için fumonisin analiz yöntemlerinin geri kazanımları (n=3).....	96
Çizelge 4.14. Farklı mısır örneklerinin FB, toplam HFB ve % bağlı-FB düzeyleri.....	97
Çizelge 4.15. Mısır ve helvada FB ₁ ve toplam HFB ₁ düzeyleri (n=3).....	98
Çizelge 4.16. Mısır ve helvada FB ₂ ve toplam HFB ₂ düzeyleri (n=3).....	98
Çizelge 4.17. Mısır ve helvadaki bağlı-FB düzeyleri.....	100
Çizelge 4.18. Kuymak için fumonisin analiz yöntemlerinin geri kazanımları (n=3).....	102
Çizelge 4.19. Mısır ve kuymakta FB ₁ ve toplam HFB ₁ düzeyleri (n=3).....	103
Çizelge 4.20. Mısır ve kuymakta FB ₂ ve toplam HFB ₂ düzeyleri (n=3).....	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1-AN	1-antrolnitril
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATA	alimenter toksik alösemi
Bağlı-FB	bağlı fumonisin
Bağlı-FB ₁	bağlı fumonisin B ₁
Bağlı-FB ₂	bağlı fumonisin B ₂
C	<i>n.</i> basamakta ekstrakte edilen analit konsantrasyonu <i>t</i> anında örnekteki toksin konsantrasyonu
C ₀	analitin başlangıç (matristeki toplam) konsantrasyonu mısır unundaki başlangıç toksin konsantrasyonu
C _{0, deneysel}	deneysel olarak belirlenen başlangıç toksin konsantrasyonu
C _{0, grafik}	grafiksel olarak hesaplanan başlangıç toksin konsantrasyonu
DAD	diyot dizini (diode array) dedektör
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DON	deoksinivalenol
DON-3G	DON-3-glukozid
E _A	reaksiyon aktivasyon enerjisi (eşik enerjisi)
E ₉₀	analitin %90'ını ekstrakte etmek için gerekli ekstraksiyon basamağı sayısı
EC	European Commission
ESI	elektrosprey iyon kaynağı
FB	fumonisin
FB ₁	fumonisin B ₁
FB ₂	fumonisin B ₂
FB ₃	fumonisin B ₃
FLD	floresans dedektör
GF/A	cam mikrofiber filtre
HCl	hidroklorik asit
HFB	hidrolize fumonisin
HFB ₁	hidrolize fumonisin B ₁
HFB ₂	hidrolize fumonisin B ₂
HPLC	yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HT-2	HT-2 toksin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

IARC	Kanser Araştırma Merkezi
IMA	immunoafinite
k	termal bozunma (birinci derece) hız sabiti
k_{ext}	ekstrakte edilebilirlik
KOH	potasyum hidroksit
LC-MS/MS	sıvı kromatografisi - kütle spektrometresi / kütle spektrometresi
LOD	tespit sınırı
LOQ	tayin sınırı
MRM	multiple reaction monitoring
n	ekstraksiyon basamağı sayısı
N	E_{90} 'ın tamsayı fonksiyonu
OPA	o-fitaldialdehit
PBS	fosfat tamponu (pH=7.4)
PEG	polietilen glikol
PHFB	kısmen hidrolize fumonisin
r^2	belirleme katsayısı
r	korelasyon katsayısı
R	evrensel gaz sabiti
RSD	relatif standard sapma
SAX	kuvvetli anyon değiştirici (strong anion exchange)
SD	standard sapma
SPE	katı faz ekstraksiyon
t	işlem süresi
$t_{1/2}$	toksin yarılanma süresi
T-2	T-2 toksin
TCA	trikarboksilik asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZEA	zearalenon
ZEA-4G	ZEA-4-glukozid

1. GİRİŞ

Hububat ve ürünleri, insan beslenmesindeki en temel ürünlerdir. Hayvan yemi, tohumluk gibi çeşitli endüstri alanlarında da yoğun şekilde kullanıldığı için ülkemiz ekonomisinde önemli yer tutmaktadır. Ancak hububatta gelişen küfler tohumun kalitesini bozarak gıda ve yem üretiminin her aşamasında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ekonomik boyutun ötesinde, küflerin ürettiği mikotoksin adı verilen toksik metabolitler sağlık açısından büyük tehdit oluşturmaktadır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) dünyada tarım ürünlerinin %25'inde çeşitli mikotoksinlerin varlığını bildirmektedir (Kabak et al., 2006).

Mikotoksinler, canlılar üzerindeki akut toksisiteden kansere kadar değişebilen etkileri nedeniyle, gıda ve yemlerde bulunan, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden kimyasal bulaşanların en önemlilerinden biridir. Toprakta yaygın olarak bulunan *Fusarium* cinsi küfler, özellikle Amerika, Avrupa ve Asya kıtalarının ılıman bölgelerinde yetiştirilen tahıllarda gelişerek mikotoksinleri üretmektedir. Tahıllarda sıklıkla ve önemli miktarlarda bulunabilen başlıca *Fusarium* mikotoksinleri fumonisinler, zearalenon ve trikotesenlerdir. Bu mikotoksinler tüm dünyada gıda zincirinde önemli bir ekonomik değere sahip olan mısır, arpa, yulaf, buğday ve pirinç gibi tahıl ürünlerinde oluşmaktadır.

Dünyada her yıl yaklaşık 600 milyon ton mısır üretilmekte ve yaklaşık %63'ü doğrudan hayvan yemi olarak kullanılmakta, %25'i ise değişik yollarla gıda zincirine girmektedir (Humpf and Voss, 2004). Mısır hasat edildiğinde yüksek nem içerdiğinden küf gelişimi sadece tarladaki ile sınırlı kalmayıp depolamada da devam etmektedir. Oluşan kayıplar ürünün türü, sıcaklık, nem, havalandırma ve böceklerin varlığı gibi çok sayıda faktörün etkisine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Tarımda küf bulaşması ve gelişiminin engellenmesinde büyük güçlüklerle karşılaşmaktadır. Küflerin zor koşullarda bile üreyebilmeleri nedeniyle, çevresel faktörlere ve ürüne bağlı olmak üzere, tarlada, hasatta ve sonrasında mikotoksinlerin tahıllardaki varlığını tümüyle önlemek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle, mikotoksinlerin son ürünlerdeki kalıntılarının fiziksel, kimyasal ve biyolojik teknikler ile uzaklaştırılması veya azaltılması hedeflenmektedir. Bu toksinlerin, çeşitli ürünlerin üretimi sırasında uğradıkları kayıpların tespiti ve son üründe hangi ölçüde azaltılabildiklerinin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

Tüketicilerin günlük beslenme ile mikotoksinlere ne kadar maruz kaldığı, son ürünlerdeki toksin düzeyleri ile ilgilidir. Mikotoksinler için hammadde ve işlenmiş son ürünlerdeki limitler ulusal ve uluslararası mevzuatta belirlenmiştir. Son ürünlerdeki limitler, üretim tekniklerinin mikotoksinler üzerindeki etkilerine göre belirlenmiştir. Bu nedenle, mikotoksinlerin tarımsal ürünlerdeki varlığının izlenmesi kadar hasat sonrası hammaddeye uygulanan işlemler ve gıda işleme tekniklerinin mikotoksin düzeylerine etkisinin belirlenmesi de risk yönetimi açısından önem taşımaktadır (Kushiro, 2008). Mikotoksinlerin, gıda ve yemlerde limitlerin altında tutulabilmesini sağlayabilmek için uygun yöntemlerin araştırılması gerekmektedir.

Mikotoksinler üzerinde etkili olabilen fiziksel yöntemler ayıklama, temizleme, kabuk soyma, öğütme gibi ön işlemler ile pişirme, fırınlama, kızartma, ekstrüzyon gibi ısı işlemlerdir (Bullerman and Bianchini, 2007). Kimyasal yöntemler ise amonyak, sodyum hidroksit ve ozon gibi kimyasalların kullanımına dayanmaktadır (Sağlam, 2008). Son yıllarda mikroorganizmalar kullanılarak biyolojik dekontaminasyon teknikleri ile de mikotoksinlerin uzaklaştırılmasına çalışılmaktadır (Caridi, 2007). İnsan tüketiminde kullanılan mısır çoğunlukla fiziksel işlemlerden geçirilerek gıda ürünleri veya katkı maddelerine işlenmektedir (Humpf and Voss, 2004). Isıl işleme dayalı pek çok üretim tekniğinin mikotoksinleri azaltıcı etkileri yıllardır araştırılmakta ve yüksek sıcaklık uygulamalarının toksinleri az da olsa uzaklaştırabildiği bildirilmektedir. Ancak ürünlerden mikotoksinleri tümüyle uzaklaştırabilen bir yöntem bulunmamaktadır.

Ülkemizin özellikle Karadeniz Bölgesi'nde önemli miktarda yetiştirilen bir tahıl olan ve giderek çeşitliliği artan bir ürün yelpazesi için hammadde oluşturan mısır, özellikle *Fusarium* cinsi küflerin gelişmesi ve mikotoksinlerini oluşturabilmesi için son derece uygun bir ortamdır. Bu nedenle buğdaydan sonra en önemli ve yaygın tüketilen mısır ve mısırdaki en baskın küf olan *Fusarium* türlerinin ürettiği toksinler, bu tez çalışmasının konusunu oluşturmuştur. Tez kapsamında, ağırlıklı olarak Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen mısır örnekleri incelenerek en sık rastlanan *Fusarium* toksinleri belirlenmiştir. Doğal kontamine mısırlardan farklı üretim teknikleri ile üretilen çeşitli mısır ürünlerinde, ısı işlemlerin toksinler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Tezde, Karadeniz Bölgesi'nin geleneksel ürünü olup tüm Türkiye'de tüketimi giderek artan mısır ekmeği ve yine Karadeniz Bölgesi'ne özgü kuymak ve helva ile ekstrüde ürünlere benzeyen genleştirilmiş mısır ürünleri çalışılmıştır. Kuymak mısır unu ve sütle yapılan ve çoğunlukla kahvaltılık olarak tüketilen bir üründür. Helva ise esas olarak mısır unu, tereyağı ve şerbet kullanılarak yapılmaktadır. Mısır ekmeğinin pişirme koşullarında bazı *Fusarium* toksinlerinin termal bozunma kinetiği model bir sistem kullanılarak ortaya konmuştur. Ekmek pişirme denemesi gerçekleştirilerek, deneysel olarak tespit edilen toksin bozunmalarının modelden tahmin edilen bozunma dereceleri ile uyumu araştırılmıştır. Genleştirilmiş mısır ürünlerinin ve kuymak ile helvanın üretimi sırasında da toksin miktarlarındaki azalmalar belirlenmiştir. Kuymak ve helva doğal kontamine mısır unundan geleneksel yolla hazırlanmış ve hem serbest hem de bağlı fumonisinler açısından analiz edilerek işleme sırasında fumonisinlerin uğradıkları değişiklikler araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi çeşitli küflerin metabolik faaliyetleri sonucunda oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip, organik yapıdaki doğal toksik bileşiklere verilen genel isimdir. Tahıl ve ürünleri temel gıda maddesi olmaları, yem maddesi olarak da yaygın olarak kullanılmaları ve küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi için hasat öncesinde, sırasında ve sonrasında elverişli bir ortam sağlamaları nedeniyle mikotoksin problemi açısından önem taşımaktadır (Arıcı et al., 2002; Oruç, 2005).

Tarımsal ürünlerde mikotoksin oluşumu, elverişli koşullar olduğu takdirde ve ürüne bağlı olmak üzere, hasat öncesinden tüketime kadar hemen her aşamada (hasat, taşıma, depolama ve kurutma gibi) meydana gelebilmektedir (Oruç, 2005). Literatürde tanımlanan yüzlerce mikotoksin olmasına rağmen, ölçülebilir sağlık riski taşıyanların sayısı sınırlıdır (Morgavi and Riley, 2007). Halk sağlığı ve tarımsal açıdan en büyük öneme sahip mikotoksinler arasında aflatoksinler, *Fusarium* toksinleri (zearalenon (ZEA), trikotesenler, fumonisinler gibi), okratoksinler, patulin ve ergot alkaloidleri sayılabilmektedir (Kabak et al., 2006).

Mikotoksinler arasında önem derecesine göre sıralama ülke ve bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte aflatoksinler, okratoksin A (OTA), fumonisinler, trikotesenler ve ZEA'nın birinci derecede önemli mikotoksinler olduğu konusunda araştırmacılar görüş birliğine varmışlardır. Örneğin mısırın önemli bir kontaminantı olan fumonisinler Amerika Birleşik Devletleri'nde birinci derecede önemli mikotoksinler arasında değerlendirilirken, mısırın beslenmede fazla kullanılmadığı Avustralya'da fumonisin varlığı önemli bir tehlike olarak görülmemektedir. Diğer taraftan Avrupa'da genel olarak sıcaklığın uygun olmaması nedeniyle yüksek düzeylerde aflatoksin oluşumuna rastlanmamakta ve ithal ürünlerin sıkı denetlenmesi nedeniyle de aflatoksinler tüketici sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmamaktadır (Oruç, 2005).

Mikotoksinler ile kontamine olmuş gıda ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda meydana gelen hastalıklara mikotoksikozis adı verilmektedir. Mikotoksikozise neden olan önemli mikotoksinler *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi küflerin oluşturduğu toksinlerdir. İlk mikotoksikozis vakası 1850'lerde *Claviceps*

purpurea'nın ergot adı verilen toksininin yol açtığı ergotizm zehirlenmesidir. Eller ve ayaklarda enfeksiyona bağlı olarak yanma hissine neden olan bu kangrenli zehirlenme, St. Anthony tarikatı papazları tarafından başarılı bir şekilde tedavi edilebilmiş ve bu nedenle tarihte "kutsal ateş" veya "Saint Anthony's fire" isimleri ile de anılmıştır. Dünyadaki önemli bazı mikotoksikozis vakaları arasında, 1942-1947 yıllarında Sovyetler Birliği'nde binlerce insanın ölümüne neden olan ve *Fusarium sporotrichioides* toksinlerinin yol açtığı alimenter toksik alösemi (ATA), Balkanlar'da okratoksinlerin neden olduğu Balkan endemik nefropatisi ve 1960 yılında İngiltere'de bazı *Aspergillus* türleriyle kontamine olmuş yer fıstığından kaynaklanan yaklaşık 100.000 hindi ve ördek yavrusunun ölüm olayları sayılabilir (Arıcı et al., 2002). Kenya'da da 2004 yılında, mısır ve ürünlerini tüketen insanlarda aflatoksikozis vakaları ortaya çıkmıştır (Oruç, 2005).

Mikotoksinlerin insan ve/veya hayvanlarda teratojenik, kanserojenik, östrojenik, nörotoksik, nefrotoksik ve bağıışıklığı baskılayıcı etkileri vardır (Kabak et al., 2006). Pek çok mikotoksin Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi (IARC) tarafından kesin veya potansiyel kanserojenler olarak sınıflandırılmıştır (Kuiper-Goodman, 2004). Genellikle toksinlerin diyetle günlük alım miktarları akut etki gösterebilmeleri için yetersiz olduğundan zehirlenmeler kronik gerçekleşmektedir (Oruç, 2005; Morgavi and Riley, 2007).

2.1.1. *Fusarium* cinsi küfler ve oluşturdukları mikotoksinler

Fusarium cinsi küfler Amerika, Avrupa ve Asya'nın ılıman bölgelerinde yetişen tahıllarda çok yaygın rastlanan küflerdir (Creppy, 2002). Bunlar tarla küfleri arasında değerlendirilmekle birlikte, toksinlerini sadece tarlada değil hasat sonrası depolama koşulları uygun olmadığında da üretebilmektedirler (WHO, 2011b). *Fusarium* cinsi küflerin oluşturduğu toksinler fusariotoksin olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Başlıca *Fusarium* toksinleri ZEA, trikotesenler ve fumonisinler olup, bunların dışında moniliformin, fusaproliferin, wortmannin, sambutoksin, fusarokromanon, fusarin C, equisetin, fusarik asit ve fusariosin gibi çok sayıda toksin de *Fusarium* küfleri tarafından oluşturulmaktadır (Scott, 2004). *Fusarium* küflerinin hemen hepsi bu toksinlerin iki veya daha fazlasını değişen derecelerde oluşturabilme yeteneğindedir. Bu küfleri, sadece birkaç türü toksin oluşturabilen

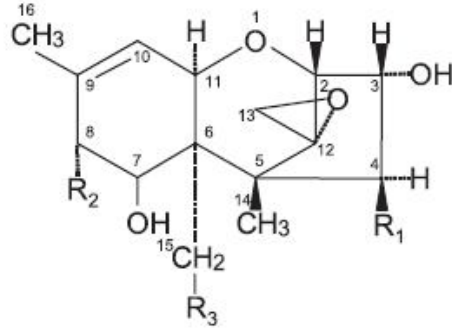
Aspergillus ve *Penicillium* cinsi küflerden ayıran temel özellik budur (Magnoli et al., 1999; Arıcı et al., 2002).

2.1.1.1. Trikotesenler

Trikotesenler yaklaşık 190 adet yapıca benzer molekülün oluşturduğu bir gruptur ve tümü uçucu olmayan, düşük molekül ağırlıklı seskiterpen epoksitlerdir. Bu moleküller, temel halka sistemlerini oluşturan bir tetrasiklik 12,13-epoksi-trikotek-9-en yapısı ile karakterize edilirler (Şekil 2.1 ve 2.2). 12. ve 13. karbon atomları arasında yer alan ve epoksit yapısı oluşturan moleküller oksijen toksisitede önemli role sahiptir. Çoğu trikotesen 9. ve 10. karbon atomları arasında çift bağa sahiptir ve bu özelliğin de toksisitede etkili olduğu düşünülmektedir (Kushiro, 2008; Döll and Dänicke, 2011; Li et al., 2011).

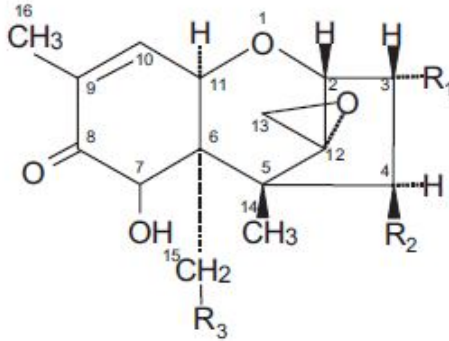
Trikotesenler fungal üreticilerine ve kimyasal özelliklerine göre A, B, C ve D olmak üzere dört gruba ayrılırlar. A ve B grubu trikotesenler doğada en yaygın rastlanan trikotesenlerdir (Krska et al., 2007). B grubu trikotesenler C-8 konumunda bir karbonil grubu içerirken A grubunun üyelerinde bu konumda fonksiyonel bir grup bulunmaktadır (Sweeney and Dobson, 1998; Döll and Dänicke, 2011). Bu özellik ve A grubu trikotesenlerin genellikle daha az hidroksil grubu içeriyor olması, bu toksin grubunu daha az polar yapmakta ve bu durum ekstraksiyon, saflaştırma ve tanımlama gibi analitik prosedürlerin farklı olmasına yol açmaktadır. A grubu trikotesenler içinde T-2 ve HT-2 toksinleri, B grubunda ise deoksinivalenol (vomitoksin, DON), nivalenol (NIV) ve fusarenon X (FUS-X) en önemlileridir (Krska et al., 2007).

Diğer taraftan C grubu trikotesenlerin C-7,8 veya C-9,10 konumlarında ikinci bir epoksit grubu bulunmakta, D grubu trikotesenler ise iki ester bağı ile C-4 ve C-5 arasında bir makrosiklik halka içermektedirler (Sweeney and Dobson, 1998).



Trikotesen	R ₁	R ₂	R ₃
T-2 toksin	OCOCH ₃	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCOCH ₃
HT-2 toksin	OH	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCOCH ₃
Tip A Neosolaniol (NEO)	OCOCH ₃	OH	OCOCH ₃
4,15-Diasetoksisirpenol (DAS)	OCOCH ₃	H	OCOCH ₃
15-Monoasetoksisirpenol (MAS)	OH	H	OCOCH ₃

Şekil 2.1. Çeşitli A grubu triketosenlerin kimyasal yapıları (Döll and Dänicke, 2011)



Trikotesen	R ₁	R ₂	R ₃
Deoksinivalenol (DON)	OH	H	OH
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH
Tip B 4-asetil nivalenol (Fusarenon-X)	OH	OCOCH ₃	OH
3-asetil DON	OCOCH ₃	H	OH
15-asetil DON	OH	H	OCOCH ₃

Şekil 2.2. Çeşitli B grubu triketosenlerin kimyasal yapıları (Köppen et al., 2010; Döll and Dänicke, 2011).

Trikotesen üretebilen *Fusarium* türleri soğuk ve nemli koşullarda iyi bir şekilde gelişerek, mısırdaki "koçan çürüklüğü", küçük taneli tahıllarda ise "başak yanıklığı"na (*Fusarium* head blight) neden olmaktadır. En yaygın rastlanan toksijenik *Fusarium* türü olan *F. graminearum*'un optimum gelişme aralığı 24-26°C olup, minimum su aktivitesi gereksinimi 0.90'dır. Toksin üretim koşulları küfün gelişme koşullarına benzer olmakla birlikte, toksin üretimi genel olarak daha dar bir aralıkta gerçekleşmektedir. Bu küf DON ve NIV'in yanısıra ZEA da üretmektedir (Sweeney and Dobson, 1998). DON, NIV ve ZEA'nın yanısıra T-2 toksin de üretebilen *F. sporotrichioides*'in optimum gelişme sıcaklığı ise 22.5-27.5°C arasında olup maksimum 35°C, minimum -2°C'de gelişimini sürdürebilmektedir. Psikrotrof bir suş olan *F. culmorum* ise 0°C'de gelişebilmekte, optimum gelişimini 21°C'de gerçekleştirmektedir (Sweeney and Dobson, 1998; Sanchis and Magan, 2004).

Trikotesenlerin genel olarak memeli hücrelerine sitotoksik etkisi olduğu ve ATA gibi hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca immunotoksik özelliktedirler ve protein sentezinin güçlü inhibitörleridir. Trikotesenler vücutta diğer mikrobiyal enfeksiyonlara hassasiyetin artmasına neden olabilmektedir (Sweeney and Dobson, 1998). Trikotesenlerin neden olduğu klinik etkiler iştahsızlık, nekroz, gastroenterik etkiler ve koagülopati (pıhtılaşma bozukluğu) olmak üzere dört grup altında toplanmaktadır. Yüksek dozda tüketilmesi halinde kusma, kilo kaybı, yem tüketiminde azalma (anoreksiya), kanlı diyare, şiddetli dermatit gibi akut etkiler görülmekte ve hatta ölüme yol açabilmektedirler. Genel olarak A grubu trikotesenlerin toksisitesi B grubu üyelerininkinden daha fazladır (Morgavi and Riley, 2007; Yazar and Omurtag, 2008).

Deoksinivalenol (DON)

DON tahıllarda en yaygın rastlanan ve B grubuna dahil olan bir trikotesendir (Bretz et al., 2006; Murphy et al., 2006). Tahıllarda genellikle NIV ve ZEA ile beraber bulunmaktadır (Kushiro, 2008). Bu toksini oluşturan başlıca iki *Fusarium* türü olan *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un optimum gelişme sıcaklıklarının farklı oluşu (sırasıyla 25 ve 21°C) toksinin coğrafik dağılımını etkilemektedir. Tarlada DON oluşumu iklim koşullarına bağlı olup, düşük sıcaklık ve yüksek nem içeriği ile teşvik edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde, tahıllar nem içeriği %13'ün altında olacak şekilde

muhafaza edildiği için DON hasat öncesinde problem olarak ortaya çıkmaktadır (Yazar and Omurtag, 2008).

Kimyasal formülü 12,13-epoksi-3,7,15-trihidroksi-trikotek-9-en-8-on olan DON ($C_{15}H_{20}O_6$), akut olarak kusmaya neden olduğundan vomitoksin adıyla da anılmaktadır (Şekil 2.2) (Krska et al., 2007; Döll and Dänicke, 2011). DON'un toksikolojik etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına karşın bir mutajen veya kanserojen olarak değerlendirilmemektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar DON'un hızla ve büyük oranda üst gastrointestinal sistemden absorblendiğini ve plazmadaki yarı ömrünün kısa olduğunu ortaya koymuştur (WHO, 2011a). IARC 1993 yılında DON'u, insan için kanserojen olarak sınıflandırılmayan bileşiklerin bulunduğu 3 nolu gruba yerleştirmiştir (Creppy, 2002).

DON'un mono-asetillenmiş türevleri olan 3-asetil-deoksinivalenol (3-Ac-DON) ve 15-asetil-deoksinivalenol (15-Ac-DON) de tahıllarda doğal olarak bulunabilen küf metabolitleridir. Bu bileşikler DON biyosentezi sırasında üretilen ara ürünlerdir. Asetillenmiş DON bileşikleri DON kadar toksik olup toksisiteleri vücutta DON'a dönüşmelerinden kaynaklanmaktadır. *In vivo* çalışmalarda 3-Ac-DON'un absorpsiyonundan sonra plazmada DON'un başlıca metabolit olarak saptanması, metabolizmada deasetilasyonun hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (WHO, 2011a; Maul et al., 2012)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarında, mevcut sınırlı verilere dayanarak, insanlarda akut intoksikasyona yol açmayacak DON düzeyinin yaklaşık 50 µg/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir. Diyetle günlük alınan toplam DON miktarları ise en düşük Afrika'da 0.77 µg'dan, en yüksek Orta Doğu'da olmak üzere 2.4 µg'a kadar değişmektedir. Dünyanın değişik bölgelerinde çeşitli tahıllarda yapılan DON taramalarına göre, kontaminasyon düzeyleri her bir bölgede ve bölgeler arasında çok büyük değişkenlik göstermiştir. Buğdayda en yüksek ortalama düzeyin 9900 µg/kg, mısırdaki 4772 µg/kg, arpada 6349 µg/kg ve yulafta 537 µg/kg olduğu bildirilmiştir. Ekmek, bira, bisküvi, makarna, erişte ve polenta gibi işlem görmüş ürünlerde DON düzeylerinin daha düşük olduğu ve 1250 µg/kg'ı geçmediği rapor edilmiştir (WHO, 2011a). 2007 yılında Avrupa Komisyonu tarafından DON için en düşük limit tahıl bazlı bebek mamaları ve çocuk gıdaları için (200 µg/kg), en

yüksek limit ise işlenmemiş durum buğdayı, yulaf ve mısır için (1750 µg/kg) verilmiştir (EC, 2007).

T-2 ve HT-2 toksin

T-2 ve HT-2 toksinler A grubu trikotesenlerden olup, *F. sporotrichioides*, *F. poae* ve *F. acuminatum* gibi *Fusarium* türleri tarafından üretilmektedir. Bu küfler özellikle soğuk iklim bölgelerinde veya nemli depolama koşullarında gelişmektedirler. T-2 toksinle en sık kontamine olan tahıllar mısır, buğday ve yulaf iken, HT-2 toksinin en önemli kaynakları sırasıyla yulaf, mısır ve çavdardır (Lippolis et al., 2008; Li et al., 2011). Ayrıca bu toksinlerin arpa, pirinç, soya fasülyesi ve çeşitli tahıl ürünlerindeki varlığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. T-2 toksin, diğer trikotesenlere göre daha az rastlanan bir toksin olmasına rağmen, en yüksek toksisiteye sahip trikotesen olduğu için önemi giderek artmıştır (Li et al., 2011). Avrupa'da T2 ve HT-2 toksinin günlük alımının sırasıyla 7.6 ve 8.7 ng/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir (Sudakin, 2003; Visconti et al., 2005).

Molekül formülü $C_{24}H_{34}O_9$ olan T-2 toksin uçucu değildir ve beyaz kristal halde bulunur. Isı ve ışığa dayanıklı olup, kuvvetli alkali veya asidik koşullarda kolaylıkla parçalanabilmektedir (Yagen and Bialer, 1993; Li et al., 2011). Sitotoksik etkili bir toksin olup, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda protein sentezi inhibitörüdür (Yagen and Bialer, 1993; Visconti et al., 2005). 12 ve 13. karbonlar arasındaki epoksit yapısının önemli oranda toksisiteden sorumlu olduğu, 8. karbon atomuna bağlı olan asetil grubunun da toksisiteye farklı oranlarda katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Şekil 2.1) (Yagen and Bialer, 1993). Hayvanlarda kilo kaybı, lökosit ve kan hücrelerinin sayısında azalma, plazma glukoz seviyesinde azalma ile karaciğer ve midede patolojik değişimler gibi çok çeşitli etkilere yol açabilmektedir. Ayrıca ATA hastalığı ve DNA hasarı ile de ilişkilendirilmektedir. Akut etkileri arasında kusma, diyare, kilo kaybı, bağışıklığın azalması, nekroz ve ölüm bulunmaktadır (Li et al., 2011).

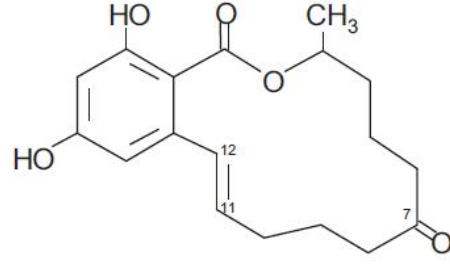
Gıda ve yemlerle alınan T-2 toksin *in vivo* koşullarda hızla HT-2 toksine ve çeşitli ürünlere metabolize edilmektedir (Visconti et al., 2005; Li et al., 2011). T-2 toksinin C-4 konumundaki asetat grubunun hidrolizi ile HT-2 toksin oluşmakta, C-15 ve C-8 konumlarındaki hidroliz ise T-2 triol, neosolaniol (NEO) ve T-2 tetraol gibi moleküllerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.1). T-2'nin *in vivo* yarı ömrü

çok kısadır ve gastrointestinal sistemdeki bakterilerin hidrolizde etkili olduğu gösterilmiştir. Toksin dışkı veya idrarla başlıca HT-2 ve neosolaniol halinde atılmaktadır (Yagen and Bialer, 1993). T-2 toksinin metabolitlerinin toksisitesi hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Ancak mevcut bilgiler T-2 ve HT-2 toksinlerinin benzer toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir (Lippolis et al., 2008).

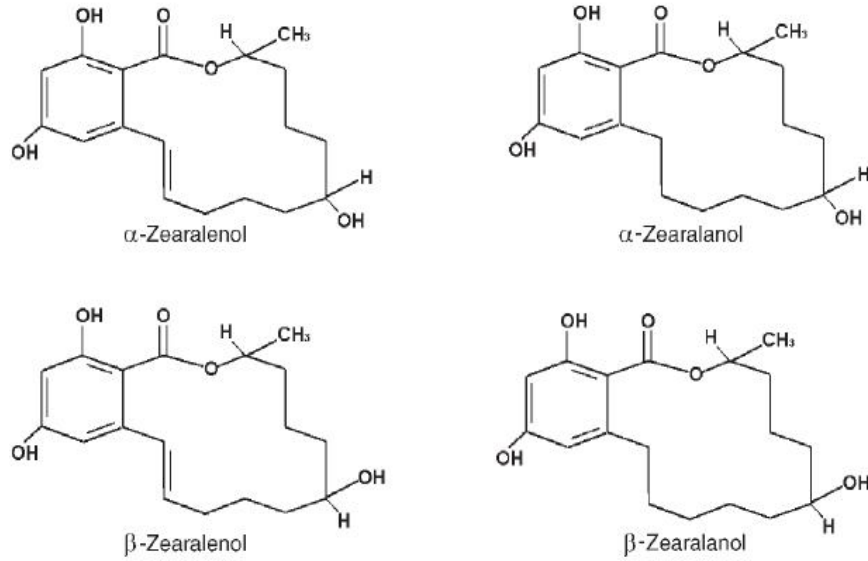
2.1.1.2. Zearalenon (ZEA)

ZEA *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* ve *F. equiseti* gibi *Fusarium* türleri tarafından mısır başta olmak üzere çeşitli tahıllarda sıklıkla oluşturulan östrojenik yapılı bir mikotoksindir (Alldrick and Hajšelová, 2004). Yapısal olarak bir β -resorsiklik asit lakton olup kimyasal ismi 6-(10-hidroksi-6-okzo-trans-1-undesenil)- β -resorsiklik asit lakton'dur ($C_{18}H_{22}O_5$) (Şekil 2.3). *F. graminearum* 25–30°C'de ve 0.90–0.91 su aktivitesi koşullarında ZEA üretimini gerçekleştirebilmektedir (Sanchis and Magan, 2004; Krska et al., 2007; Döll and Dänicke, 2011). ZEA'nın türevleri olan α -zearalenol (α -ZEA), β -zearalenol (β -ZEA), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL) ve zearalanona da *Fusarium* türleri ile enfekte olmuş mısırlarda rastlanabilmektedir (Şekil 2.4) (Minervini et al., 2005).

ZEA düşük toksisiteli ancak östrojenik etkili bir mikotoksindir. Östrojenik etkisi, östradiol ile yapısal olarak benzerlik göstermesinden kaynaklanmaktadır (Morgavi and Riley, 2007). ZEA ve bazı metabolitlerinin *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde östrojen reseptörlerine yarışmalı olarak bağlandığı gösterilmiştir. Yemlerdeki miktarına bağlı olarak hayvanlarda doğurganlığın azalması, serum progesteron ve estradiol düzeylerinin değişmesi gibi etkilere yol açmaktadır (Creppy, 2002; Minervini et al., 2005; Oruç, 2005). ZEA ve türevlerinin östrojen reseptörlerine bağlanma afiniteleri α -ZEA, β -ZAL, ZEA ve β -ZEA sırasıyla azalmaktadır. α -ZEA'nın östrojenik etkisi ZEA'ya göre üç kat daha fazladır (Morgavi and Riley, 2007; Yazar and Omurtag, 2008). Farelerin uzun süre ZEA'ya maruz kalması sonucu gelişen kanser nedeniyle ZEA, IARC tarafından 3. grup kanserojenler içerisinde sınıflandırılmıştır (Creppy, 2002; Oruç, 2005).



Şekil 2.3. ZEA'nın kimyasal yapısı (Döll and Dänicke, 2011)



Şekil 2.4. ZEA'nın bazı metabolitlerinin kimyasal yapıları (Aldrick and Hajšelová, 2004)

FAO/WHO Komitesinin raporlarında, tahıl ve baklagillerden günlük ortalama ZEA alımı en düşük Avrupa'da ($0.03 \mu\text{g}/\text{kg}$ vücut ağırlığı), en yüksek ise Orta Doğu'da ($0.06 \mu\text{g}/\text{kg}$ vücut ağırlığı) bildirilmektedir (WHO, 2000). Gıdalarda bulunabilecek ZEA miktarları ile ilgili olarak Avrupa Komisyonu tarafından bildirilen limitler, mısır dışındaki işlem görmemiş tahıllar için $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, işlem görmemiş mısır için $350 \mu\text{g}/\text{kg}$, doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar (kahvaltılık gevrekler, çerezler ve çocuk ve bebek mamaları hariç) için $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ ve ekmek için $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 'dır (EC, 2007).

2.1.1.3. Fumonisinler

Fusarium toksinleri arasında insan ve hayvan sağlığı açısından en tehlikeli olanlarından birisi de fumonisinlerdir. Fumonisinler oldukça toksik ve kanserojen etkileri nedeniyle son yıllarda giderek daha çok önem kazanmıştır (Arıcı et al., 2002).

Fumonisinler *F. verticillioides* (*F. moniliforme*) ve *F. proliferatum* başta olmak üzere *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. oxysporum*, *F. diamini* ve *F. globosum* gibi pek çok *Fusarium* türü tarafından üretilmektedir. İlk olarak 1988 yılında Güney Afrika'da, mısırdan elde edilen *F. verticillioides* kültürlerinden izole ve karakterize edilmiştir (Magnoli et al., 1999; Arıcı et al., 2002). Bu tarihte, atların beyin hücrelerinde ölüm ve domuzlarda akciğer ödemi sendromu ortaya çıkmış ve yem olarak kullanılan mısır örneklerinde fumonisinler yüksek seviyelerde bulunmuştur (Arıcı et al., 2002).

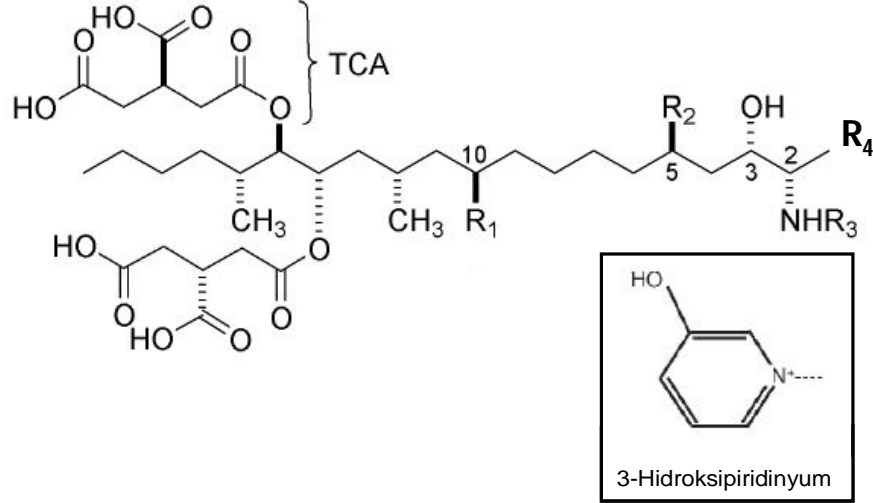
F. proliferatum ve *F. verticillioides*'in optimum gelişme sıcaklık aralığı 22.5-27.5°C olup, gelişme gösterebildikleri sıcaklık aralıkları minimum 2-5°C ve maksimum 32-37°C olarak bildirilmektedir. Toksin retimi için en uygun sıcaklık aralığı ise 15–30°C'dir. Bu küflerin hem gelişimi hem de toksin üretimi artan su aktivitesi değerleri ile artış göstermiş olup, 0.90 küflerin gelişimi için, 0.93 ise toksin üretimi için ihtiyaç duydukları minimum su aktivitesidir. Ayrıca *Fusarium* türlerince fumonisin üretimi anaerobik koşullarda artış eğerilimi göstermektedir (Sweeney and Dobson, 1998).

Yapılan araştırmalar, fumonisinlerin tarım ürünleri arasında en çok mısır ve ürünlerinde doğal kontaminantlar olarak bulunduğunu göstermektedir (Arıcı et al., 2002; Jackson and Jablonski, 2004; Krska et al., 2007). Özellikle Güney Avrupa lkeleri ile Kuzey ve Güney Amerika gibi ılıman bölgelerde yetişen mısırlar fumonisin üretimi için çok uygundur. Mısır daha tarladayken fumonisinler oluşabilmekte ve depolama sırasında tane belli bir su aktivitesinin altına düşünceye kadar toksin üretimi devam etmektedir. Buğday ve arpada fumonisinlerin daha az oluşması, fumonisin biyosentezinin tahıl kompozisyonundan etkilediğini göstermektedir (Sanchis and Magan, 2004).

Çoğu mikotoksinin aksine fumonisinler siklik bir yapıda değildir (Şekil 2.5). Temel kimyasal yapıları, sfingolipidlerin omurgasını oluşturan sfingosine benzerdir. 19 veya 20 karbonlu bir aminopolihidroksialkil zincirinin propan-1,2,3-trikarboksilik asit (TCA) ile ardışık karbonlarda iki ester formu oluşturması sonucu oluşmaktadır (Arıcı et al., 2002; Jackson and Jablonski, 2004). Ana zincir yapıyı oluşturan 2-amino-12,16-dimetilpoli-hidroksieikozanların C-14 ve C-15 hidroksil gruplarının her biri TCA molekülünün terminal bir karboksil grubu ile esterleşmiştir. Özetle molekülün temelini trikarboksilik asit, hidroksil grupları ve alifatik yapı oluşturmaktadır (Shephard, 1998; Humpf and Voss, 2004). Moleküldeki primer amin grubu biyolojik aktivite ve toksisitede önemli rol oynamaktadır. Yapılan bir araştırmada amin grubu uzaklaştırılan FB₁'in toksik özellik göstermediği belirlenmiştir (Lemke et al., 2001).

Yapısal benzerlikleri dikkate alınarak başlıca üç fumonisin grubu tanımlanmıştır. A grubu fumonisinleri B grubundan ayıran özellik C-2 pozisyonunda amin grubu yerine bir *N*-asetil amid grubu bulunmasıdır. C grubu fumonisinler B grubu üyelerine benzemekle birlikte, terminal karbon atomunda (C1) metil grubu yer almamaktadır. (Jackson and Jablonski, 2004; Krska et al., 2007). Ayrıca P grubu olarak adlandırılan yeni bir fumonisin grubu da mısırdaki gelişen *F. proliferatum* kültürlerinden izole ve karakterize edilmiştir. Bu bileşiklerin C-2 konumlarında B grubu fumonisinlerdeki amin grubu yerine bir 3-hidroksipiridinyum grubu bulunmaktadır (Şekil 2.5) (Jackson and Jablonski, 2004).

B grubu fumonisinler içerisinde fumonisin B₁ (FB₁), fumonisin B₂ (FB₂) ve fumonisin B₃ (FB₃) en önemlileri ve gıdalarda doğal olarak en fazla bulunanlarıdır. En yaygın rastlanan ve makrofüsun olarak da bilinen FB₁, doğal kontamine gıda ve yemlerin toplam fumonisin miktarının yaklaşık %70-80'ini oluşturmaktadır (Sweeney and Dobson, 1998; Krska et al., 2007). Gıdalardaki fumonisin içeriğinin % 15-25'si FB₂, %3-8'i de FB₃'tür (Jackson and Jablonski, 2004).



Toksin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Grup A				
FA ₁	OH	OH	COCH ₃	CH ₃
FA ₂	H	H	COCH ₃	CH ₃
FA ₃	OH	OH	COCH ₃	CH ₃
Grup B				
FB ₁	OH	OH	H	CH ₃
FB ₂	H	OH	H	CH ₃
FB ₃	OH	H	H	CH ₃
FB ₄	H	H	H	CH ₃
Grup C				
FC ₁	OH	OH	H	H
FC ₃	OH	H	H	H
FC ₄	H	H	H	H

Şekil 2.5. Fumonisinlerin kimyasal yapıları (Humpf and Voss, 2004; Krska et al., 2007)

Fumonisinler kanseri teşvik edici ve/veya ilerletici etkileri nedeniyle giderek önem kazanmıştır (Sanchis and Magan, 2004). Özellikle FB₁ kanserojenik bir mikotoksin olarak kabul edilmektedir. Güney Afrika'da yapılan bir araştırmada, mısır tüketiminin fazla olduğu güney bölgede yemek borusu kanseri vakalarının yüksek olduğu, mısır tüketiminin daha az olduğu kuzey bölgede ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçların İtalya, Çin, Amerika, İran ve Uruguay gibi pek çok ülkede de ortaya çıkması sonucunda araştırmacılar, fumonisinler ile yemek borusu kanseri arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak konuyla ilgili toksikolojik mekanizma henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Arıcı et al., 2002; WHO, 2011b). Genel olarak fumonisinler, IARC tarafından 2B grubunda (insanlar

için olası kanserojen) sınıflandırılmıştır (Shephard, 1998; Soriano and Dragacci, 2004).

FB₁ and FB₂'nin sindirim sisteminden absorpsiyonu çok sınırlı düzeyde gerçekleşmekte ve hızla vücuttan atılmaktadır. Absorplanan fumonisinler daha çok karaciğer ve böbrekte birikmektedir. Sfingolipid biyosentezini inhibe etme özelliği, toksisitesi ve kanserojen özelliği ile ilişkilendirilmektedir (Sweeney and Dobson, 1998; Humpf and Voss, 2004). Diğer taraftan, yüksek fumonisin içeren yemlerle beslenen ineklerin sütünde FB₁ tespit edilememiştir (WHO, 2011b).

WHO'nun verilerine göre, dünyanın değişik bölgelerinde gıdalarla fumonisin alımı farklılık göstermektedir. Genel olarak popülasyonda günlük fumonisin alımı 1 µg/kg vücut ağırlığı'ndan düşük olarak tahmin edilirken, belli bölgeler ve popülasyon grupları için bu değer FB₁ için 7.6 µg'a ve toplam fumonisinler için 10.6 µg'a kadar çıkabilmektedir. Avrupa'da günde 0.2 µg/kg FB₁ alınırken, bu oran Afrika'da 2.4 µg/kg'a çıkmaktadır. Diğer taraftan mısır en temel fumonisin kaynağı olduğundan, mısır yetiştiren ve aynı zamanda fazla miktarda mısır tüketen ülkelerde FB₁ alımının daha yüksek düzeylerde olduğu belirtilmektedir (WHO, 2011b).

Avrupa Komisyonu gıda ve yemlerde bulunabilecek fumonisin limitlerini de belirlemiştir. FB₁ ve FB₂'nin toplamı için verilen bu limitler, işlem görmemiş mısırdaki 4000 µg/kg, doğrudan insan tüketimine sunulan mısır ve ürünlerinde ise (kahvaltılık gevrekler, çerezler ve çocuk ve bebek mamaları hariç) 1000 µg/kg'dır (EC, 2007).

2.2. Çeşitli Proseslerin Mikotoksinler Üzerine Etkileri

Gıdalara uygulanan işlemler mikotoksinlerin ürüden fiziksel olarak uzaklaşmasına, gıda bileşenlerine (şekerler, proteinler vb.) bağlanmasına veya kimyasal olarak başka bileşiklere dönüşmesine yol açabilmektedir (Humpf and Voss, 2004). Mikotoksinler üzerinde etkili olabilen gıda işleme teknikleri arasında ayıklama, temizleme, öğütme, mayalama, pişirme, yağda veya fırında kızartma, konserveleme ve ekstrüzyon sayılabilir. Isıl işlemlerin toksinler üzerindeki etkileri değişken olup genellikle uygulanan sıcaklık arttıkça detoksifikasyon etkisi artmaktadır. Ancak bu yöntemler ile mikotoksinleri tamamen elimine etmek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle öncelikle hammaddede bulaşının önlenmesi

veya bulaşan materyalin tüketimden uzaklaştırılması gibi önlemlerin alınması gerekmektedir. Hasat öncesinde mikotoksin oluşumunun önüne geçilebilmesi için toprağın ekime hazırlanmasından tahılın kurutma ve depolanmasına kadar uzanan sürecin tümünde uygun tarımsal yöntemlerin uygulanması gerekir. Bu önlemlerin yetersiz kaldığı durumlarda ise çeşitli detoksifikasyon yöntemleri uygulanabilir veya gıda işleme yöntemleri modifiye edilerek gıdalardaki mikotoksin düzeylerinin azaltılması sağlanabilir (Bullerman and Bianchini, 2007).

2.2.1. Isıl işlemlerin DON üzerine etkisi

Trikotesenlerin gıdalara uygulanan işlemler sırasındaki kararlılığının araştırıldığı çalışmalar çoğunlukla DON, NIV ve T-2 toksin üzerinde yoğunlaşmıştır. Toksinin kararlılığının tahıl tanesinde bulunduğu yerden etkilenmekte olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle işlemlerin toksinler üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda doğal kontamine hammadde kullanılması önemlidir (Hazel and Patel, 2004).

Trikotesenler genel olarak ısıya oldukça dirençli moleküllerdir. Ancak literatürde ısıl işlemlerin DON üzerine etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (WHO, 2011a). Örneğin fırıncılık ürünlerinin üretiminde DON'un belli oranda azaltılabildiğini bildiren çalışmalar bulunduğu gibi (Greenhalgh et al., 1984; Young et al., 1984; Abbas et al., 1985; Seitz et al., 1986; Boyacioglu et al., 1993; Neira et al., 1997; Samar et al., 2001; Pacin et al., 2010), DON'un benzer ürünlerde kararlı kaldığını ve önemli bir azalmanın gerçekleşmediğini bildiren yayınlara da rastlanmaktadır (Scott et al., 1983; Lancova et al., 2008a). Dünyanın farklı bölgelerinde ekmek ve diğer mayalı/mayasız ürünlerin (kek, bisküvi gibi) pişirilmesinde uygulanan yöntemler ve kullanılan katkı maddeleri ile fermentasyon ve pişirme koşulları (süre ve sıcaklık) önemli farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle literatürde, benzer ürünlerdeki DON düzeyleri veya azalma dereceleri ile ilgili sonuçlar da farklı olmaktadır (Hazel and Patel, 2004). Özellikle mayalı ekmeklerin üretiminde, fermentasyon sırasında meydana gelen kompleks fizikokimyasal değişimler nedeniyle DON'un davranışını tanımlamak daha zor olmaktadır (Bergamini et al., 2010).

Bir çalışmada, doğal kontamine buğday unundan yapılan mayalı ekmeğin 205°C'de 30 dakika pişirilmesinden sonra DON'da hiçbir azalma gerçekleşmediği bildirilmiştir (Scott et al., 1983). Tanaka ve ark. (1986)'nın yaptığı bir çalışmada da, buğday unundan pandispanya yapımı sırasında DON'daki azalma araştırılmış ve 170°C'de 30 dakika pişirilen mayasız üründe DON miktarında önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Diğer taraftan Greenhalgh ve ark. (1984), buğdaydan beyaz ve kepekli ekmek üretimi sırasında DON'un %3-13 oranında parçalanma ürünlerine dönüşerek azaldığını bildirmişlerdir. Bu rnlerin konsantrasyonu ekmeğin kabuğunda içine göre daha yüksek bulunmuştur. Seitz ve ark. (1986) ise mayalı ekmek üretimi sırasında azalma gözlemiş, ancak kabuk ve i kısımlarındaki DON düzeyleri arasında önemli bir fark bulamamışlardır.

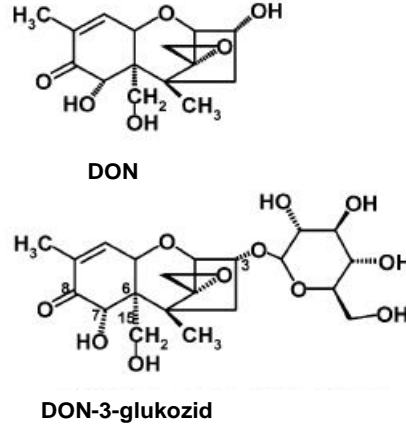
Boyacioglu ve ark. (1993) ise yapay olarak enfekte edilmiş buğdaydan mayalı ekmek yapımı sırasında çeşitli katkıların kullanımının DON zerine etkisini araştırmışlardır. 220°C'de 20 dakikalık pişirme işlemi ile %7'lik azalma sağlanırken, değişik oranlarda sodyum bisülfid, L-sistein ve amonyum fosfat ilavesi ile bu oran %38-46'lara çıkmış, potasyum bromat ve L-askorbik asit ilavesi ise hiçbir etki sağlamamıştır.

Samar ve ark. (2001), mayalı ekmek üretimi sırasındaki azalmanın sadece ısıl işlemden değil, aynı zamanda fermentasyondan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, Arjantin'e özgü iki farklı mayalı ekmek türünün üretimi sırasında DON'un fermentasyondaki kararlılığını araştırmışlardır. 50°C'de fermente edilen hamurlarda en yüksek azalmaların, Viyana ve Fransız tipi ekmekler için sırasıyla %56 ve %41 olduğunu bulmuşlardır. Benzer şekilde Pacin ve ark. (2010), Viyana tipi ekmekte ortalama %58, Fransız tipi ekmekte ise %42'lik azalma bildirmişlerdir. Üründe maya varlığının ve fermentasyon basamağının DON kayıplarını artırıcı etkisi olduğunu bildiren başka çalışmalar da bulunmaktadır (Neira et al., 1997; Voss and Snook, 2010). Neira ve ark. (1997) doğal kontamine buğdaydan yine bu teknikle üretilen ekmeklerde, hem fermentasyon hem de pişirme (210°C'de 10-40 dak) işlemlerinin ardından DON miktarında önemli azalmalar saptamışlardır. Araştırmacılar pişirme süresi uzadığıca DON kaybının da arttığını bildirmişlerdir.

Ancak literatürde mayanın toksin üzerine etkisi ile ilgili farklı sonuçlar da bulunmaktadır (Hazel and Patel, 2004). Valle-Algarra ve ark. (2009) fermentasyon sırasında toksinin kararlı olduğunu, sadece pişirme sırasında ortalama %48 oranında kayba uğradığını bildirmiştir. Young ve ark. (1984)'nın araştırmalarında ise maya içeren tatlı çöreklerde DON seviyesinde artış gözlenmiş ve bu durumun DON'un öncü bir bileşiğinin mayanın enzim sistemleri tarafından DON'a dönüştürülmesi ve kullanılan analitik yöntemle tespit edilebilir hale gelmesi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada, 210°C'de 14 dakika pişirilen mayalı bir ekmeğin üretimi sırasında değişik aşamalarda hamurdan alınan örneklerde DON düzeyleri değişkenlik göstermiştir. Ancak pişmiş son üründe hiçbir azalma görülmemesi, ekmek yapımı sırasında DON'un serbest ve konjuge formları arasında dönüşüme uğramasına bağlanmıştır (Lancova et al., 2008a).

Literatürde mikotoksinlerin glukoz gibi daha polar bir bileşiğe bağlanmasıyla oluşan ve "maskelenmiş mikotoksinler" olarak da adlandırılan konjuge mikotoksinlerin varlığı bildirilmektedir. Toksinler bitkide serbest ve bağlı formda bulunabilmektedir. Gıdalara uygulanan işlemler de bağlı toksini açığa çıkarabildiği gibi serbest toksinin maskelenmesine de neden olabilmektedir. Gıdaya uygulanan mekanik (karıştırma, çırpma gibi) veya ısı işlemler (pişirme, kızartma gibi), toksinin şeker, protein, lipid gibi makromoleküllerden ayrılmasına veya bunlarla bağlanmasına yol açabilmektedir (Bergamini et al., 2010; Maul et al., 2012).

DON'un bir glukozidi olan DON-3-β-D-glukopiranozidin (DON-3-glukozid, DON-3G) *Fusarium* ile enfekte olmuş buğday, mısır, yulaf, arpa ve ürünlerinde doğal olarak bulunduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.6) (Berthiller et al., 2005; Sasanya et al., 2008; Berthiller et al., 2011). DON'un glukozillenme yoluyla DON-3G'ye dönüşümü bitki enzimlerince (uridindifosfat glukoziltransferazlar) katalizlenmektedir. Bir başka deyişle DON-3G bitki metabolizmasının bir detoksifikasyon ürünüdür. Berthiller ve ark. (2009a) buğdayda DON'un %17'si ve mısırdaki da %14'ü oranında DON-3G bulunduğunu belirlemiştir. Genel olarak gıdalarda DON'un DON-3G ile beraber bulunduğu belirtilmektedir (Maul et al., 2012).



Şekil 2.6. DON ve DON-3G'nin kimyasal yapıları (Berthiller et al., 2005)

Bu konjugatların sindirim sırasında hidrolize uğraması ve toksinin açığa çıkması olası görünmektedir. Hidroliz yüksek sıcaklıklarda (70 ve 100°C) kolaylaşmaktadır (Lancova et al., 2008b). DON-3G midedeki asidik koşullara ve insanda bulunan β -glukozidaz enzimine dirençli olmakla birlikte, bağırsaktaki laktik asit bakterilerinin β -glukozidaz enzimleri bu bileşiği hidroliz edebilmektedir (Berthiller et al., 2011).

Mikotoksin konjugatlarının biyoyararlanımı ve toksisitesi henüz tam olarak bilinmemekle beraber DON-3G'nin toksisitesinin DON'unkine oranla daha az olduğu bildirilmiştir. Bu iki bileşiğin toksisitelerinin aynı olduğu varsayılsa bile gıdada serbest ve konjuge DON'un birlikte yaratacağı etkinin çok büyük olacağı açıktır (Lancova et al., 2008b; He et al., 2010; Berthiller et al., 2011).

Monaci ve ark. (2011), DON'un mayalı ekmek yapımı sırasındaki parçalanmasını, DON ilave ettikleri toksin içermeyen unda araştırmışlardır. Matriste bulunabilecek bağlı DON türevlerinin sonucu etkileyebileceğini düşündükleri için doğal kontamine un kullanmamışlardır. Ara ve son ürünlerin analizleri sonucunda, 30 dakikalık pişirme işlemi ile DON'un yaklaşık %20-30'unun parçalandığı ortaya konmuştur.

Young ve ark. (1984) mayasız ürünlerle çalışmış ve pişirmeden sonra hiç azalma olmadığı durumdan %35'lik azalmaya kadar değişen sonuçlar elde etmişlerdir. Ürünlerin yapısına katılan ingrediyenlerin yol açtığı seyrelme de dikkate alındığında azalma %66'ya ulaşmaktadır. En yüksek azalma amonyum karbonat

içeren hamurda görülmüş ve bu durum, ısıtma işlemi sırasında açığa çıkan amonyağın mısırdaki DON miktarını azaltmasına bağlanmıştır.

Bir diğer çalışmada, çeşitli buğday ürünlerinin üretimi sırasında DON'un kararlılığı araştırılmış, kurabiye, kraker ve çubuk kraker örneklerindeki ortalama DON konsantrasyonlarının undakinin sırasıyla %61, %70 ve %111'i kadar olduğu belirlenmiştir (Voss and Snook, 2010). Donat ve ekmekte bulunan miktarlar ise daha düşük olup, başlangıçtaki DON düzeyinin sırasıyla %44 ve %30'udur. Ekmekteki azalmada, hem DON kaybı hem de ürün bileşimine giren katkı maddelerle sağlanan seyrelmenin katkısı olmuştur.

Fırıncılık ürünleri için elde edilen farklı sonuçlardan hareketle, işlemlerin DON üzerine etkisinin, uygulanan işlem koşulları, kullanılıyorsa mayanın suşu, pişirme süresi ve sıcaklığı gibi pek çok faktöre bağlı olduğu söylenebilir. Bunların yanısıra ekmek boyutu da azalmada önemli bir faktördür (Valle-Algarra et al., 2009). Gerçek boyutlardaki gıdalar yerine model sistemlerin kullanılması ile gerçeğe daha yakın sonuçlar elde edilmesi mümkündür, ancak bu yöndeki çalışmalar sınırlıdır. Mevcut çalışmalarda da genellikle gerçek gıda matrisleri ile çalışılmamış, gıda bileşenlerini temsil edebilecek bazı model bileşikleri toksinlerle bir araya getirilerek ısıtılmış ve DON yıkımı tamponlanmış sulu çözeltilerde izlenmiştir (Bretz et al., 2006). Örneğin Wolf ve Bullerman (1998)'in bir çalışmasında, sulu bir tampon çözeltide ısı ve pH'nın DON üzerine etkisi araştırılmıştır. Yüksek pH (10.0) ve sıcaklık kombinasyonlarının (170°C'de 15 dak ve 120°C'de 30 dak) tam bir yıkım sağlayabildiği bildirilmiştir. Abramson ve ark. (2005) da model sistem üzerinde çalışmış ve arpanın az miktarda su veya 1M sodyum karbonat çözeltilerinde ısıtılması sırasında DON'da azalmalar kaydetmişlerdir. Bir diğer çalışmada da, sulu bikarbonat çözeltisi ile muamele edilip 80 veya 110°C'de 2 ve 12 gün ısıtmanın ardından DON miktarı azaltılabilmektedir (Lauren and Smith, 2001).

Ekstrüzyon pişirme işlemi geleneksel yöntemlere göre birçok avantaja sahip olduğundan son yıllarda gıda işlemede önemli bir yer edinmiştir. Bu teknik 1930'lu yıllardan beri kahvaltılık gevrekler, çerezler ve evcil hayvan yemlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Ekstrüzyon işleminde ürün, kısa süreli olarak (10-60 s civarında) yüksek sıcaklık (200°C civarında), basınç ve gerilime maruz kalmaktadır. Ürün ekstrüder çıkışında suyun yüksek hızda buharlaşması nedeniyle genişlemektedir.

Bu işleme üründe nişasta jelatinizasyonu, protein denatürasyonu, enzim inaktivasyonu ve mikrobiyal yükte azalma gibi değişimler ortaya çıkmaktadır (Humpf and Voss, 2004; Castells et al., 2005).

Ekstrüzyonun mikotoksinler üzerine azaltıcı etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, azalmaların ekstrüder sıcaklığı, vida hızı, hammaddenin nem içeriği ve işlem süresi gibi çok sayıda faktöre bağlı olduğu, ancak en büyük etkiyi sıcaklık ve sürenin oluşturduğu bildirilmektedir. Bu nedenle sonuçlar yine değişkenlik göstermekte ancak genel olarak mikotoksin düzeylerinde en yüksek azalmalar 160°C ve üzerindeki sıcaklıklarda ve göreceli olarak uzun süreli işlemlerde kaydedilmektedir (Bullerman and Bianchini, 2007).

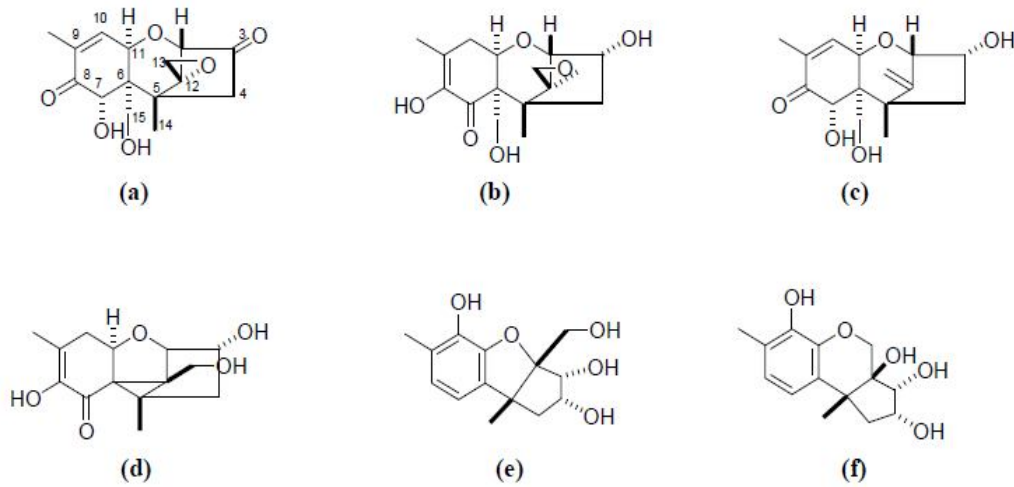
Wolf-Hall ve ark. (1999) mısıra dışarıdan ilave edilen DON'un, ekstrüzyon sırasında uygulanan sıcaklık ve basınç koşullarında kararlı olduğunu bildirmiştir. Cazzaniga ve ark. (2001) ise değişik oranlarda sodyum metabisüfit ilavesi, değişik nem içerikleri ve 150-180°C aralığındaki sıcaklıklarda DON'da %95'e varan azalma kaydetmişlerdir. Benzer şekilde Accerbi ve ark. (1999), değişik konsantrasyonlardaki sodyum bisüfit çözeltilerine daldırılan buğday tanelerinin 145 ve 170°C'de ekstrüde edilmesinin DON'da %42-92 arasında yıkım sağladığını bildirmişlerdir. Bazı durumlarda (özellikle 170°C'de) DON'da gözlenen ufak artışlar, yüksek sıcaklıklarda kararlı olmayan bir DON-sülfonat kompleksinin parçalanmasına bağlanmıştır.

Ekstrüzyon ve diğer ısı işlemleri sırasında saptanan görünürdeki azalmaların, hangi durumlarda toksinin gerçek dekompozisyonundan, hangi durumda gıda matrisine (şeker, protein vb.) kimyasal olarak bağlanmasından kaynaklandığı hâlâ tam olarak anlaşılammıştır (Kushiro, 2008; WHO, 2011a). Ekstrüde ürünlerde toksinin matrise bağlı hale gelebildiği ve mevcut analitik teknikler ile bu matristen ekstrakte edilemiyor olabileceği de bildirilmektedir (WHO, 2011a).

Literatürde DON'un fırıncılık ürünleri ve ekstrüde ürünler dışında diğer pek çok üründe uğradığı değişiklikler de geniş olarak araştırılmıştır. Meksika tipi cips (tortilla) üretiminde, kızartılmış ev yapımı turtada, kızgın buharda ısıtılmış buğdayda ve bol su ile pişirilen spagetti ve benzeri ürünlerde, uygulanan sıcaklık ve sürelerle ilgili olarak belli miktarlarda azalmalar gerçekleştiği bildirilmektedir

(Abbas et al., 1988; Visconti et al., 2004; Pronyk et al., 2006; Sugita-Konishi et al., 2006; Samar et al., 2007; Kushiro, 2008).

Bazı pişirme teknikleri ile gıdalarda DON'un çeşitli izomer veya türevlerinin oluştuğu bilinmektedir. Ancak bu bileşiklerin toksisitesi hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bu nedenle bir gıdanın toksisitesi sadece DON miktarına bağlı olmamakta, DON'un parçalanma ürünlerinin de toksisiteye katkısı olabilmektedir. norDON serisi bileşikler DON'un alkali koşullarda ısıtılmasıyla oluşmakta ve DON'a göre daha düşük toksisite gösterdiği bilinmektedir (Şekil 2.7) (Kushiro, 2008).



Şekil 2.7. Bazı DON türevlerinin kimyasal yapıları; (a) 3-keto DON, (b) izoDON, (c) de-epoksi DON, (d) norDON A, (e) norDON B, (f) norDON C (Kushiro, 2008)

Bretz ve ark. (2006), piyasada satılan kurabiye, kraker ve ekmek gibi ürünlerde norDON A, norDON B ve norDON C'nin düşük miktarlarda bulunduğunu belirlemişlerdir. Özellikle norDON A analiz edilen ürünlerin %66'sında ve DON konsantrasyonunun %10-27'si oranında saptanmıştır.

2.2.2. Isıl işlemlerin ZEA üzerine etkisi

ZEA büyük bir lakton halkasına sahip olmasına rağmen ısıya oldukça dirençli bir moleküldür (Ryu et al., 2003). Gıdalara uygulanan ısı işlemlerin ZEA üzerindeki etkisinin oldukça değişken ve uygulanan işlem koşullarına bağlı olduğu belirtilmektedir. Örneğin Bennett ve ark. (1980) 150°C'lik yüksek sıcaklık uygulamasının hem saf haldeki hem de mısırın yapısındaki toksine hiçbir etkisi

olmadığını belirlemişlerdir. Ryu ve ark. (2003) ise ZEA'nın termal stabilitesini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, sulu bir tampon çözeltide toksini farklı pH değerlerinde ve sıcaklıklarda ısıtılma tabii tutmuşlardır. 125°C ve altındaki sıcaklıklarda ZEA miktarındaki azalma yaklaşık %23 iken, 150°C'de 60 dakikalık ısıtılma işlemi %34-68 oranında azalmaya neden olmuştur. 175°C'de 60 dakika sonunda ZEA'nın %92'den fazlası kaybolurken, tam bir yıkım, pH'dan bağımsız olarak, 225°C'de 30 dakikadan kısa bir sürede gözlenmiştir. ZEA'nın pH 7'de oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir.

Buğday ununa 110-140°C'de uygulanan 6-15 dakikalık kavurma işleminin ZEA miktarını %50 oranında azaltabildiği bildirilmektedir (Cetin and Bullerman, 2005). Ayrıca ekmekte toksinin %60'ının, bisküvide ise %80'inin değişime uğramadan kaldığı bildirilmektedir (Alldrick and Hajšelová, 2004).

Bir çalışmada, toksin standardı ve doğal kontamine arpa unu 140-220°C arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılmış ve kalan toksin miktarının logaritması süreyle doğrusal bir ilişki göstermiştir. ZEA standardında 140 ve 160°C'de önemli bir azalma gerçekleşmezken, gözlenebilen en yüksek azalma 220°C'de 60 dakika sonunda elde edilen %85'lik azalmadır. ZEA standardının %50 ve %90'ının parçalanması için gerekli süreler DON ve NIV için belirlenen sürelerden daha uzun bulunmuştur. 220°C'de saf standard halinde ısıtılan DON, NIV ve ZEA'nın %90 oranında parçalanması için gerekli süreler sırasıyla 11, 10 ve 85 dakikadır (Yumbe-Guevara et al., 2003).

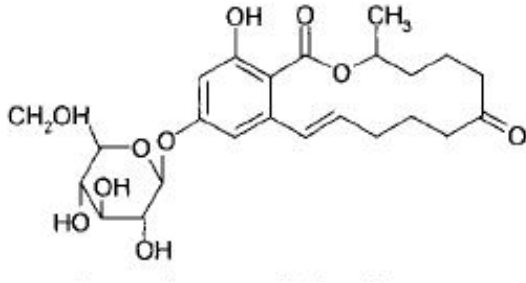
JECFA raporlarına göre ekmek, kahvaltılık tahıllar, bisküvi ve erişte gibi tahıl ürünlerinde 50 µg/kg'a varan düzeylerde ZEA kontaminasyonu saptanabilmektedir. Afrika'nın değişik bölgelerindeki tahıllarda Batı ülkelerine göre çok daha yüksek kontaminasyon düzeyleri rapor edilmiştir (Alldrick and Hajšelová, 2004).

Literatürde ekstrüzyon işleminin diğer ısıtılma tekniklerine göre ZEA konsantrasyonunu azaltmada daha etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Castells et al., 2005). Bu azalma sıcaklık, vida hızı ve nem içeriğine bağlı olarak değişmektedir (Cetin and Bullerman, 2005). Bir çalışmada 120 ve 140°C'de uygulanan ekstrüzyon işlemi ile ZEA miktarında sağlanan azalma %73-83 arasında değişirken, 160°C'de %66-77 olmuştur. Bu durum ürünün düşük

sıcaklıkta cihazda kalış süresinin daha uzun olmasına bağlanmıştır (Castells et al., 2005).

Cetin ve Bullerman (2005), *F. graminearum* ile kontamine edilmiş mısıra 150, 175 ve 200°C'de uyguladıkları ekstrüzyon ile ZEA miktarında %67-81 oranında azalma elde etmişlerdir. 200°C'de, düşük sıcaklıklara göre daha az ZEA yıkımı olması, yüksek sıcaklığın ürünlerdeki nem miktarını azaltma etkisine bağlanmıştır. Bu durum ürünlerdeki ısı transferini güçleştirmiş ve ısının ZEA üzerindeki etkisini tam olarak göstermesini engellemiştir.

ZEA, glukozla zearalenon-4-β-D-glukopiranozid (ZEA-4-glukozid, ZEA-4G) konjugatını oluşturmaktadır (Şekil 2.8). Bu bileşik tahıllardaki ZEA metabolizmasının bir ürünüdür. Yapılan bir çalışmada, ZEA içeren buğday örneklerinin %42'sinde 17-104 µg/kg düzeyinde ZEA-4G'nin de bulunduğu belirlenmiştir. Bu bileşik sindirim sırasında aglukon ZEA'ya kolayca hidrolize olabildiğinden serbest ZEA açığa çıkmakta ve mikotoksikozis gelişimine neden olabilmektedir (Schneweis et al., 2002). Başka bir konjuge mikotoksin olan ZEA-14-β-D-glukozid (ZEA-14G) de domuzların sindirim sisteminde ZEA'ya dönüşmekte, bu durum bağırsak mikroflorasının aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Berthiller et al., 2011).



Şekil 2.8. ZEA-4G'nin yapısı (Schneweis et al., 2002)

2.2.3. Isıl işlemlerin fumonisinler üzerine etkisi

Yapılan çalışmalar fumonisinlerin ısıya karşı son derece kararlı olduklarını ortaya koymuştur. Toksinin parçalanması için gerekli sıcaklık/süre koşulları pratikte uygulanan parametrelerin çok daha üzerindedir. Bu nedenle mısır kaynaklı hemen her üründe fumonisinler az ya da çok miktarda bulunmaktadır (Arıcı et al., 2002; Castells et al., 2005).

F. moniliforme kültürü ile kontamine edilmiş kuru mısır örneğinde FB₁'in termal parçalanmasının 1. dereceden reaksiyon kinetiğine uygun olduğu ve toksinin yarılanma süresinin 75°C'de 8 saat, 100°C'de 175 dakika, 125°C'de 38 dakika ve 150°C'de 10 dakika olduğu bildirilmiştir (Dupuy et al., 1993). Jackson ve ark. (1996) ise 150°C ve üzerindeki sıcaklıklara maruz kalan gıdalarda fumonisin düzeylerinin önemli oranda azalma gösterebileceğini bildirmiştir. Ancak azalma oranı sıcaklık, süre, su ve şeker içeriği ile pH gibi koşullardan etkilenmektedir (Humpf and Voss, 2004).

FB₁ ilavesi yapılmış mısır keki hamurunun 175 ve 200°C'de 20 dakika pişirilmesi sonucu toksin miktarında sırasıyla %16 ve %28 azalma saptanmıştır. Ancak her iki sıcaklıkta da keklerdeki toksin kaybı yüzeyde merkeze göre önemli derecede fazla olmuştur (Jackson et al., 1997). Aynı çalışmada, mısır cipsine 140-170°C'de uygulanan kızartma işlemi önemli bir azalmaya yol açmamış, 190°C'de 15 dakikalık kızartma işlemi sonunda ise toksinde %67 kayıp olmuştur. FB₁'in parçalanmaya başladığı sıcaklık ve süre koşulları 180°C'de 8 dakika ve üzeri olarak bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise mısır ununun 218°C'de 15 dakika kavrulması ile fumonisinlerde tam bir kayıp sağlanabilmiştir (Humpf and Voss, 2004).

Ekstrüzyon işlemi fumonisin düzeylerinde önemli azalmalar sağlayabilmektedir (Castells et al., 2005). Saunders ve ark. (2001) ekstrüde mısır ürünlerinde fumonisin konsantrasyonunun, ekstrüder tipine bağlı olarak %20–90 oranında azaltılabildiğini bildirmiştir. Meister (2001) ise dışarıdan FB₁ ve FB₂ ilavesi yaptıkları mısır örneklerinde ekstrüzyon pişirme işleminin (160-180°C) fumonisin düzeylerinde yaklaşık %50-70'lik azalmaya yol açtığını bildirmiştir. En yüksek azalmalar yüksek sıcaklık, yüksek hız, yüksek gerilim ve düşük nem içeriği kombinasyonu ile sağlanabilmiştir.

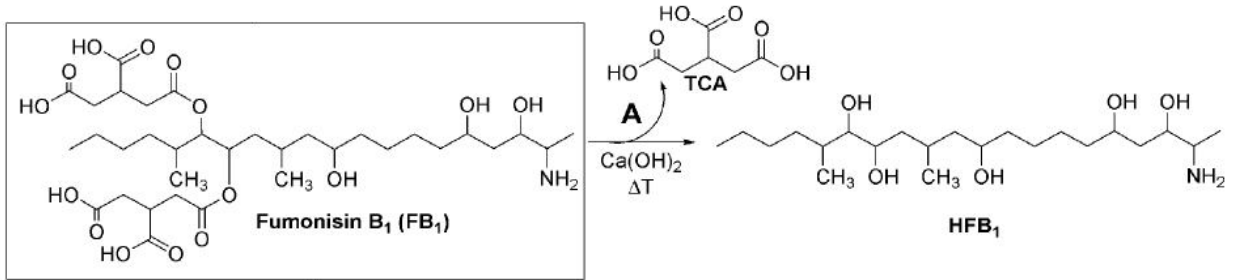
Castelo ve ark. (1998), ekstrüde örneklerde nem içeriği arttıkça FB₁'de doğrusal olarak artan önemli kayıplar gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ekstrüderde karıştırıcı özellikte bir vida kullanıldığında ise en yüksek mikotoksin kayıpları bu defa düşük nem içeriğinde ortaya çıkmıştır. Teorik olarak FB₁ kaybının daha yüksek nem içeriğinde daha fazla olması beklenmektedir, çünkü örnekteki nem miktarı arttıkça ısı transferi kolaylaşmaktadır.

De Girolamo ve ark. (2001)'in mısır gevreği üretiminde FB₁ ve FB₂'nin stabilitesini inceledikleri çalışmalarında, ara ekstrüzyon basamağındaki (70-105°C, 5 dakika) kayıp %30'dan az olmuş, ancak gevrek üretimi için fırınlama (kavurma) işlemi de yapıldıktan sonra (170-220°C) başlangıç toksin miktarının yaklaşık %60-70'i kayba uğramıştır. Araştırmacılar, bu azalmanın toksisitenin azalması anlamına gelmediğini, termal parçalanma ürünlerinin toksisitelerinin belirlenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Mısır gevreği ve mısırdan yapılan diğer kahvaltılık gevreklerde fumonisinlere yaygın olarak rastlanabilmekte ve bu tür ürünler diyetle önemli fumonisin kaynaklarını oluşturabilmektedirler (Machinski and Valente, 2000; Petersen and Thorup, 2001; Solfrizzo et al., 2001).

Isıl işlemlerin fumonisin konsantrasyonunu azaltıcı etkisinin, toksinin kimyasal yapısında meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı bilinmektedir (Saunders et al., 2001; Seefeldter et al., 2003; Humpf and Voss, 2004). İşlenmiş gıdalarda, kimyasal ve/veya ısıl işlemler sonucu fumonisinlerin gıda bileşenleri (şeker, nişasta ve proteinler) ile reaksiyon/etkileşimi ile oluşan pek çok fumonisin türevi bulunmaktadır (Jackson and Jablonski, 2004; Krska et al., 2007).

Gıdalarda rastlanan bir grup fumonisin türevi, kısmen veya tamamen hidrolize olmuş fumonisinlerdir. Fumonisin molekülünün C14 ve C15 konumlarında bulunan TCA'ların yapıdan hidroliz ile uzaklaşmasıyla kısmen (partially hydrolyzed FB, PHFB) veya tamamen hidrolize olmuş fumonisinler (hydrolyzed FB, HFB) ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.9) (Dombrink-Kurtzman et al., 2000; Humpf and Voss, 2004; Jackson and Jablonski, 2004; Dall'Asta et al., 2009a). Örneğin aminopentol (AP₁), FB₁'in tamamen hidrolize olmuş formudur ve HFB₁ olarak da adlandırılır. Alkali çözeltilerin kullanımı ve yüksek sıcaklıklar, TCA gruplarının molekülden ayrılması yoluyla, gıdalardaki görünür fumonisin varlığını önemli ölçüde azaltmaktadır.

Hidrolize fumonisinler alkali ortamda pişirilen veya alkali işlemlere maruz bırakılan mısır ürünlerinde olduğu gibi mısırdaki doğal olarak da bulunabilmektedir (Dombrink-Kurtzman et al., 2000; Soriano and Dragacci, 2004).



Şekil 2.9. HFB₁'in oluşumu ve kimyasal yapısı (Humpf and Voss, 2004)

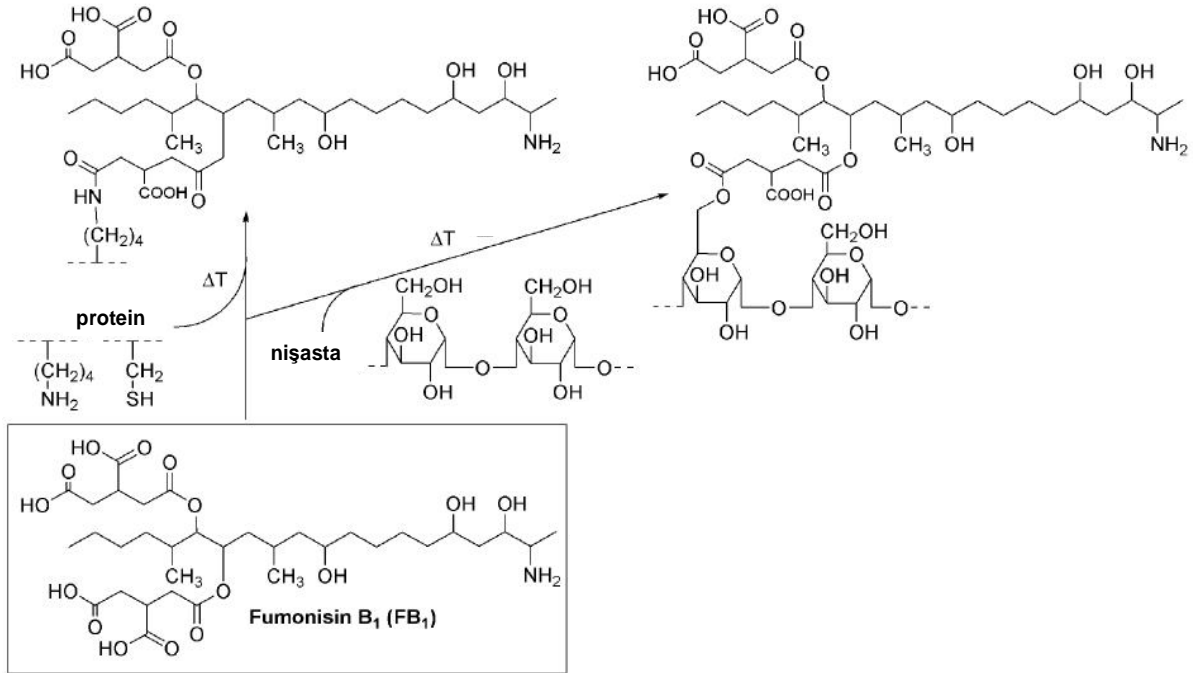
Hidroliz ürünlerinin toksisitesi hâlâ belirsiz olmakla beraber, yapılan çeşitli çalışmalarda HFB₁'in akut toksisitesinin FB₁'e göre daha düşük olduğu, ancak daha az polar olan HFB₁'in daha yüksek oranda absorplandığı bildirilmektedir (Dall'Asta et al., 2009a). HFB₁, toksinin vücuda alınmasından sonra *in vivo* olarak da oluşabilmektedir (Humpf and Voss, 2004; Soriano and Dragacci, 2004).

Kızartılmış tortilla cipslerinde FB₁ konsantrasyonu hammaddeye göre yaklaşık %60 oranında azaltılabilmektedir (Saunders et al., 2001). Dombrink-Kurtzman ve ark. (2000) tortilla cipslerinin üretiminde alkali pişirme işleminin FB₁ konsantrasyonunu %81.5 oranında azalttığını, FB₁ ve HFB₁'in bir kısmının ıslatma ve yıkama sularına geçtiğini göstermişlerdir.

Jackson ve ark. (1996), model sistemde sıcaklık ve sürenin FB₁'in kararlılığı üzerine etkisini incelemişler ve ısı ile oluşmuş başlıca parçalanma ürünlerinin PHFB ve HFB'ler olduğunu bildirmişlerdir. Toksinin hidroliz hızı ve derecesi artan sıcaklıkla artış göstermiş, 175°C ve üzerindeki sıcaklıklarda 60 dakika sonunda %90'dan fazlası kayba uğramıştır. Yazarlar FB₁ miktarının, 150°C ve üzerindeki sıcaklıklarda önemli derecede azalabileceği sonucuna varmışlardır.

Fumonisinlerin hidroliz ile oluşan türevlerine ek olarak, matrise bağlı formlarının da gıda maddelerinde saptanmaya başlamasıyla, gıdalardaki fumonisin kontaminasyonunun değerlendirilmesi daha karmaşık bir hale gelmiştir (Dall'Asta

et al., 2009a). Seefelder ve ark. (2003) ısı işlem görmüş mısır ürünlerinde, fumonisinlerin serbest TCA yan zincirleri üzerinden proteinler ve polisakkaritlerle birleşebildiğini ve böylece matrise bağlı fumonisinlerin oluşabildiğini bildirmiştir (Şekil 2.10). Toksinin bu şekilde bağlanmasının, ısı etkisiyle öncelikle TCA yan zincirinden su kaybı ile bir siklik anhidrid oluşumu ve sonrasında da bu anhidridin nişasta veya proteinin serbest fonksiyonel grupları ile (hidroksil, amin veya tiyol grubu gibi) etkileşime girmesi sonucu gerçekleştiği tahmin edilmektedir.



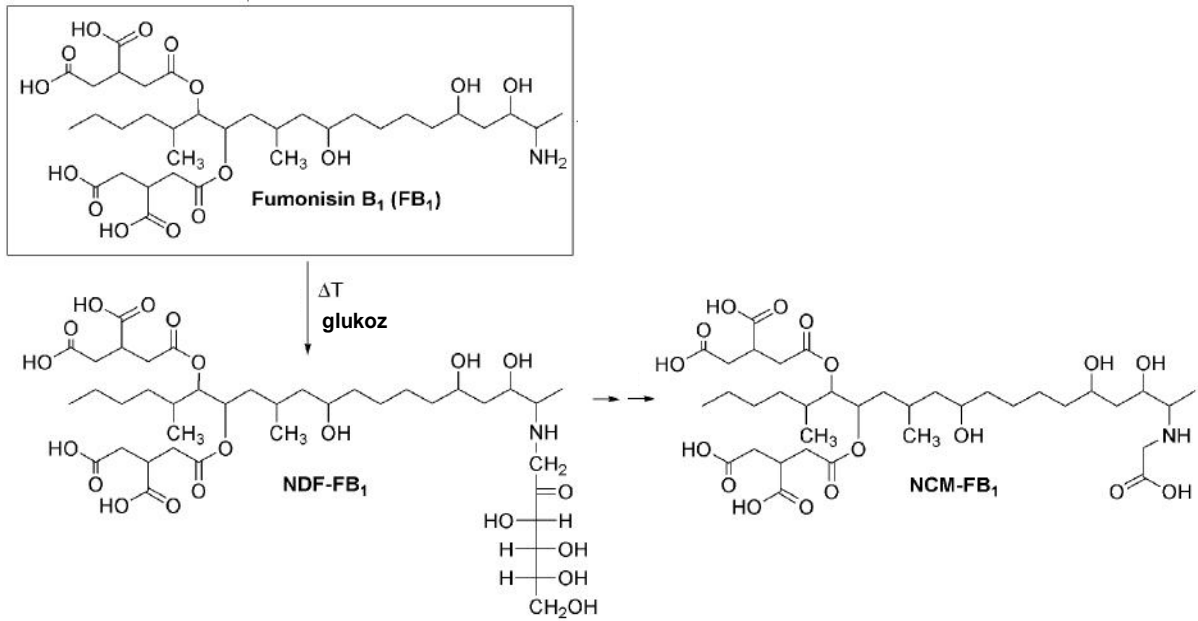
Şekil 2.10. Bağlı-FB₁'in oluşum yolları (Humpf and Voss, 2004)

Bağlı fumonisinlerin mısırdaki ve işlem görmüş çeşitli gıdalardaki varlığı ile ilgili veriler giderek artmaktadır (Humpf and Voss, 2004; WHO, 2011b). Kim ve ark. (2003) mısır gevreklerine bazik hidroliz uygulayarak bağlı fumonisinlerin matristen ayrılmasını sağlamışlar ve bu şekilde başlangıçtaki 2.6 katı kadar daha fumonisin açığa çıktığını belirlemişlerdir. Ancak örnekler piyasadan alındığı için bu bağlı fumonisinlerin işlem öncesinde mısırdaki mi bulunduğu yoksa üretim sırasında matrise bağlanma yoluyla mı oluştuğu anlaşılamamıştır.

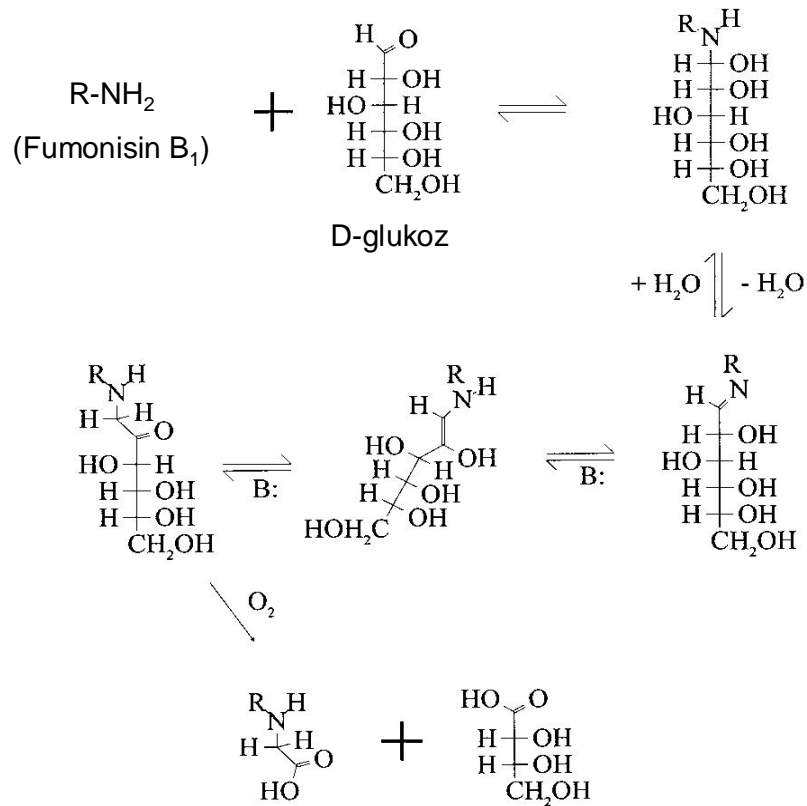
Dall'Asta ve ark. (2009a) analiz ettikleri bütün glutensiz ürünlerde, serbest fumonisinlere yakın ya da daha yüksek konsantrasyonlarda, bağlı fumonisinlerin varlığını saptamışlardır. Serbest fumonisin konsantrasyonu düşük olan bazı örneklerde serbest ve bağlı fumonisinlerin toplam miktarları, Avrupa Birliği'nin benzer ürünlerde toplam fumonisinler için bildirdiği yasal limitlerin (800µg/kg) üzerinde bulunmuştur. Ayrıca matrise bağlı fumonisinlerin sindirim sisteminde parçalanarak hidrolize fumonisinlere dönüşme olasılığından dolayı, gıdalarda bu fumonisinlerin varlığının tespiti önem kazanmıştır (Kim et al., 2003; Seefelder et al., 2003; Park et al., 2004).

Gıda matrisindeki bileşenlere bağlanmanın dışında fumonisinler, gıda işleme sırasında ortamdaki bileşenlerle reaksiyona da girebilmektedir (Humpf and Voss, 2004). FB₁'in, indirgen şekerlerin sulu çözeltileri ile ısıtıldığında azalmaya uğradığı pek çok araştırmada ortaya konmuştur (Howard et al., 1998; Jackson and Jablonski, 2004). FB₁ ve indirgen şekerleri birlikte içeren gıdaların ısı işleme tabi tutulması sonucu oluşan reaksiyon ürünleri içerisinde en önemli ikisi *N*-(karboksimetil) FB₁ (NCM-FB₁) ve *N*-(1-deoksi-D-fruktoz-1-il) FB₁ (NDF-FB₁)'dir (Şekil 2.11) (Howard et al., 1998; Seefelder et al., 2001; Jackson and Jablonski, 2004). Bu reaksiyon, FB₁ veya HFB₁'in primer amino grubu ile indirgen şekerin karbonil grubu arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu üzerinden ilerlemekte ve oluşan Schiff bazı Amadori düzenlenmesine girerek ilk reaksiyon ürünü olan NDF-FB₁'i oluşturmaktadır. Sonrasında α -ketoamin oluşumu ve oksidasyon sonucu NCM-FB₁ molekülü ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.12) (Howard et al., 1998; Humpf and Voss, 2004). Bu reaksiyonlar alkali koşullarda daha kolay gerçekleşmekte ve oksijene ihtiyaç duymaktadır. NCM-FB₁ işlem görmemiş mısır örneklerinde bile FB₁'in ortalama %4'ü oranında saptanmıştır (Howard et al., 1998).

Bullerman ve ark. (2008) ekstrüzyonun glukoz varlığında ve yokluğunda FB₁ üzerine etkisini araştırmış ve glukoz bulunmaması halinde azalma oranı %21–37 iken, glukoz ilavesinden sonra %77–87'ye çıktığını bildirmişlerdir. Başlıca parçalanma ürünü olarak NDF-FB₁ tespit edilmiş, hidrolize fumonisinlere ise önemli oranda rastlanmamıştır.



Şekil 2.11. Isıl işlem koşullarında oluşan FB₁ parçalanma ürünlerinin yapıları (Humpf and Voss, 2004)



Şekil 2.12. NCM-FB₁ oluşumunun şematik gösterimi (Howard et al., 1998)

Bir diğ er ç alışmada Castelo ve ark. (2001), mısırdan kek (muffin) ve ekstrüde ürünlerin üretimi sırasında glukoz kullanımının fruktoz ve sakkaroz a göre daha önemli azalmalar sağladığını bildirmişlerdir. Örnekl erde NCM-FB₁ varlığına da rastlanmış ancak bu bileşik dışında başka esmerleşme reaksiyonu ürünlerinin de bulunduğu bildirilmiştir. Seefelder ve ark. (2001) da 160-180°C'de gerçekleştirdikleri ekstrüzyon işle mi sonucu, glukoz ve sakkaroz içeren örnekl erde sırasıyla %85-93 ve %68-77 düzeyinde azalmalara karşın düşük düzeyde NCM-FB₁ varlığı saptamışlardır. Piyasadan toplanan örnekl erde de bu bileş iğ in konsantrasyonunun düşük olması başka reaksiyon ürünlerinin de varolabileceğini göstermiştir.

Lu ve ark. (2002) kütle spektrometresi ile gerçekleştirdikleri ç alışmada, FB₁'in glukoz ile 65°C'de 48 saat ısıtılmasıyla gerçekleşen zincir reaksiyonunun 4 temel ürününü NCM-FB₁, N-metil-fumonisin B₁, N-(3-hidroksiasetonil)-fumonisin B₁ ve N-(2-hidroksi, 2-karboksietil)-fumonisin B₁ olarak tanımlamışlardır. NDF-FB₁'e ise sadece 60°C'de ısıtma yapıldığı durumda rastlanmıştır. Ayrıca FB₁'in glukoz ile reaksiyonunun 1. dereceden kinetiğ e uygun olduğu bildirilmiştir. Castelo ve ark. (1998) da ekstrüde örnekl erde FB₁'in hidroliz ürünlerine (HFB₁ veya PHFB₁) rastlamamışlar ve bu nedenle ç alışmadaki toksin yıkımının, örnekl erin kahverengi oluşuna da dayanarak, Maillard benzeri reaksiyonlardan kaynaklandığı sonucuna varmışlardır.

Isıl işlemlerle oluş an parçalanma ürünlerinin veya matrise bağı lı fumonisinlerin kimyasal yapıları, biyolojik aktiviteleri ve toksisitelerinin belirlenmesi gerekmektedir (Humpf and Voss, 2004). Mevcut toksikolojik verilere göre, NCM-FB₁ primer amin grubu iç ermediğ inden FB₁'e göre çok daha az toksiktir (Lu et al., 1997; Howard et al., 1998; Humpf and Voss, 2004). Ancak gıdaların iş lenmesi sırasında FB₁ kadar veya daha toksik bileşiklerin oluşabileceğini bildiren ç alışmalar da mevcuttur (Castelo et al., 2001).

2.3. Mikotoksin Analiz Yöntemleri

Gıda ve yemlerde mikotoksin analizleri, uygun bir örnekleme planının uygulanmasının ve örneğin homojenize edilmesinin ardından matristen toksinin ekstraksiyonu, ekstraktın saflaştırılması, nitel ve nicel analiz basamaklarını kapsamaktadır. Küfler ve mikotoksinler tahıllarda heterojen dağılım gösterdiğinden örnekleme ve homojenizasyon işlemleri büyük önem taşımaktadır (Köppen et al., 2010).

Ekstraksiyonda mikotoksinin yapısı, fizikokimyasal özellikleri ve çözünürlüğüne, örnek matrisine ve sonrasında kullanılacak olan saflaştırma yöntemine bağlı olarak değişik çözücüler veya çözücü karışımları kullanılabilir (Krska et al., 2008; Turner et al., 2009). Genellikle su ve polar organik çözücülerin karışımı ile ve tek basamakta gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri, çözücü ve örnek miktarlarının oranları ve karıştırma süreleri bakımından farklılıklar gösterebilmektedir. Diğer taraftan, ekstraksiyon sırasında hedef toksinle beraber ekstrakte olan bileşikler kromatografik analizde girişim yaparak toksinin tespitini zorlaştırmakta ve tespit sınırının (LOD) yükselmesine neden olmaktadır. Bu nedenle sıvı-sıvı ayırması, katı-faz ekstraksiyonu (solid-phase extraction, SPE), jel permeasyon kromatografisi veya immünoafinite (IMA) kromatografisi gibi teknikler kullanılarak ham ekstraktların saflaştırılması gerekmektedir (Köppen et al., 2010).

Saflaştırma yönteminin seçiminde etkili başlıca faktörler matrisin ve girişim yapabilecek bileşiklerin türü (şekerler, yağ asitleri gibi) ile kullanılacak tanımlama yöntemidir. SPE kolonları arasında en çok tercih edilenleri, kömür ve iyon değiştirici reçineler gibi farklı dolgu materyallerini (sorbentleri) bir arada içeren multifonksiyonel saflaştırma kolonlarıdır. Bu kolonların bazı tipleri A ve B grubu trikotesenlerin bir arada analizi için sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların dışında tek bir sorbent içeren ters faz (C₁₈, oktodesilsilan) kolonlar, kuvvetli anyon değiştirici reçine (strong anion exchange, SAX) kartuşları ve aminopropil kolonlar da bulunmaktadır. SAX kartuşları özellikle fumonisinler gibi asidik mikotoksinler için uygundur, ancak bunların hidrolize formlarını tutamamaktadır (Cigić and Prosen, 2009; Lattanzio et al., 2009; Turner et al., 2009). Fumonisinler ve hidrolize fumonisinlerin birlikte analizinde genellikle C₁₈ kolonlar ile saflaştırma yapılmaktadır. Bu kolonlar daha az spesifik olup, bu özelliği sayesinde aynı anda

çok sayıda toksinin analiz edilebildiği sıvı kromatografisi - kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizleri öncesinde kullanım için de uygundur (Krska et al., 2007; Cigić and Prosen, 2009).

Saflaştırma için en sık kullanılan IMA kolonları ise, belli bir toksine veya kimyasal yapıları benzeyen bir grup toksine yüksek seçicilik gösteren antikorların kolon dolgu maddesine bağlanmasıyla hazırlanmaktadır. Her bir mikotoksin için ayrı hazırlanmış olan bu kolonların en önemli avantajları, spesifikliklerinin çok yüksek oluşu ve kromatografik analiz öncesi ön-konsantrasyon sağlayarak tayin sınırını (LOQ) önemli oranda düşürebilmeleridir. Kolonların bazı matrislerle uyumlu olmaması, maliyetlerinin yüksek oluşu ve antikorların düşük konsantrasyonlardaki organik çözücülerin varlığında bile denatüre olabilmesi gibi olumsuzlukları da bulunmaktadır. Bu nedenle ekstrakt kolona verilmeden önce seyreltilmekte ancak bu durum analizin duyarlılığını azaltmaktadır. Bu kolonlarda kullanılan antikorlar genelde *in vivo* olarak hazırlanmakla beraber, son zamanlarda sentetik yolla oluşturulmuş antikorlarla hazırlanan kolonlar da bulunmaktadır (Cigić and Prosen, 2009; Köppen et al., 2010).

Toksin analizinde uygulanacak analitik yöntemin seçiminde mikotoksinin kimyasal özelliklerinin bilinmesi önem taşımaktadır (Cigić and Prosen, 2009). Mikotoksinlerin tanımlanmasında kullanılabilen klasik analitik yöntemler içerisinde ince tabaka kromatografisi (İTK), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi (GC) sayılabilir. İTK yönteminde kromatografik ayırım düşüktür ve LOQ yetersiz kalmaktadır. Çoğu mikotoksin küçük, uçucu olmayan ve polar moleküller olduğundan GC analizinden önce kimyasal olarak türevlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenlerle diyot dizini (diode array, DAD), floresans (FLD) veya başka uygun bir dedektörle entegre HPLC teknikleri gıda, yem ve diğer matrislerde mikotoksin analizi için uzun zamandır en önemli yöntem olarak kabul edilmekte ve çok yaygın şekilde kullanılmaktadır (Köppen et al., 2010; Devreese et al., 2012).

Mikotoksinlerin çoğu UV bölgede absorpsiyon yapmamakta, sadece DON ve türevleri, okratoksinler ve bazı ZEA analogları 200-225 nm aralığındaki dalgaboylarında ışığı absorplayabilmektedirler. Bu nedenle özellikle DON, NIV ve diğer bazı B grubu trikotesenlerin analizlerinde HPLC-DAD yöntemleri yaygın

olarak kullanılmaktadır. Ancak UV absorpsiyonunun gerçekleştiği dalgalı boyları bu toksinlere spesifik olmadığından, kromatogramda girişim yapabilecek bileşikleri elimine edebilmek için mutlaka IMA kolonları ile saflaştırma işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu toksinler için HPLC-FLD'ye dayanan yöntemler de bildirilmekle beraber, bu yöntemler türevlendirme basamağı gerektirdiğinden, daha basit ve hemen hemen aynı hassasiyette olan HPLC-DAD yönteminin kullanımı tercih edilmektedir. A grubu trikotesenler ise UV bölgede absorpsiyon yapmadığından, bu toksinlere ön işlemlerle floresans özellik kazandırılmakta ve daha sonra HPLC-FLD ile analiz edilmektedir (Visconti et al., 2005; Cigić and Prosen, 2009; Lattanzio et al., 2009).

Yüksek seçicilik ve hassasiyetteki floresans dedektörü, doğal floresans özelliğine sahip mikotoksinlerin tayininde doğrudan kullanılabilirdiği gibi, bu özelliğe sahip olmayan toksinler için de uygun ajanlarla türevlendirme yapılarak kullanılabilir. ZEA ve zearalenoller doğal floresansa sahip bileşikler oldukları için gıda ve yemlerde ZEA tayininde IMA kolonlarda saflaştırmanın ardından HPLC-FLD tekniği en çok tercih edilen yöntemdir (Cigić and Prosen, 2009; Köppen et al., 2010).

Fumonisinler için en yaygın kullanılan yöntemde ise SAX veya IMA kolonlarla saflaştırma işleminden sonra *o*-fitaldialdehit ve 2-merkaptetanol ile kolon öncesi türevlendirme yapılmakta ve böylece bileşik HPLC-FLD tekniği ile teşhis edilebilir hale getirilmektedir (Shephard, 1998; Solfrizzo et al., 2001). Türevlendirme reaksiyonu primer amino grubu üzerinden gerçekleşmekte ve oluşan türev sadece 4 dakika süreyle stabilitesini sürdürebilmektedir. Türevlendirilmiş fumonisinlerde dört karboksil grubu korunduğundan kuvvetli asidik özellikte bir mobil faz kullanılması ve kromatografik ayrımın ters faz kolonda (C₁₈ veya fenilhekzil) gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Cigić and Prosen, 2009).

Son yıllarda mikotoksin analizi konusundaki en büyük gelişme, HPLC'nin dedektör olarak kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanımı olmuştur. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) arayüzlerini kullanan HPLC-MS/MS teknikleri, kolaylığı, yüksek hassasiyeti ve doğruluğu nedeniyle en çok tercih edilen yöntemler haline gelmiştir. Bu yöntemlerle kompleks matrislerde, farklı kimyasal gruplara dahil toksinlerin analizi

aynı anda ve türevlendirmeye gerek kalmadan yapılabilmektedir. ESI ve APCI arayüzleri ile tek bir kromatografik analizde pozitif ve negatif iyonizasyon modları arasında geçiş yapılabilmesi analizin hızlı gerçekleştirilebilmesini sağlamaktadır. Literatürde, gıda ve yemlerde mikotoksinlerin LC-MS veya LC-MS/MS ile analizi üzerine çok fazla yayın bulunmakta olup, bu teknikler günümüzde modern mikotoksin analizlerinin temel bir parçasını oluşturmaktadır (Köppen et al., 2010; Devreese et al., 2012). Bu yöntemlerden bazıları, matris bileşenlerinin toksinin iyonlaşma etkinliği üzerindeki olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için saflaştırma işlemini önerirken (Sørensen and Elbæk, 2005; Lattanzio et al., 2007), bazıları ise ham ekstraktın saflaştırılmadan, sadece seyreltikten sonra analizine dayanmaktadır (Sulyok et al., 2006; Spanjer et al., 2008). Güvenilir bir miktar tayini için kalibrasyonun matris etkisi dikkate alınarak yapılması ve/veya izotopik olarak etiketlenmiş iç standartların kullanılması önerilmektedir (Cigić and Prosen, 2009).

Gıda işleme sırasında çeşitli biyolojik, enzimatik veya kimyasal dönüşümlerle ortaya çıkabilen matrise bağlı toksinler yukarıda belirtilen rutin analiz yöntemleri ile belirlenememektedir. Mikotoksin konjugatları, toksinden farklı bir polariteye sahip olduğundan ekstraksiyon ve/veya saflaştırma sırasında kayba uğrayabilmektedir (Köppen et al., 2010). Örneğin DON'a göre daha polar özellikte olan konjuge DON yüksek sıcaklıkta ve trikloroasetik asit (TCA), trifloroasetik asit (TFA) veya triflorometansulfonik asit (TFMSA) gibi asitlerle hidrolize uğratıldıktan sonra analiz edilebilmektedir (Liu et al., 2005; Zhou et al., 2007; Tran and Smith, 2011). Bağlı fumonisinlerin analizi için ise gıda maddesine bazik hidroliz uygulanmakta ve böylece toksinin matristen ayrılarak hidrolize formda (HFB) açığa çıkması sağlanmaktadır (Seefelder et al., 2001; Seefelder et al., 2003). LC-MS/MS, bilinmeyen mikotoksin konjugatlarının ve reaksiyon ürünlerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve tayini için çok güçlü bir yöntemdir (Berthiller et al., 2005; Kushiro, 2008; Köppen et al., 2010). Ticari standartları olduğu takdirde bu bileşikler için analitik yöntemler geliştirilebilmekte ve miktar tayinleri yapılabilmektedir (Berthiller et al., 2005; Berthiller et al., 2009b).

Diğer taraftan mikotoksin analizlerinde hızlı var/yok sonuçlarına duyulan ihtiyaç pek çok yeni izleme metodunun geliştirilmesine de yol açmıştır. Özellikle immunoanalitik prensiplere dayanan hızlı ve kullanımı kolay test kitleri veya yapay

makromoleküler reseptörlerin geliştirilmesinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. ELISA sistemleri (enzyme linked immunosorbent assays), mikotoksinlerin kantitatif ve yarı-kantitatif analizlerinde yaygın uygulama alanı bulmuş olup bütün temel mikotoksinler için ticari test kitleri mevcuttur. Genel olarak bu teknik, mikro-plaka kuyucuklarında antijen ve antikorun reaksiyonunu kapsamakta ve kromojenik bir substratın eklenmesinden sonra optik bir ELISA okuyucu kullanılarak analitin miktar tayini yapılabilmektedir. Ancak bu tekniklerin doğruluğu ve hassasiyeti daha düşük olduğundan çoğunlukla örnekteki yaklaşık kontaminasyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılmakta ve pozitif sonuçların daha seçici yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir (Turner et al., 2009; Köppen et al., 2010).

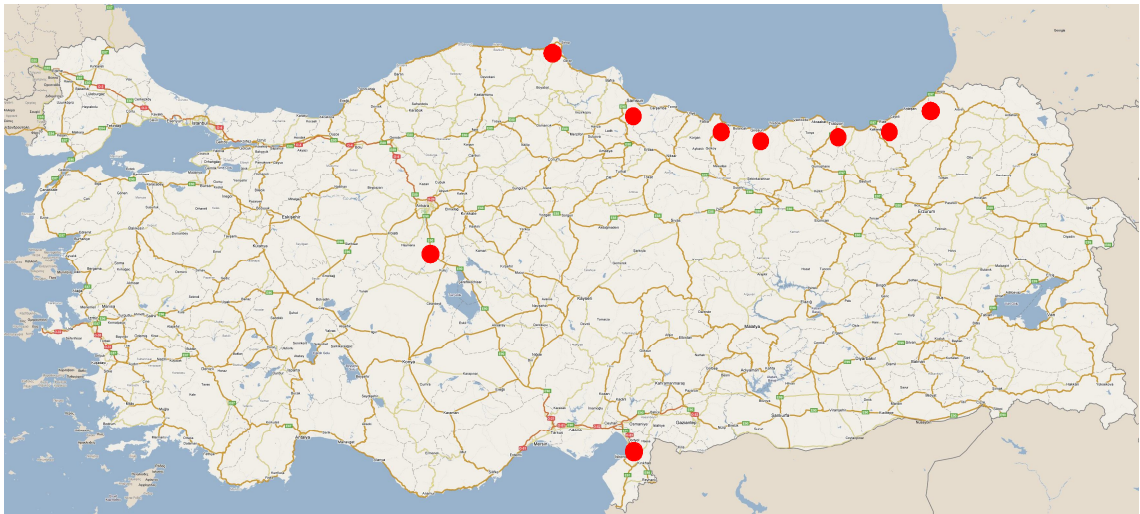
3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

ZEA standardı R-Biopharm (Germstadt, Almanya)'dan, DON standardı (%98 saflıkta) Sigma (Diesenhofen, Almanya)'dan, T-2 ve HT-2 standartları Sigma-Aldrich (Milan, İtalya)'den, FB₁ ve FB₂ standard çözeltileri Biopure (Tulln, Avusturya) firmasından sağlanmıştır. Her bir toksine spesifik IMA kolonları Vicam (Watertown, MA, ABD) ve R-Biopharm (Germstadt, Almanya)'dan sağlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan ultra saf su, bir Millipore Milli-Q sistemi (Millipore, Bedford, MA, ABD) kullanılarak elde edilmiştir.

3.1.1. Mısır örnekleri

Ekme ve geliştirilmiş ürünlerin üretiminde doğal kontamine mısır örnekleri kullanılmıştır. Bu örnekler Karadeniz Bölgesi'nin farklı yörelerinden (Trabzon, Sinop, Rize, Artvin, Giresun, Samsun ve Ordu) ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nden (Hatay) sağlanmıştır (Şekil 3.1). Karadeniz Bölgesi'nden sağlanan örneklerin bir kısmı Ocak-Mart 2008 tarihleri arasında toplanmış, bir kısmı ise 2009 yılının Ekim ayı hasatından alınmıştır. Kontaminasyonun artması için örnekler geç hasat edilmiştir. Akdeniz Bölgesi'nden ise Kasım 2009'da ikinci ürün mısırdan örnekler alınmıştır. Ayrıca yerel marketten (Ankara) alınan ve orijini bilinmeyen 5 örnek de incelenmiştir. Uygulanan işlemlerin mikotoksinler üzerindeki etkisini daha iyi gözlemleyebilmek için özellikle yüksek küf kontaminasyonlu örnekler tercih edilmiştir. Toplanan 38 adet örnek Çizelge 3.1'de verildiği şekilde numaralanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan mısır örneklerinin sağlandığı bölgeler

Çizelge 3.1. Mısır örnekleri

Örnek no	Şehir
1 - 18	Trabzon
19 - 23	Giresun
24 ve 25	Samsun
26 ve 27	Rize
28	Artvin
29	Sinop
30	Ordu
31 - 33	Hatay
34 - 38	Ankara (market)

Helva ve kuymakta fumonisin çalışmaları ise, Güney İtalya bölgesinde tarlada kontrollü olarak *Fusarium* kontaminasyonuna uğratılmış bir mısır örneği (mısır 1) kullanılmıştır. Ayrıca bağlı fumonisin düzeylerini belirlemek için iki farklı çeşitteki mısır örneğinde daha (mısır 2 ve 3) analizler yapılmıştır. Mısırlar laboratuvar değirmenleri (HD-703 model, Şimşek Laborteknik, Ankara ve MLI 204 model Bühler S.p.A, Milan, İtalya) ile 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar ve malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasal madde ve malzemeler aşağıda sunulmuştur. Kimyasalların tümü analitik saflıkta, çözücüler HPLC ve LC-MS sistemlerinde kullanım için uygun saflıktadır.

Polietilen glikol (PEG) (molekül ağırlığı 8000)	: Sigma (Diesenhofen, Almanya)
Asetonitril	: Sigma (Diesenhofen, Almanya)
Amonyum asetat	: Sigma (Diesenhofen, Almanya)
Sodyum klorür	: Sigma (Diesenhofen, Almanya)
Metanol	: Merck (Darmstadt, Almanya)
Glasiyal asetik asit	: Carlo Erba (Milan, İtalya)
Potasyum hidroksit (KOH)	: J.T. Baker (Deventer, Hollanda)
Fosfat tamponu (PBS, pH 7.4)	: Sigma-Aldrich (Milan, İtalya)
o-fitaldialdehit (OPA)	: Sigma-Aldrich (Milan, İtalya)

2-mercaptoetanol	: Sigma-Aldrich (Milan, İtalya)
Dibazik sodyum fosfat (Na ₂ HPO ₄)	: Sigma-Aldrich (Milan, İtalya)
Sitrik asit (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	: Sigma-Aldrich (Milan, İtalya)
1-antrolnitril (1-AN)	: Wako (Neuss, Almanya)
4-dimetilaminopiridin (DMAP)	: Mallinckrodt Baker (Milan, İtalya)
Toluen	: Mallinckrodt Baker (Milan, İtalya)
Whatman No. 4 filtre	: Whatman (Maidstone, UK)
Cam mikrofiber (GF/A) filtre	: Whatman (Maidstone, UK)

3.2. Metot

3.2.1. Model sistem

Mısır ekmeği üretiminde uygulanan pişirme koşullarında ZEA ve DON'un termal bozunma davranışı, model sistem üzerinde çalışılarak belirlenmiştir.

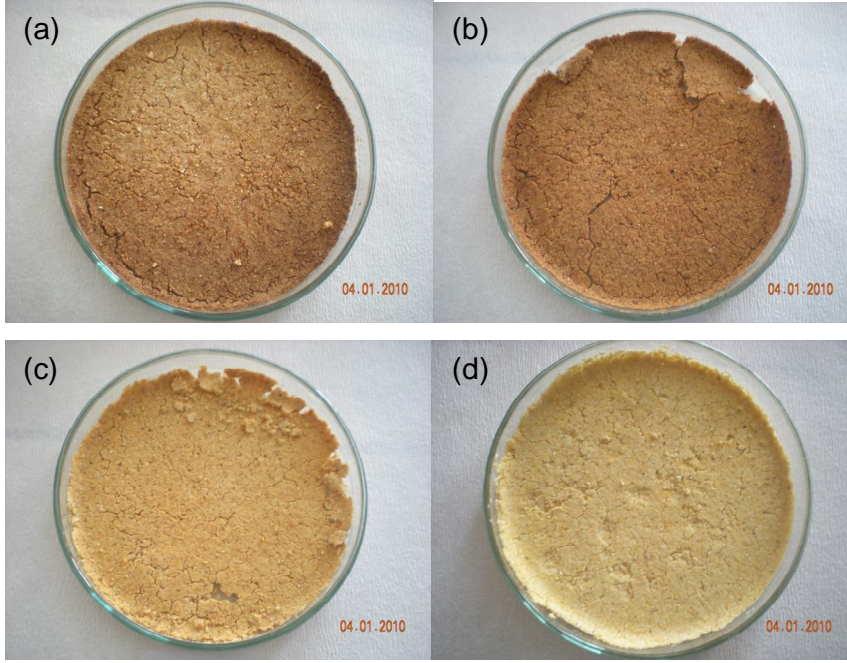
3.2.1.1. Örnek hazırlama

Model sistem örnekleri yüksek ZEA ve DON kontaminasyonuna sahip olduğu belirlenen mısır unlarından, Açar ve Gökmen (2009)'in önerdiği kabul modeli esas alınarak hazırlanmıştır. Model örneklerin hazırlanmasında, geleneksel mısır ekmeği formülasyonuna uygun olarak mısır unu, su ve tuz karıştırılarak hamur elde edilmiştir. Hazırlanan hamur 9.5 cm çapında ve 1 mm kalınlığında diskler haline getirilmiştir. Bu formülasyona göre her bir hamur diski yaklaşık 12 g mısır unu, 8 ml su ve 0.1 g tuzdan oluşmuştur. Analizler için yeterli miktarda örnek elde edilebilmesi açısından disklerin ağırlığı daha fazla düşürülemedi ve kalınlığın da 1 mm'yi aşmaması için çapı daha fazla küçültmek mümkün olmamıştır.

3.2.1.2. Isıl işlem

Hazırlanan hamur disklerine, önceden ısıtılmış laboratuvar tipi bir fırında (Memmert, UNE 400, Almanya), 100-250°C sıcaklık aralığında belirli sürelerle ısıl işlem uygulanmıştır. Toplam işlem süreleri 250°C'de 15 dakika, 200°C'de 30 dakika, 150°C'de 3 saat ve 100°C'de ise 3 veya 6 saattir (Şekil 3.2). Bu sıcaklıklar, ekmeğin pişirildiği fırın sıcaklığı (250°C) ve pişirme sırasında ekmeğin içinde ulaşılan yaklaşık sıcaklık (90-100°C) dikkate alınarak belirlenmiştir. Toplam işlem sürelerine ise ön ısıtma denemelerinin sonuçlarına göre karar verilmiş olup, özellikle 200 ve 250°C'de örneklerin yanmaya yüz tuttuğu süreler esas alınmıştır.

Fırından uygun zaman aralıklarıyla alınan örnekler öğütüldükten sonra mikotoksin düzeyleri belirlenmiştir.



Şekil 3.2. (a) 250°C'de 15 dak, (b) 200°C'de 30 dak, (c) 150°C'de 3 saat ve (d) 100°C'de 3 saat ısıtım uygulanan model sistem örnekleri

3.2.1.3. Sıcaklık ölçümleri

Hamur disklerine uygulanan ısıtım işlemlerin amaçlandığı gibi izotermal şartlarda gerçekleştiğini ve sıcaklık gradyanının oluşumunun önüne geçilebildiğini doğrulamak amacıyla sıcaklık değişimleri incelenmiştir. Çalışılan her bir sıcaklıkta, hem fırın iç sıcaklığı hem de hamur disklerinin merkez ve kenar sıcaklıkları bir veri toplama sistemi (Keithley Multimeter Data Acquisition System, Integra Series Model 2700, Cleveland, OH) yardımıyla ölçülerek kaydedilmiştir. Bunun için veri toplama sistemine bağlı ısıtım çiftleri (thermocouple) örnek merkezi, örnek kenarı ve fırın içerisine yerleştirilmiştir (Çetinkaya Açar, 2010). Elde edilen sıcaklık – süre verileri kullanılarak sıcaklık profilleri oluşturulmuştur.

3.2.2. Mısır ekmeği üretimi

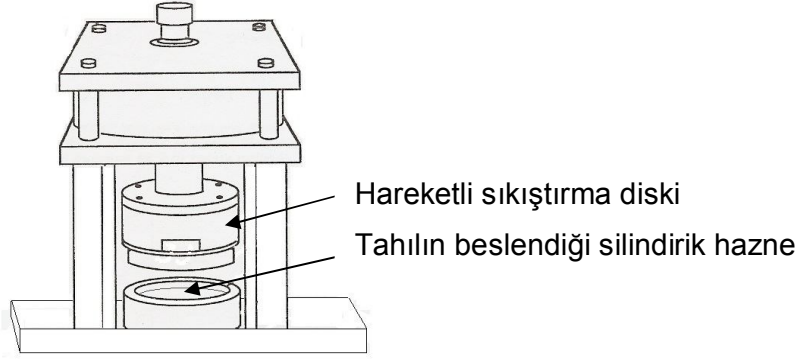
Toksinlerin, model sistem çalışması ile belirlenen termal bozunma davranışlarının gerçeğe uygunluğunu test etmek için küçük ölçekte mayasız mısır ekmeği üretimi gerçekleştirilmiştir. Geleneksel formülasyona göre mısır unu (100 g), su (65 ml, 45°C) ve tuz (1g) karıştırılarak hazırlanan hamur, 9 x 5.5 cm boyutlarında ve yüksekliği 8.5 cm olan yağlanmış teflon ekmeğ kalıplarına konmuştur. Ekmekler 250°C'ye ayarlı fırında 1 saat 10 dakika süreyle pişirilmiştir. Bu sırada ısıçiftler ve veri toplama sistemi kullanılarak ekmeğin kabuğu ve merkezinde ulaşılan sıcaklıklar kaydedilmiştir. Ekmeğin piştikten sonraki kalınlığı yaklaşık 4 cm, kabuk kalınlığı ise yaklaşık 5 mm olarak ölçülmüştür.

Fırından çıkarılan ekmekler soğutulduktan sonra iç ve kabuk kısımları ayrılarak öğütülmüştür. Ekmek içindeki nem miktarı (%30-35) una göre çok yüksek olduğundan ve bu durum analiz sonuçlarının doğruluğunu etkilediğinden, ekmeğ içi analiz edilmeden önce etüvde (40°C'de 17 saat) kurutulmuştur.

3.2.3. Genleştirilmiş mısır ürünlerinin üretimi

Genleştirilmiş mısır ürünleri, gevrek çerez tipi bir ürün olan pirinç kekinin üretiminde kullanılan Harry Popper (HHP 4506 model, Erom, Co. Ltd., Kore) cihazı ile üretilmiştir. Bu cihaz ile tahıllardan yüksek sıcaklık ve basınç altında genleştirilmiş ürünler üretilmektedir. Tahılların (mısır, pirinç, buğday) un haline getirilmeden patlamasını sağlayan ve çerez üretiminde kullanılan ekstrüder benzeri sistemin şematik gösterimi Şekil 3.3'de verilmektedir. Bu makine ile ürünler yaklaşık 4.5 cm çapında ve 11 mm kalınlığındaki diskler şeklinde üretilmektedir (Şekil 3.4). Tane halindeki tahıllar, 200-250°C'ye ısıtılmış silindirik haznelere beslenmektedir. Silindirik haznenin içerisinde 6 saniye kalan tane, 15 MPa'lık basınçla sıkıştırıldıktan sonra basıncın hızlıca kaldırılması ile patlamakta ve patlama esnasında silindirik haznenin şeklini alarak ürünün disk şeklinde bir görünüm kazanmasına neden olmaktadır.

Bu cihazla, genleşmeye uygun doğal kontamine mısırlardan 200, 240, 267°C'de ve 15 MPa basınç altında genleştirilmiş mısır ürünlerinin üretimi gerçekleştirilmiş ve ürünlerde mikotoksin (ZEA ve DON) düzeylerindeki azalma belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Genleştirilmiş ürünlerin üretiminde kullanılan cihaz



Şekil 3.4. Genleştirilmiş mısır ürününün görüntüsü

3.2.4. Helva üretimi

Helva üretimi için 75 g mısır unu, 30 g tereyağı (%82 yağlı), 75 g şeker, 75 ml UHT süt (%3.5 yağlı) ve 75 ml su kullanılmıştır. Öncelikle şerbetin hazırlanması için su ve şeker karıştırılarak 5 dakika kaynatılmış ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Diğer taraftan, tereyağı pişirme kabına konmuş ve ısıtıcı (RCT basic, IKA Werke, Almanya) 300°C'ye ayarlanmıştır. 4 dakika sonra mısır unu eklenmiş ve 7 dakika boyunca devamlı karıştırılarak kavrulmuştur. Isıtıcının sıcaklığı 200°C'ye düşürüldükten sonra eşit miktarda sütle karıştırılan şerbet kavrulan una ilave edilmiş ve 5 dakika boyunca karıştırarak pişirme işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.5). Ürün soğuduktan sonra liyofilizasyon tekniği ile kurutulup öğütülmüş ve analize alınmıştır.



Şekil 3.5. Mısır helvası

Helva üretimi üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve standart bir üretim yapılıp yapılamadığı kontrol etmek amacıyla her bir deneme sırasında ürün sıcaklığı dijital bir termometre ile takip edilmiştir. Tereyağının eritilmesi ve mısır ununun kavrulması sırasında ölçüm yapılması mümkün olmadığından, sıcaklık ölçümüne şerbet ilavesinden 1 dakika sonra (12. dakikada) başlanabilmiş ve pişirme tamamlanana (16. dakikaya) kadar devam edilmiştir.

Helva üretimi hem doğal kontamine mısır unu hem de toksin içermeyen bir un örneği ile gerçekleştirilmiştir. Toksin içermeyen örnek geri kazanım çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5. Kuymak üretimi

Kuymak üretiminde kullanılan malzemeler 45 g mısır unu, 600 ml UHT süt (%3.5 yağlı) ve 3 g tuzdur. Uygun bir pişirme kabına alınan süt ısıtıcı üzerine yerleştirilmiş ve ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Isıtıcı 300°C'ye ayarlandıktan 13 dakika sonra süt kaynamaya başlamış ve mısır unu kaynayan süte 30 saniye içerisinde karıştırılarak ilave edilmiştir. Tuz ilavesi yapıldıktan sonra 15 dakika boyunca devamlı karıştırılarak pişirilmiştir (Şekil 3.6). Kuymak soğuduktan sonra liyofilizasyon tekniği ile kurutulmuş ve öğütülmüştür.



Şekil 3.6. Kuymak

Kuymak üretimi dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve her bir üretimde, pişirmenin değişik kademelerde dijital bir termometre ile sıcaklık ölçümleri yapılarak standart bir üretim yapılıp yapılmadığı kontrol edilmiştir. Kuymak yapımı hem doğal kontamine mısır unu hem de toksin içermeyen bir un örneği ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Mikotoksin analiz yöntemleri

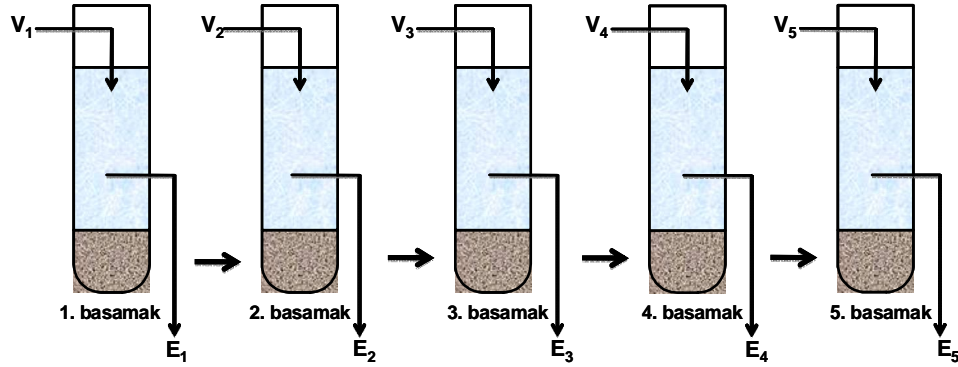
Mikotoksin analizleri aşağıda verilen yöntemler kullanılarak ve iki veya üç paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. DON analiz yöntemi

Örneklerde DON analizi için MacDonald ve ark. (2005b)'nın bildirdiği yöntem esas alınmış, ancak ekstraksiyon yönteminde bildirildiği gibi tek basamakta değil üç basamakta gerçekleştirilmiştir. Tek basamaklı ekstraksiyonun yeterli olmadığına aşağıda açıklanan çalışmaların gerçekleştirilmesi sonucunda karar verilmiştir. Üç farklı konsantrasyonda DON içeren doğal kontamine mısır unu örnekleri, su ve PEG ile ardı ardına beş defa ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.7). Beş kademeli ekstraksiyonun ilk basamağında, 20 g örnek 80 ml su ve 4 g PEG ile mekanik karıştırıcıda (Stuart Scientific, SF1, Redhill, UK) 30 dakika süreyle ekstrakte edilmiştir. Örnek 5000xg hızla 5 dakika santrifüjlenmiş ve GF/A filtreden süzülerek sıvı kısmı (E₁) ayrılmıştır. Daha sonraki basamakların her birinde katı kısım 40'ar ml su ile 30'ar dakika daha ekstrakte edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Her kademedede elde edilen ekstraktlar (E₂-E₅) GF/A filtreden geçirildikten sonra IMA kolonlara belli hacimlerde yüklenerek saflaştırılmıştır (Çizelge 3.2). Analizler iki paralelli olarak gerçekleştirilmiş, her bir basamaktaki DON konsantrasyonu ve ekstraksiyon verimi belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları "Araştırma Sonuçları ve Tartışma" bölümünde verilmiş olup, sonuç olarak ekstraksiyonun en az iki basamakta yapılması gerektiği anlaşılmıştır.

Yukarıda açıklanan çalışmanın sonuçlarına göre mısır unu, model sistem örnekleri, ekme ve genleştirilmiş ürünlerde uygulanmasına karar verilen DON analiz yöntemi şu şekildedir; 5 g öğütülmüş örnek 20 ml su ve 1 g PEG ile vorteks karıştırıcıda 2 dakika boyunca karıştırılmıştır. 8000xg hızında 5 dakika santrifüjlendikten sonra üstte kalan faz alınmış, alttaki katı kısım 2 defa daha 10 ml su ile ekstrakte edilmiştir. Üç kademeli ekstraksiyon sonucunda süpernatantların

birleştirilmesiyle elde edilen ekstrakt sırasıyla Whatman no.4 ve GF/A filtreden filtre edildikten sonra IMA kolonlar ile saflaştırma işlemine alınmıştır.



Şekil 3.7. DON analizi için çok basamaklı ekstraksiyonun şematik gösterimi (Gökmen et al., 2009)

Çizelge 3.2. DON için çok basamaklı ekstraksiyon denemesindeki koşullar

Ekstraksiyon kademesi	Su hacmi (ml)	IMA kolondan geçirilen ekstrakt hacmi (ml)	Kalıntının çözündürüldüğü mobil faz hacmi (μ l)	HPLC'ye enjekte edilen matris miktarı (ng)
1	80	1	500	0.050
2	40	3	400	0.375
3	40	5	400	0.625
4	40	7	400	0.875
5	40	9	400	1.125

Ekstrakt saflaştırma işleminde, 2 ml ekstrakt IMA kolondan 1 damla/s hızında geçirildikten sonra 5 ml su veya fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkama yapılmıştır. Su trombu ile vakum oluşturularak kolonun kurutulması sağlanmış ve daha sonra toksin kolondan 1.5 ml metanol geçirilerek alınmıştır. 50°C'de azot gazı akımında kurutulan örnek 1000 μ l mobil faz ile çözündürüldükten sonra HPLC sistemine 100 μ l hacminde enjekte edilmiştir. Kullanılan HP Agilent 1100 HPLC sistemi (Waldbronn, Almanya) kuarternar pompa, otomatik enjeksiyon sistemi, DAD dedektör ve kolon fırınından oluşmaktadır. Kullanılan analitik kolon LiChrospher100 RP-18 (4 x 250 mm, 5 μ m) olup Agilent (Waldbronn, Almanya) firmasından sağlanmıştır. HPLC sisteminde uygulanan koşullar Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. DON analizi için HPLC koşulları

Mobil faz:	Su-asetonitril (90:10, v/v)
Dalgaboyu (DAD):	220 nm
Akış hızı:	1 ml/dak
Sıcaklık:	25°C

DON stok çözeltisi asetonitril içerisinde ve 1.0 mg/ml derişimde hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hazırlanan kalibrasyon stok çözeltisinin (100 µg/ml) mobil faz ile uygun oranlarda seyreltilmesiyle çalışma standart çözeltileri elde edilmiştir. Kalibrasyon noktaları, analiz edilecek örneklerdeki yaklaşık toksin konsantrasyonları dikkate alınarak belirlenmiş ve kalibrasyon doğruları en az 5 noktali olacak şekilde oluşturulmuştur. Elde edilen r^2 değerleri çalışılan aralıkta doğrusallığın yüksek olduğunu göstermiştir.

3.2.6.2. T-2 ve HT-2 toksin analiz yöntemi

T-2 ve HT-2 toksinin floresans dedektörlü HPLC ile analizi için türevlendirme ajanı olarak 1-AN reaktifinin kullanıldığı bir analiz yöntemi uygulanmıştır (Visconti et al., 2005). Bu yöntemde göre 50 g örnek, 1 g NaCl ve 100 ml metanol-su (90:10, v/v) karışımı ile yüksek hızlı bir karıştırıcıda 2 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir. Filtre edilen ekstraktın 10 ml'si 40 ml %4'lük (w/v) NaCl çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra GF/A filtreden geçirilmiştir. 10 ml filtrat (1 g örneğe eşdeğer) IMA kolon ile saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur.

Filtratlar IMA kolonlardan 1 damla/s hızında geçirilmiştir. 10 ml saf su ile yıkanan kolon kurutulduktan sonra 1.5 ml metanol ile toksinlerin kolondan alınması sağlanmıştır. 50°C'de hava akımı ile kurutulan örnek kolon öncesi türevlendirmeye tabi tutulmuştur. Türevlendirme işlemi için toluende sırasıyla 0.325 ve 0.3 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan DMAP ve 1-AN çözeltileri kullanılmıştır. 50'şer µl DMAP ve 1-AN çözeltisi kurutulmuş kalıntıya eklendikten sonra 1 dakika vortekslenmiş ve 50°C'de 15 dakika boyunca reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla örnekler -20°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon karışımı 50°C'deki hava akımıyla kurutulmuş, 1000 µl mobil faz içinde (asetonitril-su, 70:30, v/v) çözüldürülmüştür. Çözeltinin 50µl'si (0.05g örnek) Agilent 1100 HPLC-FLD sistemine enjekte

edilmiştir. Kromatografik ayırım Phenyl-Hexyl Luna® (4.6 × 150 mm, 5µm) kolonda (Phenomenex, Torrance, ABD) gerçekleştirilmiştir. Kullanılan mobil faz, HPLC koşulları ve lineer gradiyen programı Çizelge 3.4 ve 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. T-2 ve HT-2 analizi için HPLC koşulları

Mobil faz:	A: asetonitril B: su
Dalgaboyları (FLD):	Uyarma: 381 nm Emisyon: 470 nm
Akış hızı:	1 ml/dak
Sıcaklık:	23°C

Çizelge 3.5. T-2 ve HT-2 analizi için HPLC'de uygulanan lineer gradiyen programı

	Süre (dak)	%A	%B
1	5.0	70	30
2	15.0	85	15
3	22.0	85	15
4	24.0	100	0
5	29.0	100	0
6	29.1	70	30
7	39.0	70	30

T-2 ve HT-2 toksinlerinin her birini 50 µg/ml konsantrasyonda içeren stok çözelti asetonitrilde hazırlanmıştır. Kalibrasyon çözeltileri, stok çözeltilerden asetonitril kullanılarak ve 0.01-0.1 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve HPLC analizi öncesinde yukarıda açıklandığı şekilde türevlendirilmiştir. Stok çözeltiler ve kalibrasyon çözeltileri sırasıyla -20 ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6.3. ZEA analiz yöntemi

Mısır unu, model sistem örnekleri, ekmek ve geliştirilmiş ürünlerdeki ZEA analizleri, MacDonald ve ark. (2005a) tarafından bildirilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. DON analizinde olduğu gibi üç basamaklı olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde, 5 g öğütülmüş örnek ilk olarak 10 ml ekstraksiyon çözeltisi (asetonitril-su, 75:25, v/v) ile 2 dakika

vortekslenmiş ve 8000xg hızda 5 dakika santrifüjlenmiştir. Tüpte kalan retentat üzerine tekrar 7.5 ml ekstraksiyon çözeltisi ilave edilerek vortekslenmiş ve santrifüjlenmiştir. Ekstraksiyon işlemi 7.5 ml ekstraksiyon çözeltisi ile üçüncü defa tekrarlanarak tüm süpernatantlar birleştirilmiştir. Süpernatantlara karışan retentat partiküllerinin ayrılması amacıyla Whatman no.4 filtre kağıdından filtrasyon yapılmıştır. Elde edilen filtratın 15 ml'si 85 ml PBS ile seyreltilmiş ve GF/A filtreden geçirilmiştir.

IMA kolonlar ile saflaştırma işleminde, 25 ml filtrat kolonlardan 1 damla/s hızında geçirildikten sonra 20 ml su veya PBS ile yıkama yapılmıştır. Su trombu ile vakum oluşturularak kolonların kurutulması sağlanmış ve daha sonra toksin kolonlardan 1.5 ml asetonyril geçirilerek alınmıştır. 50°C'de azot gazı akımında kurutulan örnek 1000 µl asetonyril-amonyum asetat tamponu (15mM) (50:50, v/v) ile çözdürüldükten sonra Agilent 1100 HPLC-FLD sistemine 100 µl hacminde enjekte edilmiştir (Çizelge 3.6). Saflaştırma aşamasında kullanılan IMA kolonun markasına göre (Vicom veya R-Biopharm), örnek yükleme öncesindeki kolon şartlandırma ve sonrasındaki kolon yıkama basamaklarında ve örnek yükleme hacimlerinde farklılıklar olabilmektedir. Her bir durumda HPLC'ye enjekte edilen matris miktarları belirlenerek hesaplamalarda kullanılmıştır. Kromatografik ayırım LiChrospher100 RP-18 (4 x 250 mm, 5µm) kolonda gerçekleştirilmiş, mobil faz olarak asetonyril - 15mM amonyum asetat (47:53, v/v) izokratik karışımı kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. ZEA analizi için HPLC koşulları

Mobil faz:	Asetonyril-amonyum asetat tamponu (15mM) (47:53, v/v)
Dalgaboyları (FLD):	Uyarma: 275 nm Emisyon: 450 nm
Akış hızı:	1 ml/dak
Sıcaklık:	35°C

Kristal haldeki ZEA standardı asetonyrilde çözdürülerek 25 µg/ml'lik stok çözeltisi ve bu çözeltiden de kalibrasyon stok çözeltisi (1.0 µg/ml, asetonyril-amonyum asetat, 50:50, v/v) hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğruları çalışılan

aralıklarda en düşük 0.9993'lük bir r^2 değeri ile iyi bir doğrusallık göstermiştir. Stok çözelti -20°C'de, kalibrasyon çözeltileri 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6.4. Fumonisin analiz yöntemleri

Mısır örneklerinin toksin düzeylerinin belirlenmesi çalışmasında FB₁ ve FB₂ analizi yapılmıştır. Kuymak ve helva ürünlerinde ise aşağıdaki fumonisin formları analiz edilmiştir;

- Fumonisinler (FB₁ ve FB₂)
- Fumonisinlerin doğal ve bazik hidrolize formları (HFB₁ ve HFB₂)

FB₁ ve FB₂ analizi için aşağıda verilen ve HPLC-FLD'ye dayalı olan analiz yöntemi kullanılmıştır. Hidrolize fumonisinlerin analizleri ise LC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir. HPLC analizlerinde miktar tayini kalibrasyon eğrisi kullanılarak, LC-MS/MS'de ise matris-destekli tek nokta kalibrasyonu kullanılarak yapılmıştır.

Fumonisinlerin HPLC ile analizi

FB₁ ve FB₂'in HPLC-FLD ile analizi için, mısırdan yapılan bazı gıdalar için geliştirilmiş ve laboratuvarlar arası validasyonu gerçekleştirilmiş olan bir yöntem kullanılmıştır (De Girolamo et al., 2010). Ekstraksiyon çözeltisi sitrat tampon çözeltisi-metanol-asetonitril (50:25:25, v/v/v) karışımıdır. Sitrat tampon çözeltisi sitrik asit çözeltisi (0.1 mol/L) ile dibazik sodyum fosfat çözeltisinin (0.2 mol/L) eşit hacimde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. 20 g öğütülmüş örnek ilk olarak 100 ml ekstraksiyon çözeltisi ile 120 rpm hızda ve 55°C sıcaklıkta 60 dakika süreyle karıştırılmıştır. Daha sonra orbital karıştırıcıda ve oda sıcaklığında 30 dakika süreli bir karıştırma işlemi uygulanmış ve örnek 3000xg hızında 15 dakika santrifüjlenmiştir. Whatman no.4 filtre kağıdından süzülen örneğin 10 ml'si 40 ml su ile karıştırıldıktan sonra GF/A filtreden geçirilmiştir.

Saflaştırma aşamasında, 25 ml filtrat IMA kolondan 1-2 damla/s hızında geçirildikten sonra kolon 10 ml PBS ve 2 ml su ile yıkanmıştır. Kurutulan kolonlardan fumonisinlerin alınması için, 2 ml metanol ve 2 ml su 1-2 damla/s'den hızlı olmayacak şekilde kolondan geçirilmiştir. Yaklaşık 60°C'de azot gazı ile kurutulan ekstrakt 500µl asetonitril-su (30:70, v/v) ile 1 dakika boyunca vortekslenerek çözüldürülmüş ve HPLC analizine kadar 4°C'de saklanmıştır.

Temizlenen örnekler, Agilent 1100 HPLC-FLD sisteminde, OPA reaktifi ile kolon öncesi türevlendirme yapılarak analiz edilmiştir. OPA reaktifi, 40 mg OPA'nın 1 ml metanolde çözüldükten sonra 5 ml 0.1 M disodyum tetraborat ile seyreltilmesi ve 50 µl 2-merkaptolanol ilavesi ile hazırlanmıştır. Bu çözelti koyu renkli bir şişede, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 haftadan kısa süre muhafaza edilmiştir. Uygulanan otomatik türevlendirme programı ile 110µl ekstraktın eşit hacimde OPA ile 30 saniye karıştırılması sağlanmış ve böylece fumonisinlerin floresans türevleri oluşturulmuştur. Bu çözeltinin 50 µl'si OPA ilavesinden tam 3 dakika sonra kromatografik sisteme enjekte edilmiştir. Analitik kolon olarak Symmetry Shield RP 18 ters faz kolon (4.6 x 150 mm, 5µm) (Waters, Bellefonte, PA, ABD) kullanılmıştır. Mobil faz A ve B sırasıyla 30:69:1 ve 60:39:1 (v/v/v) oranlarındaki asetonitril-su-asetik asit karışımlarıdır (Bullerman et al., 2008). HPLC koşulları Çizelge 3.7'de, analiz sırasında uygulanan lineer gradiyen programı ise Çizelge 3.8'de verilmiştir (De Girolamo et al., 2010).

Çizelge 3.7. FB₁ ve FB₂ analizi için HPLC koşulları

Mobil faz:	A: asetonitril-su-asetik asit (30:69:1, v/v/v) B: asetonitril-su-asetik asit (60:39:1, v/v/v)
Dalgaboyları (FLD):	Uyarma: 335 nm Emisyon: 440 nm
Akış hızı:	0.8 ml/dak
Sıcaklık:	20°C

Çizelge 3.8. FB₁ ve FB₂ analizi için HPLC'de uygulanan lineer gradiyen programı

	Süre (dak)	%A	%B
1	5.0	60	40
2	26.0	12	88
3	29.0	12	88
4	29.1	0	100
5	30.0	0	100
6	30.1	60	40
7	38.0	60	40

Ticari FB₁ ve FB₂ standart çözeltilerinin her biri asetonitril-su (50:50, v/v) içinde 50 µg/ml konsantrasyonunda toksin içermektedir. Bu çözeltiler uygun oranlarda karıştırılarak 40 µg/ml FB₁ ve 10 µg/ml FB₂ içeren bir stok fumonisin çözeltisi hazırlanmıştır. FB kalibrasyon çözeltileri FB₁ ve FB₂ için sırasıyla 40.64-1016 ng/ml ve 10.05-251.25 ng/ml aralıklarında hazırlanmıştır. FB₁ ve FB₂ kalibrasyon doğrularının belirleme katsayıları (r^2) sırasıyla 0.9987 ve 0.9982'dir.

Fumonisinler ve doğal hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile analizi

Yukarıda açıklanan FB₁ ve FB₂ analiz yönteminde kullanılan IMA kolonlar fumonisinlerin hidroliz sonucu açığa çıkan formlarına (HFB₁ ve HFB₂) seçicilik göstermemektedir. Bu nedenle analiz için IMA kolonlar kullanılamamış, farklı saflaştırma yöntemleri (SPE kolonlarla) uygulanarak ve saflaştırma uygulanmadan HPLC-FLD ile ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Her iki durumda, fumonisinlere floresans özellik kazandırmak için türevlendirme işlemi OPA ile gerçekleştirilmiş ancak OPA, HFB₁ piki ile girişim yapmıştır. Bu problem HPLC koşullarında değişiklik yapılmasına rağmen giderilemediği için HPLC tekniğinin bu bileşiklerin (HFB) analizi için uygun olmadığına karar verilmiştir. Ayrıca saflaştırma yöntemlerinin hiçbiri ile yeterince temiz örnekler elde edilememiş, kromatogramda girişim yapan bileşikler nedeniyle miktar tayini zorlaşmıştır.

Literatürde, mısır ürünlerinde fumonisinlerin farklı formlarının HPLC ile analizinde girişim yapan maddelerin varlığı ve üründeki ingrediyenlerin fumonisinlerle fiziksel veya kimyasal bağlanmaları nedeniyle önemli problemler yaşandığı bildirilmektedir. Bu problemler, kromatogramların güvenilirliğinin zayıf olması ve geri kazanım değerlerinin yetersizliği şeklinde ortaya çıkmaktadır (Solfrizzo et al., 2001).

Fumonisinler (FB) ve hidrolize fumonisinlerin (HFB) LC-MS/MS ile analizi için iki farklı deneme yapılmıştır;

Deneme 1

Dall'Asta ve ark. (2009b) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde ekstraksiyon, metanol-su (70:30, v/v) karışımı ile gerçekleştirilmiştir. 10 g örnek 100 ml metanol-su (70:30, v/v) ile UltraTurrax kullanılarak (6000 rpm) 10 dakika homojenize edilmiş ve ardından oda sıcaklığında 50 dakika karıştırılmıştır.

Santrifüjlenen örnek (3500xg, 15 dak) 0.45 µm'lik naylon filtreden geçirilmiş ve saflaştırma işlemi yapılmadan doğrudan LC-MS/MS'de analiz edilmiştir.

Deneme 2

Ekstraksiyon, "Fumonisinlerin HPLC ile analizi" bölümünde detayları verilen analiz yöntemindeki gibi gerçekleştirilmiş (De Girolamo et al., 2010) ve örnekler filtre edildikten sonra doğrudan LC-MS/MS'e enjekte edilmiştir.

LC-MS/MS ile fumonisin analizlerinde bir elektrosprey iyon kaynağı (ESI) ve Agilent 1100 mikro-LC sistemi (ikili bir pompa ve bir mikro otomatik enjeksiyon sistemi, Waldbronn, Almanya) ile donatılmış bir QTrap MS/MS sistemi (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılmıştır. ESI arayüzeyi pozitif iyon modunda kullanılmış ve şu arayüzey parametreleri uygulanmıştır; kurutucu gaz (N₂) basıncı 30 psi, sıcaklığı 350°C; nebulizer gaz (hava) basıncı 10 psi; ısıtıcı gaz (hava) basıncı 30 psi; iyonsprey voltajı +5500V. Kütle spektrometresi MRM (Multiple reaction monitoring) dedeksiyon modunda ve Avrupa Komisyonu tarafından bildirilen doğrulama kriterlerini sağlayabilmek amacıyla her molekül için iki geçiş (1 niceleyici ve 1 niteleyici olmak üzere) izlenecek şekilde çalıştırılmış olup, her geçişin (fragment iyonun) dedeksiyonu için geçen süre (dwell time) 50 ms'dir (EC, 2002). FB ve HFB miktar tayini için kullanılan m/z iyonları ve MS/MS parametreleri Çizelge 3.9'da verilmiştir. LC-MS/MS analizlerinin tümü İtalya'da bulunan Ulusal Araştırma Konseyi (National Research Council - CNR) bünyesindeki Gıda Üretim Bilimleri Enstitüsü (ISPA)'nın imkânları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik ayırım Gemini C18 kolonda (2 x 150 mm, 5µm) (Phenomenex, Torrance, CA, ABD) gerçekleştirilmiş, ön kolon olarak da bir Gemini C18 kolon (2 x 4 mm, 5µm) kullanılmıştır. Kolon fırını 40°C'ye ayarlanmıştır. Mobil faz bileşiminde yer alan çözücüler su-%0.5 asetik asit (A) ve metanol-%0.5 asetik asit (B)'dir. Mobil faz kompozisyonu Çizelge 3.10'daki gibi uygulanmış ve akış hızı 0.2 ml/dak olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20µl'dir. Kolondan çıkan eluent, bölme işlemi uygulanmaksızın doğrudan ESI arayüzeyine yönlendirilmiştir.

Çizelge 3.9. MRM metodu ile mikotoksin dedeksiyonu için MS/MS parametreleri

Analit	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
FB ₁	722.40	352.40	80.00	10.00	47.00	14.00
		334.50			55.00	
FB ₂	706.40	336.60	70.00	9.00	45.00	7.00
		318.30			42.00	13.00
HFB ₁	406.30	334.50	70.00	9.00	38.00	4.00
		370.40			30.00	
HFB ₂	390.40	336.40	70.00	9.00	30.00	4.00
		372.40				

Q₁: birinci kuadrupol; Q₃: üçüncü kuadrupol; DP: kümelenmeme (declustering) potansiyeli; EP: giriş (entrance) potansiyeli; CE: çarpışma (collision) enerjisi; CXP: çarpışma hücresi çıkış (collision cell exit) potansiyeli

Çizelge 3.10. LC-MS/MS'de uygulanan lineer gradiyen programı

Süre (dak)	%A	%B
0	60	40
1	20	80
2	20	80
3	0	100
4	0	100
5	60	40
6	60	40

LC-MS/MS sisteminde kalibrasyonlar tek noktalı olarak ve matris etkisi dikkate alınarak yapılmıştır. Matris-destekli kalibrasyon için çözeltiler, toksin içermeyen mısır, kuymak ve helva ekstraktları kullanılarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon noktalarına, analiz edilecek örneklerde beklenen toksin miktarlarına göre karar verilmiştir. FB₁, FB₂, HFB₁ ve HFB₂ için sırasıyla 5.18-13.64, 1.42-3.73, 1.76-23.01 ve 0.48-6.27 nmol/g aralığında değişen konsantrasyonlarda kalibrasyon noktaları kullanılmıştır. Nicel analiz, örneklerin MRM kromatogramlarındaki pik alanlarının ölçülüp matris-destekli kalibrasyon çözeltilerinin pik alanlarıyla karşılaştırılmasıyla yapılmıştır.

Fumonisin miktarlarını belirlemede, ticari FB₁ ve FB₂ standartlarından “Fumonisinlerin HPLC ile analizi” bölümünde belirtildiği şekilde hazırlanan stok fumonisin çözeltisi kullanılmıştır. Hidrolize fumonisinlerin miktar tayininde ise bu stok FB çözeltisi bazik hidrolize uğratarak HFB stok çözeltisi elde edilmiştir. HFB stok çözeltisini hazırlamak amacıyla, FB stok çözeltisinin 10 ml'si kurutulmuş ve 30 ml 2M potasyum hidroksit (KOH) ile hidrolize edilmiştir. Etil asetat kullanılarak iki defa gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminden sonra toplanan etil asetat fazları azot gazıyla kurutulmuş ve 10 ml asetonitril-su (50:50, v/v) ile çözüldürülmüştür. Böylece 21 µg/ml HFB₁ ve 5.5 µg/ml HFB₂ içeren stok çözelti elde edilmiştir (Dall'Asta et al., 2008). Stok FB ve HFB çözeltileri 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Bazik hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile analizi

Bazik hidroliz işlemi için 5 g örnek 50 ml 2 M KOH ile yüksek hızda homojenize edildikten sonra (UltraTurrax, 8000 rpm, 5dak), magnetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 60 dakika karıştırılmıştır (Dall'Asta et al., 2009b). Hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile tayini için Dall'Asta ve ark. (2009b)'nın bildirdiği yöntem esas alınmış ve yöntemde modifikasyonlar yapılmıştır (Galaverna, 2010). Buna göre, 50 ml asetonitril ilave edilen örnek homojenize edildikten sonra (UltraTurrax, 6000 rpm, 5dak) elde edilen organik fazın 15 ml'si alınıp santrifüjlenmiş (3500xg, 15 dak) ve 0.22 µm filtreden filtre edilmiştir. Su ile seyreltilen filtrat doğrudan LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir.

3.2.7. Kurumadde analizi

Undaki başlangıç toksin seviyeleri ile uygulanan işlemlerden sonra ürünlerde saptanan kalıntı toksin düzeylerinin kuru ağırlık üzerinden karşılaştırılabilmesi ve % azalmaların hesaplanabilmesi için analize alınan tüm örneklerde (mısır unu, model örnekleri, ekme ve geliştirilmiş ürünler) gravimetrik yöntemle kurumadde analizi yapılmıştır (AACC, 2000). Helva ve kuymak çalışmasında ise ürünler liyofilizasyon tekniği ile kurutulduktan sonra analize alındığından kurumadde analizi yapılmamıştır. Kurumadde analizleri iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Toksin analiz sonuçları kurumadde düzeltmeleri yapılarak verilmiştir.

3.2.8. Geri kazanım çalışmaları

Tez kapsamında uygulanan analiz yöntemlerinin çalışılan matrislerdeki (mısır unu ve ürünler) güvenilirliğini test etmek amacıyla, iki veya üç tekrarlı olarak geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, ilgili toksinleri hiç içermeyen veya çok düşük miktarda içeren mısır unu örnekleri ve bu unlardan hazırlanmış olan model sistem örnekleri, genişletilmiş ürün, kuymak ve helva kullanılmıştır.

Uygun derişimdeki standart çözeltiler matrislere mikropipet yardımıyla damlacıklar halinde eklenmiştir. Oda sıcaklığında en az 1 saat çözücünün buharlaşması için beklenmiş ve bu sürenin sonunda damlaların kuruduğu noktalarda oluşan kabarcıklar spatül ile kırıldıktan sonra ilgili analiz yöntemlerine göre ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. % Geri kazanım (%GK) değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır. Bütün analiz sonuçları ilgili % geri kazanım değerine göre düzeltilerek verilmiştir.

$$\%GK = (\text{Hesaplanan miktar} - \text{Başlangıç miktarı}) / \text{Eklenen miktar} \times 100 \quad (3.1)$$

Mısır ununda ZEA, DON ve FB (FB₁ ve FB₂'nin her biri) için toksin ilavesi sırasıyla 0.5, 1.5 ve 2.0 µg/g düzeyinde yapılmıştır. Model diskleri ve ekmek için ise ZEA 0.2 µg/g düzeyinde, DON 0.5 µg/g düzeyinde ilave edilmiştir. Model sistem çalışmalarında, ZEA veya DON içermeyen undan hazırlanan disklere en düşük sıcaklık olan 100°C'de 2 saat ve en yüksek sıcaklık olan 250°C'de 15 dakika süreyle ısıtılma işlemi uygulanmıştır. Geri kazanım çalışması bu matrisler üzerinde gerçekleştirildikten sonra analize alınan her bir model diski ile ekmek kısımları için en uygun olan geri kazanım değeri hesaplamalarda kullanılmıştır. Ekmek kabuğunda 250°C'de ısıtılan model diskinin geri kazanımı, kurutulmuş ekmek içinde ise unun geri kazanımının kullanılması uygun bulunmuştur. Genleştirilmiş ürünlerde ise ZEA için 0.1 µg/g, DON için 1 µg/g düzeyinde çalışılmıştır.

Diğer taraftan, fumonisin analizi için uygulanan LC-MS/MS yöntemlerinin geri kazanımları da belirlenmiştir. Hem FB₁-FB₂ hem de HFB₁-HFB₂ için geri kazanım deneylerinde stok FB çözeltisi kullanılmıştır. HFB'lerin geri kazanımı için, örneklere FB stok çözeltisi uygun düzeyde eklendikten sonra 1 gece boyunca çözücünün buharlaşması için bekletilmiş, ertesi gün 2 M KOH ile hidroliz yapıldıktan sonra analize alınmıştır. Elde edilen geri kazanımlar, mikotoksinler için Avrupa

Komisyonu tarafından 401/2006 nolu yönetmelikte bildirilen analitik metod kriterleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir (EC, 2006).

3.2.9. İstatistiksel analizler

Bu çalışma kapsamında analizler iki veya üç paralelli bir düzende yürütülmüş ve sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde veya relatif standart sapma (RSD) değerleri ile beraber verilmiştir. Araştırma sonuçları SPSS 15.0 istatistik paket programı (SPSS, Chicago, IL, USA) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. İşlemler öncesi ve sonrası mikotoksin düzeyleri arasındaki farkın önem kontrolü %95 güven aralığında ve Duncan testi ile gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1. Mikotoksin Analizlerinin Optimizasyonu

4.1.1. DON analizinde ekstraksiyon veriminin artırılması

Çok sayıda hidroksil grubu içerdiği için polar özellik gösteren DON, katı matrislerden genellikle sulu metanol veya sulu asetonitril gibi polar çözücü karışımlarıyla ekstrakte edilmektedir (Lattanzio et al., 2009; Döll and Dänicke, 2011). Suda çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle, özellikle IMA kolonla saflaştırma yapılan analiz yöntemlerinde, çoğunlukla su ve polietilen glikolün (filtrasyona yardımcı olmak amacıyla) kullanıldığı tek basamaklı bir ekstraksiyon prosedürü uygulanmaktadır (MacDonald et al., 2005b; Stroka et al., 2006; Ok et al., 2009). Su ekstraksiyon için etkili bir çözücüdür ancak DON'un yanısıra protein ve şeker gibi suda çözünen başka moleküller de ekstraksiyon sırasında uygulanan koşullara bağlı olarak ekstrakte edilmektedir. Tek basamaklı ekstraksiyonda DON ekstraksiyon veriminin düşük olacağı düşünülerek çok basamaklı bir prosedürün uygulanmasına karar verilmiş ve Bölüm 3.2.6.1'de detayları verilen çalışma gerçekleştirilmiştir.

Farklı düzeylerde DON içeren unlarda, ardarda beş ekstraksiyon basamağında belirlenen DON düzeyleri ve ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.1'de verilmektedir. Bir basamağın ekstraksiyon verimi, o basamak ve öncesindeki basamaklarda ekstrakte edilen toplam DON miktarının, beş basamağın sonunda elde edilen toplam DON miktarına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Bütün örnekler için, birinci basamakta elde edilen ekstraksiyon verimlerinin toplam verime göre oldukça düşük kaldığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Yüksek, orta ve düşük düzeyde DON içeren örneklerde birinci ekstraksiyon basamağının verimi sırasıyla %83.3, %77.8 ve %76.0'dır. Örnekteki DON konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak verimin arttığı gözlenmiştir. Bu verilere göre DON ekstraksiyon veriminin %90'a ulaşabilmesi için en az iki kademeli bir ekstraksiyon işleminin gerekli olduğu anlaşılmaktadır. En yüksek kontaminasyona sahip un için her bir ekstraksiyon basamağından sonra elde edilen kromatogramlar Ek 1'de verilmiştir. İlk basamaktan sonra DON'un önemli bir miktarının örnekte kaldığı kromatogramlardan da görülmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı düzeylerde DON içeren mısır unlarında her bir ekstraksiyon basamağında belirlenen DON düzeyleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ve ekstraksiyon verimleri (%)

Ekstraksiyon basamağı	yüksek		orta		düşük	
	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [*]	verim (%) [†]	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [*]	verim (%) [†]	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [*]	verim (%) [†]
1	2408.6 \pm 3.0	83.3 ^a	915.3 \pm 13.4	77.8 ^a	273.2 \pm 3.0	76.0 ^a
2	251.5 \pm 11.7	92.1 ^b	153.4 \pm 4.6	90.8 ^b	76.5 \pm 0.4	97.3 ^b
3	137.8 \pm 0.6	96.8 ^c	71.7 \pm 7.0	96.8 ^c	8.5 \pm 0.4 ^θ	99.7 ^c
4	59.5 \pm 2.0	98.9 ^d	29.0 \pm 1.4 ^θ	99.2 ^d	0.6 \pm 0.0 ^θ	99.9 ^c
5	32.4 \pm 1.1 ^θ	≤ 100	9.2 \pm 0.1 ^θ	≤ 100	0.5 \pm 0.1 ^θ	≤ 100

Ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

[†] Her kolonda farklı harflere sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

^θ Bu değerler LOQ'nun altındadır ancak verimi belirleyebilmek için hesaplamaya alınmıştır.

Mısır unundan DON ekstraksiyonu için koşulların optimize edilmesi amacıyla, Gökmen ve ark. (2009) tarafından geliştirilen “ekstrakte edilebilirlik” kavramı kullanılmıştır. Bir analitin katı bir gıda matrisinden ekstrakte edilebilirliği, Eş. 4.1’de verilen ve çözücünün ve gıdanın tipinden bağımsız olan üstel bir fonksiyonla ifade edilebilmektedir. Bu durum, çok basamaklı bir ekstraksiyon prosedüründe, örneği bütünüyle temsil edebilecek bir ekstrakt elde etmek için gerekli ekstraksiyon basamağı sayısının tahmin edilmesine olanak tanır. Ekstrakte edilebilirlik (k_{ext}) değeri, çok basamaklı bir ekstraksiyon işlemi sırasında herhangi bir basamakta elde edilen DON konsantrasyonunun, Eş. 4.1’in doğal logaritması ile ilişkilendirilmesiyle belirlenebilmektedir. Çalışmada her bir örnek için elde edilen deneysel ekstraksiyon verileri üstel fonksiyonla ifade edilmiş ve k_{ext} değerleri grafiklerden belirlenmiştir (Şekil 4.1). Düşük düzeyde DON içeren örnekte k_{ext} değeri diğerlerinden daha yüksek bulunmuştur.

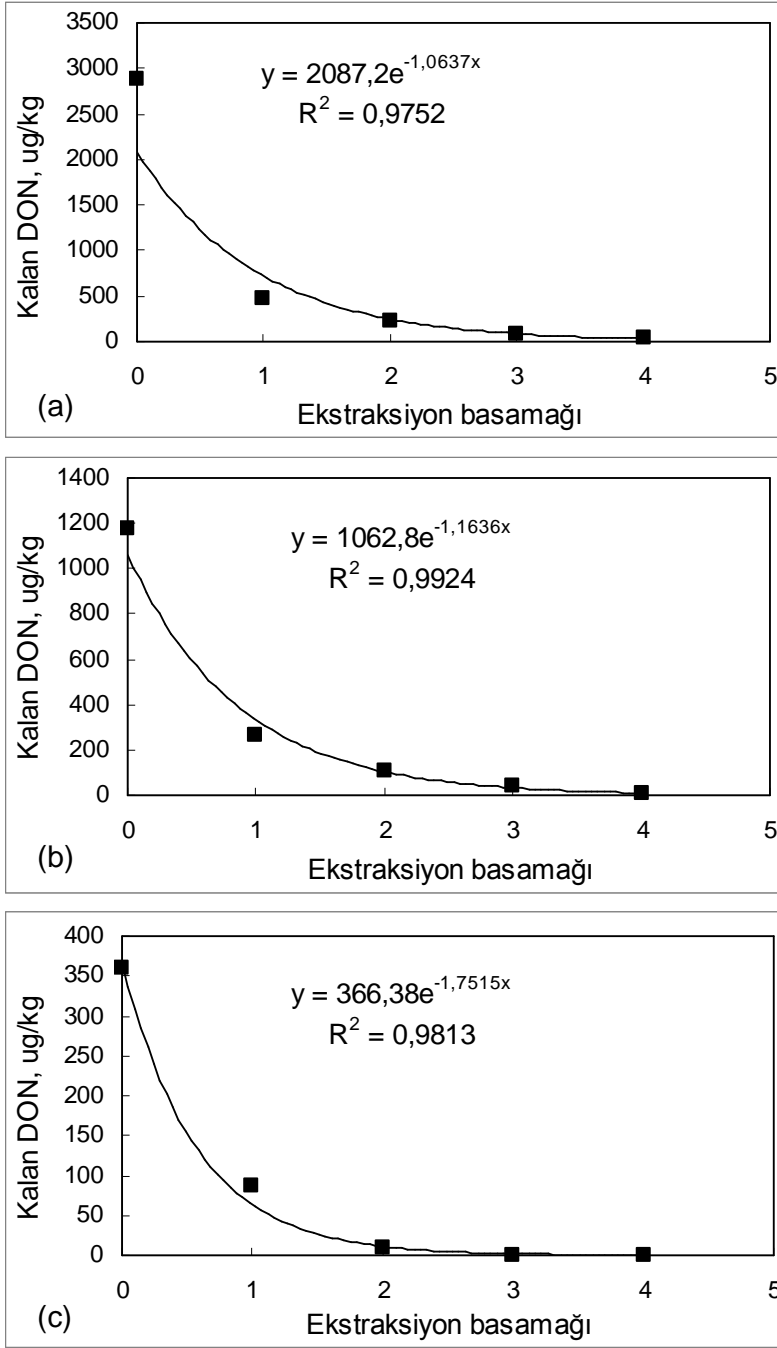
$$C = C_0 e^{-k_{ext} n} \quad (4.1)$$

C : n. basamakta ekstrakte edilen analit konsantrasyonu, $\mu\text{g}/\text{kg}$

C_0 : Analitin başlangıç (matristeki toplam) konsantrasyonu, $\mu\text{g}/\text{kg}$

k_{ext} : ekstrakte edilebilirlik (sabit)

n : ekstraksiyon basamağı sayısı



Şekil 4.1. (a) Yüksek, (b) orta ve (c) düşük düzeyde DON içeren unlar için ekstraksiyon verilerinin grafiksel ifadesi

Analitik açıdan, bir örnekteki analitin %90'ının örnekten ekstrakte edilerek alınabilmesi, ekstraksiyon prosedürünün başarılı olması için yeterli sayılabilir. Bunun için gerekli ekstraksiyon basamağı sayısı (E_{90}) aşağıdaki gibi hesaplanır (Eş. 4.2) ve tamsayı olarak ifade edilmesi gerekir. N , E_{90} 'ın bir tamsayı fonksiyonudur (Eş. 4.3) (Gökmen et al., 2009).

$$E_{90} = 2.303 / k_{ext} \quad (4.2)$$

$$N = INT(E_{90}) + 1 \quad (4.3)$$

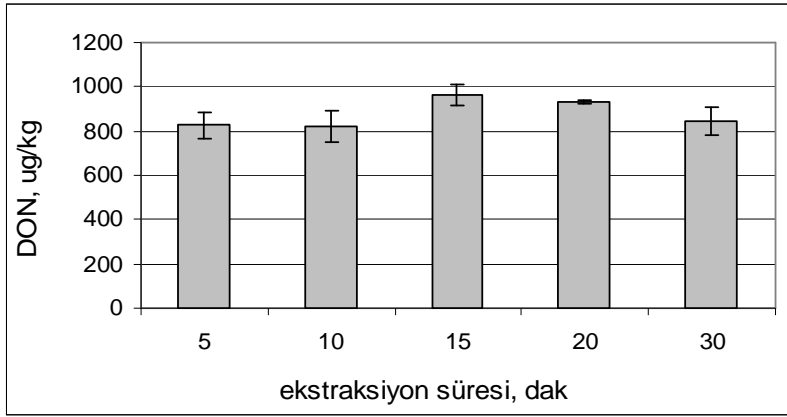
Mısır unu örnekleri için yukarıdaki eşitlikler kullanılarak E_{90} ve N değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Orta ve düşük düzeyde DON içeren örnekler için E_{90} değerleri sırasıyla 1.98 ve 1.31 olarak belirlenmiş ve bu da örnekten DON'un %90'ından fazlasını alabilmek için ekstraksiyonun iki kademeli yapılması gerektiğini göstermiştir. Diğer taraftan, yüksek düzeyde DON içeren örnekte E_{90} 2.17 olarak bulunmuştur, yani ekstraksiyonun üç basamaklı yapılması gerekmektedir. Bu örnekteki toplam DON konsantrasyonunun (2889.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mısırdaki DON için Avrupa Komisyonu tarafından belirlenen maksimum limitten (1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oldukça yüksek olduğu düşünülürse, üç kademeli ekstraksiyona ancak çok yüksek düzeyde DON içeren örneklerde gerek olabileceği söylenebilir (EC, 2007). Bu sonuçlara göre, mısırdan DON ekstraksiyonunun en az iki kademedeki ve yüksek düzeyde DON içeren örneklerde ise üç kademedeki yapılması gerektiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan mısır örnekleri için, üstel fonksiyon eşitliğinden elde edilen başlangıç DON konsantrasyonları ($C_{0,\text{grafik}}$), deneysel olarak elde edilen başlangıç konsantrasyonları ($C_{0,\text{deneysel}}$) ile uyum içindedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Mısır unları için k_{ext} , E_{90} , N ve C_0 değerleri

DON düzeyi	k_{ext}	E_{90}	N	$C_{0,\text{grafik}} (\mu\text{g}/\text{kg})$	$C_{0,\text{deneysel}} (\mu\text{g}/\text{kg})$
Yüksek	1.0637	2.17	3	2087.2	2889.8
Orta	1.1636	1.98	2	1062.8	1178.6
Düşük	1.7515	1.31	2	366.4	359.3

Diğer taraftan, DON'un ekstrakte edilebilirliği üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi de araştırılmış ve bu amaçla çözücü hacmi (80 ml) sabit tutularak 5, 10, 15, 20 ve 30 dakika süreyle tek basamaklı ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ekstraksiyon süresinin artmasıyla ekstrakte edilebilen DON miktarının başlangıçta arttığı, ancak daha sonra azalmaya başladığı gözlenmektedir (Şekil 4.2). Ekstraksiyon süresi 15 dakikadan 30 dakikaya uzatıldığında ekstrakte edilebilen DON miktarında azalma olmuştur. 15 dakika

süreyle ekstraksiyona göre 30 dakikalık ekstraksiyon DON miktarının yaklaşık %12 oranında daha düşük belirlenmesine neden olmuştur. Sürenin uzaması suda çözünen diğer bileşenlerin sudaki konsantrasyonlarını artırarak, DON'un suya doğru kütle transferinin yavaşlamasına ve/veya matrise doğru geri difüzyonuna neden olabilir. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, ekstraksiyon süresinin uzatılmasının verim üzerine önemli bir etkisi olmadığı ortaya konulmuştur ($p>0.05$).



Şekil 4.2. Ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilebilir DON miktarına etkisi

Son zamanlarda bazı mikotoksinler için ekstraksiyonun çok basamaklı uygulanması gerektiğine işaret eden yayınlara rastlanmaktadır. Örneğin tek ekstraksiyon basamağında fumonisinlerin geri kazanımının çok düşük olduğu bildirilmiştir (Sulyok et al., 2006; Spanjer et al., 2008). Toksinlerin matristeki kesin miktarlarının bilinmesi gerekiyorsa en azından ikinci bir ekstraksiyon basamağının uygulanması gerektiği rapor edilmiştir (Turner et al., 2009). Toksinlerin gıda ve yemlerdeki düzeylerinin kesin olarak belirlenmesi, güvenilir veri tabanlarının oluşturulabilmesi ve risk değerlendirmenin iyileştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmanın sonuçları, literatürle de uyumlu olarak, toksin miktarının doğru bir şekilde tayin edilebilmesi için çok basamaklı ekstraksiyon yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. Tez çalışması boyunca DON analizi yapılan bütün matrisler için, Bölüm 3.2.6.1'de detayları verilen üç kademeli ekstraksiyon prosedürünün uygulanmasına karar verilmiştir. Cihazdaki elektronik gürültünün sırasıyla 3 ve 6 katı alınarak hesaplanan, yöntemin tespit (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) sırasıyla 16.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 33.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'dır. Benzer şekilde ZEA analizi için de

standart analiz yöntemindeki ekstraksiyon prosedürü üç kademeli olarak uygulanmıştır (Bölüm 3.2.6.3).

4.1.2. Fumonisinler ve doğal hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile analizi

Bölüm 3.2.6.4'de "Fumonisinler ve doğal hidrolize fumonisinlerin LC-MS/MS ile analizi" başlığı altında verilen Deneme 1 ve Deneme 2, Güney İtalya'dan sağlanan ve tarlada kontrollü olarak *Fusarium* kontaminasyonuna uğratılmış olan mısır örneği üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu örnek, kuymak ve helva üretiminde kullanılan örnektir. Denemelerin FB₁ ve FB₂ sonuçlarının karşılaştırılabileceği referans bir değer elde etmek bakımından bu örnek, Bölüm 3.2.6.4'de "Fumonisinlerin HPLC ile analizi" başlığı altında verilen valide HPLC yöntemi ile de analiz edilmiş ve FB₁ ve FB₂ içerikleri ortaya konulmuştur.

Deneme 1 ve Deneme 2'de iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile belirlenen FB düzeyleri, HPLC yönteminin sonuçları ile karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.3'de verilmektedir. Birinci yöntemde metanol-su (70:30, v/v) karışımı ile ekstrakte edilebilen FB₁ ve FB₂ miktarları ikinci yöntemde göre oldukça düşük bulunmuştur. İkinci yöntemde ekstraksiyon için sitrat tamponu kullanımının ve sıcaklığın artırılmasının (55°C) ekstraksiyon verimini artırdığı görülmektedir. Ayrıca, bu yöntemle ekstraksiyon yapıldığı durumda elde edilen FB₁ ve FB₂ konsantrasyonları, HPLC yöntemi ile belirlenen sonuçlara da oldukça yakındır. Diğer taraftan, denemelerin hiçbirinde örnekte doğal HFB₁ ve HFB₂ bulunamamıştır.

Çizelge 4.3. FB'lerin LC-MS/MS ile analizinde iki farklı denemede elde edilen sonuçlar ve HPLC yönteminin sonuçları ile karşılaştırılması

	LC-MS/MS		HPLC
	metanol:su (70:30) ile ekstraksiyon (Dall'Asta et al., 2009b)	sitrat tamponu içeren çözücü ile sıcak koşullarda ekstraksiyon (De Girolamo et al., 2010)	(De Girolamo et al., 2010)
FB ₁ (nmol/g) ^{a,b}	6.84 ± 0.203	11.10 ± 0.388	10.44 ± 0.490
FB ₂ (nmol/g) ^{a,b}	1.98 ± 0.105	3.63 ± 0.053	3.21 ± 0.184

^a Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

^b µg/g cinsinden bulunan sonuçları nmol/g'a çevirmek için kullanılan molekül ağırlıkları; FB₁ için 771.8 g/mol, FB₂ için 705.8 g/mol'dür.

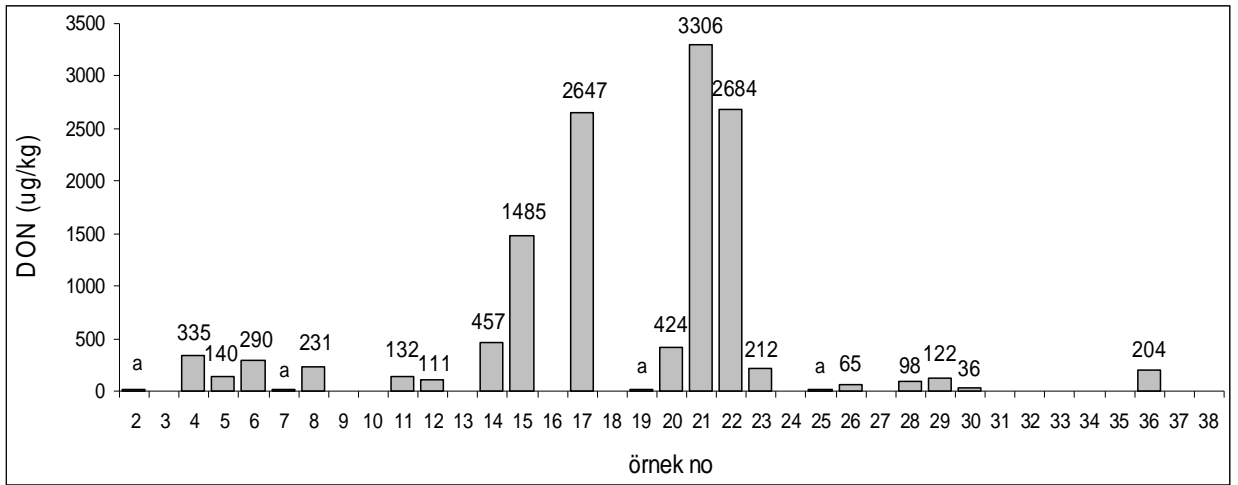
Literatürde, mısır ürünlerinde ve özellikle çok çeşitli ingrediyenler içerebilen bebek mamalarında fumonisin tayininin zorluğu ve resmi bir analiz yöntemi bulunmadığı bildirilmektedir. Mısır için kabul edilen resmi yöntemler (AOAC gibi), bu ürünlere uygulandığında geri kazanım ve tekrarlanabilirliğin düşük olması önemli bir problemdir. FB₁ için geri kazanımın %12'lere kadar düşebildiği bildirilmektedir. Bunun nedeni, geri kazanım çalışması için matrise eklenen fumonisinlerin kısa süre içerisinde ürünlerdeki çok çeşitli gıda bileşenleriyle (nişasta, tuz, vitamin, şeker, süt ve/veya mineraller gibi) etkileşime girebilmesidir (Kim et al., 2002; Dall'Asta et al., 2009b; De Girolamo et al., 2010). Bu esnada ısı uygulaması olmadığından, gerçekleşen etkileşim, toksinin makromoleküller içerisinde kovalent olmayan şekilde kompleks oluşturması ile açıklanabilir (Dall'Asta et al., 2009b) Asidik bir çözücü olan sitrat tampon çözeltisi-metanol-asetonitril karışımı (pH=4.9) ile ılık koşullarda (55°C) gerçekleştirilen ekstraksiyon, fumonisinlerin matris bileşenleri ile kovalent olmayan zayıf bağlarının / etkileşimlerinin ayrılmasını kolaylaştırmakta ve böylece ekstrakte edilebilir fumonisinlerin miktarında artış olmaktadır. Sewram ve ark. (2003), asidik koşulların bileşiklerin lipofilik karakterinin artmasına katkıda bulunduğunu ve bunların organik çözücülerle mısır matrisinden ayrılmasını sağladığını bildirmiştir.

Sonuç olarak, mısırdaki ve ürünlerde (helva ve kuymak) FB'ler (ve mevcut ise doğal HFB'ler)'in LC-MS/MS ile tayininde Dall'Asta ve ark. (2009b)'nin yöntemi yerine De Girolamo ve ark. (2010)'nin bildirdiği şekilde ekstraksiyon yapılmasına karar verilmiştir. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.5 ve 1.0 µg/kg olarak belirlenmiştir.

4.2. Mısır Örneklerinin Mikotoksin Düzeyleri

Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan 38 mısır örneğinde başlıca *Fusarium* toksinlerinin (ZEA, DON, T-2 ve HT-2 toksinleri, fumonisin B₁, B₂ ve B₃) varlığı belirlenmiş ve kontaminasyon düzeyleri ortaya konmuştur. ZEA ve DON analizleri bütün örneklerde gerçekleştirilirken, fumonisinler ile T-2 ve HT-2 toksin analizleri örneklerin bir bölümünde gerçekleştirilebilmiştir. Toksin düzeylerinin hesaplanmasında DON, ZEA, FB₁ ve FB₂ için mısır ununda elde edilen geri kazanım değerleri (sırasıyla %94.7, %83.6, %83.0 ve %81.0) kullanılmıştır.

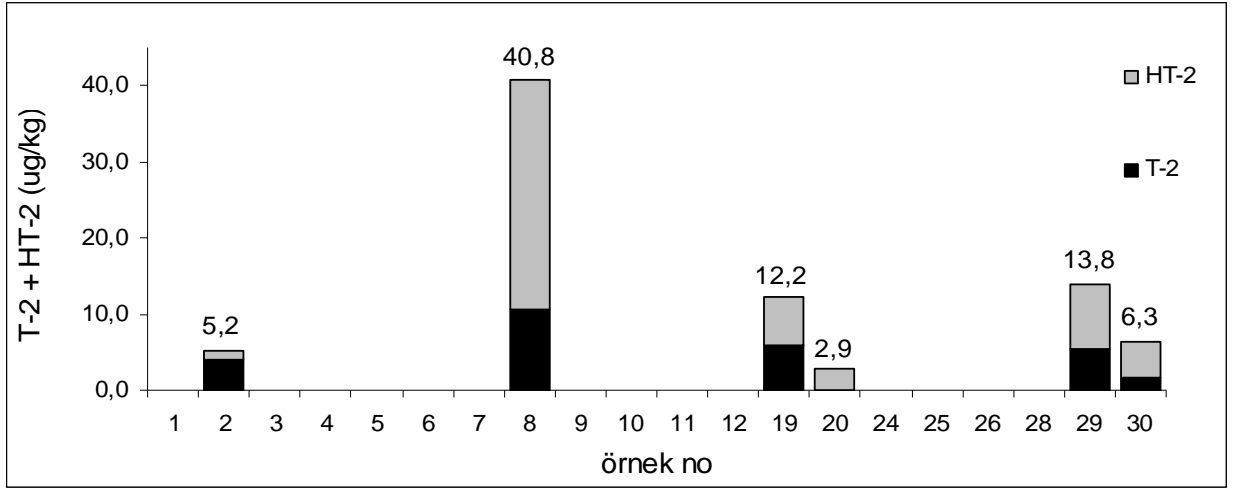
Örneklerin mikotoksin analizlerinin sonuçları Şekil 4.3-4.6'da verilmiştir. Trabzon'un Çaykara ilçesinden sağlanan 1 nolu örnek, görsel olarak ayırt edilebilen ölçüde yüksek bir küf kontaminasyonuna maruz kalmış bir örnektir. Bu örnek ZEA ve DON'u en yüksek düzeyde içeren örnek olup (sırasıyla 1595 ve 16145 µg/kg), toplam fumonisin konsantrasyonu ise 944 µg/kg olarak belirlenmiştir. Özellikle DON konsantrasyonu diğer örnekler göre çok yüksek olduğu için bu örnek Şekil 4.3'de gösterilememiştir. İşlem görmemiş mısırdaki DON için Avrupa Komisyonu tarafından belirlenen yasal limit (1750 µg/kg) dikkate alındığında, bütün örnekler arasında sadece Trabzon ve Giresun'dan sağlanmış olan dört örneğin (1, 17, 21 ve 22 nolu örnekler) limitlerin üzerinde DON kontaminasyonuna sahip olduğu görülmektedir (EC, 2007). Trabzon, Samsun, Rize ve Ankara'dan alınan örneklerin bazılarında, Hatay'dan alınan örneklerin ise hiçbirisinde DON tespit edilememiştir. Kontaminasyon profilleri açısından bölgeler arasında belli bir korelasyon bulunmamaktadır. Örneğin, Trabzon'un bazı yörelerinden toplanan örneklerde yüksek düzeylerde DON bulunurken, diğer yörelerine ait örneklerde DON tespit edilememiştir.



Şekil 4.3. Mısır örneklerinin DON düzeyleri (a ile gösterilen örneklerde DON<LOQ)

Karadeniz Bölgesi'nden sağlanan mısır örneklerinin 20'sinde T-2 ve HT-2 analizi yapılmıştır. Örneklerin 14'ünde bu toksinlere hiç rastlanmamış ve 6 örnekte (2, 8, 19, 20, 29 ve 30 nolu örnekler) düzeyleri 50 µg/kg'ın altında saptanmıştır (Şekil 4.4). Bu toksinlerin miktarları DON, ZEA ve fumonisinlerle karşılaştırıldığında çok daha düşük bulunmuştur. Örneklerde T-2 ve HT-2 varlığı bölge içinde yöreye

bağıllık göstermemiştir. Mısırdaki T2 ve HT-2 toksinlerin toplamı için yasal bir limit belirlenmemiş olmakla beraber, yakın bir gelecekte Avrupa Komisyonu tarafından bir sınırlama getirilmesi (işlem görmemiş mısır için tahmini 150 µg/kg) beklenmektedir (Solfrizzo et al., 2009). Kullanılan analiz yönteminin mısırdaki LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.0 µg/kg ve 2.0 µg/kg'dır.

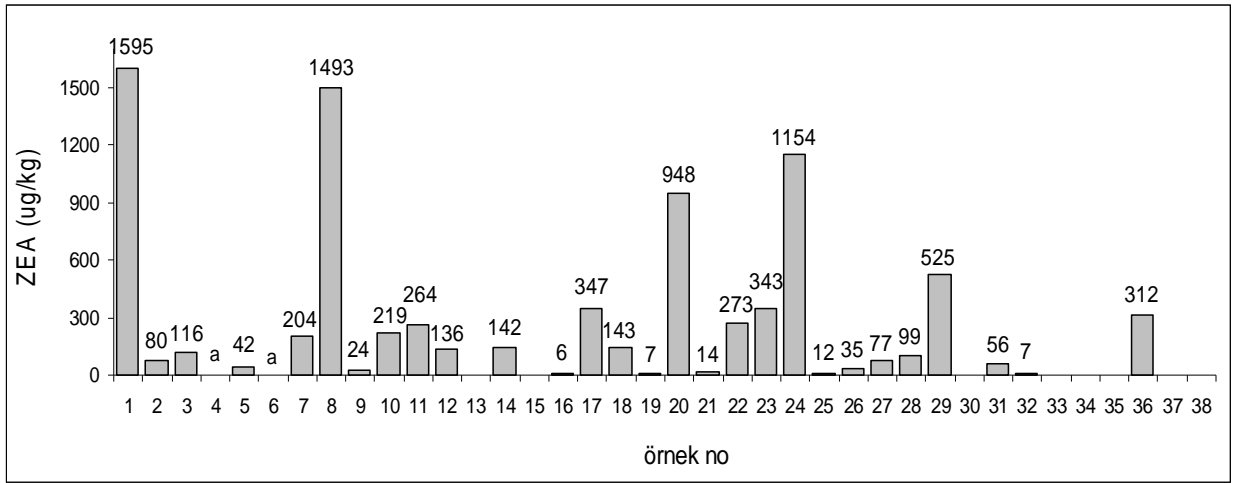


Şekil 4.4. Mısır örneklerinin T-2 ve HT-2 düzeyleri

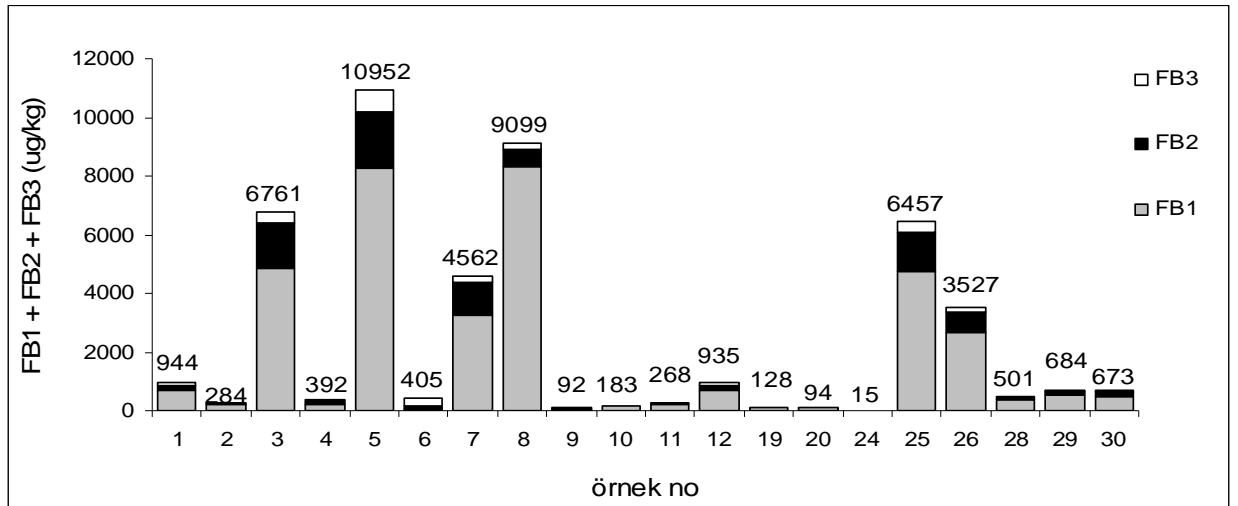
Mısır örneklerinin tümü ZEA varlığı açısından analiz edilmiştir (Şekil 4.5). Örneklerin %13'ünde (1, 8, 20, 24 ve 29 nolu örnekler) ZEA düzeyleri mısırdaki izin verilen yasal limitten (350 µg/kg) yüksek bulunmuştur (EC, 2007). En yüksek kontaminasyon düzeyine sahip örnek Trabzon'dan sağlanan 1 no'lu örnektir. Çoğu Hatay ve Ankara örnekleri olmak üzere 8 örnekte ise ZEA tespit edilememiştir. Kullanılan ZEA analiz yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2.6 µg/kg ve 5.2 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Karadeniz Bölgesi'nden sağlanan mısır örneklerinin 20'si üzerinde yürütülen fumonisin analizi sonuçları ise Şekil 4.6'da verilmiştir. FB₁ ve FB₂ için yöntemin LOQ değerleri sırasıyla 2.8 ve 2.2 µg/kg'dır. Örneklerdeki FB₁ düzeyleri 15 - 8315 µg/kg aralığında olup, beklendiği gibi FB₁ düzeylerinin FB₂ düzeylerine göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. FB₁, doğal kontamine gıdalardaki toplam fumonisin miktarının yaklaşık %70-80'ini, FB₂ ve FB₃ ise sırasıyla % 15-25 ve %3-8'ini teşkil etmektedir (Jackson and Jablonski, 2004; Krska et al., 2007). En yüksek FB₁ içeriğine sahip olan 8 ve 5 nolu örneklerde FB₂ sırasıyla 600 ve 1881

$\mu\text{g/kg}$ düzeyine ulaşmıştır. FB_1 ve FB_2 düzeylerinin toplamı dikkate alındığında, en yüksek kontaminasyon seviyesi (5 nolu örnekte) $10163 \mu\text{g/kg}$ olarak saptanmıştır. Avrupa Komisyonu'nun 1126 nolu yönetmeliğinde, mısırdaki FB_1 ve FB_2 toplamının en fazla $4000 \mu\text{g/kg}$ düzeyinde olması gerektiği bildirilmiştir (EC, 2007). FB_1 ve FB_2 toplamı örneklerin %25'inde (3, 5, 7, 8 ve 25 nolu örnekler) maksimum limiti aşmıştır. FB_3 'e ise örneklerin bir kısmında ve FB_2 'den çok daha düşük konsantrasyonlarda rastlanmış olup, en yüksek FB_3 konsantrasyonu ($789 \mu\text{g/kg}$) 5 nolu örnektir. Fumonisin varlığı açısından analiz edilen örneklerin tümü Karadeniz Bölgesi'nden toplanan örnekler olduğu için Hatay yöresindeki mısırlarda fumonisin varlığı ile ilgili yorum yapılamamaktadır.



Şekil 4.5. Mısır örneklerinin ZEA düzeyleri (a ile gösterilen örneklerde ZEA<LOQ)



Şekil 4.6. Mısır örneklerinin FB_1 , FB_2 ve FB_3 düzeyleri

Yapılan bu tarama çalışmasında amaç, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerinde yetiştirilen mısırlardaki genel kontaminasyon profilini ortaya koymak değildir. Çünkü analiz için toplanan örnek sayısı geniş kapsamlı bir tarama için yeterli değildir ve rastgele bir örnekleme yapılmamış, özellikle kontaminasyona maruz kaldığı tahmin edilen örnekler seçilmiştir. Ancak yine de elde edilen sonuçların, bu bölgelerde yetişen mısırların kontaminasyon durumu hakkında genel bir fikir verebileceği düşünülmektedir.

Karadeniz'in çeşitli illerinden alınan örneklerde ZEA ve DON'a sıklıkla rastlanırken Akdeniz Bölgesi'nden sağlanan mısırların sadece bazılarında ve düşük miktarda ZEA kontaminasyonu gözlenebilmiştir. Ayrıca DON içeren örneklerde genellikle ZEA da bulunmakta, ancak istisnalar olmakla birlikte, bu toksinlerin miktarları arasında ters bir ilişki olduğu gözlenmektedir. DON kontaminasyonunun yüksek olduğu örneklerde genel olarak ZEA miktarı düşüktür ve tam tersi de geçerlidir. DON'un tahıllarda genellikle ZEA ile beraber bulunduğu literatürde yer almaktadır (Kushiro, 2008). DON oluşturabilen başlıca iki *Fusarium* türü olan *F. graminearum* ve *F. culmorum* aynı zamanda ZEA da üretebilmektedir. Bu *Fusarium* türleri soğuk (24-26°C) ve nemli koşullarda (0.90 su aktivitesi) hem optimum gelişme özelliği göstermekte hem de DON ve ZEA üretimini gerçekleştirmektedir (Sweeney and Dobson, 1998). Fumonisin üreten başlıca türler ise *F. verticillioides* (*F. moniliforme*) ve *F. proliferatum*'dur (Jackson and Jablonski, 2004). Fumonisinlerin en az bir türüne analiz edilen örneklerin tümünde rastlanmış olup, en yüksek düzeylerin saptandığı 5 ve 8 nolu örneklerde ZEA ve DON da azımsanamayacak miktarlarda bulunmaktadır.

T-2 ve HT-2 toksinlerinin bulunduğu mısırlarda DON ve ZEA değişik düzeylerde saptanmıştır. T-2 toksin üretebilen başlıca *Fusarium* türleri, yine soğuk iklimde ve nemli koşullarda gelişebilen *F. sporotrichioides* ve *F. poae*'dir (Sudakin, 2003). *F. sporotrichioides*'in ZEA ve DON da üretebildiği bilinmektedir (Sweeney and Dobson, 1998). Ayrıca trikotesenler tahıllardaki çeşitli mikroorganizmalar tarafından kimyasal değişikliklere uğratılabilmekte veya detoksifiye edilebilmektedir. Örneğin T-2 toksininin bazı bakteri ve küfler tarafından (*Pseudomonas*, *Alternaria* ve *Aspergillus* gibi) hızla ve etkin bir şekilde parçalanabildiği bilinmektedir (Sudakin, 2003). Trikotesenlerin ve diğer

mikotoksinlerin tahıllarda oluşumu ve yıkımında çevresel koşulların (sıcaklık, nem, substrat varlığı gibi) yanısıra genetik faktörler de önemli bir rol oynamakta ve bu nedenle hangi bölgede veya iklim koşullarında hangi toksinlerin baskın olarak ortaya çıkacağıının öngörülmesi oldukça zor olmaktadır.

İncelenen örneklerdeki toplam mikotoksin kontaminasyonu dikkate alındığında, örneklerin yaklaşık %32'sinin en az bir toksin açısından AB limitlerini aştığı görülmektedir (EC, 2007). Analiz sonuçlarına göre, test edilen *Fusarium* toksinleri arasından DON, ZEA ve fumonisinlerin mısırlarda en fazla rastlanan toksinler olduğu söylenebilir. Fumonisinler içerisinde FB₃'e FB₁ ve FB₂'ye oranla çok daha düşük seviyelerde rastlanmaktadır. T-2 ve HT-2 az sayıda örnekte ve düşük seviyelerde saptanmıştır. Bu kontaminasyon profili dikkate alınarak, tez çalışması kapsamında ısıtma işlemlerinin ZEA, DON, FB₁ ve FB₂ üzerine etkisinin araştırılmasına karar verilmiştir.

4.3. ZEA ve DON'un Kabuk-Model Sisteminde Termal Bozunma Kinetiği

Ekmek pişirme işleminin ZEA ve DON üzerine etkisi, ekmeği temsil edecek nitelikte hazırlanan kabuk-model sistemi üzerinde incelenmiştir. Fırında pişirme işlemi, ısı ve kütle aktarımının eş zamanlı olarak gerçekleştiği bir süreçtir. Bunun sonucu olarak ürün içerisinde bir sıcaklık gradiyeni meydana gelir ve bu gradiyenin özellikleri fırın sıcaklığının yanısıra, ürünün fiziksel boyutlarından (çap ve kalınlık) da etkilenir (Çetinkaya Açar, 2010). Pişirme sırasında ekmekte oluşacak sıcaklık gradiyeni nedeniyle, ekmeğin her noktasında sıcaklıklar ve termal bozunma reaksiyonlarının hızları farklı olacaktır. Açar ve Gökmen (2009)'in bildirdiği kabuk-model sistemine göre belli çap ve kalınlıkta hazırlanan hamur diskleri kullanılarak sıcaklık gradiyeni oluşumunun önüne geçilebilmiş, izotermal kabul edilebilecek ısıtma koşulları sağlanmış ve kinetik sabitler bu koşullarda belirlenmiştir. Böylece toksinlerin termal yıkımı yalnızca sıcaklık ve süreye bağlı olarak izlenebilmiş ve her bir sıcaklıkta ısının toksin üzerindeki etkisi net bir şekilde ortaya konabilmiştir.

Yapılan ön çalışmalar sonucunda, bir ekmeğin pişirilmesi sırasında, ekmek boyutlarına da bağlı olmak üzere, ürün iç sıcaklığının 100°C'yi geçmediği görülmüştür. Bu bulgu literatür tarafından da desteklenmektedir (Rosenkvist and Hansen, 1995). Bu nedenle toksin konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişimi

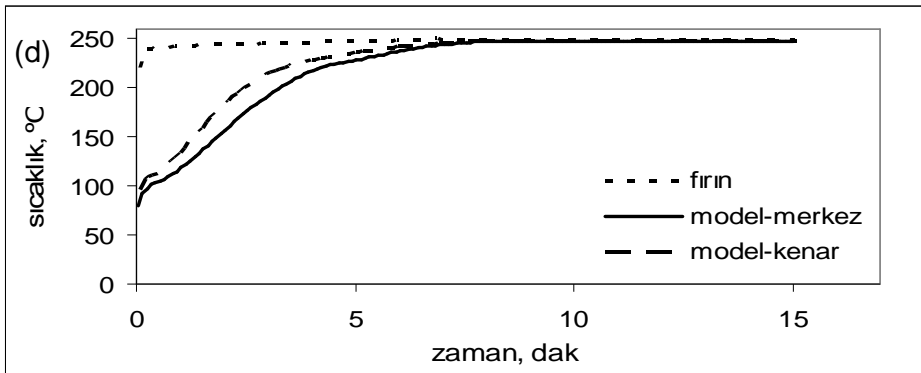
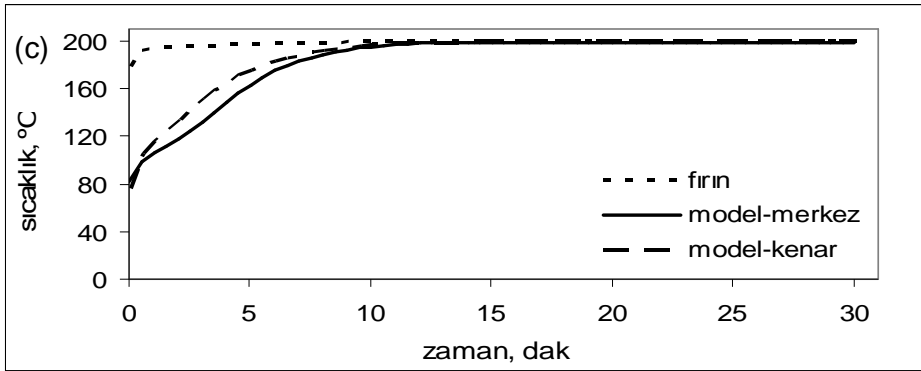
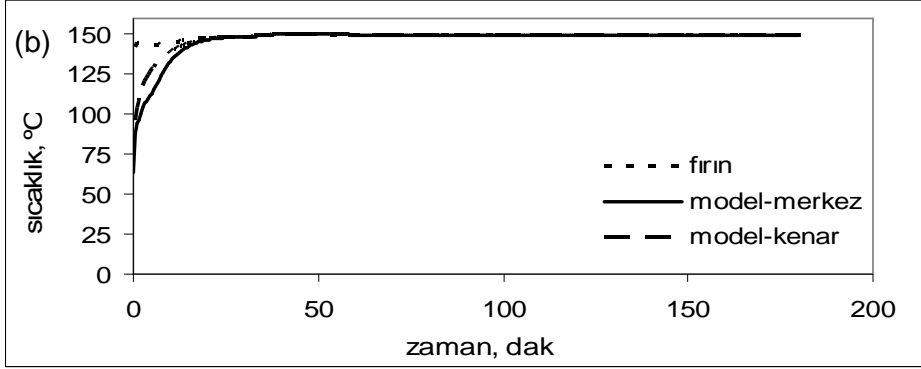
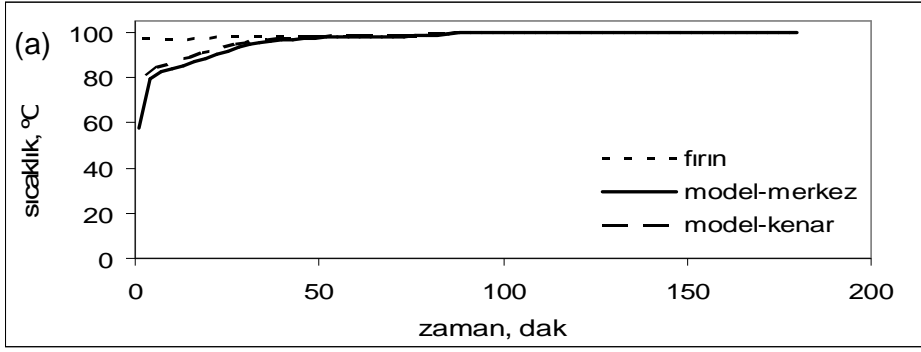
100-250°C'lik sıcaklık aralığında incelenmiş ve toksinlerin termal bozunma davranışı ortaya konmuştur. Ayrıca ekme kalıplarında pişirilen ekme örneklerinde deneysel olarak saptanan azalmalar dikkate alınarak, türetilen kinetik davranışın gerçeğe uygunluğu da incelenebilmiştir.

4.3.1. Model sistemde sıcaklık ölçümleri

Hamur disklerine uygulanan ısı işlemlerin sabit sıcaklıkta gerçekleştiğini ve disklerin her noktasının fırın sıcaklığına yeterince kısa sürede ve eş zamanlı olarak ulaştığını doğrulamak amacıyla, ısı işlemler sırasındaki sıcaklık profilleri ortaya konulmuştur. Disklerin merkezinde ve kenarında ölçülen sıcaklıkların zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen sıcaklık profilleri Şekil 4.7'de verilmiştir.

Sıcaklık profillerinden görülebileceği gibi, ısı işlemlerin başlangıcında örneklerde nem içeriğinin yüksek olmasına ve gerçekleşen kuruma olayına bağlı olarak evaporatif bir soğuma etkisi oluşmakta ve ürün sıcaklığının hedef sıcaklığa ulaşması zaman almaktadır (Çetinkaya Açar, 2010). Düşük sıcaklıklarda (100 ve 150°C) pişirme süresi uzun olduğundan, fırın sıcaklığına ulaşmak için gerekli süre toplam işlem süresinin yanında önemsiz düzeydedir. Ancak 200 ve 250°C'deki toplam pişirme süreleri daha kısa olduğundan (sırasıyla 30 ve 15 dak), hedeflenen sıcaklığa ulaşmak için geçen süre (sırasıyla 10 ve 7 dak) daha belirgin olmuştur. Bu süre 150°C'de toplam sürenin %10'unu, 200°C'de %30'unu, 250°C'de ise %50'sini oluşturmaktadır. Çetinkaya Açar (2010), model boyutlarının daha fazla küçültülmesi ile örnek sıcaklıklarının fırın sıcaklıklarına ulaşması için gereken sürenin oldukça kısaltılabildiğini ortaya koymuştur. Ancak özellikle 250°C'lik işlem için, çok küçük boyutlardaki örneklerin çok daha çabuk yanmasından dolayı toplam pişirme süresinin de kısaltılması zorunlu hale gelmektedir. Bu nedenle bu sıcaklıkta %50'lere varan gecikme evresi kaçınılmaz olup kabul edilebilir varsayılmıştır.

Genel olarak model örneklerin ısıtma sırasında yeterli izotermal koşulları sağladığı ve ısı işlemlerin sabit sıcaklıkta gerçekleştiği kabul edilmiştir. Ayrıca disklerin merkez ve kenar sıcaklıkları arasında önemli bir fark bulunmadığı söylenebilir.



Şekil 4.7. (a) 100°C'de 3 saat (b) 150°C'de 3 saat (c) 200°C'de 30 dak ve (d) 250°C'de 15 dak süreyle ısıtma sırasında fırında ve disklerde ölçülen sıcaklıklar

4.3.2. ZEA'nın termal bozunma kinetiği

Hamur disklerinin farklı sıcaklıklarda ısıtılması sırasında uygun zaman aralıklarıyla alınan örneklerde belirlenen ZEA düzeyleri Çizelge 4.4'de verilmiştir. Mısır unu, 100°C'de ısıtılan hamur disk ve 250°C'de ısıtılan hamur disk için geri kazanım değerleri sırasıyla %83.6, %88.4 ve %110.2 olarak bulunmuştur. Avrupa Komisyonu'nun EC 401/2006 nolu Yönetmeliği'nde >50 µg/kg düzeyinde toksin ilavesi yapıldığı durumda ZEA için geri kazanımın %70-120 arasında olması gerektiği bildirilmektedir (EC, 2006). Bu durumda, ZEA için kullanılan analiz yönteminin hamur diskleri için de uygun olduğu sonucuna varılmıştır. ZEA seviyesinde meydana gelen azalmalar Şekil 4.8'de de görülebilmektedir. Her bir sıcaklıkta yüzde ZEA bozunması işlem süresi ile artış göstermektedir.

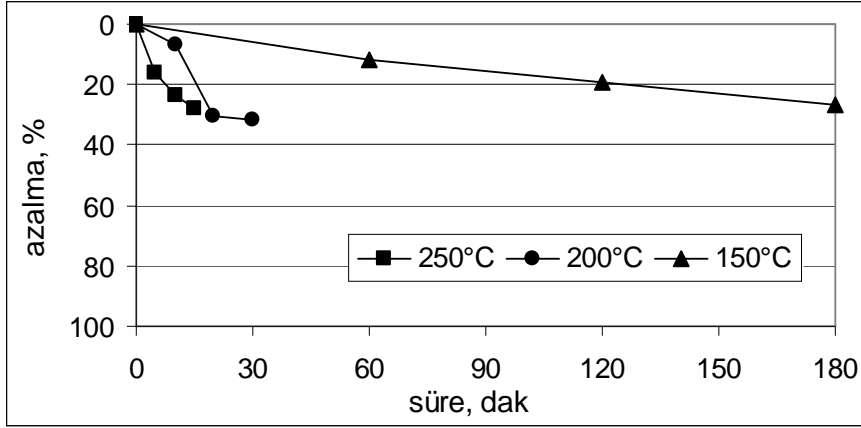
Çizelge 4.4. Farklı sıcaklıklarda ısıtılan hamur disklerinde ZEA seviyeleri ve una göre meydana gelen % azalmalar (n=2)

		ZEA, µg/kg*	RSD, %†	azalma, %
250°C	0.dak	1403 ^a	5.3	-
	5.dak	1178 ^a	2.8	16.0
	10.dak	1074 ^a	11.5	23.4
	15.dak	1009 ^a	36.5	28.1
200°C	0.dak	2254 ^a	1.3	-
	10.dak	2095 ^a	11.0	7.1
	20.dak	1573 ^b	1.6	30.2
	30.dak	1540 ^b	1.0	31.7
150°C	0.dak	1482 ^a	0.8	-
	60.dak	1310 ^b	3.4	11.6
	120.dak	1199 ^b	5.5	19.1
	180.dak	1090 ^b	11.1	26.5
100°C	0.dak	1432 ^a	1.4	-
	120.dak	1498 ^a	5.9	-4.6
	240.dak	1549 ^a	35.2	-8.2
	360.dak	1593 ^a	25.9	-11.2

* Analiz sonuçları, kurumadde ve geri kazanım düzeltmeleri yapılarak verilmiştir

† RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Her bir sıcaklık için farklı harflerle gösterilen değerler 0. dak değerinden istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (p<0.05).



Şekil 4.8. Hamur disklerinin 250, 200 ve 150°C'de ısıtılması sonucu ZEA seviyesindeki % azalmalar

250°C'de 5, 10 ve 15 dakikalık ısıtma işlemleri sonucu ZEA düzeylerindeki azalmalar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4). 200°C denemesinde, 10. dakikadaki azalma önemsizken, 20. ve 30. dakikalarda önemli azalmalar saptanmıştır ($p < 0.05$). İlk 10 dakikada henüz işlem sıcaklığına ulaşılmadığı için (Şekil 4.7) azalmanın önemsiz çıkması beklenen bir sonuçtur. 150°C'de pişirme sırasında ise 1 saatlik aralıklarla alınan örneklerin her birindeki ZEA düzeyleri başlangıçtakinden önemli oranda düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sıcaklıkta 180 dakika sonunda azalma maksimum değerine (%26.5) ulaşmıştır.

Diğer taraftan, 100°C'de 6 saat boyunca gerçekleştirilen ısıtma işlemi sırasında başlangıç ZEA seviyesinde önemli bir değişim gerçekleşmemiştir ($p > 0.05$). 100°C'de artış yönünde gözlenen değişimler ise istatistiksel açıdan önemli değildir. Bu sonuçlara göre, yaklaşık 100°C sıcaklığa maruz kalan ekmeğin içinde de ZEA miktarında değişim olmaması veya önemsiz artışlar gözlenmesi beklenebilir. ZEA düzeyinde kaydedilecek bir azalmanın ancak 150°C ve üzerindeki sıcaklıklarda meydana geldiği söylenebilir.

ZEA'nın termal bozunma davranışını ortaya koyabilmek amacıyla, çalışılan her bir sıcaklık için Çizelge 4.4'de verilen belli bir t zamanındaki ZEA düzeyleri (C), 0. dakikada ölçülen başlangıç konsantrasyonlarına (C_0 , deneysel) oranlanarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.9). Birinci dereceden reaksiyonlar için geçerli olan Eş. 4.4 uyarınca oluşturulan C/C_0 - zaman grafiklerinden, ZEA miktarının birinci derece reaksiyon kinetiğine uygun olarak üstel şekilde azaldığı gözlenmiştir.

Bu grafiklerden ZEA'nın 150, 200 ve 250°C sıcaklıktaki termal bozunma hız sabitleri (k) belirlenmiştir. 100°C için elde edilen sonuçlar ve yapılan istatistiksel analizler ZEA'da hiçbir bozunma olmadığını gösterdiğinden, bu sıcaklıkta k değerinin hesaplanmasına gerek görülmemiştir.

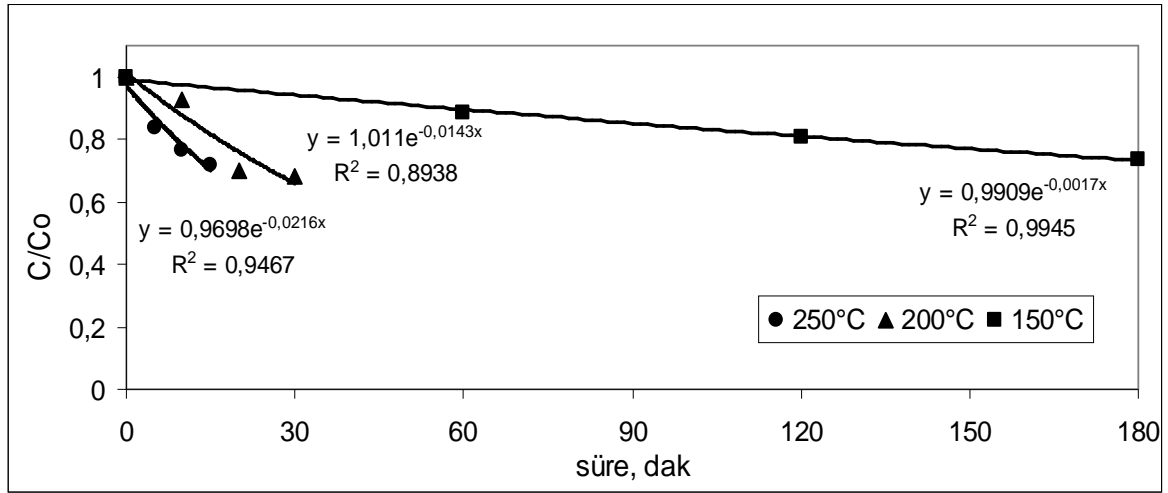
$$C = C_0 e^{-k t} \quad (4.4)$$

C : t anında örnekteki toksin konsantrasyonu, $\mu\text{g}/\text{kg}$

C_0 : mısır unundaki başlangıç toksin konsantrasyonu ($C_{0, \text{deneysel}}$), $\mu\text{g}/\text{kg}$

k : termal bozunma (birinci derece) hız sabiti, dak^{-1}

t : işlem süresi (dak)



Şekil 4.9. Model sistemde ZEA için 250°C, 200°C ve 150°C'de termal bozunma hız sabitlerini (k) veren grafikler (birinci derece reaksiyon yaklaşımı ile)

Grafiklerden elde edilen k değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. ZEA'nın termal bozunma hız sabitinin (k) sıcaklıkla artması, ZEA yıkımının yüksek sıcaklıklarda arttığını doğrulamaktadır. Toksinin her bir sıcaklıktaki yarılanma süresi de, o sıcaklıklara ait k değerlerinden Eş. 4.5'e göre hesaplanmış ve Çizelge 4.5'de verilmiştir. Eş. 4.5, $C=C_0/2$ ilişkisi kullanılarak Eş. 4.4'den türetilmektedir. Elde edilen yarılanma sürelerine göre, kontamine bir una 200°C'de yaklaşık 50 dakikalık bir ısıl işlem uygulanarak ZEA miktarının %50 oranında azaltılabileceği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.5. ZEA için farklı sıcaklıklardaki termal bozunma verileri

T (°C)	k (dak ⁻¹)	r	$C_{0, \text{deneysel}}$ (µg/kg)	$C_{0, \text{grafik}}$ (µg/kg)	$t_{1/2}$ (dak)
250	0.0216	0.973	1403	1361	32
200	0.0143	0.945	2254	2279	49
150	0.0017	0.997	1482	1469	408

$$t_{1/2} = 0.693 / k \quad (4.5)$$

$t_{1/2}$: toksinin yarılanma süresi, dak

k : termal bozunma (birinci derece) hız sabiti, dak⁻¹

Ayrıca her bir sıcaklık için, Şekil 4.9'daki grafiklerin eğimleri ile unda ölçülen başlangıç ZEA konsantrasyonlarının ($C_{0, \text{deneysel}}$) çarpımı alınarak $C_{0, \text{grafik}}$ değerleri hesaplanmış ve $C_{0, \text{deneysel}}$ değerleri ile uyumu incelenmiştir (Çizelge 4.5). Bu değerler iyi bir uyum içerisinde olup, ayrıca birinci derece reaksiyon grafiklerinin tümü için korelasyon katsayıları (r) yaklaşık 0.95 ve üzerindedir. Bu durumda, uygulanan kinetik modelin ZEA'nın bozunma reaksiyonuna uygunluğu doğrulanmaktadır.

ZEA'nın termal bozunmasının sıcaklığa bağımlılığını belirlemek amacıyla, kimyasal kinetikte hız sabiti üzerine sıcaklığın etkisini veren Arrhenius eşitliği kullanılmıştır (Eş. 4.6). Bu eşitliğe göre sıcaklık arttıkça ve aktivasyon enerjisi (E_A) azaldıkça hız sabitinin (k) değeri büyümektedir. Bu eşitliğin doğal logaritması uyarınca $\ln k$ 'nin $1/T$ değerlerine karşı çizilen grafiği doğrusal olup Arrhenius grafiği olarak adlandırılmaktadır. ZEA'nın farklı sıcaklıklardaki k değerleri kullanılarak Arrhenius grafiği oluşturulmuş ve ZEA için Arrhenius eşitliği $\ln k = -5736.3 / T + 7.3989$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). ZEA'nın bozunma reaksiyonunun 0.91'lik bir belirleme katsayısı (r^2) ile Arrhenius eşitliğine uyduğu görülmektedir. Bu grafiğin eğiminden bozunma reaksiyonunun aktivasyon enerjisi 48 kJ/mol olarak hesaplanmaktadır.

$$k = A e^{(-E_A / R T)} \quad (4.6)$$

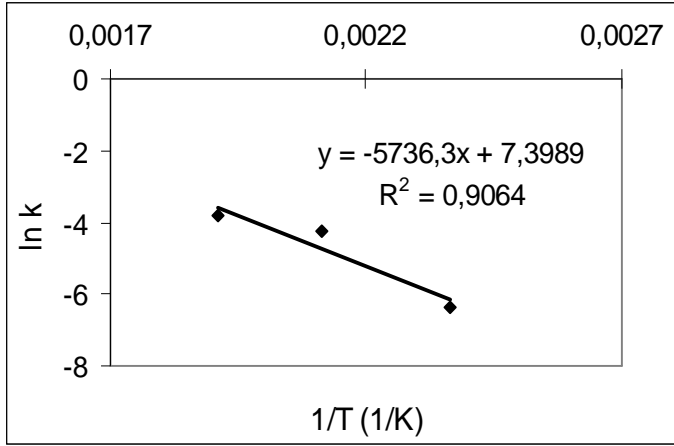
k : termal bozunma (birinci derece) hız sabiti, dak⁻¹

E_A : reaksiyon aktivasyon enerjisi (eşik enerjisi) (J/mol)

R : evrensel gaz sabiti (8.314 J/mol K)

T : mutlak sıcaklık (K)

A : sabit



Şekil 4.10. ZEA'nın termal bozunma reaksiyonu için Arrhenius grafiği

Son zamanlarda literatürde, son ürün yerine onu temsil edebilecek model sistemlerin kullanıldığı çalışmalar yer almaya başlamıştır. Ancak bu tür çalışmalarda, pH'sı ayarlanmış çözeltiler içinde hazırlanan mikotoksin ve temel gıda bileşenleri karışımlarına uygulanan ısı işlemlerindeki toksin yıkımı izlenmektedir (Bretz et al. 2006). Bu tür çalışmaların avantajı, toksinin gıda matrisi ile bağlanma olasılığını ve analizlerde matristen kaynaklı ortaya çıkabilecek hataları elimine etmektir. Lauren ve Smith (2001), nem, pH ve ısının ZEA üzerine etkisini hem doğal kontamine mısır hem de mikotoksin çözeltisi üzerinde çalışmışlardır. 110°C'de 12 günlük ısıtma işlemine karşı ZEA'nın, çözeltideki oranla mısırdaki daha dayanıklı olduğu ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda olduğu gibi mısır matrisiyle çalışan Bennett ve ark. (1980), 150°C'de 44 saat boyunca ZEA'da bozunma saptayamamışlardır. Tampon çözelti ortamında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, 150°C'de 60 dakikalık ısı işlem pH'ya bağlı olarak %34-68 oranında azalmaya neden olmuştur (Ryu et al., 2003).

Çalışmamızda ise 150°C'de 60 dakika ısıtma sonunda saptanabilen azalma yaklaşık %12 düzeyinde kalmıştır. Ryu ve ark. (2003)'nın bildirdiği %34'lük azalma ile kıyaslandığında çalışmamızda daha düşük bir azalma gözlenmesinin nedeni, saf toksin çözültisi yerine doğal kontamine gıda matrisi ile çalışılmış olmasıdır. Saf toksin çözültisinde matris etkisi olmadığından yıkımın daha kolay gerçekleştiği düşünülebilir.

Bir diğer çalışmada, dışardan ZEA ilavesi yapılan buğday unu ile çalışılmış ve aynı sıcaklık-süre koşullarında (150°C-60 dak) %28.5'lik azalma bildirilmiştir. 200°C'de 30 dakika sonunda ise %37'lik bir azalma saptanmış olup, çalışmamızdaki yaklaşık %32'lik azalmaya yakın bir sonuç olarak değerlendirilebilir (Matsuura et al., 1981).

Ryu ve ark. (2003) ayrıca bulgularımızla uyumlu olarak, artan sıcaklık ve süreyle yıkımın artış gösterdiğini ve 100°C'de hiçbir yıkım gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 100-125°C gibi kaynatma veya otoklav sıcaklıklarında ZEA içeriğinde çok ufak değişimler veya hiç değişim beklenemeyeceğini, sıcaklık 150°C'ye ulaştığı veya geçtiği takdirde (fırında pişirme, kızartma, ekstrüzyon gibi işlemlerde olduğu gibi) kademeli azalmaların başlayacağını belirtmişlerdir.

Diğer taraftan Ryu ve ark. (2003)'nin çalışmasında 225°C'de 30 dakikadan kısa bir sürede tam bir yıkım sağlanabilmiştir. Bu tezde ise 250°C'de 15 dakikalık işlemin ancak %30'a yaklaşan bir yıkım sağlayabildiği ortaya konulmuştur. Ayrıca araştırmacılar tampon çözültide ZEA yıkımının, çalışılan sıcaklıklarda (125, 150, 175 ve 200°C) birinci derece reaksiyona uyum gösterdiğini bildirmişler ve zamana karşı C 'nin doğal logaritmasını ($\ln C$) grafiğe geçirerek oluşturdukları grafiklerin eğiminden k değerlerini hesaplamışlardır. Belirlenen yarılanma süreleri ($t_{1/2}$) ve k değerlerine göre en yüksek ZEA yıkımının, çalışılan en yüksek sıcaklık olan 200°C'de gerçekleştiğini doğrulamışlardır.

4.3.3. DON'un termal bozunma kinetiği

Model disklerinin ısıtılma işlemi sırasında uygun zaman aralıklarıyla alınan örneklerdeki DON düzeyleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Bu sonuçların hesaplanmasında kullanılan geri kazanım değerleri mısır unu için %94.7, 100°C modeli için %93, 250°C modeli için ise %68'dir. Bu değerler Avrupa Komisyonu'nun 401/2006 nolu yönetmeliğinde verilen aralıklara uygundur (EC, 2006). DON seviyelerindeki azalmalar Şekil 4.11'de de görülebilmektedir.

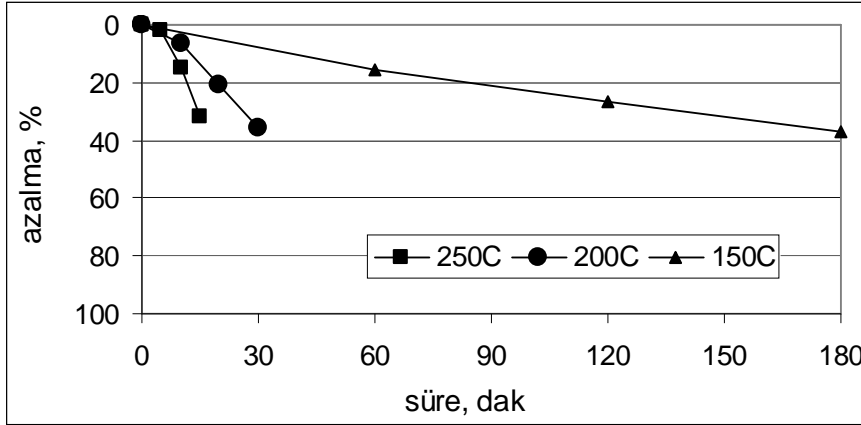
Çizelge 4.6. Farklı sıcaklıklarda ısıtılan hamur disklerinde DON seviyeleri ve una göre meydana gelen % azalmalar (n=2)

		DON, µg/kg*	RSD, %†	azalma, %
250°C	0.dak	4286 ^a	2.5	-
	5.dak	4202 ^a	1.2	2.0
	10.dak	3650 ^b	3.5	14.8
	15.dak	2924 ^c	0.5	31.8
200°C	0.dak	4286 ^a	2.5	-
	10.dak	4020 ^a	0.3	6.2
	20.dak	3390 ^b	2.6	20.9
	30.dak	2758 ^c	6.0	35.7
150°C	0.dak	3905 ^a	2.6	-
	60.dak	3303 ^b	4.1	15.4
	120.dak	2855 ^c	0.9	26.9
	180.dak	2447 ^d	4.8	37.3
100°C	0.dak	3905 ^a	2.6	-
	60.dak	4051 ^a	4.2	-3.7
	120.dak	4133 ^a	2.2	-5.8
	180.dak	3819 ^a	3.8	2.2

* Analiz sonuçları, kurumadde ve geri kazanım düzeltmeleri yapılarak verilmiştir

† RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Her bir sıcaklık için farklı harflerle gösterilen değerler 0. dak değerinden istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (p<0.05).



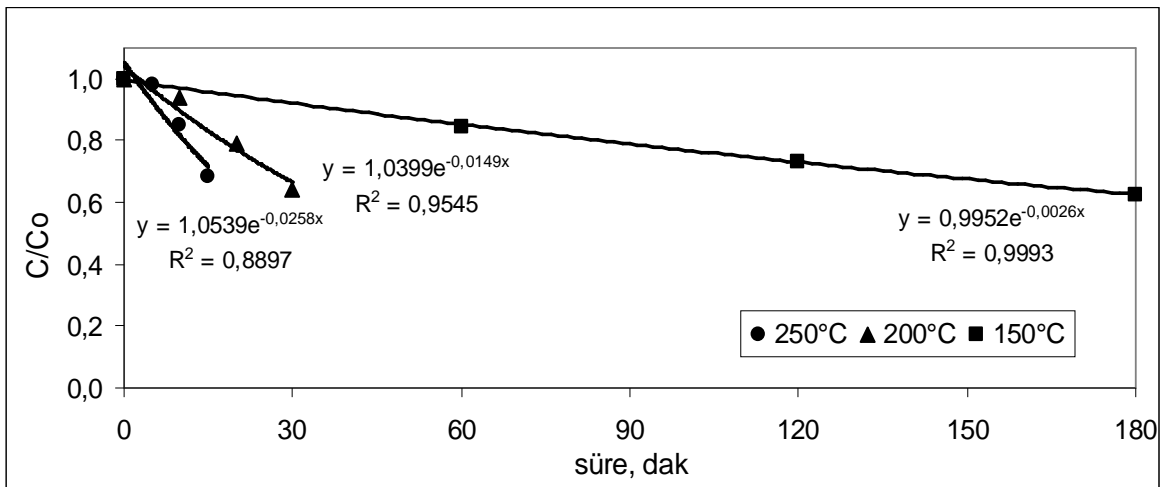
Şekil 4.11. Hamur disklerinin 250, 200 ve 150°C'de ısıtılması sonucu DON seviyesindeki % azalmalar

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, 250°C'de 5 dakikalık pişirme işlemi ile meydana gelen %2'lik azalma önemli bulunmazken, 10. ve 15. dakikalardaki azalmalar önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.6). Benzer şekilde 200°C'lik ısıtım işlem uygulamasında DON seviyesinde ilk 10 dakikadaki azalma önemsiz, 20. ve 30.dakikalarda gerçekleşen azalmalar ise istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). 250°C'de 5 dak ve 200°C'de 10 dak süresince hamur disklerinde hedeflenen işlem sıcaklıklarına ulaşamadığı için DON seviyelerinde önemli bir azalma olmamıştır (Şekil 4.7).

150°C'deki ısıtım sırasında 1 saatlik aralıklarla alınan örneklerin her birindeki DON düzeyleri başlangıçtakinden önemli derecede düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer taraftan, 100°C'de 3 saat boyunca gerçekleştirilen ısıtım işlem sonucunda başlangıç DON seviyesinde önemli bir azalma gerçekleşmemiştir ($p > 0.05$). İlk 2 saatte artış yönünde gözlenen değişimler istatistiksel açıdan önemli değildir. Literatürde de DON'un ekmekte 100°C sıcaklıkta oldukça stabil bir davranış sergilediği bildirilmektedir (Wolf and Bullerman, 1998). Çizelge 4.6'daki sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, yüksek sıcaklıkta kısa süre yerine düşük sıcaklıkta uzun süreli ısıtımın daha fazla toksin yıkımına neden olabileceği söylenebilir.

Eş. 4.4'e göre, çalışılan her bir sıcaklık için DON düzeylerinin başlangıç konsantrasyonlarına oranları (C/C_0 , deneysel) zamana karşı grafiğe geçirilerek DON'un farklı sıcaklıklardaki termal bozunma davranışı ortaya konmuştur (Şekil

4.12). C/C_0 - zaman grafiklerinden elde edilen birinci derece termal bozunma hız sabitleri (k) Çizelge 4.7'de verilmektedir. k değerleri sıcaklıkla artmakta ve bu durum DON'un da ZEA gibi sıcaklık arttıkça daha fazla yıkıma uğradığını göstermektedir. 100°C'de DON termal bozunmaya uğramadığından k değeri de negatif çıkmaktadır. Eş. 4.5'e göre hesaplanan toksin yarılanma süreleri, 250°C'de 27 dakika iken 150°C'de 267 dakikaya kadar uzamaktadır. Bu sonuçlar ZEA için belirlenen yarılanma süreleriyle karşılaştırıldığında (Çizelge 4.5), 150°C'de daha belirgin olmak üzere her bir sıcaklıkta, ZEA'nın DON'a göre ısıya karşı daha kararlı olduğu söylenebilir. ZEA ve DON için termal bozunma hız sabitleri (k) karşılaştırıldığında da (Çizelge 4.5 ve 4.7), her bir sıcaklıkta DON için bu değerlerin daha yüksek olduğu ve dolayısıyla DON'un daha hızlı bozunmaya uğradığı anlaşılmaktadır. Farklı sıcaklık derecelerinde uygulanan ısı işlemlerin DON ve ZEA üzerine etkisini toksin standardı ve doğal kontamine arpa unu üzerinde inceleyen bir çalışmada, ZEA için yarılanma sürelerinin DON'a göre daha yüksek olduğu ve ZEA'nın DON'dan en az %20 daha kararlı olduğu saptanmıştır (Yumbe-Guevara et al., 2003). 220°C'de saf standard halinde ısıtıldıklarında, %50 oranında parçalanma için gerekli süreler DON ve ZEA için sırasıyla 4 ve 25 dakikadır. Arpa ununun ısıtılması sırasında ise bu süreler oldukça yakın olup sırasıyla 8 ve 9 dakikadır. Çalışmada, 140 ve 160°C'de ZEA standardında önemli bir değişiklik gerçekleşmezken, gözlenebilen en yüksek azalma 220°C'de 60 dakika sonunda elde edilen %85'lik azalmadır.



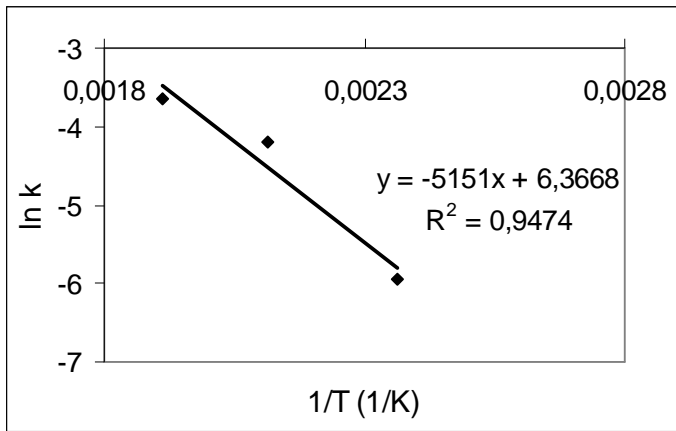
Şekil 4.12. Model sistemde DON için 250°C, 200°C ve 150°C'de termal bozunma hız sabitlerini (k) veren grafikler (birinci derece reaksiyon yaklaşımı ile)

Çizelge 4.7. DON için farklı sıcaklıklardaki termal bozunma verileri

T (°C)	k (dak ⁻¹)	r	$C_{0, \text{deneyse}} (\mu\text{g/kg})$	$C_{0, \text{grafik}} (\mu\text{g/kg})$	$t_{1/2}$ (dak)
250	0.0258	0.9432	4286	4517	27
200	0.0149	0.9770	4286	4457	47
150	0.0026	0.9997	3905	3886	267

Diğer taraftan, DON için elde edilen bütün grafiklerin korelasyon katsayıları (r) 0.94'ün üzerinde olup, grafiklerden hesaplanan başlangıç DON konsantrasyonları ($C_{0, \text{grafik}}$) ile deneysel olarak belirlenen başlangıç konsantrasyonları ($C_{0, \text{deneyse}}$) uyumludur (Çizelge 4.7). Kullanılan kinetik modelin DON için de bozunma reaksiyonunu açıklamakta uygun olduğu anlaşılmaktadır.

DON'un termal bozunmasının sıcaklığa bağımlılığını belirlemek amacıyla, Eş. 4.6'nın doğal logaritması uyarınca, farklı sıcaklıklardaki k değerleri kullanılarak Arrhenius grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.13). 100°C'de DON seviyelerinde herhangi bir azalma saptanmadığından 100°C verileri Arrhenius grafiğine dâhil edilmemiştir. Grafiğin eşitliği $\ln k = -5151 / T + 6.3668$ ve r^2 değeri 0.95 olup, sıcaklık ve hız sabitleri arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Toksinin bozunma hız sabitlerinin sıcaklığa bağımlılığı Arrhenius kuralına uymaktadır. DON'un termal bozunma reaksiyonu için aktivasyon enerjisi ise 42.8 kJ/mol olup ZEA'ninkine göre daha düşüktür. Aktivasyon enerjisinin büyüklüğü, sıcaklığın reaksiyon hızı üzerine etkisini ifade etmektedir.



Şekil 4.13. DON'un termal bozunma reaksiyonu için Arrhenius grafiği

Literatürde DON bozunması, çalışmamızda olduğu gibi gıda matrisini içeren model sistemler yerine daha çok sulu çözeltilerde araştırılmıştır. Bu tür bir çalışmada Wolf ve Bullerman (1998), sulu bir tampon çözeltide 170°C'de 15 dakika ve 120°C'de 30 dakikalık işlem sonunda tam bir DON yıkımı gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise 250°C'de 15 dakika sonunda bile ancak yaklaşık %32'lik bir yıkım gerçekleşmiştir. Bu durum, çalışmamızda gerçek bir gıda matrisinin model sistem olarak kullanılması ile açıklanabilir. Mikotoksinlerin gıda matrisindeki davranışları ile saf çözelti durumundaki davranışları farklılık göstermektedir. Yumbe-Guevara ve ark. (2003), küf misellerinin tanelerin içine nüfuz etmesi sonucu iç kısımlarda biriken ve diğer gıda bileşenleri ile etkileşim halinde olan toksinlerin, dışardan toksin ilavesi yapılmış tanelerin sadece yüzeyinde bulunan toksinlere göre çok daha iyi korunabildiğini bildirmişlerdir. Yaptıkları araştırmada, standart çözeltideki toksin yıkım hızı kontamine arpa unundakinin iki katı olmuştur. 220°C'de standard çözeltide %50'lik yıkım sağlamak için 4 dakika yeterli iken, un örneklerinde bu süre 8 dakikaya çıkmıştır. Doğal kontamine gıda matrisinde toksinin dokulardaki farklı yerleşimi bile ısı etkisiyle yıkımını etkilemektedir (Hazel and Patel, 2004).

Yumbe-Guevara ve ark. (2003), toksin standardının 140°C'de 60 dakika ısıtılması sonucu DON'da en fazla %15'lik bir bozunma gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu değer, tezde daha yüksek bir sıcaklık olan 150°C'de 60 dakika sonucu elde edilen %15.4'lik azalmaya oldukça yakındır. Araştırmacılar 160, 180, 200 ve 220°C'de 60 dakika sonunda ise sırasıyla %48, %79, %96 ve %100 azalma olduğunu bildirmişlerdir.

4.4. Mısır Ekmeğinde Toksinlerin Yıkımı ve Kinetik Modele Uygunluğu

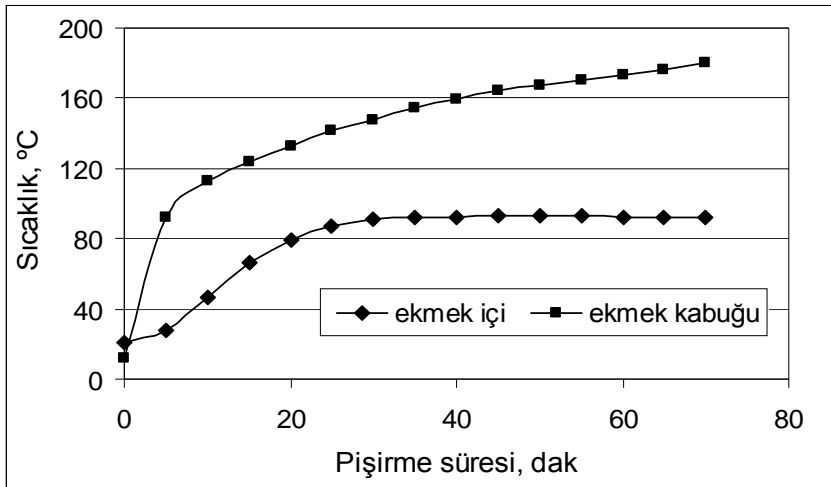
Model sistem çalışmaları ile belirlenen kinetik davranışların doğruluğunu test etmek amacıyla laboratuvar ölçeğinde geleneksel mısır ekmeği üretimi gerçekleştirilmiştir. Ekmeğin pişirilmesi sırasında (250°C'de 70 dak) ZEA ve DON'un ekmekteki tahmini yıkımı, model sistem çalışmalarından elde edilen kinetik veriler ile hesaplanmıştır. Bu amaçla, pişirme sırasında kabuk ve merkezdeki sıcaklıklar ısılıçiftler yardımıyla ölçülmüştür. Her 5 dakikalık zaman dilimi için ortalama sıcaklıklar bulunmuş ve bu sıcaklıklardaki termal bozunma hız sabitleri (k) Arrhenius eşitliğinden hesaplanmıştır. Daha sonra Eş. 4.4 ve k

değerleri kullanılarak bu zaman dilimleri için kısmi yüzde azalmalar hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak tüm pişirme işlemi sonunda hem kabuk hem de merkezdeki toplam toksin kaybı tahmin edilmiştir.

Diğer taraftan ekmekteki toksin yıkımı deneysel olarak da belirlenmiştir. Ekmeğin pişirilmesi sırasında gerçekleşecek ısı ve kütle aktarım olayları dikkate alınır, ekmeğin bir bütün halinde homojenize edilerek analize alınması sıcaklık etkisiyle oluşan gerçek toksin yıkımı hakkında doğru bilgi vermeyecektir. Bu nedenle, unda ve pişirilen ekmeklerin kabuk ve iç kısımlarında ayrı ayrı mikotoksin analizleri gerçekleştirilerek deneysel azalmalar belirlenmiştir. Bu değerler, yukarıda anlatıldığı şekilde kinetik verilerle tahmin edilen azalmalarla karşılaştırılmıştır.

4.4.1. Mısır ekmeğinde ZEA yıkımı ve modele uygunluğu

250°C'deki fırında 70 dakika boyunca pişirilen 4 cm kalınlığındaki ekmeğin kabuğu ve merkezinde gözlenen sıcaklık değişimleri Şekil 4.14'de verilmiştir. Pişirme süresi sonunda kabuktaki sıcaklık 180°C'ye ulaşırken merkezde ancak 93°C'ye yaklaşabilmiştir. Diğer taraftan, fırının ısıtma gücünü kontrol etmek amacıyla pişirme sırasında fırın iç sıcaklığı da ölçülmüştür. Fırında sıcaklık göstergesi 250°C'yi gösterirken ölçülen iç sıcaklık 246-247°C arasında değişmiştir.



Şekil 4.14. ZEA analizleri için kullanılan ekmeğin pişirme sıcaklık profilleri

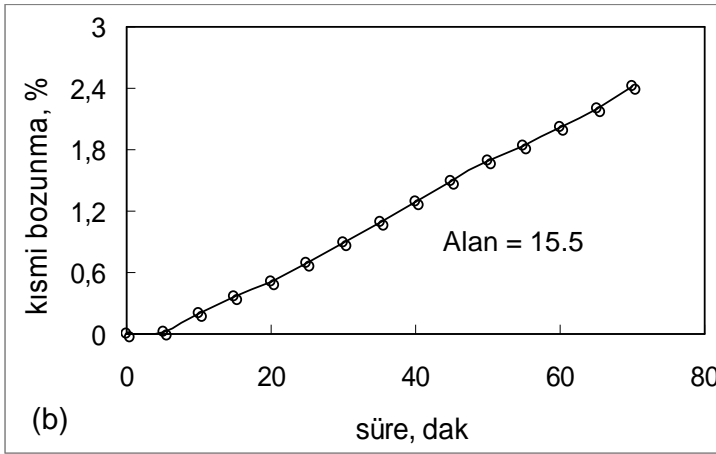
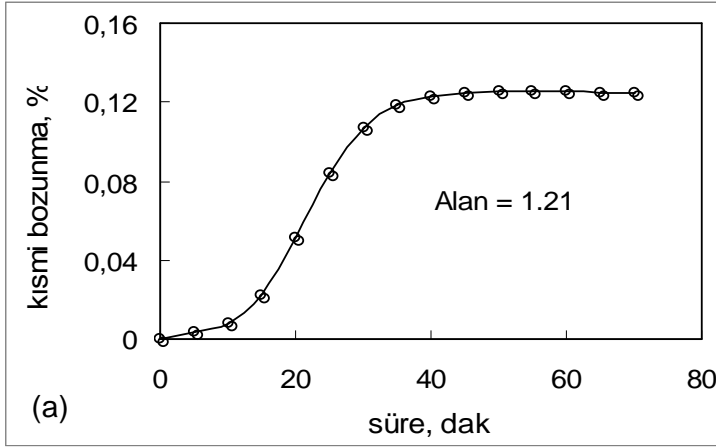
Şekil 4.14'den gözlenebileceği gibi, pişirmenin başlangıcında hem iç hem de kabuk sıcaklığında hızlı bir yükselme meydana gelmektedir. Sıcaklıktaki bu hızlı yükselmeye, başlangıçta soğuk olan ekmekte suyun yoğunlaşması sırasında ortaya çıkan ısı sebep olmaktadır (Çetinkaya Açar, 2010). Daha sonra ekmek içi sıcaklığı yaklaşık 93°C'de sabit kalmıştır. Bu durgun evrede, ürünün yapısında bulunan su buharlaşarak yapıdan uzaklaşmaktadır. Bu evrenin uzunluğu, uygulanan fırın sıcaklığına bağlı olarak değişim göstermekte; düşük fırın sıcaklıklarında çok daha uzun iken, fırın sıcaklığı yükseldikçe bu süre kısalmaktadır. Ekmeğin içinde suyun buharlaşması kabuğa göre daha uzun sürdüğünden, pişirmenin yaklaşık ilk 25 dakikasında sıcaklık artışı gözlendikten sonra sonra iç sıcaklık yaklaşık 93°C'de sabit kalmıştır. Kabukta ise sıcaklığın daha yüksek olmasına bağlı olarak, yapıda bulunan suyun hızla ve tamamen uzaklaşması nedeniyle durgun bir evre yaşanmamıştır. Sıcaklık yaklaşık ilk 5 dakikada hızla artmış ve pişirmenin devamında daha düşük bir hızla artmaya devam etmiştir. Ancak hiçbir zaman fırın sıcaklığına ulaşamamıştır.

Ekmeğin kabuk ve iç kısımları için hesaplanan kısmi yüzde azalma değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek eğrilerin altında kalan alanlar trapezoid kuralına göre hesaplanmıştır (Şekil 4.15). Bu şekilde elde edilen, pişirme sonundaki toplam yüzde bozunma değerleri kabuk için %15.5, ekmek içi için ise %1.2'dir.

Ekmeğin yapımında kullanılan mısır ununda ve üretilen ekmeğin kabuk ve iç kısımlarında deneysel olarak belirlenen kalıntı ZEA düzeyleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Ekmeğin kabuğunda %13.1'lik bir azalma saptanmış, ancak bu azalmanın istatistiksel anlamda önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Ekmeğin içinde ise, 100°C'de gerçekleştirilen model çalışmalarında da gözlemlendiği gibi önemsiz bir artış (%3.3) olmuştur ($p>0.05$).

Modelden tahmin edilen bozunma değerleri Çizelge 4.8'de verilen deneysel azalmalarla karşılaştırıldığında, kabuktaki %13.1'lik azalmanın, kinetik verilerle tahmin edilen %15.5'lik azalmaya çok yakın olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, ekmeğin içinde öngörülen %1.2'lük azalma, deneysel olarak gözlenememiştir. Ancak ekmeğin kabuğundaki sonuçlar dikkate alındığında, kullanılan matematiksel yaklaşım, gerçek azalmaları tahmin etmekte başarılı görünmektedir. Kabuk benzeri model sistemin kinetik çalışmalardaki güvenilirliğinin yüksek olduğu ve bu

yolla belirlenen kinetik sabitlerin ekmek pişirme sırasında gerçekleşen ZEA yıkımını tahmin etmek için yeterli doğrulukta olduğu söylenebilir.



Şekil 4.15. ZEA için (a) ekmek içi ve (b) kabuğunda zamana karşı kısmi yüzde bozunma grafikleri

Çizelge 4.8. Ekmek içi ve kabuğunda deneysel olarak belirlenen ve modelden tahmin edilen ZEA azalmalarının karşılaştırılması (n=2)

	ZEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ kurumadde) ^a	RSD (%) ^b	Deneysel azalma (%)	Tahmin edilen azalma (%)
un	2179.6	1.69		
ekmek içi	2251.4	1.91	-3.3	1.2
ekmek kabuğu	1894.9	0.84	13.1	15.5

^a Analiz sonuçları, kurumadde ve geri kazanım düzeltmeleri yapılarak verilmiştir

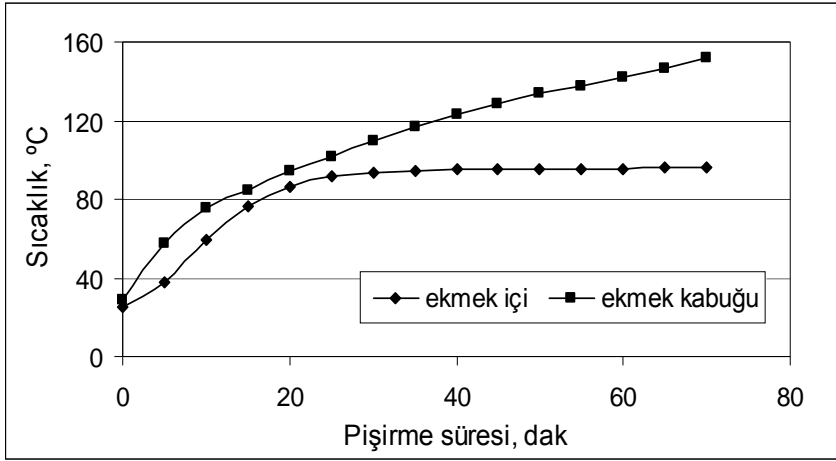
^b RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Mısır ekmeğinde deneysel olarak belirlenen ZEA azalmalarını literatürdeki sonuçlarla karşılaştırmak çok zordur. Literatürde mayasız mısır ekmeği ile yapılan bir çalışmaya rastlanamamış olmasının yanısıra, diğer ekme ve mayalı / mayasız ürünler üzerinde yapılan çalışmalarda da pişirme yöntemleri ve koşulları, fermentasyon basamağının varlığı, kullanılan katkı maddeleri ve ekmeğin boyutu gibi faktörler büyük farklılıklar göstermektedir. Isıl işlemin toksinler üzerine etkisi, özellikle sıcaklık-süre koşullarına ve ürün boyutuna bağlı olarak çok değişkendir ve bu nedenle literatürdeki bulgular da birbiriyle çelişmektedir (Hazel and Patel, 2004). Bu tezde model sistem üzerinde çalışma yapılmasının amacı, farklı ürünler üzerinden elde edilen farklı bozunma bulgularının karşılaştırılmasındaki zorlukların önüne geçebilmektir. Ancak ortaya konan kinetik davranışın sadece benzer bileşimdeki (örneğin mayasız) ürünlere uygulanabileceği düşünülmektedir. Bu model sistemle elde edilen kinetik sabitler, ısıl işlem uygulanan benzer özellikteki ürünlere toksin düzeylerinin belli oranlarda azaltılabilmesi için gerekli sıcaklık ve süre koşullarının belirlenmesinde kullanılabilir.

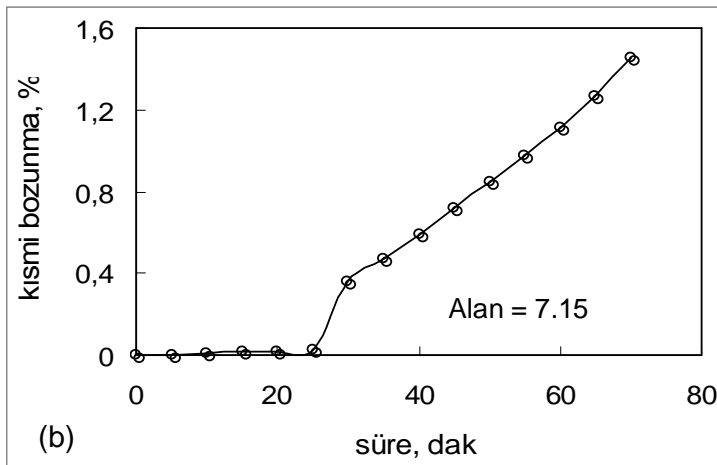
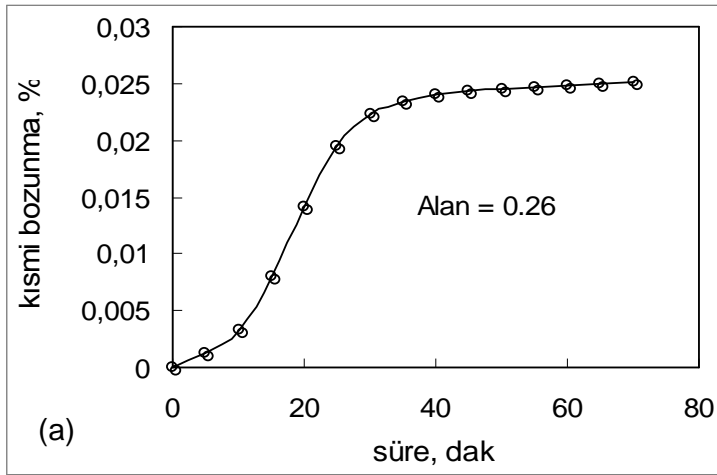
4.4.2. Mısır ekmeğinde DON yıkımı ve modele uygunluğu

DON için ortaya konan kinetik davranışın doğruluğunu test etmek amacıyla yine küçük ölçekte bir ekme üretimini gerçekleştirilmiş ve pişirme sırasında ekme kabuğu ve merkezinde kaydedilen sıcaklık değişimleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Merkezdeki sıcaklık pişirmenin sonunda yaklaşık 100°C'ye ulaşabilirken, kabuktaki en yüksek sıcaklık 150°C olarak ölçülmüştür. Bu durum, yukarıda açıklandığı gibi, ürün merkezinde gerçekleşen evaporasyonun yarattığı soğuma etkisinden kaynaklanmaktadır (Çetinkaya Açar, 2010).

Ekmeğin kabuk ve iç kısımlarında, pişirmenin her 5 dakikalık zaman dilimi için hesaplanan kısmi yüzde bozunma değerlerinin zamana karşı çizilen grafiklerinde eğri altında kalan alanlar hesaplanmıştır (Şekil 4.17). Buna göre belirlenen toplam yüzde bozunma değerleri kabuk için %7.2, ekme içi için ise %0.3'tür.



Şekil 4.16. DON analizleri için kullanılan ekmeğin pişirme sıcaklık profilleri



Şekil 4.17. DON için (a) ekmeğin içi ve (b) kabuğunda zamana karşı kısmi yüzde bozunma grafikleri

Mısır unu ve ekmekte gerçekleştirilen analizlerin sonuçları ve deneysel azalma değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir. 250°C'de gerçekleştirilen pişirme işlemi sonucunda, DON'da sadece ekmek kabuğunda önemli bir azalma (%9.9) gözlenmiştir (p<0.05). ZEA için kabuktaki deneysel azalma ise %13.1'dir. Kinetik özelliklerine göre ısıya daha dayanıklı olduğu belirlenen ZEA'nın kabuktaki yıkımı daha yüksek gibi görünmektedir; ancak ZEA çalışmasında ekmeğin pişirilmesi sırasında kabuğun ulaştığı en yüksek sıcaklığın (180°C) DON çalışmasındakinden (150°C) yüksek oluşu, bu deneysel veriler üzerinden doğrudan karşılaştırma yapmanın doğru olmayacağını göstermektedir. DON için ekmek içinde gözlenen artış (%7.7) ise istatistiksel açıdan önemsizdir (p>0.05). 100°C sıcaklıktaki model çalışmalarında da ilk iki saatte benzer artışlar gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.9. Ekmek içi ve kabuğunda deneysel olarak belirlenen ve modelden tahmin edilen DON azalmalarının karşılaştırılması (n=3)

	DON (µg/kg kurumadde) ^a	RSD (%) ^b	Deneysel azalma (%)	Tahmin edilen azalma (%)
un	3022	0.7		
ekmek içi	3255	4.8	-7.7	0.3
ekmek kabuğu	2721	3.3	9.9	7.2

^a Analiz sonuçları, kurumadde ve geri kazanım düzeltmeleri yapılarak verilmiştir

^b RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Literatürde çeşitli gıda işlemleri sonrasında artan DON konsantrasyonları ile ilgili bulgular yer almaktadır (Young et al., 1984; Accerbi et al., 1999; Sugita-Konishi et al., 2006; Voss and Snook, 2010). Örneğin Voss ve Snook (2010), hammadde ve ürünler arasında kütle denkliği yapıldığı durumda, buğday ununa göre donat ve tahıl gevreklerinde DON konsantrasyonlarının daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar bu durumu, işlem sırasında konjugat yapıların (DON glukozidleri gibi) açılarak DON'un serbest hale geçmesi ile açıklamışlardır. Gıdaların işlenmesi sırasında üç farklı olay aynı anda gerçekleşebilmektedir; toksinin ısı etkisiyle bozunması, serbest toksinin gıda matrisine bağlanması ve bağlı toksinin konjugatlarından serbest hale geçmesi (Bergamini et al., 2010; Voss and Snook, 2010). Çalışmamızda toksinin bozunma kinetiği ortaya konulurken un veya ekmekteki bağlanma veya parçalanma ürünleri araştırılmamıştır. Konjugatların işlemler sırasında hidrolize uğrayarak son ürünlerdeki toksin miktarını artırabilmesi,

daha çok fermentasyon gibi enzimatik prosesleri kapsayan ürünlerde (malt, bira veya mayalı ekmekek gibi) söz konusu olabilmektedir (Berthiller et al., 2009b). Young et al. (1984)'un çalışmasında, maya ilavesiyle üretilmiş fermente gıdalarda DON içeriğinin hammaddeden daha yüksek olması, fermentasyon sırasında enzimatik bir hidrolizle DON'un açığa çıkmasına bağlanmıştır.

Modelden tahmin edilen yüzde bozunma değerleri, Çizelge 4.9'de verilen deneysel azalmalarla karşılaştırıldığında, kabukta deneysel olarak elde edilen azalmanın (%9.9) model verileriyle tahmin edilen %7.2'lik azalmaya yakın olduğu görülmektedir. Benzer şekilde, ekmeğin içinde önemsiz bir azalma (%0.3) gerçekleşmesi tahmin edilirken deneysel anlamda da önemli bir azalma saptanamamıştır. Sonuç olarak, model sistem çalışmalarıyla elde edilen kinetik davranışın gerçek azalmaları tahmin edebilme başarısı yüksektir. ZEA için olduğu gibi DON için de bu matematiksel yaklaşımla benzer ürünlerdeki toksin yıkımının tahmini mümkündür.

Literatürde DON'un 170-350°C'de fırında pişirmeye karşı oldukça dayanıklı olduğu ve 170°C'de 30 dakika sonunda DON konsantrasyonunda azalma olmadığı bildirilmektedir (Kushiro, 2008). Voss ve Snook (2010) ise buğday ekmeği üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada DON'un, 227°C'de 18 dak pişirilen üründe %50'nin üzerinde azaldığını ortaya koymuştur. Ancak bu azalmada hem termal yıkım, hem de ürün bileşimine giren ingrediyenlerin neden olduğu seyrelmenin etkisi bulunmaktadır.

Bergamini ve ark. (2010), çeşitli ekmekek yapım parametrelerinin DON üzerine etkisini araştırmışlardır. Doğal kontamine un kullanılan çalışmada hem pilot hem de endüstriyel ölçekte ekmekek denemeleriyle istatistiksel bir tahmin modeli oluşturulması hedeflenmiştir. Elde edilen tahmin modeli, fermentasyon basamağının DON düzeyinde artışa neden olduğunu, ancak pişirme sırasında artan sıcaklık-süre kombinasyonunun DON'u azalttığını göstermiştir. Modele göre özellikle 210°C'nin üzerindeki sıcaklıkların DON konsantrasyonunda önemli bir azalmaya yol açabileceği ortaya konulmuştur. Ancak bu etki sadece yüksek seviyede kontamine olmuş un için gösterilebilmiştir. Araştırmacılar, ekmekek yapımı sırasında matriste oluşan fizikokimyasal değişimler ve DON'un maskelenmiş formlarının enzimatik olarak serbest hale geçmesi nedeniyle ekmekek yapımı

sırasında toksin azalmasının kesin olarak ortaya konmasının zorluğunu bildirmişlerdir.

Diğer taraftan, literatürde ekmek yapımında maya kullanımının DON kayıplarını artırıcı etkisi olduğu da bildirilmektedir (Neira et al., 1997; Samar et al., 2001; Voss and Snook, 2010). Samar ve ark. (2001) ile Pacin ve ark. (2010) Arjantin tipi geleneksel mayalı ekmeklerde %58'lere varan azalmalar bildirmiş ve bu azalmalarda ısının yanısıra fermentasyon basamağının da önemli etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Neira ve ark. (1997) da aynı teknikle ürettikleri ekmeklerde, hem fermentasyon hem de pişirme (210°C'de 10-40 dak) işlemlerinin ardından DON miktarında önemli azalmalar kaydetmişlerdir. Undaki başlangıç DON düzeyi ile fermentasyon sonrasındaki azalmalar arasında pozitif bir ilişki belirlenmiş ve pişirme süresi uzadıkça DON kaybı da artmıştır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda mikotoksinlerin ekmek üretimi sırasında özellikle ekmek içindeki stabiliteyi, Karadeniz Bölgesi'ne özgü geleneksel mısır ekmeği üretiminde fermentasyon işleminin bulunmamasına bağlanabilir.

Ayrıca çalışmamızda, ısı işlemin etkisiyle toksinlerin belli oranlarda yıkımı gösterilmiş olmakla beraber, azalmalar tam anlamıyla bir detoksifikasyon sağlandığı anlamına gelmemektedir (Bullerman and Bianchini, 2007). Toksinin matrise bağlanma kapasitesi ve olası parçalanma ürünlerinin de değerlendirilmesi, ürünün gerçek toksisitesinin ortaya konması için gereklidir.

4.5. Genleştirilmiş Ürünlerde ZEA ve DON Bozunması

Ekstrüzyona benzer bir işlem olan tahıl genleştirme işleminin mikotoksinler üzerine etkisinin incelenmesi için genleştirilmiş ürünler üretilmiştir. Ticari ekstrüde ürünlerin üretiminde kullanılan büyük ölçekli cihazların çok yüksek miktarda hammadde gerektirmesi (20-50 kg) ve bu miktarlarda doğal kontamine mısır bulunmasının zorluğu nedeniyle, küçük miktarda örnekle çalışmaya olanak sağlayan pirinç keki üretim cihazı kullanılmıştır (Bölüm 3.2.3).

Üç farklı sıcaklıkta (200, 240 ve 267°C) gerçekleştirilen genleştirme işleminin ardından ZEA ve DON içeriklerinde meydana gelen azalmalar Çizelge 4.10 ve 4.11'de verilmektedir. Sonuçların hesaplanmasında genleştirilmiş ürünler için kullanılan geri kazanım değerleri ZEA ve DON için sırasıyla %104.6 ve %84.2'dir.

Çizelge 4.10. Genleştirilmiş mısır ürünlerinde ZEA düzeyindeki azalmalar

Genleştirme sıcaklığı (°C)	Mısır		Ürün		Azalma (%)
	ZEA (µg/kg) ^a	RSD (%) ^b	ZEA (µg/kg) ^a	RSD (%) ^b	
200			92.0	0.00	13.5
240	106.5	6.06	84.1	3.65	21.0
267			75.8	0.00	28.8

^a Analiz sonuçları, kurumadde ve geri kazanım düzeltmeleri yapılarak verilmiştir

^b RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Çizelge 4.10'da verilen sonuçlara göre, artan sıcaklıkla ZEA düzeyindeki azalmalar artma eğilimi göstermektedir. En yüksek azalma 267°C'de gerçekleşmiş, her bir sıcaklıktaki azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05).

Tezde uygulanan üretim yöntemi yüksek basınç uygulamasını içermesi bakımından ekstrüzyona benzemekle beraber gerçek bir ekstrüzyon işlemi değildir. Ayrıca bu tür proseslerin mikotoksinler üzerine etkisi katkı maddelerinin varlığı, nem içeriği ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle literatürde bulunan ekstrüzyonla ilgili araştırma sonuçları bulgularımızdan önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Örneğin bir çalışmada, 120 ve 140°C gibi daha düşük sıcaklıklarda uygulanan ekstrüzyon işlemi bile ZEA miktarında %73-83 oranında azalma sağlayabilmiş, 160°C'de ise azalma %66-77 olmuştur (Castells et al., 2005). DON için ise bu azalmalar daha düşük düzeyde (en fazla %55) gerçekleşmiştir. Genellikle ekstrüzyon işleminin, ısı uygulaması içeren diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında ZEA düzeylerinin azaltılmasında daha etkili olduğu bildirilmektedir. Cetin ve Bullerman (2005) ise 150-200°C'de uyguladıkları ekstrüzyon işlemleri ile ZEA miktarında %67-81 oranında azalma elde etmişlerdir. Genel olarak ekstrüzyon işlemi ile sağlanan azalmaların çalışmamızda uygulanan genleştirme işlemine göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.11. Genleştirilmiş mısır ürünlerinde DON düzeyindeki azalmalar

Genleştirme sıcaklığı (°C)	Mısır		Ürün		Azalma (%)
	DON (µg/kg) ^a	RSD (%) ^b	DON (µg/kg) ^a	RSD (%) ^b	
200			1703	1.9	20.0
240	2130	9.9	1627	10.9	23.6
267			1463	8.9	31.3

^a Analiz sonuçları, kurumadde ve geri kazanım düzeltmeleri yapılarak verilmiştir

^b RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Çizelge 4.11'e göre, artan genleştirme sıcaklığıyla DON'daki bozunma da artmaktadır. Her bir sıcaklıktaki azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). 200-267°C sıcaklık aralığındaki genleştirme işlemi ile üründe ortalama yaklaşık %25 oranında bir DON azalması gerçekleştiği söylenebilir. DON için de araştırma sonuçlarının literatürdeki ekstrüzyon bulguları ile karşılaştırılmasının uygun olmayacağı düşünülmektedir. Örneğin Cazzaniga ve ark. (2001) değişik oranlarda sodyum metabisülfite ilavesi, değişik nem içerikleri ve 150-180°C aralığındaki sıcaklıklarda DON'da %95'e varan azalma kaydetmişlerdir.

Literatürde ayrıca, ekstrüzyon işlemi sırasında sıcaklık azaldıkça ve ürünün nem içeriği arttıkça toksin kayıplarının arttığı ile ilgili bulgular da bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda üründeki nem miktarının azalmasına bağlı olarak ısı transferinin zorlaştığı ve ısının toksin üzerindeki etkisinin azaldığı bildirilmektedir (Castelo et al., 1998; Cetin and Bullerman, 2005). Genleştirme işlemi ise bu tür bir etkiye neden olmamış, tersine her iki toksin için de sıcaklık arttıkça toksin kayıplarında artış olmuştur.

DON ve ZEA için genleştirme işlemi ile sağlanan azalmaların, 200°C dışındaki sıcaklıklarda, çok belirgin bir fark göstermediği söylenebilir. Ancak yine de bütün sıcaklıklarda ZEA daha stabil gibi görünmektedir ve bu durum ekmek için gerçekleştirilen model sistem çalışmalarından elde edilen bulgularla uyum göstermektedir.

Genleştirilmiş ürünlerin boyutları (4.5 cm çap ve 11 mm kalınlık), model sistem çalışmasında kullanılan hamur disklerinin boyutları (9.5 cm çap ve 1 mm kalınlık) ile karşılaştırıldığında, genleştirilmiş ürünlerin belirgin şekilde daha kalın olduğu görülmektedir. Ancak yine de ısı dağılımının bu örnekler boyunca çok heterojen şekilde gerçekleşmeyeceği tahmin edilerek, 200, 240 ve 267°C'lerde gerçekleşen ZEA ve DON azalmaları, bir önceki bölümde belirlenmiş olan kinetik davranışlar üzerinden tahmin edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle, toksinlerin Arrhenius eşitliklerinden her bir sıcaklıktaki k değerleri belirlenmiş ve daha sonra Eş. 4.4 kullanılarak her bir durumda gerçekleşmesi beklenen yüzde azalmalar hesaplanmıştır. Bütün genleştirme işlemi boyunca tanelerin cihazda en fazla 1 dakika kaldığı düşünülerek, hesaplamalarda işlem süresi 1 dakika olarak varsayılmıştır. Çünkü mısır, genleştirme cihazının ısıtılmış silindirik haznesine beslendikten yaklaşık 6 saniye sonra yüksek basınç altında sıkıştırılmakta ve basıncın hızlıca kaldırılması ile genleşme gerçekleşmektedir.

ZEA için bu yöntemle tahmin edilen azalmalar 200, 240 ve 267°C'de sırasıyla %1, %2 ve %4'tür. DON için de benzer şekilde, artan sıcaklıkla azalmalar sırasıyla %1, %3 ve %4 olarak tahmin edilmiştir. Ancak Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'deki deneysel azalmaların çok daha yüksek olduğu görülmektedir (ZEA için %13.5-28.8, DON için %20-31.3 aralığında). Aradaki önemli fark genleştirme işlemindeki basınç uygulamasına bağlanabilir. Model sistemde basınç uygulaması olmaması nedeniyle, kinetik verilerin genleştirilmiş ürüne uyumlu olmadığı görülmüştür. Bu üretim tekniğinde sıcaklığa ek olarak basıncın toksin azalmasında önemli bir etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, genleştirilmiş ürünlerin kalınlıkları nedeniyle ısı dağılımının model sistem örneklerindeki kadar homojen gerçekleşmemiş olması da aradaki önemli farkın bir nedeni olabilir.

4.6. Helva ve Kuymak Üretimine Fumonisinler Üzerine Etkisi

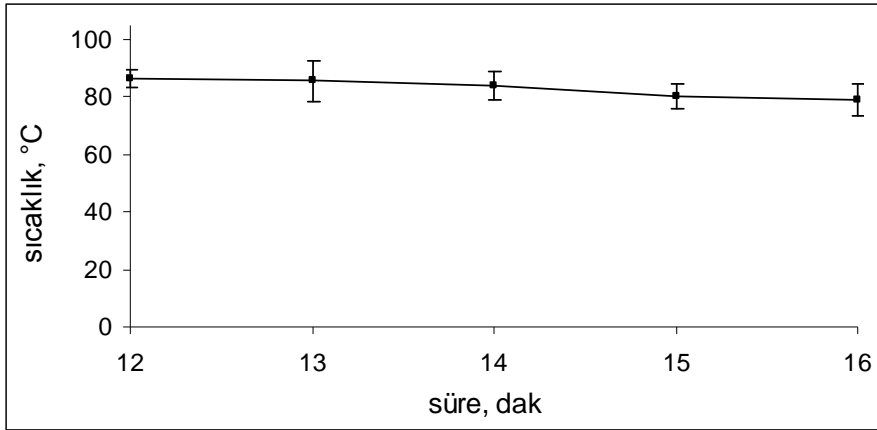
Karadeniz Bölgesi'nin geleneksel ürünleri olan ve mısır unundan hazırlanan helva ve kuymakta *Fusarium* toksinleri ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Kuymak, mısır unu ve sütle yapılan ve çoğunlukla kahvaltılık olarak tüketilen bir üründür. Helva ise mısır unu, tereyağı ve şerbet kullanılarak yapılmaktadır. Tezin bu bölümünde fumonisinlere özel bir önem verilmesinin nedeni, çalışılan ürünlerin şeker içeriğinin yüksek olması ve fumonisinlerin şeker varlığında ısıtıldığında Maillard benzeri reaksiyonlara girmesidir.

Gıdalara uygulanan işlemler sırasında mikotoksinlerin miktarında meydana gelen azalmalar bunların parçalanmasından, başka bileşiklere dönüşmesinden veya gıda bileşenlerine (şekerler, proteinler vb.) bağlanmasından kaynaklanabilmektedir (Humpf and Voss, 2004). Fumonisinler de, bu işlemler sırasında matrise bağlanabildiği ve/veya matristen ayrılabilirdiği için işlemler öncesi ve sonrasındaki bağlı fumonisin (bağlı-FB) düzeylerinin belirlenmesi önemlidir.

Örneklerdeki bağlı fumonisinlerin belirlenebilmesi için bazik hidroliz uygulanmıştır. Bağlı fumonisinler matris bileşenlerine TCA grupları üzerinden bağlı bulunmaktadırlar. Hidroliz sırasında bağlı fumonisinlerin TCA grupları uzaklaşarak hidrolize fumonisinler açığa çıkmaktadır. Aynı şekilde yapıdaki serbest fumonisinler de bu sırada hidrolize uğramaktadır. Hidroliz sonucu belirlenen toplam hidrolize fumonisin miktarı, örnekte doğal olarak bulunan hidrolize formları da içermektedir. Bağlı fumonisinlerin miktarı, hidroliz sonrası toplam hidrolize fumonisin (toplam HFB) miktarından hidroliz öncesi belirlenen fumonisin (FB) ve doğal hidrolize fumonisinlerin (doğal HFB) miktarlarının çıkarılmasıyla hesaplanmaktadır. Matematiksel işleme alınan bileşiklerin moleküler yapılarının farklı olması nedeniyle $\mu\text{g/g}$ birimi ile hesaplama yapılamamaktadır. Bu nedenle $\mu\text{g/g}$ cinsinden belirlenen sonuçlar nmol/g 'a çevrilmiştir. Bu amaçla FB_1 , FB_2 , HFB_1 ve HFB_2 'nin molekül ağırlıklarından yararlanılmıştır. Bu molekül ağırlıkları FB_1 için 771.8 g/mol , FB_2 için 705.8 g/mol , HFB_1 için 405.6 g/mol , HFB_2 için 389.6 g/mol 'dür.

4.6.1. Helva üretiminin etkisi

Standart bir helva üretimi yapıp yapılamadığını kontrol etmek amacıyla üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen üretim sırasında ölçülen ortalama sıcaklık değerleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Her bir denemede elde edilen sıcaklık profilleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Mısırın kavrulması sırasında sıcaklık ölçümü yapılamamış, 12. dakikada kavrulmuş una şerbet ilave edildikten sonra ölçüme başlanmıştır. 16. dakikada pişirme tamamlanana kadar sıcaklık en fazla 90°C'ye ulaşmıştır. 300°C'deki ısıtıcı üzerinde gerçekleştirilen kavurma işlemi sırasında unun en yüksek sıcaklığa maruz kaldığı düşünülmektedir. Isıya karşı çok kararlı olan fumonisinlerin, su aktivitesi, pH ve şeker içeriği gibi koşullara bağlı olmak üzere, genellikle 150-160°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kayba uğramaya başladığı bildirilmektedir (Jackson et al., 1996; Bullerman and Bianchini, 2007). Helva üretiminde, özellikle kavurma sırasında ulaşılan sıcaklıklar fumonisinlerde belli oranda kayba neden olabilecek kadar yüksektir.



Şekil 4.18. Helva yapımı sırasında ölçülen ortalama sıcaklık değerleri

Fumonisin, doğal hidrolize ve bazik hidrolize fumonisin analizleri, HPLC kromatogramlarındaki girişim problemleri nedeniyle Bölüm 3.2.6.4'de bildirildiği gibi LC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemle mısır ve helvada elde edilen geri kazanım değerleri Çizelge 4.12 ve 4.13'de verilmiştir. Avrupa Birliği'nin EC 401/2006 nolu Yönetmeliği'nde FB₁ ve FB₂ için geri kazanım değerlerinin, ≤500 µg/kg düzeyinde toksin ilavesi yapıldığı durumda %60-120, >500 µg/kg düzeyinde toksin ilavesi yapıldığı durumda ise %70-110 arasında olması gerektiği bildirilmiştir (EC, 2006). Bu çalışmada matrisse 500 µg/kg'ın altında ve üstünde

toksin ilaveleri yapılmıştır. Mısırdaki FB₁ ve FB₂ için % geri kazanım ve RSD değerleri izin verilen aralıkta bulunmuş, bazik HFB₁ ve HFB₂ için de yakın değerler elde edilmiştir. Yönetmelikte hidrolize fumonisinler için bir geri kazanım aralığı belirtilmediğinden, bazik HFB'ler için elde edilen sonuçlar FB'ler için verilen aralıklara göre değerlendirilmiş, yalnız HFB₁ için bulunan sonuç sınırları aşmıştır. Helva için ise FB₁ ve FB₂'nin geri kazanımı üst limitten biraz yüksektir (EC, 2006).

Çizelge 4.12. Mısır için fumonisin analiz yöntemlerinin geri kazanımları (n=3)

FB ₁		FB ₂		Bazik HFB ₁		Bazik HFB ₂	
Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)
1600	109.3 *RSD=1.28	400	109.9 *RSD=3.66	840	126.1 *RSD=8.99	220	95.4 *RSD=2.24

* RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Çizelge 4.13. Helva için fumonisin analiz yöntemlerinin geri kazanımları (n=3)

FB ₁		FB ₂		Bazik HFB ₁		Bazik HFB ₂	
Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)
3333	133.5 *RSD=4.41	800	122.8 *RSD=4.09	1754	89.3 *RSD=8.67	460	90.5 *RSD=3.98

* RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Helva yapımında kullanılan mısır örneğinde belirlenen fumonisin düzeyleri Çizelge 4.14'de verilmektedir. Mısır 1 örneği helva yapımında kullanılırken, Mısır 2 ve 3 örneklerinde yalnızca bağlı-FB miktarları belirlenmiştir. Üç mısır örneğinde de doğal HFB₁ ve HFB₂ bulunmadığı belirlenmiş, Mısır 1 örneğinde FB'ler ve toplam HFB'ler birbirlerine yakın düzeylerde saptanmıştır. Bu durum, helva üretiminde kullanılan mısır örneğinin düşük miktarda bağlı-FB (%4.1 bağlı-FB₁ ve %0.5 bağlı-FB₂) içerdiğini göstermektedir.

Çizelge 4.14. Farklı mısır örneklerinin FB, toplam HFB ve %bağlı-FB düzeyleri

	Fumonisin B ₁ (nmol/g)			Fumonisin B ₂ (nmol/g)		
	FB ₁	Toplam HFB ₁	%Bağlı-FB ₁	FB ₂	Toplam HFB ₂	%Bağlı-FB ₂
Mısır 1 ^a	11.10	11.58	4.1	3.63	3.65	0.5
Mısır 2	2.77	3.16	12.3	0.74	1.01	26.7
Mısır 3	2.23	4.78	53.3	0.75	1.59	52.8

^aBu mısır örneği, kuymak ve helva çalışmasında kullanılan örnektir.

Bağlı fumonisinler, fumonisinlerin TCA grupları ile nişastadaki hidroksil grupları veya proteinlerdeki aminoasitlerin yan zincirlerinde bulunan amino veya sülfidril grupları arasında kovalent bağ oluşumu sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.10) (Dall'Asta et al., 2009b). Bu etkileşim genellikle ısı işlem sonucu oluşmaktadır (Seefelder et al., 2003). Ancak literatürde, hiçbir işlem uygulanmamış mısırlarda da yüksek miktarlarda bağlı-FB bulunduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (WHO, 2011b). Bu bağlanma (konjugasyon) olayı bitkinin enfeksiyona karşı bir savunma mekanizması olarak gerçekleşmektedir. Buradaki mekanizma Seefelder ve ark. (2003)'ünün bildirdiği, ısı etkisiyle bağlanma mekanizmasından farklı olup spesifik veya spesifik olmayan bir enzimatik aktivite sonucu oluştuğu tahmin edilmektedir. Mısır 2 ve 3 örneklerinde bağlı-FB, Mısır 1 örneğine göre daha yüksek oranlarda belirlenmiştir. Özellikle Mısır 3 örneğinde toplam HFB₁ miktarı başlangıçta belirlenen FB₁'in yaklaşık iki katı kadardır. Bağlı fumonisinlerin hammadde ve ürünlerde önemli bir yüzdeyi oluşturabilmesi ve yasal limitlere uygun gibi görünen ürünlerde gizli bir tehlike oluşturmasından dolayı gıdalarda bu fumonisinlerin varlığının tespiti oldukça önemlidir. Bu toksinler ürüne işleme sırasında veya tüketildikten sonra sindirim sisteminde açığa çıkarak aynı etkiyi gösterebilmektedirler (Kim et al., 2003; Park et al., 2004).

Mısırın helvaya işlenmesinden sonra üründe belirlenen FB ve toplam HFB düzeyleri Çizelge 4.15 ve 4.16'de verilmektedir. Çizelgedeki % azalma değerleri işlem öncesi (mısırdaki) ve işlem sonrası (helvada) fumonisin düzeyleri arasındaki farklılıktan yola çıkarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar FB ve toplam HFB'de önemli azalmalara işaret etmektedir. Serbest fumonisinler üzerinden değerlendirildiğinde FB₁ ve FB₂ için sırasıyla %50 ve %55 oranında bir azalma söz konusu iken; toplam HFB'deki azalma açısından bakıldığında toplam HFB₁ %38

oranında azalırken, toplam HFB₂ mısırdaki başlangıç miktarının yaklaşık yarısına (%51) düşmüştür. Toplam HFB'deki bu azalma, fumonisinlerin Maillard benzeri reaksiyonlara girerek bazı yeni bileşiklere dönüşmesi ile açıklanabilir. Başlangıçta ortamdaki (serbest veya bağlı) fumonisin B₁'in %38'inin ve fumonisin B₂'nin %51'inin bu tür reaksiyon ürünlerini oluşturmuş olabileceği tahmin edilmektedir. Fumonisinler ve indirgen şekerler arasında gerçekleşen Maillard benzeri reaksiyonların NCM-FB₁ gibi yeni bileşiklerin oluşumuna yol açtığı iyi bilinmektedir (Humpf and Voss, 2004).

Çizelge 4.15. Mısır ve helvada FB₁ ve toplam HFB₁ düzeyleri (n=3)

	nmol/g ^a		FB ₁ 'e göre üründeki % azalma	Toplam HFB ₁ 'e göre üründeki % azalma
	FB ₁	Toplam HFB ₁		
Mısır	11.10 ± 0.388	11.58 ± 0.695		
Helva	5.59 ± 0.151	7.15 ± 0.110	50	38

^a Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

Çizelge 4.16. Mısır ve helvada FB₂ ve toplam HFB₂ düzeyleri (n=3)

	nmol/g ^a		FB ₂ 'e göre üründeki % azalma	Toplam HFB ₂ 'e göre üründeki % azalma
	FB ₂	Toplam HFB ₂		
Mısır	3.63 ± 0.053	3.65 ± 0.199		
Helva	1.64 ± 0.075	1.80 ± 0.067	55	51

^a Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

Gıdaların işlenmesi sırasında, fumonisinlerde en yüksek kayıplar 160°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve glukoz varlığında gerçekleşmektedir (Humpf and Voss, 2004; Bullerman and Bianchini, 2007). Helva üretiminde kullanılan sakkaroz indirgen bir şeker olmamakla beraber, belli koşullarda inversiyona uğrayarak Maillard reaksiyonunda daha yüksek aktiviteye sahip indirgen şekerler olan glukoz ve fruktozu oluşturabilmektedir. Pişirme sırasında sakkarozun hidrolizini, uygulanan ısıl işlem normları sağlamaktadır. Sıcaklık ve süre ne kadar yüksekse, hidroliz derecesi o kadar yükselmekte, oluşan Maillard ve benzeri reaksiyon ürünlerinin miktarı da artmaktadır (Çetinkaya Açar, 2010). Helva üretimi sırasında, şerbet ilave edildikten sonra uygulanan yaklaşık 90°C'lik sıcaklıkta 16 dakikalık işlem süresince, sakkarozdan az da olsa indirgen şeker oluşumu ve buna bağlı olarak Maillard benzeri reaksiyonların oluşumu beklenebilir.

Diğer taraftan literatürde, kızartma işlemi sırasında indirgen şeker yokluğunda bile Maillard reaksiyonlarının gerçekleşebildiği bildirilmektedir. Termal oksidasyon sonucu aldehit grubu içeren bileşiklerin oluşumu, reaksiyon için gereken karbonil grubu kaynağını oluşturmaktadır (Zhang et al., 2012). Üretimde, mısır ununun tereyağında kavrulması sırasında karbonil grupların açığa çıktığı da düşünülebilir.

Bu çalışmada, oluştuğu tahmin edilen reaksiyon ürünlerinin nitel ve nicel analizi yapılamadığı için bunlar hakkında herhangi bir yaklaşımda bulunulamamaktadır. Bu tür reaksiyon ürünlerinin fumonisine göre daha az toksik olduğu bilindiğinden, bu tür bir üretimin toksisitede azalma sağlayabilmek açısından uygun olduğu söylenebilir. Toksikite kritik bir öneme sahip olan primer amino grubunun bu reaksiyonla bloke olduğu ve böylece molekülün toksisitesinde azalma sağlanabildiği bildirilmektedir (Lu et al., 2002; Bullerman and Bianchini, 2007).

Castelo ve ark. (2001) mısırdan yapılan kek (muffin) ve ekstrüde ürünlerde şeker varlığının fumonisinler üzerine etkisini araştırmışlardır. Kekler içerisinde sadece glukoz içerenlerin FB₁ düzeylerinin önemli oranda azaldığını belirlemişlerdir. Ekstrüzyon işlemi sonucunda ise her koşulda önemli azalmalar olmuş, ancak glukoz kullanımı daha önemli azalmalar (%45-71) sağlamıştır. Glukoz konsantrasyonunun artırılması azalmayı artırmış ve ekstrüzyon koşulları optimize edildiğinde %92'ye varan bir FB₁ azalması sağlanabilmiştir. Fruktoz ve sakkaroz kullanıldığı durumda ise azalmalar sırasıyla %30-53 ve %19-39 düzeyinde gerçekleşmiştir. Çalışmamızda sakkaroz varlığında gözlenen fumonisin azalması, uygulanan üretim yöntemi çok farklı olmakla beraber, Castelo ve ark. (2001)'nin çalışmasındakine yakın görünmektedir. Ancak araştırmacılar çalışmamızdan farklı olarak toplam HFB₁ miktarını belirlemedi, sadece FB₁, doğal HFB₁ ve NCM-FB₁ analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Ürünlerde fumonisinlerin hidroliz ürünlerine (HFB₁) rastlamamışlar ve bu nedenle FB₁'deki azalmanın toksinin hidrolize olmasından değil, glukoz ile Maillard reaksiyonuna girmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu tezde de helvada bazik hidroliz yapılmadığı durumda LC-MS/MS kromatogramlarında HFB₁ ve HFB₂ pikine rastlanmamıştır. Bu da helva üretimi sırasında mısırdaki FB₁ ve FB₂'de herhangi bir hidroliz gerçekleşmediğini göstermektedir.

Howard ve ark. (1998) bir şekerin indirgenlik (Fehling çözeltisini indirgeyebilme) özelliği ve FB₁ ile reaksiyona girerek NCM-FB₁ oluşturabilme yeteneği arasındaki ilişkiyi detaylı olarak incelemiştir. FB₁ iki indirgen olmayan şekerle (sakkaroz ve sedoheptuloz) tampon çözeltide bir gece inkübe edildikten sonra toksinde azalma veya NCM-FB₁ oluşumu gözlenmemiştir. İndirgen şekerler (2-deoksi-D-riboz, maltoz, D-glukoz ve D-galaktoz) ise FB₁ ile farklı oranlarda reaksiyona girmiştir. FB₁, kuvvetli indirgen şekerler olan D-ribuloz, D-ksiluloz ve D-fruktoz ile inkübe edildiğinde ise %75'den fazla kayba uğramış, ancak oluşan NCM-FB₁ miktarı D-glukoz ve D-galaktoz ile oluşan miktarlardan daha az seviyede kalmıştır. Fruktozun FB₁ konsantrasyonunu azaltmada oldukça etkili olduğunu bildiren başka çalışmalar da bulunmaktadır (Lu et al., 1997). Sonuç olarak, şekerlerin NCM-FB₁ oluşturma yeteneğinin, karbonil karbonu üzerinden nükleofilik atağa uğrama eğilimlerine bağlı olduğu bildirilmiştir (Howard et al., 1998).

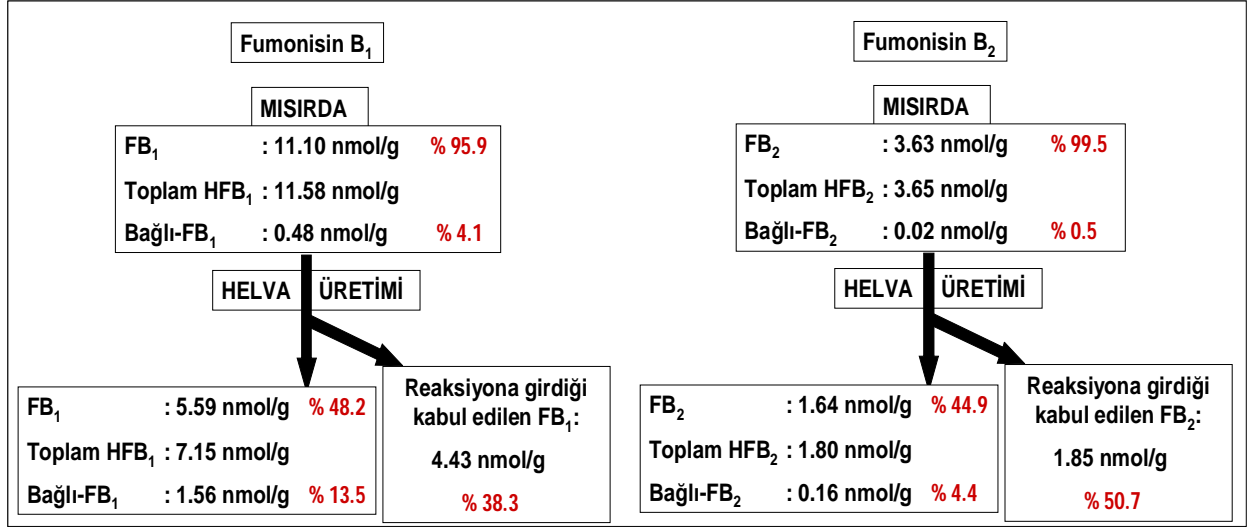
Mısırdan helva üretimi sırasında fumonisinlerdeki kayıplar %38 ve %51 olarak gerçekleşmiştir. Mısır ve helvadaki toplam HFB ile FB düzeyleri arasındaki farktan yola çıkılarak hesaplanan bağlı-FB düzeyleri ise Çizelge 4.17'de verilmiştir. Mısırdaki bağlı-FB₁ %4.1 ve bağlı-FB₂ %0.5 oranında iken, helvada bu oranlar yaklaşık %22 ve %9 olarak artış göstermiştir.

Çizelge 4.17. Mısır ve helvadaki bağlı-FB düzeyleri

	Bağlı-FB ₁		Bağlı-FB ₂	
	(Toplam HFB ₁ - FB ₁)		(Toplam HFB ₂ - FB ₂)	
	nmol/g	%	nmol/g	%
Mısır	0.48	4.1	0.02	0.5
Helva	1.56	21.8	0.16	8.9

Mısırın helvaya işlenmesi sırasında fumonisin B₁ ve B₂'nin serbest ve bağlı formları arasındaki dönüşümleri Şekil 4.19'da şematik olarak gösterilmektedir. Toplam HFB₁'in mısırdaki başlangıç düzeyi (11.58 nmol/g) helvadaki bağlı-FB₁ düzeyi (1.56 nmol/g) ile karşılaştırıldığında, helva üretiminde gerçek bağlanma oranı %13.5 olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, başlangıçta mısırdaki toplam fumonisin B₁'in yaklaşık %4'ü matrise bağlı, %96'sı serbest durumdayken, helva üretiminden sonra yaklaşık %14'ünün bağlandığı ve %48'inin üründe hâlâ serbest halde bulunduğu anlaşılmakta, %38'inin ise yukarıda açıklandığı gibi reaksiyona

girdiği kabul edilmektedir. Benzer şekilde, fumonisin FB₂ için de üründeki gerçek bağlanma %4.4 oranında olup, yaklaşık %51'inin reaksiyona girdiği kabul edildiğinde %45 oranında FB₂ de üründe hâlâ serbest haldedir.

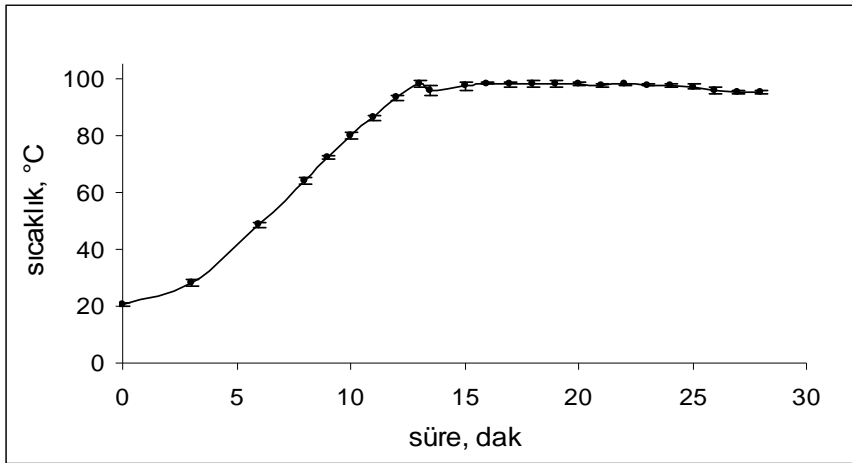


Şekil 4.19. Mısırın helvaya işlenmesi sonucu FB₁ ve FB₂'nin serbest ve bağlı formları arasındaki dönüşümleri ve reaksiyona girme oranlarının şematik gösterimi

Bu çalışmada elde edilen bağlı-FB yüzdelerindeki artışlar ürünün toksisitesi açısından önemli bir sonuçtur. Son üründe bağlı halde bulunan bu toksinler, ürün tüketildikten sonra sindirim sisteminde açığa çıkarak aynı toksisiteyi gösterebilmektedirler (Kim et al., 2003; Dall'Asta et al., 2010). Genelde mısır ürünlerinde ısıtma işlem uygulamalarının bağlı-FB miktarını artırdığı literatürde yer alan bazı araştırmalarda da doğrulanmaktadır (Humpf and Voss, 2004; Park et al., 2004). Bu bağlanmanın derecesi öncelikli olarak fumonisin konsantrasyonu, işlem sıcaklığı ve su oranından etkilenmektedir (Seefelder et al., 2003). Bulgularımıza göre hem mısırdaki hem de helva üretimi sırasında FB₁, FB₂'ye oranla matrisle daha fazla bağlanma göstermiş olup, bu durumun iki toksinin başlangıç konsantrasyonları arasındaki farktan kaynaklandığı düşünülebilir. FB₁ ve FB₂'den sadece R1 pozisyonunda bir hidroksil grubunun bulunmayışıyla farklılık gösteren FB₂'nin (Şekil 2.5) matrisle bağlanma afinitelerinin karşılaştırılmasıyla ilgili literatürde bir bulguya rastlanamamıştır.

4.6.2. Kuymak üretiminin etkisi

Kuymak üretimi sırasında pişirmenin değişik kademelerde yapılan sıcaklık ölçümlerinin sonuçları Şekil 4.20'de verilmektedir. Denemeler dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir denemede elde edilen sıcaklık profilleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Kuymak üretiminde, helva üretiminden farklı olarak pişirmenin başlangıcından itibaren sıcaklıklar kaydedilebilmiştir. İlk 13 dakika boyunca ortamda mısır unu bulunmamakta, süt kaynamaya başlayınca kadar sıcaklık yükselmektedir. Daha sonra mısır unu ve tuz ilavesiyle sıcaklıkta ufak bir düşüş olmakta ve takip eden 15 dakika boyunca ürün yaklaşık 98-99°C'de ısıya maruz kalmaktadır.



Şekil 4.20. Kuymak yapımı sırasında ölçülen ortalama sıcaklık değerleri

Fumonisin analiz yöntemlerinin kuymaktaki geri kazanım değerleri Çizelge 4.18'de verilmiştir. Sonuçlar, FB₂ için elde edilen RSD değeri haricinde EC 401/2006 nolu Yönetmeliğe uygun bulunmuştur (EC, 2006).

Çizelge 4.18. Kuymak için fumonisin analiz yöntemlerinin geri kazanımları (n=3)

FB ₁		FB ₂		Bazik HFB ₁		Bazik HFB ₂	
Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)	Toksin düzeyi (µg/kg)	Geri kazanım (%)
4210	84.6	1100	77.2	2216	96.1	582	81.3
	*RSD=15.25		*RSD=23.57		*RSD=7.58		*RSD=1.68

* RSD: relatif standart sapma (%RSD = (standart sapma / ortalama) x 100)

Kuymakta belirlenen FB ve toplam HFB düzeyleri ile mısıra göre üründe gerçekleşen azalma değerleri Çizelge 4.19 ve 4.20'de verilmektedir. Kuymakta FB₁ ve toplam HFB₁ miktarları birbirine çok yakın bulunmuştur. Bu sonuç üründe bağlı-FB₁ bulunmadığını düşündürmektedir. Unda %4.1 oranında varolan bağlı-FB₁'in de kuymak üretimi sırasında serbest hale geçtiği kabul edilebilir.

Çizelge 4.19. Mısır ve kuymakta FB₁ ve toplam HFB₁ düzeyleri (n=3)

	nmol/g ^a		FB ₁ 'e göre üründeki % azalma	Toplam HFB ₁ 'e göre üründeki % azalma
	FB ₁	Toplam HFB ₁		
Mısır	11.10 ± 0.388	11.58 ± 0.695		
Kuymak	12.87 ± 0.397	11.09 ± 0.655	-	4

^a Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

Çizelge 4.20. Mısır ve kuymakta FB₂ ve toplam HFB₂ düzeyleri (n=3)

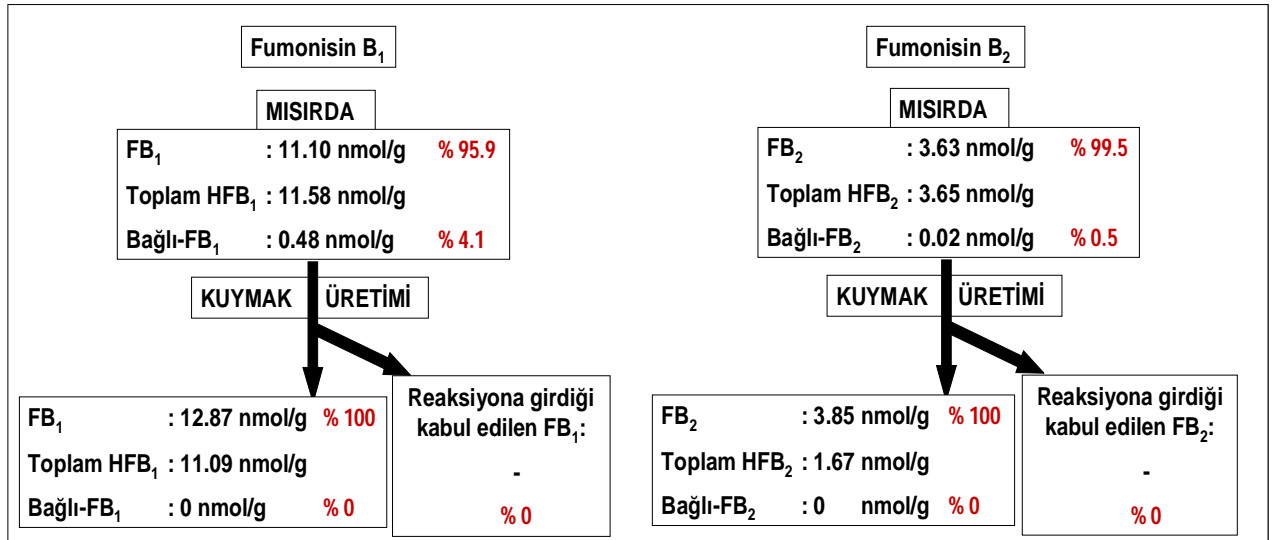
	nmol/g ^a		FB ₂ 'e göre üründeki % azalma	Toplam HFB ₂ 'e göre üründeki % azalma
	FB ₂	Toplam HFB ₂		
Mısır	3.63 ± 0.053	3.65 ± 0.199		
Kuymak	3.85 ± 0.366	1.67 ± 0.065	-	54

^a Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

Matriste hiç bağlı-FB₁ bulunmadığı durumda, uygulanan bazik hidroliz sonucu mevcut serbest FB₁'in hidrolize formuna dönüşmesi ve teorik olarak FB₁ ve toplam HFB₁ miktarlarının eşit çıkması beklenir. Kuymakta toplam HFB₁'in FB₁'den ve daha belirgin şekilde de toplam HFB₂'in FB₂'den düşük bulunması, bazik HFB tayini için kullanılan yöntemin bu ürüne uygun olmadığını düşündürmektedir. Literatürde, çok çeşitli ingrediyanları içeren mısır ürünlerinde geri kazanım çalışmalarında dışarıdan eklenen fumonisinlerin bile tayin edilmesinde büyük zorluklar yaşandığı bildirilmektedir. Bunun nedeni fumonisinlerin bu bileşenlerle kısa sürede etkileşime girebilmesidir. Üründe bulunabilecek sütün de böyle bir etkileşim sonucu yöntemin ekstraksiyon etkinliğini etkileyebileceği bildirilmektedir (De Girolamo et al., 2010). FB'lerin analizinde sitrat tamponu içeren çözücünün kullanımı ile yeterli ekstraksiyon etkinliğinin sağlanabildiği varsayılırsa, bazik HFB tayini için kullanılan yöntemle ortamdaki tüm hidrolize fumonisinlerin ekstrakte edilemediği düşünülebilir.

Fumonisinlerin, mısırın makromoleküler bileşenlerine ve özellikle de proteinlere (zein) TCA grupları üzerinden kovalent bağlarla bağlandığı bilinmektedir (Humpf and Voss, 2004). Çeşitli çalışmalar, ısıtma işlemi sırasında oluşan kovalent bağlanmaların yanı sıra, muhtemelen toksinlerin makromoleküller tarafından fiziksel olarak tutuklanmasına dayanan başka bir toksin maskeme mekanizması daha bulunduğunu bildirmektedir (Kim et al., 2003; Dall'Asta et al., 2009b). Bu mekanizmaya göre, toksinin nişasta ve zein gibi makromoleküllerin oluşturduğu supramoleküler yapıların içinde kompleks oluşturabileceği bildirilmektedir (Dall'Asta et al., 2009b). Kuymağın pişirilmesi sırasında denatürasyona uğrayan süt proteinlerinin (kazein miselleri) muhtemelen kovalent olmayan bir etkileşimle hidrolize fumonisinleri bağlaması / tutuklaması nedeniyle ekstraksiyonun zorlaşmış olabileceği ve düşük bir verimle gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Kovalent olmayan bu tür bir etkileşim durumunda, kullanılan yöntemler valide olsa bile, farklı analitik koşulların farklı analiz sonuçlarına yol açacağı bildirilmektedir (Dall'Asta et al., 2009b).

Kuymakta fumonisinlerin serbest ve bağlı formları arasındaki dönüşümleri Şekil 4.21'de de şematik olarak verilmektedir. Teorik olarak üründe toplam HFB miktarının FB miktarından düşük olamayacağı düşünüldüğünde, mısır ve kuymaktaki toplam HFB düzeyleri arasındaki görünür farklar (Çizelge 4.19 ve 4.20'deki %4 ve 54'lük azalmalar) anlamını yitirmektedir. Buna göre mısır ununun sütle pişirilmesi sırasında fumonisin düzeylerinde azalma olmadığı ve fumonisinlerin başka bileşiklere de dönüşmediği anlaşılmaktadır. Kuymak üretimi sırasında yağda kızartma / kavurma işlemi uygulanmamaktadır. Ürünün maruz kaldığı yaklaşık 100°C sıcaklıkta, indirgen bir şeker olan laktozun veya bunun olası hidroliz ürünleri olan glukoz ve galaktozun da fumonisinlerle reaksiyona girmediği anlaşılmaktadır. Ancak literatürde glukozun yanı sıra galaktozun da FB₁ ile iyi bir şekilde reaksiyona girebildiğine dair bulgular vardır (Howard et al., 1998). Bu nedenle, kuymakta serbest ve bağlı-FB'lerin daha doğru analizi için yöntemin modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, ekstraksiyon sırasında proteinlerin bağlanmış / tutuklanmış olabileceği fumonisinleri açığa çıkarabilmek amacıyla, protein fraksiyonunu çözüdürebilecek SDS gibi bir deterjan solusyonunun kullanımı denenebilir (Park et al., 2004).



Şekil 4.21. Mısırın kuymağa işlenmesi sonucu FB₁ ve FB₂'nin serbest ve bağlı formları arasındaki dönüşümlerinin şematik gösterimi

Literatürde kuymağa benzer özellikte ürünlerle yapılan çalışmalar araştırılmış ve tahılların (genelde yulaf) su veya sütle birlikte pişirilmesiyle hazırlanan bir çeşit lapa olan “porridge” ürünü ile ilgili birkaç çalışma bulunmuştur. Örneğin Hindistan’da gerçekleştirilen bir çalışmada, mısırdan üretilen üründe ihmal edilebilir düzeyde (%1.2) bir azalma olmuş, sorgumdan yapılan üründe ise %11.9 azalma saptanmıştır (Vasanthi and Bhat, 1998). Ancak bu ürünlerin suyla mı sütle mi hazırlandığı bilgisine ulaşılamamıştır. Diğer taraftan, Shephard ve ark. (2002) mısır ununu su ve tuzla pişirerek ürettikleri “porridge” ürünüde FB₁'de %23 oranında azalma saptamışlardır. Ancak bu çalışmalarda serbest ve bağlı fumonisinler ayrı ayrı çalışılmamış, sadece fumonisin azalması rapor edilmiştir. Özetle kuymak için elde edilen sonuçların karşılaştırılabileceği, benzer özellikte ürünler için yapılan bir çalışmaya rastlanamamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tahıllara uygulanan işlemlerin ve gıda işleme tekniklerinin mikotoksin düzeylerine etkisinin anlaşılması, hem insan beslenmesinde maruz kalınan miktarların tahmin edilebilmesi hem de bu miktarların minimize edilmesine yönelik önlemler alınabilmesi açısından önemlidir. Bu tez çalışması kapsamında, ısı işleme dayalı bazı gıda üretim tekniklerinin mısırdaki yaygın olarak bulunan *Fusarium* toksinleri üzerine etkisi, mısır kaynaklı bazı ürünler üzerinde çalışılmıştır. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar ve konu ile ilgili çözüm önerileri aşağıda özetlenmektedir;

- Çalışmanın başlangıcında, Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan mısır örnekleri üzerinde yürütülen araştırma, Türkiye'nin Karadeniz ve Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen mısırlarda *Fusarium* toksinlerinin varlığı hakkında kabaca da olsa fikir vermesi açısından önem taşımaktadır. İşlemlerin etkisini daha iyi gözlemleyebilmek için özellikle kontaminasyona maruz kaldığı tahmin edilen örnekler değerlendirmeye alınmıştır. İncelenen mısırlarda rastlanan başlıca *Fusarium* toksinleri DON, ZEA ve fumonisinler olmuş, özellikle de fumonisinlerin çok yüksek düzeyde ve sıklıkla saptandığı ortaya konulmuştur. Fumonisinlere analiz edilen örneklerin tümünde, ZEA ve DON'a ise örneklerin sırasıyla %79 ve %61'inde rastlanmıştır. Örneklerin %11'inde DON, %13'ünde ZEA ve %25'inde fumonisinler yasal limitlerin üzerinde bulunmuştur. T-2 ve HT-2 toksinler ise değerlendirilen örneklerin sadece %30'unda ve oldukça düşük seviyelerde saptanmıştır.

- Tahıllarda mikotoksin kontaminasyonunun önlenmesi genellikle mümkün olmadığından, ürünlerin gıda veya yem olarak tüketiminden önce mikotoksinlerin çeşitli yöntemler ile azaltılması zorunlu hale gelmiştir. Bu yöntemler içerisinde ısı işlemler ilk sıralarda yer almakla beraber mikotoksinlerin genellikle ısıya dayanıklı oldukları da bilinmektedir. Bu tez kapsamında, gıda matrisinden oluşturulmuş bir model sistemde toksin (ZEA ve DON) konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişimi ayrıntılı olarak irdelenmiştir. Kabuk benzeri model sistem ile çalışılmasının nedeni, ticari boyutlarda hazırlanan bir mısır ekmeğinde ısının toksin üzerindeki gerçek etkisini saptamanın zorluğudur. Hamur diskleri ile izotermal kabul edilebilecek ısıtma koşulları sağlanabilmiş ve toksinlerin termal bozunma kinetiği detaylı olarak incelenebilmiştir. Artan sıcaklıkla toksin

düzeylerindeki azalmanın arttığı ve bozunmanın bütün sıcaklıklarda birinci derece reaksiyon kinetiğine uygun olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın sonuçlarına göre, 100°C veya altındaki sıcaklık derecelerinde ısıtma işlemi DON ve ZEA düzeylerinde önemli bir fark yaratmamaktadır. Bu toksinlerde kayda değer azalmalar ancak 150°C'den itibaren meydana gelmektedir. Ayrıca, özellikle düşük sıcaklıklarda daha belirgin olmak üzere ZEA'nın DON'a göre ısıya daha dirençli olduğu belirlenmiştir.

Kinetik modelin deneysel olarak belirlenen gerçek azalmaları tahmin etmede kullanılabileceği ortaya konmuştur. Model sistemle elde edilen kinetik davranışlar, farklı sıcaklıklarda / koşullarda pişirilen mısır ekmeklerinde ve ısıtma işlemi uygulanan benzer ürünlerde toksin (ZEA ve DON) miktarındaki azalmanın ve ürünlerdeki son toksin düzeyinin tahminine imkân vermesi açısından oldukça önemlidir. Bu kinetik modelle, ekmek veya benzeri bir ürünün işlenmesi sırasında farklı bölgelerdeki sıcaklıkların izlenebilmesi durumunda o bölgelerdeki mikotoksin yıkımı hakkında deneysel bir çalışma yapılmaksızın tahminde bulunmak mümkün olabilir.

Toksinlerin farklı sıcaklıktaki bozunma hız sabitlerinin ve bu sabitlerin sıcaklıkla olan ilişkisinin bilinmesi, belli bir sıcaklıkta toksinin %50, %90 veya başka herhangi bir oranda azaltılabilmesi için uygulanması gereken ısıtma işlemi süresinin belirlenebilmesine imkân tanımaktadır. Örneğin, bulgularımıza göre 250°C'de DON ve ZEA'da %50 oranında bozunma sağlayabilmek için işlem süresinin sırasıyla 27 ve 32 dakika olması gerekmektedir. 150°C ve altındaki sıcaklıklarda işlem uygulanması, gerekli işlem süresinin çok uzun olması nedeniyle, gıda endüstrisi açısından pratik olmayacaktır. Alternatif olarak, toksinlerin belli bir sürede belli oranlarda dekompozisyonu için gerekli sıcaklıklar da bu kinetik modelden tahmin edilebilir. Isıtma işlemi süresinin kritik bir faktör olduğu ve belli bir aralıkta sınırlanması gerektiği uygulamalarda, belirlenen süre zarfında toksini tamamen veya belli oranda yıkıma uğratmak için gerekli sıcaklıklar toksinlerin Arrhenius eşitliklerinden hesaplanabilir. Mikotoksinlerin yıkımı için bu tür öngörülerde bulunulabilmesi gıda endüstrisi açısından önemlidir.

Bu tezde bozunma kinetiği ile ilgili araştırmalar ZEA ve DON üzerinde odaklanmıştır, ancak aynı prensibin ve kinetik modelin diğer toksinler için de uygulanabileceği açıktır. Böylece her bir toksin için ısıl stabilite ve uygun sıcaklık-süre koşulları tahmin edilebilir.

- Mısır ekmeğine uygulanan 250°C'de 1 saat 10 dakikalık pişirme işlemi sırasında, sıcaklığı en fazla 180°C'ye ulaşan kabuk kısmında ZEA %13.5 oranında ve 150°C'deki kabukta da DON %9.9 oranında azalmaya uğramıştır. En fazla 100°C sıcaklığa maruz kalan i kısımda ise önemli herhangi bir azalma gerçekleşmemiştir. Ekmeğin kabuk kısmında bile düşük seviyede azalmalar saptanması, ekmek yapımı sırasında etkin bir dekontaminasyon sağlanamadığını göstermektedir. Bu durumda, kontamine mısırlardan üretilen ekmeklerin sağlık açısından risk oluşturabileceği anlaşılmaktadır. Çalışmamızda ekmek üretimi, ticari ya da ev yapımı mısır ekmeklerine göre daha küçük ölçekte gerçekleştirilmiştir. Ekmek boyutlarının artması ekmek içinde ulaşılabilecek sıcaklıkları ve toksin yıkımını sınırlayıcı bir faktördür. Pişirme sırasında ısının ekmeğin içine iletimini kolaylaştırmak ve ekmek içi sıcaklığının yükselmesini sağlayarak i kısımdaki toksin yıkımını biraz da olsa artırabilmek için ekmek kalınlığının mümkün olduğunca düşük tutulması önerilebilir.

- Yüksek sıcaklık ve basıncın uygulandığı ekstrüzyon benzeri bir işlem olan tahıl genleştirme işleminin mikotoksinlerde (ZEA ve DON) nemli azalmalara yol açtığı saptanmıştır. 200-267°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilen denemelerde DON miktarında en fazla %31 oranında azalma saptanırken, ZEA'da en fazla %29 azalma gerçekleşmiştir. Ekmek yapımında olduğu gibi bu işlem sırasında da ZEA DON'a göre ısıya karşı daha stabil bir davranış sergilemiştir. Genleştirme işleminde sıcaklığa ek olarak basınç uygulamasının da toksinler üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Literatürde bu tür bir genleştirme işleminin toksinler üzerine etkisiyle ilgili veri bulunmamaktadır ve sonuçların ekstrüde ürünlerdeki toksin yıkımı çalışmalarıyla karşılaştırılması da uygun bulunmamıştır.

- Tez çalışmasının bir diğer amacı da, mısırın Karadeniz Bölgesi'ne özgü iki ürün olan helva ve kuymağa işlenmesi sırasında fumonisinlerin miktarında meydana gelen azalmaların belirlenmesidir. Bu kapsamda, fumonisinlerin tüm formlarını içine alacak şekilde (serbest, hidrolize ve bağlı) bir kütle denkliği yaklaşımı ile

değerlendirme yapılmıştır. İşleme sırasında matrise bağlanma veya matristen ayrılma derecelerini belirleyebilmek için mısır ve ürünlerinde fumonisin, doğal hidrolize fumonisin ve bazik hidrolize fumonisin analizleri gerçekleştirilmiş, toplam ve bağlı fumonisin miktarları hesaplanmıştır.

Mısırın sütle pişirildiği kuymak ürünüde fumonisinlerde hiçbir azalma gözlenememiş, matrise bağlanma da gerçekleşmemiştir. Aksine hammaddedeki tüm bağlı fumonisinler serbest formlarına dönüşmüştür. Ancak kuymakta elde edilen sonuçların yöntemle ilgili olarak doğruluğu tartışmaya açıktır. Bu nedenle kuymakta ve bu tür kompleks matrislerde, serbest ve bağlı fumonisinlerin belirlenmesine yönelik analiz yöntemlerinin modifiye edilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Helvaya işleme yaklaşık %50 düzeyinde bir görünür fumonisin (FB₁) azalması sağlamıştır. Bu azalma kısmen, fumonisinlerin TCA grupları üzerinden matrise bağlanmasından kaynaklanmakta, daha büyük oranda da fumonisinlerin amino grupları ile şeker veya yağ kaynaklı karbonil grupları arasında gerçekleşmiş olabilecek Maillard benzeri reaksiyonlara bağlanmaktadır. Mısırdaki başlangıç FB₁ içeriğinin %38'inin bu tür reaksiyonlarla yeni ürünlere dönüştüğü tahmin edilmektedir. Literatürde reaksiyon ürünlerinin daha az toksik olduğu belirtildiğinden, son üründe toksisitede azalma olacağı öngörülebilir.

Diğer taraftan, bağlı fumonisinler sindirim sisteminde hidrolize uğrayarak tekrar serbest hale geçebildiklerinden, işlem sırasında gerçekleşen bağlanma olayının toksisitede azalmaya neden olamayacağı açıktır. Helvada bağlı fumonisin miktarının arttığı göz ardı edilmemelidir.

Bu çalışmada helvada önemli oranda oluştuğu düşünülen Maillard benzeri reaksiyon ürünlerinin tanımlanması ve miktar tayini için ileri çalışmalar yapılması uygun olacaktır. Böylece fumonisinler için tahmin edilen reaksiyona girme yüzdesinin oluşan ürünler üzerinden de doğrulanması mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

- AACC International, 2000, Approved methods of the AACC American Association of Cereal Chemists, 10th Edition, St. Paul, MN., USA.
- Abbas, H. K., Mirocha, C. J., Pawlosky, R. J. and Pusch, D. J., 1985, Effects of cleaning, milling, and baking on deoxynivalenol in wheat, Applied and Environmental Microbiology. 50, 482-486.
- Abbas, H. K., Mirocha, C. J., Rosiles, R. and Carvajal, M., 1988, Decomposition of zearalenone and deoxynivalenol in the process of making tortillas from corn, Cereal Chemistry. 65(1), 15-19.
- Abramson, D., House, J. D. and Nyachoti, C. M., 2005, Reduction of deoxynivalenol in barley by treatment with aqueous sodium carbonate and heat, Mycopathologia. 160(4), 297-301.
- Accerbi, M., Rinaldi, V. E. A. and Ng, P. K. W., 1999, Utilization of highly deoxynivalenol-contaminated wheat via extrusion processing Journal of Food Protection. 62(12), 1485-1487.
- Açar, Ö. Ç. and Gökmen, V., 2009, Investigation of acrylamide formation on bakery products using a crust-like model, Mol Nutr Food Res. 53(12), 1521-1525.
- Alldrick, A. J. and Hajšelová, M., 2004, Zearalenone. Mycotoxins in Food - Detection and Control. Magan, N. and Olsen, M. (eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge. pp. 353-362.
- Arıcı, M., Gümüş, T. and Dağlıoğlu, O., 2002, Mısır ve mısır kaynaklı ürünlerde fumonisinler. Hububat 2002 - Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi. Bayram, M. and Bozkurt, H. (eds.), Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gaziantep. pp. 129-137.
- Bennett, G., Shotwell, O. and Hesseltine, C., 1980, Destruction of zearalenone in contaminated corn, Journal of the American Oil Chemists' Society. 57(8), 245-247.
- Bergamini, E., Catellani, D., Dall'asta, C., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R. and Suman, M., 2010, Fate of *Fusarium* mycotoxins in the cereal product supply chain: the deoxynivalenol (DON) case within industrial bread-making technology, Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 27(5), 677-687.
- Berthiller, F., Dall'asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., Adam, G. and Schuhmacher, R., 2009a, Occurrence of deoxynivalenol and its 3-beta-D-glucoside in wheat and maize, Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 26(4), 507-511.

- 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 spectrometry, *J Agric Food Chem.* 53, 3421-3425.
- Berthiller, F., Krska, R., Domig, K. J., Kneifel, W., Juge, N., Schuhmacher, R. and Adam, G., 2011, Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion, *Toxicol Lett.* 206(3), 264-267.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G. and Krska, R., 2009b, Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins, *Anal Bioanal Chem.* 395(5), 1243-52.
- Boyacioglu, D., Heitiarachchy, N. S. and D'appolonia, B. L., 1993, Additives affect deoxynivalenol (vomitoxin) flour during breadbaking, *Journal of Food Science.* 58(2), 416-418.
- Bretz, M., Beyer, M., Cramer, B., Knecht, A. and Humpf, H. U., 2006, Thermal degradation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol, *J Agric Food Chem.* 54(17), 6445-51.
- Bullerman, L. B. and Bianchini, A., 2007, Stability of mycotoxins during food processing, *Int J Food Microbiol.* 119(1-2), 140-146.
- Bullerman, L. B., Bianchini, A., Hanna, M. A., Jackson, L. S., Jablonski, J. and Ryu, D., 2008, Reduction of fumonisin B₁ in corn grits by single-screw extrusion *J Agric Food Chem.* 56, 2400-2405.
- Caridi, A., 2007, New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity, *Int J Food Microbiol.* 120(1-2), 167-172.
- Castells, M., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J., 2005, Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review, *Food Additives & Contaminants Part A.* 22(2), 150-157.
- Castelo, M. M., Jackson, L. S., Hanna, M. A., Reynolds, B. H. and Bullerman, L. B., 2001, Loss of fumonisin B₁ in extruded and baked corn-based foods with sugars, *Journal of Food Science.* 66(3), 416-421.
- Castelo, M. M., Katta, S. K., Sumner, S. S., Hanna, M. A. and Bullerman, L. B., 1998, Extrusion cooking reduces recoverability of fumonisin B₁ from extruded corn grits, *Journal of Food Science.* 63(4), 696-698.
- Cazzaniga, D., Basílico, J. C., González, R. J., Torres, R. L. and de Greef, D. M., 2001, Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour, *Letters in Applied Microbiology.* 33, 144-147.

- Cetin, Y. and Bullerman, L. B., 2005, Evaluation of reduced toxicity of zearalenone by extrusion processing as measured by the MTT cell proliferation assay, *J. Agric. Food Chem.* 53, 6558-6563.
- Cigić, I. K. and Prosen, H., 2009, An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins, *Int. J. Mol. Sci.* 10(1), 62-115.
- Creppy, E. E., 2002, Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicology letters.* 127(1-3), 19-28.
- Çetinkaya Açar, Ö., 2010, Bisküvi Benzeri Ürünlerde Pişirme Sırasında Termal Proses Kontaminantlarının Oluşumunun İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 140s.
- Dall'Asta, C., Falavigna, C., Galaverna, G., Dossena, A. and Marchelli, R., 2010, In vitro digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize, *J Agric Food Chem.* 58(22), 12042-12047.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Aureli, G., Dossena, A. and Marchelli, R., 2008, A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products, *World Mycotoxin Journal.* 1(3), 237-246.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Mangia, M., Sforza, S., Dossena, A. and Marchelli, R., 2009a, Free and bound fumonisins in gluten-free food products, *Mol Nutr Food Res.* 53(4), 492-499.
- Dall'Asta, C., Mangia, M., Berthiller, F., Molinelli, A., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Krska, R., Galaverna, G., Dossena, A. and Marchelli, R., 2009b, Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins, *Anal Bioanal Chem.* 395(5), 1335-1345.
- De Girolamo, A., Pereboom-de Fauw, D., Sizoo, E., van Egmond, H. P., Gambacorta, L., Bouten, K., Stroka, J., Visconti, A. and Solfrizzo, M., 2010, Determination of fumonisins B₁ and B₂ in maize-based baby food products by HPLC with fluorimetric detection after immunoaffinity column clean-up, *World Mycotoxin Journal.* 3(2), 135-146.
- De Girolamo, A., Solfrizzo, M. and Visconti, A., 2001, Effects of processing on fumonisin concentration in corn flakes, *Journal of Food Protection.* 64(5), 701-705.
- Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P. and Croubels, S., 2012, Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods, *J Chromatogr A.* 1257, 74-80.

- Dombrink-Kurtzman, M. A., Dvorak, T. J., Barron, M. E. and Rooney, L. W., 2000, Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas, *J Agric Food Chem.* 48, 5781-5786.
- Döll, S. and Dänicke, S., 2011, The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, *Prev Vet Med.* 102(2), 132-145.
- Dupuy, J., Le Bars, P., Boudra, H. and Le Bars, J., 1993, Thermostability of Fumonisin B₁, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn, *Applied and Environmental Microbiology.* 59, 2864-2867.
- EC (European Commission), 2007, Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products, *EC Official Journal of the European Union L 255.* 4p.
- EC (European Commission), 2006, Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, *EC Official Journal of the European Union L 70.* 22p.
- EC (European Commission), 2002, Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *EC Official Journal of the European Union, L 221.* 29p.
- Galaverna, G., 2010, Yazılı görüşme, Università Degli Studi di Parma, Dipartimento di Chimica Organica e Industriale - Viale G. P. Usberti, 17/A, 43100, Parma, İtalya, gianni.galaverna@unipr.it
- Gökmen, V., Morales, F. J., Ataç, B., Serpen, A. and Arribas-Lorenzo, G., 2009, Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods, *Journal of Food Composition and Analysis.* 22, 142-147.
- Greenhalgh, R., Gilbert, J., King, R. R., Blackwell, B. A., Startin, J. R. and Shepherd, M. J., 1984, Synthesis, characterization, and occurrence in bread and cereal products of an isomer of 4-deoxynivalenol (vomitoxin), *J. Agric. Food Chem.* 32(6), 1416-1420.
- Hazel, C. M. and Patel, S., 2004, Influence of processing on trichothecene levels, *Toxicol Lett.* 153(1), 51-59.
- He, J., Zhou, T., Young, J. C., Boland, G. J. and Scott, P. M., 2010, Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review, *Trends in Food Science & Technology.* 21(2), 67-76.

- Howard, P. C., Churchwell, M. I., Couch, L. H., Matilde Marques, M. and Doerge, D. R., 1998, Formation of N-(carboxymethyl)fumonisin B₁, following the reaction of fumonisin B₁ with reducing sugars, *J. Agric. Food Chem.* 46, 3546-3557.
- Humpf, H. U. and Voss, K. A., 2004, Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins, *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 255-269.
- Jackson, L. and Jablonski, J., 2004, Fumonisin. *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. Magan, N. and Olsen, M. (eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge. pp. 367-391.
- Jackson, L. S., Hlywka, J. J., Senthil, K. R., Bullerman, L. B. and Musser, S. M., 1996, Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B₁ in an aqueous model system, *J. Agric. Food Chem.* 44, 906-912.
- Jackson, L. S., Katta, S. K., Fingerhut, D. D., DeVries, J. W. and Bullerman, L. B., 1997, Effects of baking and frying on the fumonisin B₁ content of corn-based foods, *J. Agric. Food Chem.* 45, 4800-4805.
- Kabak, B., Dobson, A. D. W. and Var, I., 2006, Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 46, 593-619.
- Kim, E.-K., Scott, P. M. and Lau, B. P.-Y., 2003, Hidden fumonisin in corn flakes, *Food Addit Contam.* 20(2), 161-169.
- Kim, E.-K., Scott, P. M., Lau, B. P. Y. and Lewis, D. A., 2002, Extraction of fumonisins B₁ and B₂ from white rice flour and their stability in white rice flour, cornstarch, cornmeal, and glucose, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3614-3620.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. and Nehls, I., 2010, Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations, *Appl Microbiol Biotechnol.* 86(6), 1595-1612.
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. and Crews, C., 2008, Mycotoxin analysis: an update, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 25(2), 152-163.
- Krska, R., Welzig, E. and Boudra, H., 2007, Analysis of *Fusarium* toxins in feed, *Animal Feed Science and Technology.* 137(3-4), 241-264.
- Kuiper-Goodman, T., 2004, Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. Magan, N. and Olsen, M. (eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge. pp. 3-27.

- Kushiro, M., 2008, Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat, *Int J Mol Sci.* 9(11), 2127-2145.
- Lancova, K., Hajslova, J., Kostelanska, M., Kohoutkova, J., Nedelnik, J., Moravcova, H. and Vanova, M., 2008a, Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: milling and baking, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 25(5), 650-659.
- Lancova, K., Hajslova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostalek, P. and Sachambula, L., 2008b, Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 25(6), 732-44.
- Lattanzio, V. M. T., Pascale, M. and Visconti, A., 2009, Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals, *Trends in Analytical Chemistry.* 28(6), 758-768.
- Lattanzio, V. M. T., Solfrizzo, M., Powers, S. and Visconti, A., 2007, Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup, *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 21(20), 3253-3261.
- Lauren, D. R. and Smith, W. A., 2001, Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments, *Food Addit Contam.* 18(11), 1011-1016.
- Lemke, S. L., Ottinger, S. E., Ake, C. L., Mayura, K. and Phillips, T. D., 2001, Deamination of fumonisin B₁ and biological assessment of reaction product toxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 11-15.
- Li, Y., Wang, Z., Beier, R. C., Shen, J., De Smet, D., De Saeger, S. and Zhang, S., 2011, T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods, *J Agric Food Chem.* 59, 3441-3453.
- Lippolis, V., Pascale, M., Maragos, C. M. and Visconti, A., 2008, Improvement of detection sensitivity of T-2 and HT-2 toxins using different fluorescent labeling reagents by high-performance liquid chromatography, *Talanta.* 74(5), 1476-1483.
- Liu, Y., Walker, F., Hoeglinger, B. and Buchenauer, H., 2005, Solvolysis procedures for the determination of bound residues of the mycotoxin deoxynivalenol in *Fusarium* species infected grain of two winter wheat cultivars preinfected with barley yellow dwarf virus, *J Agric Food Chem.* 53, 6864-6869.
- Lu, Y., Clifford, L., Hauck, C. C., Hendrich, S., Osweiler, G. and Murphy, P. A., 2002, Characterization of fumonisin B₁-glucose reaction kinetics and products, *J Agric Food Chem.* 50, 4726-4733.

- Lu, Z., Dantzer, W. R., Hopmans, E. C., Prisk, V., Cunnick, J. E., Murphy, P. A. and Hendrich, S., 1997, Reaction with fructose detoxifies fumonisin B₁ while stimulating liver-associated natural killer cell activity in rats, *J. Agric. Food Chem.* 45, 803-809.
- MacDonald, S. J., Anderson, S. and Brereton, P., 2005a, Determination of zearalenone in barley, maize and wheat flour, polenta, and maize-based baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study, *Journal of AOAC International.* 88(6), 1733-1740.
- MacDonald, S. J., Chan, D. and Brereton, P., 2005b, Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study, *Journal of AOAC International.* 88(4), 1197-1204.
- Machinski, M. and Valente, L. M., 2000, Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products, *Food Addit Contam.* 17(10), 875-879.
- Magnoli, C. E., Saenz, M. A., Chiacchiera, S. M. and Dalcero, A. M., 1999, Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina, *Mycopathologia.* 145, 35-41.
- Matsuura, Y., Yoshizawa, T. and Morooka, N., 1981, Effect of food additives and heating on the decomposition of zearalenone in wheat flour, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 22, 293-298.
- Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F.-J. and Irene, N., 2012, Germination induces the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains, *Food Chemistry.* 131(1), 274-279.
- Meister, U., 2001, Investigations on the change of fumonisin content of maize during hydrothermal treatment of maize. Analysis by means of HPLC methods and ELISA, *Eur Food Res Technol.* 213, 187-193.
- Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A. and Visconti, A., 2005, Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters, *Toxicol Lett.* 159(3), 272-83.
- Monaci, L., De Angelis, E. and Visconti, A., 2011, Determination of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins in a bread model food by liquid chromatography-high resolution-Orbitrap-mass spectrometry equipped with a high-energy collision dissociation cell, *J Chromatogr A.* 1218(48), 8646-8654.
- Morgavi, D. P. and Riley, R. T., 2007, An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins, *Animal Feed Science and Technology.* 137(3-4), 201-212.

- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C. and Bryant, C. M., 2006, Food Mycotoxins: An Update, *Journal of Food Science*. 71(5), R51-R65.
- Neira, M. S., Pacin, A. M., Martínez, E. J., Moltó, G. and Resnik, S. L., 1997, The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination, *International Journal of Food Microbiology*. 37, 21-25.
- Ok, H. E., Kim, H. J., Cho, T. Y., Oh, K. S. and Chun, H. S., 2009, Determination of deoxynivalenol in cereal-based foods and estimation of dietary exposure, *J Toxicol Environ Health A*. 72(21-22), 1424-1430.
- Oruç, H. H., 2005, Mikotoksinler ve tanı yöntemleri, *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 24, 105-110.
- Pacin, A., Ciancio Bovier, E., Cano, G., Taglieri, D. and Hernandez Pezzani, C., 2010, Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate, *Food Control*. 21(4), 492-495.
- Park, J. W., Scott, P. M., Lau, B. P. Y. and Lewis, D. A., 2004, Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins, *Food Addit Contam.* 21(12), 1168-1178.
- Petersen, A. and Thorup, I., 2001, Preliminary evaluation of fumonisins by the Nordic countries and occurrence of fumonisins (FB₁ and FB₂) in corn-based foods on the Danish market, *Food Addit Contam.* 18(3), 221-226.
- Pronyk, C., Cenkowski, S. and Abramson, D., 2006, Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels, *Food Control*. 17(10), 789-796.
- Rosenkvist, H. and Hansen, A., 1995, Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production, *International Journal of Food Microbiology*. 26, 353-363.
- Ryu, D., Hanna, M. A., Eskridge, K. M. and Bullerman, L. B., 2003, Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system, *J. Agric. Food Chem.* 51, 1746-1748.
- Sağlam, M., 2008, Depolama Aşamasında Hububat ve Baklagil Kökenli Tanelerde Bulunan Küfler Üzerine Plazma Uygulamasının İnhibisyon Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 71s.
- Samar, M., Resnik, S. L., González, H. H. L., Pacin, A. M. and Castillo, M. D., 2007, Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers, *Food Control*. 18(10), 1295-1299.
- Samar, M. M., Neira, M. S., Resnik, S. L. and Pacin, A., 2001, Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology, *Food Addit Contam.* 18(11), 1004-1010.

- Sanchis, V. and Magan, N., 2004, Environmental conditions affecting mycotoxins. *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. Magan, N. and Olsen, M. (eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge. pp. 174-186.
- Sasanya, J. J., Hall, C. and Wolf-Hall, C., 2008, Analysis of deoxynivalenol, masked deoxynivalenol, and *Fusarium graminearum* pigment in wheat samples, using liquid chromatography-UV-mass spectrometry, *Journal of Food Protection*. 71(6), 1205-1213.
- Saunders, D. S., Meredith, F. I. and Voss, K. A., 2001, Control of fumonisin: Effects of processing, *Environmental Health Perspectives*. 109(2), 333-336.
- Schneweis, I., Meyer, K., Engelhardt, G. and Bauer, J., 2002, Occurrence of zearalenone-4-B-D-glucopyranoside in wheat, *J Agric Food Chem*. 50, 1736-1738.
- Scott, P. M., 2004, Other mycotoxins. *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. Magan, N. and Olsen, M. (eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge. pp. 406-427.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lau, P.-Y., Dexter, J. E. and Greenhalgh, R., 1983, Effects of experimental flour milling and breadbaking on retention of deoxynivalenol (vomitoxin) in hard red spring wheat, *Cereal Chemistry*. 60(6), 421-424.
- Seefelder, W., Hartl, M. and Humpf, H. U., 2001, Determination of N-(carboxymethyl)fumonisin B₁ in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry, *J Agric Food Chem*. 49, 2146-2151.
- Seefelder, W., Knecht, A. and Humpf, H. U., 2003, Bound fumonisin B₁: Analysis of fumonisin-B₁ glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *J Agric Food Chem*. 51, 5567-5573.
- Seitz, L. M., Eustace, W. D., Mohr, H. E., Shogren, M. D. and Yamazaki, W. T., 1986, Cleaning, milling, and baking tests with hard red winter wheat containing deoxynivalenol, *Cereal Chemistry*. 63(2), 146-150.
- Sewram, V., Shephard, G. S., Marasas, W. F. O. and De Castro, M. F. P. M., 2003, Improving extraction of fumonisin mycotoxins from Brazilian corn-based infant foods, *Journal of Food Protection*. 66, 854-859.
- Shephard, G. S., 1998, Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins-Review, *Journal of Chromatography A*. 815, 31-39.
- Shephard, G. S., Leggott, N. L., Stockenström, S., Somdyala, N. I. M. and Marasas, W. F. O., 2002, Preparation of South African maize porridge: effect on fumonisin mycotoxin levels, *South African Journal of Science*. 98, 393-396.

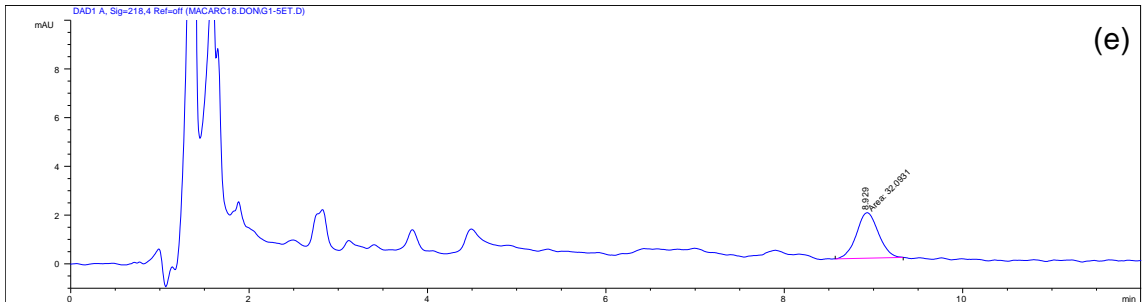
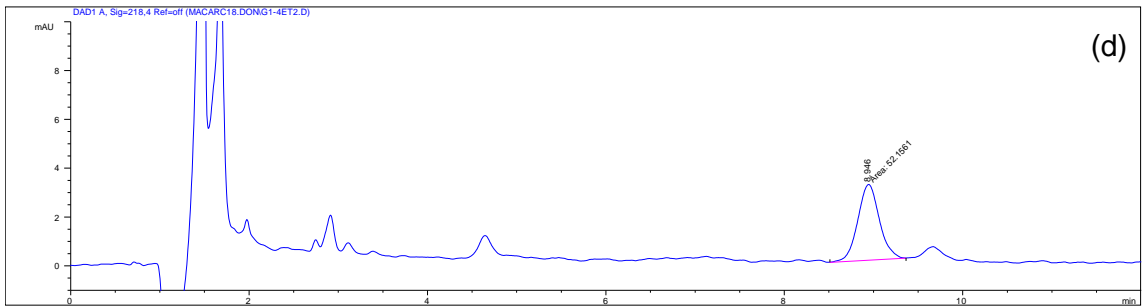
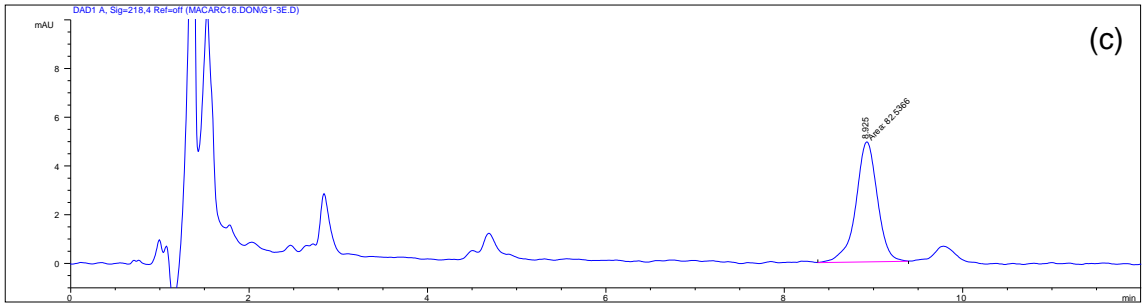
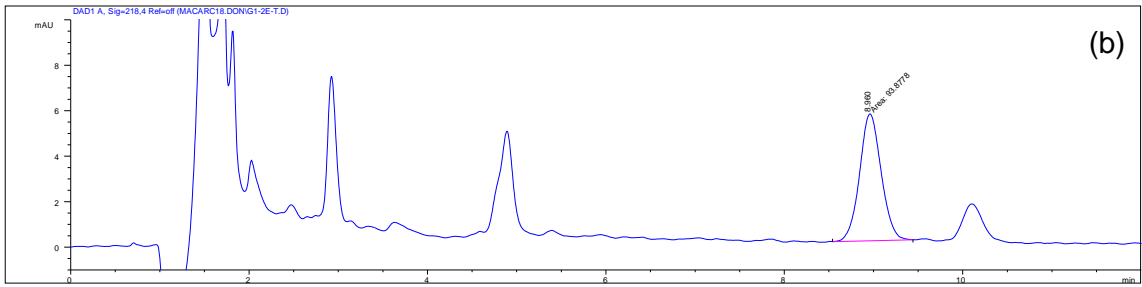
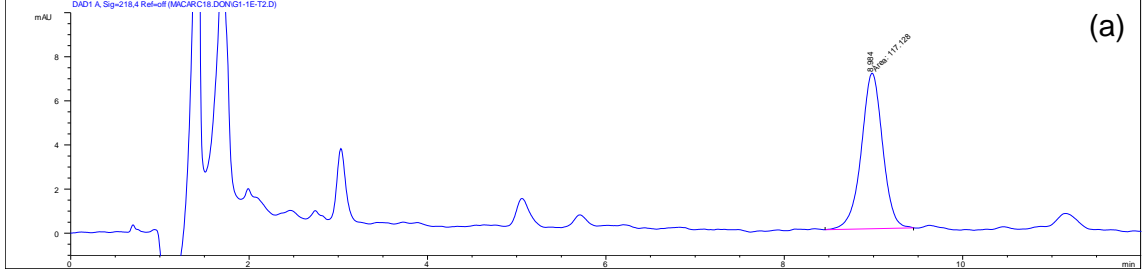
- Solfrizzo, M., Alldrick, A. J. and van Egmond, H. P., 2009, The use of mycotoxin methodology in practice: a need for harmonization, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 1, 121-132.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A. and Visconti, A., 2001, Determination of fumonisins B₁ and B₂ in cornflakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity clean-up, *Food Addit Contam*. 18(3), 227-235.
- Sørensen, L. K. and Elbæk, T. H., 2005, Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 820(2), 183-196.
- Soriano, J. M. and Dragacci, S., 2004, Occurrence of fumonisins in foods, *Food Research International*. 37(10), 985-1000.
- Spanjer, M. C., Rensen, P. M. and Scholten, J. M., 2008, LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 25(4), 472-489.
- Stroka, J., Derbyshire, M., Mischke, C., Ambrosio, M., Kroeger, K., Arranz, I., Sizoo, E. and Van Egmond, H. P., 2006, Liquid chromatographic determination of deoxynivalenol in baby food and animal feed: Interlaboratory study, *Journal of AOAC International*. 89(4), 1012-1020.
- Sudakin, D., 2003, Trichothecenes in the environment: relevance to human health, *Toxicology Letters*. 143(2), 97-107.
- Sugita-Konishi, Y., Park, B. J., Kobayashi-Hattori, K., Tanaka, T., Chonan, T., Yoshikawa, K. and Kumagai, S., 2006, Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70(7), 1764-1768.
- 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 Commun Mass Spectrom*. 20(18), 2649-2659.
- Sweeney, M. J. and Dobson, A. D. W., 1998, Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *Int J Food Microbiol*. 43, 141-158.
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Matsuki, Y. and Y., U., 1986, Residues of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in wheat and processed food after milling and baking, *Journal of the Food Hygienics Society of Japan*. 27, 653-655.
- Tran, S. T. and Smith, T. K., 2011, Determination of optimal conditions for hydrolysis of conjugated deoxynivalenol in corn and wheat with trifluoromethanesulfonic acid, *Animal Feed Science and Technology*. 163(2-4), 84-92.

- Turner, N. W., Subrahmanyam, S. and Piletsky, S. A., 2009, Analytical methods for determination of mycotoxins: a review, *Anal Chim Acta.* 632(2), 168-180.
- Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M., Medina, A., Mateo, F., Gimeno-Adelantado, J. V. and Jimenez, M., 2009, Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 26(6), 896-906.
- Vasanthi, S. and Bhat, R. V., 1998, Mycotoxins in foods - Occurrence, health and economic significance and food control measures, *Indian J Med Res.* 108, 212-224.
- Visconti, A., Haidukowski, E. M., Pascale, M. and Silvestri, M., 2004, Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking, *Toxicol Lett.* 153(1), 181-189.
- Visconti, A., Lattanzio, V. M. T., Pascale, M. and Haidukowski, M., 2005, Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A.* 1075(1-2), 151-158.
- Voss, K. A. and Snook, M. E., 2010, Stability of the mycotoxin deoxynivalenol (DON) during the production of flour-based foods and wheat flake cereal, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 27(12), 1694-1700.
- WHO (World Health Organization), 2011a, Evaluation of Certain Contaminants in Food - Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No. 959, India. 105p.
- WHO (World Health Organization), 2011b, Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants - Seventy-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No. 966, Malta. 136p.
- WHO (World Health Organization), 2000, Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants - Fifty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No. 896, Singapore. 128p.
- Wolf-Hall, C. E., Hanna, M. A. and Bullerman, L. B., 1999, Stability of deoxynivalenol in heat treated foods, *Journal of Food Protection.* 62, 962-964.
- Wolf, C. E. and Bullerman, L. B., 1998, Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment, *Journal of Food Protection.* 61(3), 365-367.
- Yagen, B. and Bialer, M., 1993, Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes, *Drug Metabolism Reviews.* 25(3), 281-323.

- Yazar, S. and Omurtag, G. Z., 2008, Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals, *Int J Mol Sci.* 9(11), 2062-2090.
- Young, J. C., Fulcher, R. G., Hayhoe, J. H., Scott, P. M. and Dexter, J. E., 1984, Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats, *J. Agric. Food Chem.* 32, 659-664.
- Yumbe-Guevara, B. E., Imoto, T. and Yoshizawa, T., 2003, Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat, *Food Addit Contam.* 20(12), 1132-40.
- Zhang, Q., Saleh, A. S. M., Chen, J. and Shen, Q., 2012, Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review, *Chem Phys Lipids.* 165(6), 662-681.
- Zhou, B., Li, Y., Gillespie, J., He, G. Q., Horsley, R. and Schwarz, P., 2007, Doehlert matrix design for optimization of the determination of bound deoxynivalenol in barley grain with trifluoroacetic acid (TFA), *J Agric Food Chem.* 55(25), 10141-10149.

EKLER

Ek 1. En yüksek düzeyde DON içeren mısır unu için ekstraksiyonun (a) 1. (b) 2. (c) 3. (d) 4. ve (e) 5. basamağında sonra elde edilen kromatogramlar



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eren NUMANOĞLU

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1981

Adres : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü 06800
Beytepe Ankara

Tel : 0 312 297 71 00

E-posta : **enuman@hacettepe.edu.tr**

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise 1996-1999 Gazi Anadolu Lisesi

Lisans 1999-2003 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans 2003-2006 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi:

2005-2012 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü - Araştırma Görevlisi

TEZ KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR

Numanoglu, E., Uygun U., Koksel, H., Solfrizzo, M. 2010. Stability of *Fusarium* toxins during traditional Turkish maize bread production, **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, 2(2), 84-92.

Numanoglu, E., Uygun, U., Gökmen, V., Köksel, H., 2011. Multiple-stage extraction strategy for the determination of deoxynivalenol in maize, **Food Additives and Contaminants: Part A**, 28(1), 80-85

Numanoglu, E., Gökmen, V., Uygun, U., Köksel, H., 2012. Thermal degradation of deoxynivalenol during maize bread baking, **Food Additives and Contaminants: Part A**, 29(3), 423-430

Numanoglu, E., Yener, S., Gökmen, V., Uygun, U., Köksel, H., 2012. Modelling thermal degradation of zearalenone in maize bread during baking, **Food Additives and Contaminants: Part A**, DOI: 10.1080/19440049.2012.751629