



T.C.  
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ANALİTİK KALİBRASYON STANDARDI OLARAK KULLANILMASI  
AMACIYLA PATULİN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MURAT DAĞ**

**TEMMUZ 2020  
GÜMÜŞHANE**



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

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANALİTİK KALİBRASYON STANDARDI OLARAK KULLANILMASI  
AMACIYLA PATULİN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Murat DAĞ**

**Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
“Biyoteknoloji Anabilim Dalı”  
Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04.06.2020  
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 08.07.2020**

**TEMMUZ 2020**

Bu alışma GÜBAP projesi kapsamında desteklenmiştir. Proje no:19.F5115.07.01 .

## TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda tez yazımına ait kurallara uygun olarak hazırladığım "**Analitik Kalibrasyon Standardı Olarak Kullanılması Amacıyla Patulin Üretimi**" isimli yüksek lisans tezi çalışmasında; söz konusu tüm bilgi ve belgeleri genel akademik kurallara göre elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

12/06/2020



Murat DAĞ

**ÖZET**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANALİTİK KALİBRASYON STANDARDI OLARAK KULLANILMASI**  
**AMACIYLA PATULİN ÜRETİMİ**

Murat DAĞ

Gümüşhane Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cemalettin BALTACI

2020, 68 sayfa

Mikotoksinler; tarlada, depolama esnasında ya da daha sonraki ısı ve nem açısından uygun koşullar altındaki gıda zincirinde yer alan *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* vb cinslerin bazı türleri tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Gıda ve yemlerin mikotoksinler ile bulaşması insan ve hayvan sağlığı açısından çok önemli bir risk oluşturmaktadır. Mikotoksinler ile bulaşmış gıda ve yemlerin tüketilmesinden sonra insan ve hayvanlar için akut ya da kronik zehirlenme ve vücutta bazı hasarların oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu zararlara ilaveten mikotoksinler üretim yapılan ülkelerde çok büyük ekonomik kayıpların meydana gelmesine neden olmaktadır. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde Aflatoksinler (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>), Okratoksin A, Zearalenon, Fumonisinler

(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>), Patulin, Deoksinivalenol olmak üzere toplam 11 adet Mikotoksin metaboliti için maksimum residu limitleri (MRL) verilmiştir.

Bu mikotoksinlerden olan patulinin, çürümüş elmaların işlenmesiyle üretilen elma sularındaki patulin derişimi çok yüksek sevide olabilmektedir. Patulin genellikle *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssochlamys* cinsindeki bir dizi küf türü tarafından üretilen ikincil bir metabolittir. Patulin birçok küflü meyve, sebze, tahıl ve diğer gıdalarda bir kirletici olarak tespit edilmiştir. Başlıca bulaşma kaynakları elma ve elma ürünleridir. İthalat, ihracat ve piyasa denetimi esnasında yönetmelikte belirtilen ürünlerde patulin analizinin yapılma zorunluluğu vardır. Patulinin çeşitli analiz metotları kullanılmak suretiyle analizi yapılmaktadır. Diğer mikotoksinler gibi patulin için yapılacak miktar tayini analizlerinde analitik kalibrasyon standartlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tezde, patulinin analitik kalibrasyon standardı üretimi için çalışmalar yapılmıştır.

Yapılan bu çalışmada doğal olarak çürütülmüş elmalarda oluşan küf türleri ilk olarak renklerine göre izole edilmeye çalışıldı ve bu renklere göre kodlandı. Renklerine göre izole edilen bu küf türleri daha sonra MALDİ-TOF/MS yöntemi kullanılarak teşhis edildi. Bu analiz sonucunda kodlanan küflerin, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* oldukları tespit edildi. Bu küf türlerinden, *P. chrysogenum*, kırmızı elmalarda 13.48 mg/kg, sarı elmalarda 45.91 mg/kg ve yeşil elmalarda 25.07 mg/kg patulin üretti. *P. expansum* kırmızı elmalarda 24,47 mg/kg, sarı elmalarda 49.80 mg/kg ve yeşil elmalarda 28.22 mg/kg patulin üretti. Küf türleri içersinde en fazla patulin üretimini *P. expansum* yaptı. *P. digitatum*, kırmızı elmalarda 8.36 mg/kg, sarı elmalarda 10.83 mg/kg ve yeşil elmalarda 9.48 mg/kg patulin üretti. Küf türleri içersinde en az patulin üretimini *P. digitatum* yapmıştır. *P. italicum*, kırmızı elmalarda 4.68 mg/kg, sarı elmalarda 22.40 mg/kg ve yeşil elmalarda 8.50 mg/kg patulin üretti. Literatürde *P. italicum*' un patulin üretimi ile ilgi bir çalışmaya rastlanmadı. Farklı elma türlerine göre (kırmızı, sarı, yeşil) patulin üretme kapasitesine bakıldığında genel olarak sıralama sarı > yeşil > kırmızı şeklinde olduğu görüldü. Fakat bazı durumlarda yeşil elmalarda patulin miktarının fazla olduğu görüldü. Genel olarak kırmızı elmalarda patulin miktarının düşük olduğu, sarı ve yeşil olanlarda daha yüksek olduğu görüldü. Çalışılan elma türleri, Gümüşhane ve Erzincan yerel elma türleridir. Bu elmalardan küfler izole edilerek türleri tespit edilen bu küflerin ürettikleri patulinin çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak analizi yapıldı. Üretimi yapılan patulinin HPLC ile kontrolü yapıldığında saflığı  $\geq 98.0$  % olarak tespit edildi.

Yapılan bu tez çalışmasında izlenen yöntem ile analitik kalibrasyon standardı kullanılabilinecek saflıkta patulin üretimi gerçekleştirildi.

**Anahtar Kelimeler:** Analitik standart, Mikotoksin, Patulin, *Penicillium chrysogenum*,  
*Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*





**ABSTRACT**  
**MS THESIS**

**PATULIN PRODUCTION TO USE AS AN ANALYTICAL CALIBRATION  
STANDARD**

Murat DAĞ

Gümüşhane University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Cemalettin BALTACI

2020, 68 pages

Mycotoxins; They are secondary metabolites produced by some species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, etc. in the food chain, which are in the field, during storage, or later under favorable conditions for heat and humidity. Contamination of food and feed with mycotoxins poses a very important risk for human and animal health. After consuming food and feeds contaminated with mycotoxins, it may cause acute or chronic poisoning and some damage to the body for humans and animals. In addition to these losses, mycotoxins cause huge economic losses in the countries of production. In the Turkish Food Codex Contaminants Regulation, maximum residual limits (MRL) are given for a total of 11 Mycotoxin metabolites including Aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>), Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonicins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>), Patulin, Deoxynvalenol.

Patulin concentration from these mycotoxins can be very high in the apple juice produced by processing rotten apples. Patulin is a secondary metabolite usually produced by a number of mold species in the genus *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssoschlamys*. Patulin has been identified as a contaminant in many moldy fruits, vegetables, grains and other foods. The main sources of contamination are apples and apple products. Patulin analysis is mandatory for products specified in the regulation during import, export and market control. Patuline is analyzed by using various analysis methods. Analytical calibration standards are needed in the assay analysis for patulin like other mycotoxins. In this thesis, studies were carried out for the production of the analytical calibration standard of patulin.

In this study, the types of mold formed in naturally rotten apples were first tried to be isolated according to their color and coded according to these colors. These mold types, which were isolated according to their color, were subsequently diagnosed using the MALDI-TOF / MS method. As a result of this analysis, the coded molds were determined to be *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*. Of these mold species, *P. chrysogenum* produced 13.48 mg / kg in red apples, 45.91 mg / kg in yellow apples and 25.07 mg / kg in green apples. *P. expansum* produced 24.47 mg / kg of red apples, 49.80 mg / kg of yellow apples, and 28.22 mg / kg of patulin in green apples. *P. expansum* produced the most patulin production among mold species. *P. digitatum* produced 8.36 mg / kg in red apples, 10.83 mg / kg in yellow apples and 9.48 mg / kg patulin in green apples. *P. digitatum* produced the least amount of patulin in mold species. *P. italicum* produced 4.68 mg / kg in red apples, 22.40 mg / kg in yellow apples and 8.50 mg / kg in green apples. There is no study related to the production of patulin of *P. italicum* in the literature. Considering the capacity of producing patulin according to different apple types (red, yellow, green), it was seen that the ranking was generally yellow > green > red. However, in some cases, the amount of patulin was observed in green apples. It was seen that the amount of patulin was low in red apples and higher in yellow and green ones. The apple types studied are local apple types in Gümüşhane and Erzincan. The molds of these molds, which were identified by isolating molds from these apples, were analyzed using various chromatographic methods. When the produced patulin was checked by HPLC, its purity was determined as 98.0%. The produced patulin was obtained purely using the method I used in my thesis and produced as an analytical standard.

**Keywords:** Analytical standard, Mycotoxin, Patulin, *Penicillium chrysogenum*,  
*Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*



## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

İlk olarak tez çalışmam sırasında her zaman kıymetli bilgi, birikim ve tecrübesiyle benden desteğini esirgemeyen ve değerli yorumları ile tezimi şekillendirmemde yardımcı olan Sayın Hocam Doç. Dr. Cemalettin BALTACI'ya tezime katkılarından dolayı teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tüm eğitim ve öğrenim yaşamım süresince büyük bir sabırla bana destek olan, gücünü ve imkânlarını hiçbir zaman esirgemeyen tüm ailem ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Murat DAĞ  
Gümüşhane, 2020

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	VII
TEŞEKKÜR .....	X
İÇİNDEKİLER.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XIV
TABLolar DİZİNİ.....	XV
SEMBOLLER ve KISALTMALAR .....	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Mikotoksinlerin Oluşumu ve Bunu Etkileyen Faktörler .....	3
1.2.1. Patulin.....	4
1.2.2. Aflatoksinler .....	5
1.2.3. Okratoksin A ( OTA ).....	8
1.2.4. Deoksinivalenol ( DON ).....	10
1.2.5. Zearalenon .....	11
1.2.6. Fumonisinler.....	12
1.3. MALDI-TOF-MS İle Küf Teşhis Yöntemi .....	13
1.4. Kimyasal Standart ve Referans Materyaller .....	14
1.5. Doğal Maddelerin Ekstraksiyonu .....	17
1.5.1. Katı Faz Ekstraksiyonu.....	17
1.5.2. Dispersif Katı Faz Ekstraksiyonu .....	17
1.5.3. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu .....	18
1.5.4. Katı Faz Mikroekstraksiyon .....	18
1.5.5. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu .....	18
1.5.6. Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu.....	19

1.5.7.	Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu .....	19
1.6.	Kromatografi .....	19
1.6.1.	Gaz Kromatografisi (GC) .....	20
1.6.2.	Sıvı Kromatografisi (LC) .....	20
1.6.3.	Sıvı-Katı Kromatografisi (LSC) .....	22
1.6.4.	İyon Değişimi Kromatografisi (IEC) ve İyon Kromatografisi (IC) .....	22
1.6.5.	İnce Tabaka Kromatografisi ( TLC).....	23
1.6.6.	Kütle Spektroskopisi (MS) .....	23
1.6.7.	Kolon Kromatografisi.....	24
1.7.	Önceki Çalışmalar .....	24
1.8.	Çalışmanın Amacı .....	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar .....	28
2.1.1.	Cihazlar.....	28
2.1.2.	Kimyasallar ve Besi Yerleri .....	29
2.2.	Elma Örneklerinin Toplama Çalışmaları.....	29
2.3.	İzolasyonu Yapılacak Olan Küf Türlerinin Belirlenmesi.....	30
2.4.	Besi Yerlerinin Hazırlanması .....	31
2.5.	Çürümüş Elmalardan Küflerin İzolasyon Çalışmaları .....	31
2.6.	İzole Edilen Küflerin Teşhis Çalışması.....	34
2.7.	İzole Edilen Küflerin Sağlam Elmalara Aşılması.....	36
2.8.	Aşılana Elmaların Farklı Küf Türlerine Göre Patulin Miktarlarının Analizlerinin Yapılması.....	37
2.8.1.	Reaktifler .....	38
2.8.2.	Test Çözeltisinin Hazırlanması.....	38
2.8.3.	HPLC-UV Tayini .....	39
2.8.4.	Hesaplamalar .....	40

2.9.	Küf Türlerinin Patulin Kapasitelerinin İncelenmesi.....	41
2.10.	Patulin Ekstraksiyonu .....	41
2.11.	Basınçlı Kolon Kromatografisi İle Patulin Saflaştırma Çalışmaları .....	41
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
3.1	Genel.....	45
3.2.	Küflerin Tanılama Sonuçlarının Değerlendirmesi .....	45
3.3	Altmış Günlük Üreme Sonunda Elde Edilen Patulin Miktarları .....	48
3.4.	Üretimi Yapılan Patulin Standartına Ait Değerlendirmeler .....	50
3.5.	Üretimi Yapılan Patulin Standartından 100 µg/mL Asetonitril İçinde Hazırlanması.....	51
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER .....	53
5.	KAYNAKLAR.....	57
6.	EKLER: .....	70
	ÖZGEÇMİŞ.....	115

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Patulinin kimyasal yapısı .....	5
Şekil 1.2.	Önemli okratoksinlerin kimyasal yapısı (Duarte vd., 2011). .....	9
Şekil 1.3.	DON'un kimyasal yapısı ( Wang, vd., 2019 ).....	10
Şekil 1.4.	Zearalenon'un kimyasal yapısı ( Rogowska vd., 2019 ) .....	11
Şekil 1.5.	Fumonisin'nin kimyasal yapısı (Voss vd., 2007).....	13
Şekil 2.1.	Toplanan çürümüş elmalar .....	30
Şekil 2.2.	Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki küfler .....	31
Şekil 2.3.	Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki küfler .....	32
Şekil 2.4.	Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki yatık agardaki küfler .....	32
Şekil 2.5.	Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki agardaki küflerden görünüşler .....	33
Şekil 2.6.	Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki agardaki küfler .....	34
Şekil 2.7.	MALDİ-TOF/MS analizi şeması (Clark vd., 2013).....	35
Şekil 2.8.	Küflerle aşılanan elmaların 60 günlük gelişim durumları.....	37
Şekil 2.9.	Kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 2.10.	Kolon Kromatografisi.....	42
Şekil 2.11.	Kolon Kromatografisi ekstraktın yüklenmesi .....	42
Şekil 2.12.	Kolon kromatografisi uygulaması sonucu elde edilen ekstraktlar .....	43
Şekil 2.13.	Kolon kromatografisi uygulaması sonucu elde edilen ekstraktlar .....	44
Şekil 3.1.	Etilasetat ile yapılan ekstraksiyon sonucu organik fazda bulunan maddeler..	50
Şekil 3.2.	Kolon kromatografisi uygulaması sonucu birleştirilen 19 - 24 nolu ekstraktlar .....	51



## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1.1. Patulinin kimyasal formülü ve fiziksel özellikleri .....	5
Tablo 1.2. Patulinin neden olduğu sağlık riskleri ve bu risklerle ilgili çalışmalar .....	7
Tablo 3.1. Sonuçlara genel bakış.....	46
Tablo 3.2. Puan değerlerinin anlamı.....	47
Tablo 3.3. İzole edilen küf türlerinin MALDI-TOF/MS analiz sonuçları.....	48
Tablo 3.4. İzole edilen küf türlerinin altmış günlük analiz sonuçları.....	49
Tablo 3.5 . Üretime yapılan patulinin sertifika analizi .....	52

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

AFB <sub>1</sub>	: Aflatoksin B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	: Aflatoksin B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	: Aflatoksin G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	: Aflatoksin G <sub>2</sub>
AFM <sub>1</sub>	: Aflatoksin M <sub>1</sub>
AFM <sub>2</sub>	: Aflatoksin M <sub>2</sub>
AK	: Avrupa Komisyonu
a <sub>w</sub>	: Su aktivitesi
BİSAK	: Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi
COST	: Bilim ve Teknolojide Avrupa İşbirliği
CRM	: Sertifikalı Referans Materyal
DLLME	: Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikro Ekstraksiyonu
DON	: Deoksinivalenol
dSPME	: Dağıtıcı Katı Faz Ekstraksiyonu
ECD	: Elektrokimyasal Dedektör (electrochemical detector)
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FB <sub>1</sub>	: Fumunosin B <sub>1</sub>
FB <sub>2</sub>	: Fumunosin B <sub>2</sub>
FB <sub>3</sub>	: Fumunosin B <sub>3</sub>
FB <sub>4</sub>	: Fumunosin B <sub>4</sub>
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (
GC	: Gaz Kromatografisi (gas chromatography)
GLC	: Gaz-Sıvı kromatografisi (Gas- Liquid Chromatography)
GSC	: Gaz-Katı Kromatografisi (Gas-Solid Chromatography)
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	: Uluslar Arası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC	: İyon Kromatografisi ( Ion Chromatography )
IEC	: İyon Değişimi Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography)
ISO	: Uluslararası Standartlar Teşkilatı
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
JRC	: Avrupa Ortak Araştırma Merkezi (Joint Research Centre )
LC	: Sıvı Kromatografisi (Liquid Chromatography)
LLE	: Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (liquid liquid extraction)
LPME	: Sıvı Fazlı Mikro Ekstraksiyon (Luquid Phase Microextraction)
LSC	: Sıvı-Katı Kromatografisi ( Liquid- Solid chromatography)
MOLDI-TOF	: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu - Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi
MP	: Hareketli Faz ( Mobile Phase)
MRC	: Tıbbi Araştırma Konseyi (Medical Research Council)
MRL	: Maksimum Residu Limitleri
MS	: Kütle Spektrometresi ( Mass Spectrometry)

MSPME	: Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (Magnetic Solid Phase Microextraction)
OTA	: Otratoksin A
OTB	: Otratoksin B
OTC	: Otratoksin C
PDA	: Fotodiyot Dizisi (Photodiode Array)
RI	: Kırılma İndisi
RM	: Referans Materyal
SP	: Sabit Faz (stable Phase )
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
SPME	: Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (Solid Phase Microextraction)
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography )
TUBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UHPLC	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV-VIS	: Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometrisi
ZAE	: Zearalenon

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Tarım ürünleri ve gıdalar, içerisinde birçok mikroorganizmayı doğal olarak ihtiva eder ya da çevresel etmenlerden dolayı bu mikroorganizmalar tarafından kontamine olurlar. Bu mikroorganizmalardan bazıları (özellikle küf oluşturanlar ) ürünlerde hastalık yapıcı etkiler meydana getirebileceklerinden büyük önem arz ederler (Çelik, 2008). Küfler, yüzey üzerinde ve bitki, gıda, kuru yaprak veya hayvan kaynaklı hemen hemen tüm maddelerin içinde büyüyen uzun filamentlerden oluşan mikroskobik olarak küçük bitki benzeri organizmalardır (Nwakanma ve Unachukwu, 2017). Bu mikroorganizmaların ürettikleri bazı küf türleri, zaman zaman kontamine ettikleri ürünlerin tadını, kokusunu ve ürünün kimyasal yapısını bozarak bu ürüne çeşitli hastalık yapıcı özellikleri bulunan ikincil metabolitleri (mikotoksinler) oluşturmalarına neden olabilirler\_(Sabuncuoğlu vd., 2008; Karaca, 2006).

Mikotoksinler küfler tarafından üretilen, uçucu olmayan, nispeten düşük moleküler ağırlıklı, oldukça toksik bileşiklerin bir sınıfını oluşturan sekonder metabolitlerdir (Barreira vd., 2010; Brase vd., 2009). Küflerin gelişimi için gerekli olmadıklarından sekonder metabolit olarak değerlendirilmekte olup, basit bir ifadeyle birincil metabolik süreçlerin bir ürününü teşkil etmektedirler (Brase vd., 2009). Mikotoksinlerin kimyasal yapıları oldukça karmaşık ve çeşitlidir (Roseanu vd., 2010). Literatüre göre küf türleri tarafından üretilen 500'den fazla çeşit mikotoksin olduğu bilinmektedir (Köppen vd., 2010). Bu son derece toksik metabolitler, insan ve hayvanlarda hastalık veya ölüm gibi ciddi sağlık problemlerine neden olabilmektedir (Karaca, 2005). Mikotoksinlerin fonksiyonları açıkça belirlenmemiştir; fakat bu toksinlerin aynı çevrede bulunan diğer mikroorganizmaları ortadan kaldırmakla ilgili bir rol oynadıkları, ayrıca parazitik küflerin konakçı dokularını istila etmelerine yardımcı oldukları düşünülmektedir (Brase vd., 2009). Mikotoksinler, tümör oluşumunu veya hızlı ölümü tetikleyebileceğinden küflerin insanlarda kanser oluşturma üzerine etkisi, 1960'lardan itibaren yoğun araştırma konusu haline gelmiştir (Brase vd., 2009). Laboratuvar hayvanları ile yapılan deneyler, bu mikotoksinin zararlı etkilerinin, pulmoner ve beyin ödemi ve karaciğer, dalak, böbreklerdeki kanama ile karakterize olan immünosupresyon ve zehirlenmeyi içerdiğini göstermiştir (Pádua vd.,

2005). En çok araştırılan mikotoksinler *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* ve *Myrothecium* cinslerine ait türler tarafından üretilmektedir (Brase ve ark. 2009). Mikotoksinler, bu küflerin hif ve sporlarında oluşmaktadır (Köppen vd., 2010). IUPAC ismi 4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one olan Patulin proteinlerin sülfidril ve amino gruplarına karşı oldukça reaktif olan, suda çözünebilir,  $\beta$ -doymamış, toksik bir laktondur (Hayes vd., 1979). Patulin, ilk önce geniş spektrumlu antibiyotik özelliklere sahip bir bileşik olarak çalışıldı. Ancak sonraki araştırmalar, mutajenik, immünotoksik, nörotoksik ve gastrointestinal sistem üzerinde olumsuz etkilere neden olan patulin'deki toksikolojik özellikleri gösterdi (Claude vd., 2008) Patulin, *Penicillium* türleri dışında *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Byssosclamyces* cinslerinin çeşitli suşları tarafından üretilmektedir (Bonarba vd., 2010). Patulin üretici mikroorganizmaların başında gelen *Penicillium expansum* izolatlarının tümü %100 patulin üreticisidir (Morales vd., 2010). *P. expansum*, yüzeyleri hasar görmüş meyvelerle alakalı bir küf olarak tanımlanmakla birlikte elmalarda mavi küf çürümelerinden sorumlu, Patulin üretme yeteneğinde olan küfler arasında en önemli ve en çok karşılaşılan türdür (Tangni vd., 2003; Welke vd., 2010; Lawley vd., 2008). Bu tür, psikrofil özellik göstermekte olup 0 °C'de oldukça iyi gelişmekte; fakat aynı zamanda -2 ila -3 °C'de de gelişme göstermektedir. Bu tür için optimum gelişme sıcaklığı 25°C, maksimum gelişme sıcaklığı ise 35 °C'dir (Morales vd., 2010). Patulin üretimi, en yüksek 21 °C'de olmak üzere *P. expansum* gelişimine izin veren 0-30 °C'yi kapsayan her sıcaklıkta gözlenmiştir (Moake vd., 2005) Patulin, çeşitli meyvelerde özellikle de elmalarda ve elmadan yapılmış ürünlerde bulunmaktadır (Koçkaya vd., 2009). Patulin, çoğunlukla *P. expansum*'un etkisiyle çürüyen, özellikle de toprağa düşmüş elmalarda bulunmuştur (Paterson vd., 2000). Bu mikotoksin, doğal olarak elma, elma suyu ve işlem görmüş veya görmemiş kayısı, üzüm, greyfurt, şeftali, armut, muz, ananas, çilek, erik, domates, frenk üzümü, çay üzümü, ahududu, nektarin, beyaz ve karadut, portakal, kavun, karpuz, kiraz gibi çeşitli meyvelerde, biber, salatalık, havuç, yer elması gibi sebzelerde, sert kabuklu yemişler, bira, şarap, ekmek, yem, peynir, zeytin, et ürünleri ve tahıllarda bulunmuştur (Dombrink-Kurtzman, 2006; Gökmen vd., 1998; Karaca, 2005; Li vd., 2007; Moake vd., 2005; Silva vd., 2007). Elma şırası gibi ürünlerin genellikle Patulin içermediği ileri sürülmesine rağmen Patulinin elma şırasında bulunduğunu gösteren bazı çalışmaların mevcut olduğu belirtilmiştir (Speijers, 2004). *P. expansum*'un Patulin üretimi için, elma ve elma ürünleri mükemmel substratlardır (Barreira vd., 2010). Meyvelerde, sebzelerde ve bunlardan elde edilmiş ürünlerde patulin üretimi su aktivitesi, sıcaklık, pH ve meyvelere

özgü diğer kimyasal özellikler gibi faktörlere bağlıdır (Moake vd., 2005). Küflü, çürümüş ve zarar görmüş elmaların üretimden önce yıkanması ve ayıklanıp atılması işlemleri elma suları ve elmalardan üretilen diğer ürünlerde patulin seviyesinin düşürülmesine önemli ölçüde yardımcı olabilmektedir (Iha vd., 2008; Lawley vd., 2008; Spadaro vd., 2007).

## 1.2. Mikotoksinlerin Oluşumu ve Bunu Etkileyen Faktörler

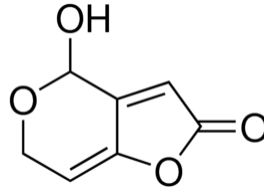
Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinsine bağlı küfler tarafından üretilen ikincil metabolitler grubunda olan toksik kimyasal bileşiklerdir. Bu cinslerden ilk üç sıradakiler özellikle meyvelerdeki mikotoksin üretiminden önemli derecede etkilidirler. Söz konusu bu küfler meyve bozulmasında büyük oranda sorumludurlar. Gıda ve yem endüstrisinde üretim yapan, toplayan, depolayan, işleyen veya kullanan herhangi bir zincir için önemli mali kayıplardan sorumludur. Ekonomik kayıplara ek olarak, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. ve *Alternaria* spp. insan sağlığını ilgilendiren mikotoksinleri üretirler. En yaygın mikotoksinler, Patulin, Aflatoksinler, Okratoksin A, Deoksivinelenol, Zeralenon, Fumonisin, *Alternaria* toksinleri'dir. Gıdaların küf bulaşmasını kontrol etme çabalarına rağmen, mikotoksin üreten küfler doğanın her yerinde bulunabilen bulaşanlardır. Tarla, meyve bahçesinde, hasatda, işlemede, depolamada ve pazarlama sırasında herhangi bir zamanda bulaşabilirler. Çoğu gıda, küf veya mikrobiyal bozulmayı müsaade eden kimyasal ve/veya fiziksel özelliklere sahiptir. Özellikle meyveler yüksek su aktivitesi sahip olması (aw), şeker içeriğinden dolayı ve organik asitlerin varlığı sebebiyle mikrobiyal bozulmadan ziyade küflere karşı hassastır (Tournas ve Katsoudas, 2005).

Toksin üreten küflerin tahılda, meyvede vb. yerlerde bulunması, mikotoksinlerin mevcut olacağı anlamına gelmez, çünkü toksin üretimi, çevresel koşullar, ürünün tipine, çeşidine ve beslenme durumuna, ürünün mikrobik yükü ve suyu gibi birçok faktöre bağlıdır (Drusch ve Ragab, 2003; Sanchis ve Magan, 2004).

Yiyeceklerin ve içeceklerin küflenmesi, endüstri için önemli gelir kayıplarına neden olmaktadır. Ayrıca küflenme, bu küfler tarafından mikotoksin veya alerjen üretimi nedeniyle gıda güvenliği sorunu da oluşturabilmektedir (Rico-Munoz vd., 2019).

### 1.2.1. Patulin

Patulin, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssochlamys* dahil olmak üzere çeşitli cinslere ait küfler tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı  $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış  $\gamma$ -laktondur. Patulin, armut, çilek, mango, erik, kayısı ve domates de dahil birçok küflü meyvede ortaya çıkabilse de, patulin bulaşmasının ana kaynağı, çürük elma ve küflü meyveden preslenmiş elma suyudur. *Penicillium expansum*'un elma ürünlerinde patulin'e katkıda bulunan başlıca mantar türleri olduğuna inanılmaktadır. Patulin, akut toksik (Dailey ve diğerleri, 1977), genotoksik, teratojenik (Dailey vd., 1977; Roll vd., 1990) ve hayvanlarda muhtemel immünotoksik etkileri bulunmaktadır (Sorenson vd, 1985). Bu muhtemel etkiler ve bu etkilerin araştırıldığı çalışmalar Tablo 1.2'de özetlenmiştir ( Moake M., vd., 2005 ). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda patulinin kanıtlanmış bir toksikolojik veya epidemiyolojik zararı bulunmamaktadır. Fakat, olası etkileri sebebiyle elma ürünlerinde, elma ürünlerinde patulin seviyelerini sınırlama arzusu vardır, çünkü bebekler ve küçük çocuklar bu gıdaların ana tüketicileridir ve patuline uzun süre maruz kalmanın etkileri henüz bilinmemektedir. Amerika Birleşik Devletleri dahil birçok ülke, 50 mg / L veya daha az elma ürünlerinde patulin için düzenleyici limitler belirlemiştir (van Egmond, 1987; FDA, 2001). IUPAC adı, Patulinin kimyasal formülü ve fiziksel özellikler Tablo 1.1'de, kimyasal yapısı ise şekil 1.1'te gösterilmiştir (PubChem, 2005a). Diğer mikotoksinlerin aksine patulin analizi için herhangi bir ELISA kiti bulunmamaktadır. Patulin analiz yöntemleri daha çok geleneksel etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna dayanmaktadır (MacDonald, Illida, 1997; MacDonald vd., 2000). Bu ön işlemlerden sonra patulin analizinin kesinliği ve miktarının belirlenmesi için çeşitli analitik analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar; ince tabaka kromatografisi (TLC) ( Marsol-Vall vd. 2016 ), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ( Abu-Bakar vd., 2014), yüksek performanslı sıvı kromatografisi ultraviyole tespiti (HPLC-UV) ( Yang vd., 2016 ), yüksek performanslı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (HPLC-MS) ( Anene vd., 2016 , Kharandi vd., 2013 ), kılcal elektroforez (CE) (Marsol-Vall, vd., 2014). Bunlar arasında HPLC-MS yöntemi, diğer enstrümantal yöntemlerin aksine daha yüksek seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle patulin tayininde en yaygın kullanılan analitik teknik olmuştur ( Li vd., 2018 ).



Şekil 1.1. Patulinin kimyasal yapısı

Tablo 1.1. Patulinin kimyasal formülü ve fiziksel özellikleri

Kimyasal Formül	IUPAC Adı	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Erime Noktası (°C)
C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	4-hidroksi-4H-furo [3,2c] piran-2 [6H] -on	154,12	111

### 1.2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler; *Aspergillus*, -özellikle *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* cinsinden mantar türleri tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Ayrıca, gıda ürünlerinde doğal olarak gelişen ve insanlar da dahil olmak üzere çeşitli hayvan türlerinde çok çeşitli toksik etkilere neden olan mikotoksinlerdir (Ismail vd., 2005). Aflatoksinler; fıstık, fındık, Brezilya fıstığı ve incir gibi çeşitli meyvelerde bulunabilmektedir. Diğer yandan, badem, ceviz ve kuru üzüm gibi meyveler düşük de olsa aflatoksin riski altında kabul edilir (Jelinek ve ark. 1989). Tüm bu ürünler çoğunlukla tarlada kontamine olurlar. Ancak depolanma sırasında mantar büyümesi için elverişli koşulların oluşması halinde mikotoksin seviyesinde bir artış meydana gelebilir (Battilani P. vd., 2008). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), dünyadaki gıda kaynaklarının yaklaşık % 25'inin aflatoksin kontaminasyonundan etkilendiğini tahmin etmektedir (FAO, 1997). Aflatoksinlerin 20'den fazla türü tespit edilmiştir. Bu türlerden en önemlileri; B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) ve M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) olarak belirtilmiştir (Ismail A., vd. 2018). Aflatoksinler genel olarak tahıl ve meyvelerde tespit edilmişse de, AFM<sub>1</sub> ve AFM<sub>2</sub> aflatoksin çeşitleri sütte rapor edilmiştir (Akhtar, S. vd., 2017; Udomkun P. vd., 2017).

Aflatoksinler, doğada ki en güçlü kanserojen, teratojenik ve mutajenik bileşikler arasındadır. Örneğin; AFB<sub>1</sub>, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından



grup I kanserojen olarak listelenmiştir ve insan primer hepatosellüler karsinomunun nedeni olduğu düşünülmektedir (IARC, 2002). AFB<sub>1</sub>, çok sayıda hayvan türünde güçlü hepatokarsinogeniktir ve insan hepatoselüler karsinomunun etiyojisinde rol oynamaktadır (Hall and Wild, 1994; Eaton and Gallagher, 1994; Groopman vd., 2008 ). AFB<sub>1</sub>'in en güçlü aflatoksin olduğu ve ardından toksisite sırasına göre AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> ve AFG<sub>2</sub> olduğu gösterilmiştir (Asao vd., 1965).



Tablo 1.2. Patulinin neden olduğu sağlık riskleri ve bu risklerle ilgili çalışmalar

<b>Akut Semptomlar</b>	<b>Kaynak</b>
Ajitasyon, Konvülsiyonlar, Nefes Darlığı, Akciğer Tıkanıklığı, Ödem, Hiperemi, GI Yolu Distansiyonu	Escoula and others 1977; Hayes and others 1979
Mide Bulantısı	Walker and Wiesner 1944
Epitelyal Hücre Dejenerasyonu, Bağırsak Kanaması Bağırsak İltihabı	McKinley and Carlton 1980a, 1980b; McKinley and others 1982; Mahfoud and others 2002
Ülser	Escoula and others 1977; Hayes and others 1979; McKinley and Carlton 1980a, 1980b; McKinley and others 1982; Mahfoud and others 2002
<b>Kronik semptomlar</b>	<b>Kaynak</b>
Genotoksik	Mayer and Legaror 1969; Korte 1980; Thust and others 1982; Lee and Rosenthaler 1986; Roll and others 1990; Hopkins 1993; Pfeiffer and others 1998
Nörotoksik	Hopkins 1993
İmmunotoksik	Hopkins 1993; Wichmann and others 2002
Bağışıklık	Wichmann and others 2002
Teratojenik	Ciegler and others 1976; Roll and others 1990
Kanserojen	Dickens and Jones 1961; Oswald and others 1978
<b>Hüresel Etkiler</b>	<b>Kaynak</b>
Plazma Membranında Bozulma	Riley and Showker 1991; Mahfoud and others 2002
Protein Sentezi İnhibisyonu	Hatez and Gaye 1978; Miura and others 1993; Arafat and Musa 1995
Transkripsiyon Bozulması, Çeviri Bozulması	Moule and Hatey 1977; Arafat and others 1985; Lee and Rosenthaler 1987
DNA Sentezi İnhibisyonu	Cooray and others 1982
Na-Bağlı Amino Asit Taşıma İnhibisyonu	Ueno and others 1976
RNA Polimeraz İnhibisyonu	Moule and Hatey 1977
Aminoasil-tRNA Sentetazların İnhibisyonu	Arafat and others 1985
Na-K ATPase İnhibisyonu	Phillips and Hayes 1977, 1978; Riley and Showker 1991
Kas Aldolazı İnhibisyonu	Ashoor and Chu 1973
Üreaz İnhibisyonu	Reiss 1977

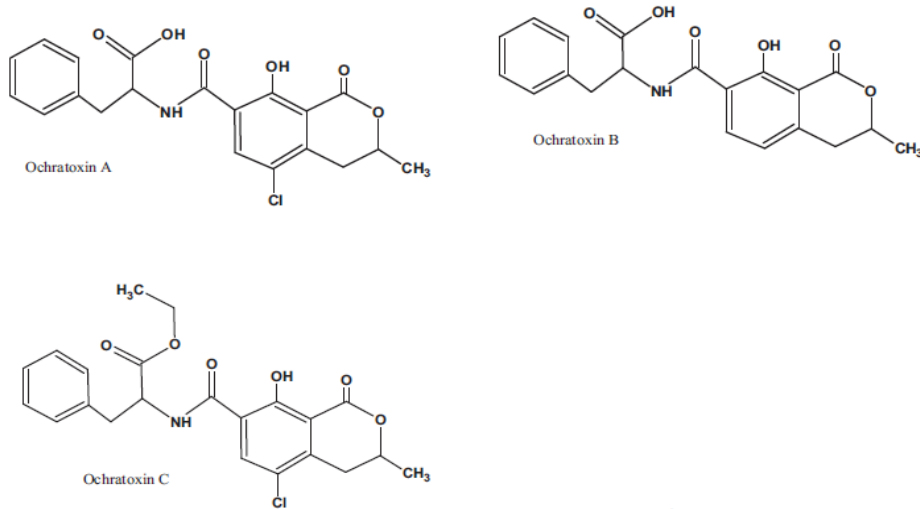
AFB<sub>1</sub>, iklim koşullarının AFB<sub>1</sub> üreten küflerin büyümesini desteklediği ve mısır, yer fıstığı gibi AFB<sub>1</sub>'e duyarlı ürünlerin tarımının yaygın olduğu bölgelerde önemli halk sağlığı etkilerine sahiptir. Karaciğer kanserinin yüksek oranlarda görüldüğü dünyanın birçok bölgesinde (örneğin, Güneydoğu Asya ve Sahra Altı Afrika) AFB<sub>1</sub>'e maruz kalma ve Hepatit Virüsü ile kronik enfeksiyon, özellikle sinerjistik olarak etkileşime girme olasılığı yüksek olduğu için ana risk faktörleri olarak kabul edilmektedir ( Groopman vd., 1996 , Wild ve Montesano, 2009 ). Türk Gıda Kodeksi'nde AFB<sub>1</sub> için çeşitli miktar sınırlamaları mevcuttur. Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar için; 8 µg/kg, badem, antepfıstığı ve kayısı çekirdeği için 12 µg/kg, fındık ve Brezilya fındığı için; 8 µg/kg, sert kabuklu meyveler için; 8 µg/kg bu meyvelerden meydana getirilen işlenmiş ürünler için ise: 5 µg/kg, kurutulmuş meyveler için; 8 µg/kg, mısır ve pirinç için; 5 µg/kg olarak belirlenmiştir ( Türk Gıda Kodeksi, 2011).

### 1.2.3. Okratoksin A ( OTA )

Okratoksinler çoğunlukla, tahıllar, kuru yemişler, kuru meyveler, kahve ve üzüm bazı bazı içecekleri kontamine eden yaygın mikotoksinlerdir (Bayman ve Baker, 2006; Czerwiecki, vd., 1998; Otteneder, vd., 2001). Okratoksinler, *Aspergillus* ve *Penicillium* mantar türleri, özellikle, *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* ve *P. verrucosum* tarafından üretilir (Koszegi ve Poor, 2016). En önemli okratoksinlerin; A (OTA), B (OTB) ve C (OTC) olduğu söylenebilir. Bu okratoksinlerin kimyasal yapıları şekil 1.2'de verilmiştir. Üç okratoksin arasında, okratoksin A (OTA) hem insanlarda hem de hayvanlarda ciddi olumsuz etkilere sebep olabilmektedir (Koszegi ve Poor, 2016). OTA, dünya çapında çiftlik hayvanı yemlerinin doğal bir kirleticisidir ve hayvan üretimi için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır (Duarte vd., 2011). Bu kirletici etkisi sadece hayvan üretiminde değil, kontamine olmuş yemlerle beslenen bu hayvanlardan üretilen gıda maddelerinin tüketilmesi sonucunda insanların maruziyetide önem kazanmaktadır (Manning vd, 2003). Bu bağlamda yapılan araştırmalarda OTA, et, süt, süt ürünleri ve diğer hayvansal kaynaklı gıdalarda, bitkisel ilaçlarda, şişelenmiş suda tespit edilmiştir (Guillamont vd., 2005; Skaug, 1999; Dall'Asta vd., 2008; Pozzo vd., 2010; Chen vd., 2015; Shim vd., 2014; Veprikova vd., 2015; Solfrizzo vd., 2015). OTA ile kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlarda çeşitli klinik, patolojik, ekonomik sorunlar saptanmıştır (Duarte vd., 2011). Yumurta tavuklarında, yumurta büyüklüğünde ve sayılarında azalma, yumurta kabuğunda incelme, böbrek ve karaciğer rahatsızlıkları gözlenmiştir ( Bozzo vd., 2011). Etlik piliçlerde, büyüme miktarında

azalma gözlenmiştir (Sakthivelan ve Rao, 2010). Domuzlarda, kilo alımında azalma gözlenmiştir (Malagutti vd., 2005). Süt ineklerinde, ishal, ağır depresyon, halsizlik, süt üretiminde azalma, yem reddi gözlenmiştir (Abramson vd., 1983).

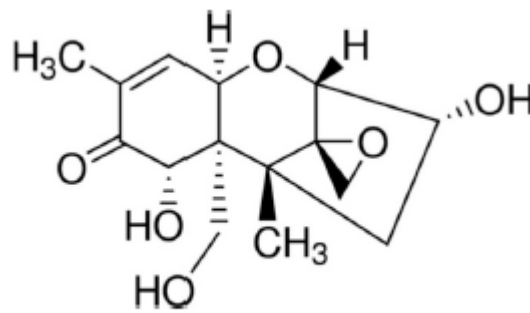
OTA'nın laboratuvar hayvanları arasında kanserojen olduğu gösterilmiştir (Boorman, 1989). Ayrıca OTA, IARC tarafından grup 2B kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1993). Bununla birlikte, bebeklerin tolere edilebildiği miktarın düşüklüğü göz önüne alındığında, bebek mamalarında bulunan OTA miktarları büyük önem kazanmaktadır. Kanada'da yapılan bir çalışmada ülke içinde satışı sunulan bebek mamalarında Lombaert ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada bebek mamalarının %26'sında OTA tespit edilmiştir (Lombaert vd., 2003). OTA, çoğu yiyecek saklama ve hazırlama işleminden etkilenmeden kalabilen orta derecede kararlı bir moleküldür (Schiavone ve diğerleri, 2008). Ayrıca, ısıtma ve olgunlaşma gibi işlemler, OTA seviyelerini değiştiremezler (Monaci et al., 2005). Türk Gıda Kodeksi'nde OTA için çeşitli miktar sınırlamaları mevcuttur. İşlenmemiş tahıllar, kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve için; 5 µg/kg, Kurutulmuş asma meyveleri, kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve için; 10 µg/kg, şarap ve meyve şarapları için; 2 µg/kg, bebek ve küçük çocuk ek gıdaları için; 0,5 µg/kg, karabiber ve kırmızı biber için; 15 µg/kg olarak belirlenmiştir ( Türk Gıda Kodeksi, 2011).



Şekil 1.2. Önemli okratoksinlerin kimyasal yapısı (Duarte vd., 2011)

#### 1.2.4. Deoksinivalenol ( DON )

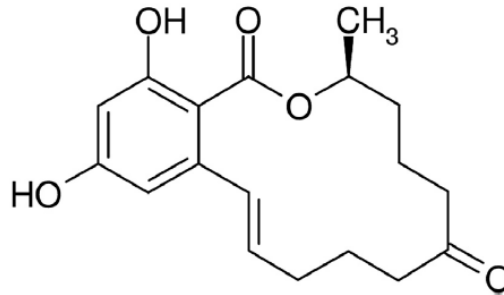
Deoksinivalenol (DON, vomitoksin) ağırlıklı olarak *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* türler grubu tarafından üretilen ve buğday, mısır, arpa, yulaf gibi temel tahılları kirleten B tipi trikotekendir ( Mishra vd., 2014 ). Ürünler genellikle üretim yerlerinde DON ile kontamine olurlar. Fakat gerekli şartlar oluştuğunda depolama sırasında da kontaminasyon meydana gelebilir (Ma ve Guo, 2008). DON, toksisitesini sağlayan 3 (-OH) grubu ile birlikte polar bir yapıdadır (Nagy vd., 2005). DON'un kimyasal yapısı şekil 1.3'te gösterilmiştir. DON ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi durumunda insanlarda; kusma ve anoreksiya gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olduğunu bazı araştırmalarda belirtilmiştir (Pestka ve Smolinski, 2005). Gıda ürünlerinde geniş DON kontaminasyonu nedeniyle birlikte hayvan ve insanlarda potansiyel toksikolojik etkilerini göz önünde bulundurularak bazı ulusal ve uluslararası gıda güvenliği örgütleri ile uzman grupları gıdalarda DON'un risk değerlendirmesi ihtiyacını vurgulamıştır (Mishra vd., 2014). Türk Gıda Kodeksi'nde DON için çeşitli miktar sınırlamaları mevcuttur. İşlenmemiş tahıllar için; 1250 µg/kg, işlenmemiş durum buğdayı, yulaf ve mısır için; 1750 µg/kg, tahıllar, tahıl unları, kepek, rüşeym ve makarna için; 750 µg/kg, ekmek, pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar için; 500 µg/kg, bebek ürünleri için; 200 µg/kg olarak belirlenmiştir ( Türk Gıda Kodeksi, 2011).



Şekil 1.3. DON'un kimyasal yapısı ( Wang, vd., 2019 )

### 1.2.5. Zearalenon

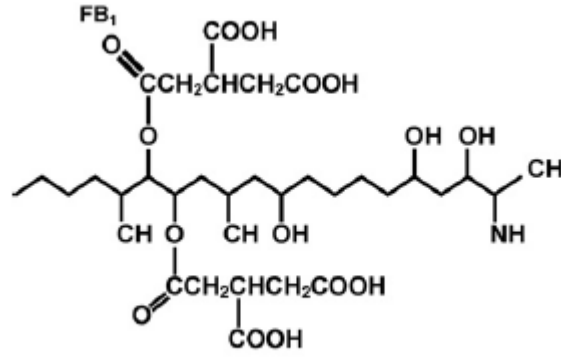
Zearalenon, yaygın olarak *F. graminearum* (*Gibberella zea*), *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* ve *F. semitectum* dahil olmak üzere çeşitli *Fusarium* mantarları tarafından biyosentezlenen, steroid olmayan östrojenik mikotoksindir. Toprak mantarları, ılıman ve sıcak ülkelerde ve dünya çapında tahıl ürünlerinin önemli kirleticileridir (Bennett ve Klich, 2003). Zearalenon, güçlü östrojenik aktivite gösteren bir bileşiktir. Kan dolaşımına girdikten sonra, çeşitli hayvan türlerinde üreme problemlerine neden olur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, diyetle 1.0 ppm'e eşit olan ZEA konsantrasyonunun domuzlarda hiperöstrojenik sendromlara yol açabileceğini ve daha yüksek konsantrasyonların gebe kalamama, düşük ve diğer birçok hastalık ile ilgili sorunlara neden olabileceğini göstermiştir (Lawlor ve Lynch, 2001 ; Minervini ve Dell 'Aqualia, 2008). Zearalenon (ZEA) kimyasal olarak 6- [10-hidroksi-6-okso-trans-1-undesenil] -B-resorsiklik asit lakton olarak tarif edilen bir resorsiklik asit laktonudur. Zearalenon kimyasal yapısı şekil 1.4'te gösterilmiştir. Türk Gıda Kodeksi'nde zearalenon için çeşitli miktar sınırlamaları mevcuttur. İşlenmemiş tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar için; 100 µg/kg, işlenmemiş mısır için; 350µg/kg, tahıllar, tahıl unları, kepek ve rüşeym için; 75 µg/kg, ekmek, pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar için; 50 µ/kg, bebek ve küçük çocuk ek gıdaları için; 20 µg/kg olarak belirlenmiştir ( Türk Gıda Kodeksi, 2011).



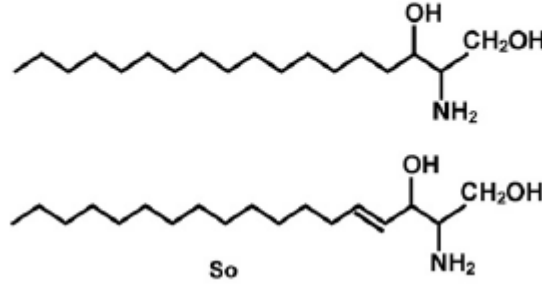
Şekil 1.4. Zearalenon'un kimyasal yapısı ( Rogowska vd., 2019 )

### 1.2.6. Fumonisinler

Fumonisinler, ilk olarak 1988 yılında Tygerberg'deki Tıbbi Araştırma Konseyi (MRC) Programında *Fusarium verticillioides* suşu MRC 826 kültürlerinden izole edilmiştir ( Marasas, 2001 ). Yapılan çalışmalar sonucunda, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium oxysporum* tarafından da üretildikleri bilinmektedir (Bezuidenhout vd., 1988; Gelderblom vd., 1988; Knaflewski vd., 2008; Seefelder vd., 2002). Fumonisin üreticileri olarak bilinen *F. verticillioides* ve *F. proliferatum*, fide hastalığını, kök çürümesini, sap çürümesini ve başak veya çekirdek çürümesini etkileyen dünya çapında tahıl patojenleridir (Blandino vd., 2009; Waskiewicz, vd., 2010). Son yıllarda, mısır bazlı gıda ve yemler, süt, bira, biyolojik sıvılarda fumonisinlerin belirlenmesi için önemli araştırmalar yapılmaktadır (Arino, vd. 2007; Stepien, vd., 2011a). Fumonisinlerin sorgum, beyaz fasulye, adzuki fasulyesi, maş fasulyesi, buğday, arpa, soya fasulyesi, incir, siyah çay gibi mahsullerde meydana geldiğine dair kanıtlar vardır (Waskiewicz, vd., 2012). Fumonisinlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri belirsizdir. Bu mikotoksinlerle ilgili sorunlar neredeyse tamamen kontamine mısır veya mısırdan yapılan ürünlerin tüketimi ile ilişkilidir (Waskiewicz, vd., 2012). Fumonisinlerin insan sağlığı üzerinde karaciğer kanserleri, nöral tüp defektleri ve kardiyovasküler problemleri için risk oluşturduğundan şüphelenilmektedir ( IARC., 2002; Odhav vd., 2008; Wang, vd., 2005). Fumonisinlerin kimyasal yapıları ilk olarak 1988 yılında aydınlatılmıştır (Gelderblom vd.,1988). Şekil 1.4'te fumonisinin kimyasal yapısı gösterilmiştir. Kimyasal yapının aydınlatılmasından sonra yapılan çalışmalarda 28 farklı fumonisin homoloğu belirlenmiştir (Rheeder vd, 2002; Humpf ve Voss, 2004). FB<sub>1</sub> en yaygın bulunan fumunositir. Daha sonra sırasıyla FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub> fumonisinleri gelir ( Voss vd., 2007). Türk Gıda Kodeksi'nde fumonisin için çeşitli miktar sınırlamaları mevcuttur. İşlenmemiş mısır için, 4000 µg/kg, mısır ve mısır bazlı ürünler için, 1000µg/kg, mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerezler için, 800 µg/kg, işlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları için, 200 µg/kg olarak belirlenmiştir ( Türk Gıda Kodeksi, 2011).



Sa



So

Şekil 1.5. Fumonisin'in kimyasal yapısı (Voss vd., 2007)

### 1.3. MALDI-TOF-MS ile Küf Teşhis Yöntemi

Yaklaşık 40 yıl önce kimyagerler, kütle spektrometresi kullanarak küçük organik moleküllerin tespiti yoluyla bakteri, küf vb kültürlerini tanımlamayı düşündüler. On yıldan fazla bir süre sonra, matris, lazer desorpsiyonu / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisinin (MALDI-TOF-MS), proteinler gibi bozulmamış daha büyük biyomoleküllerin saptanmasını sağladı ve rutin klinik laboratuvarlarında mikrobiyal kimlik tespiti için geliştirildi. Analiz işlemi sırasında proteinler, lazerin ve matrisin küçük organik asitlerinin koordineli hareketi ile parçalanmadan iyonize edilir ve kütle-yük oranları temelinde ayrılır, bu da karakteristik bir kütle spektral profili ile ortaya koyar. Mikrobiyal kimlik tespiti, bozulmamış bütün bakteriyel hücrelerden üretilen protein spektrumunun, belirli bir algoritma kullanılarak türe özgü referans protein profili veri tabanıyla karşılaştırılmasına dayanır. Bu biçimde bakterilerin ve küflerin tespiti yapılabilmektedir.

1990' ların ortalarında, farklı gruplar kendi bakteriyel referans kütle spektrumları kütüphanesini ve bakteriyel tanımlama ve taksonomik sınıflandırma yazılımı geliştirdiler.



Farklı yerlerde kütle spektral profillerinin tekrar üretilebilirliği, kültür koşullarındaki çeşitliği ve değişkenliği açıklamak için sağlamlık, klinik olarak ilgili bakterilerin çoğuna uygulama ve otomatik kütle spektral analizi, MALDI-TOF MS bazlı bakteriyel kimlik tespiti uygulanan laboratuvarlarda rutin kullanım için uygun hale geldi. Hızlı ve doğru tanımlama için zaten doğrulanmış olan bu yöntem bakteri, maya ve küf türleri, bozulmamış hücrelerin karakteristik parmak izlerine bağlıdır ve yapısal proteinlerin moleküler ağırlıklarını mikroorganizma kültürlerinden ön seçim ve saflaştırma adımları olmadan doğrudan tespit edebilmektedir.

Son birkaç makale MALDI-TOF MS tarafından birçok küf türünün tanımlanmasının, tedaviyi optimize etmede iki anahtar faktör olan doğru ve hızlı olduğunu göstermiştir. Bir çalışmada MALDI-TOF MS'nin performansını klinik dermatofit izolatlarının tanımlanması için geleneksel morfoloji tabanlı yöntemlerle karşılaştırmıştır (Saleeb vd., 2011; Carbonnelle vd., 2011; Stevenson vd., 2010; Hettick vd., 2008).

#### **1.4. Kimyasal Standart ve Referans Materyaller**

Kimyasal ve biyolojik ölçümler, her gün dünyanın dört bir yanındaki laboratuvarlarda, maddenin özelliklerini incelemek ve maddenin bileşenlerini daha iyi tanımlamak ve nicelleştirmek amacıyla çok sayıda analist tarafından yapılmaktadır. Kimyasal ve biyolojik ölçümler, insan yaşamının tüm alanlarında yapılır. Örneğin, hammaddelerin, ara ve nihai ürünlerin kalitesini kontrol etmeye katkıda bulunurlar. Ayrıca üretim süreçlerini izleme, üretimin çevre üzerindeki etkileri veya mesleki sağlık hizmetleri, vb. konularında kilit rol oynarlar (Venelinov ve Quevauviller, 2003; Tsalev, 1994). Yapılan bu analitik ölçümlerin doğrulanmasında temel taşlardan biri, sertifikalı referans materyallerinin kullanılmasıdır (Quevauviller ve Maier, 1999).

Referans Materyal, bir ölçüm işleminde kullanım amacına uygun olduğu belirlenen bir veya daha fazla belirlenmiş özellik ile ilgili olarak yeterince homojen ve kararlı bir malzeme olarak tanımlanır (I.O.F. ISO, 2006). Referans materyallerin 4 türü mevcuttur. Bu türler ISO tarafından aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (ISO, 1992).

- **Birincil standart:** En yüksek metrolojik niteliklere sahip olduğu belirlenen veya yaygın olarak kabul edilen ve değeri aynı miktardaki diğer standartlara referansla kabul edilen standart.

- Sertifikalı referans materyal (CRM): Belirtilen materyalin değerini, ilgili belirsizliğini ve metrolojik izlenebilirlik ifadesini sağlayan bir sertifika ile birlikte, bir veya daha fazla belirtilen materyal için metrolojik olarak geğerli bir prosedürle karakterize edilen referans materyal.
- Referans malzeme (RM): Bir veya daha fazla özellik değeri yeterince homojen olan ve bir aparatın kalibrasyonu, bir ölçüm yönteminin değerlendirilmesi veya malzemelere değer atamak için iyi belirlenmiş malzeme veya madde.
- İkincil standart: Değeri aynı miktardaki birincil standartla karşılaştırılarak atanan standart.

Birincil standartlar, kimyasal standartların üst katmanını temsil eder ve prensip olarak, analitik verilerin kilogram, metre ve mol gibi temel SI ölçüm birimlerinde izlenebilirliğini sağlarlar (Walker ve Lumley, 1999). Birincil standartların özellikleri ilk olarak 1965 yılında aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (Analytical Standards Sub-Committee of the RSC, 1965);

- Ticari olarak kolayca elde edilebilmelidir.
- Yüksek kimyasal saflıkta olmalıdır ( $100 \pm \% 0,02$ ).
- Yüksek kararlılıkta olmalıdır.
- Homojen olmalıdır.
- Higroskopik olmayan ve çiçeklenmeyen yapıda olmalıdır.
- Kolayca çözünebilmelidir.
- Yüksek eşdeğer ağırlıkta olmalıdır.

Kimyasal bileşim açısından, iki tür referans malzemesi vardır (Walker ve Lumley, 1999);

- Tek madde referans malzemeleri: Saf kimyasallar (elementler veya bileşikler) veya kimyasal saflık, konsantrasyon, erime noktası, füzyon entalpisi, viskozite, UV-Vis absorbansı, parlama noktası gibi özellikler için iyi karakterize edilmiş referans değerlere sahip saf kimyasal çözeltileridir.
- Matris referans malzemeleri: Genellikle doğal formlarında ve doğal ortamlarında ilgili analitleri içeren doğal malzemeleridir.

Güvenilir sonuçlar alınabilmesi için dünyada oluşan baskı nedeniyle bir çok alanda referans maddelerin kullanımı artmıştır (Quevauviller, 1999). Referans materyallerin önemi 1970'lerden itibaren anlaşılmaya başlanmıştır. 1970'lerde Avrupa'da Bilim ve Teknoloji İşbirliği (COST) kurulmuştur. Ayrıca 1973 yılında, Avrupa Komisyonu (AK) ve Üye Devletler, Ortak Araştırma Merkezi (JRC) faaliyetlerinin bir parçası olarak laboratuvarlar arası çalışmaları organize etmek ve referans materyalleri geliştirmek için bir program geliştirme kararı almışlardır (Olivares, 2018). Sertifikalı referans maddeler pahalı olması nedeniyle en başlarda tercih edilmemekteydiler. Fakat, sertifikalı referans maddeler analiz tekrar sayılarını önemli ölçüde azaltmasının anlaşılmasıyla kullanımı büyük ölçüde artmıştır (Venelinov ve Quevauviller, 2003). Bu bağlamda yapılan araştırmalarla 2000'li yıllarda sertifikalı referans madde ihtiyacının artacağı, sertifikalı referans madde üretim ve geliştirilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır (Venelinov ve Quevauviller, 2003). Günümüzde, kalite kontrolü için -malzemenin izlenebilirliği ve uygulanması ve ayrıca belirsizliklerin tahmin edilmesi için- sertifikalı referans maddelerin laboratuvar ölçüm testlerinin rutinine eklenmesi gerekliliği vurgulanmaktadır (Olivares ve Lopes, 2012). Bir sertifikalı referans madde üretilmek istendiğinde, karakterizasyon, belirsizlik, tekrarlanabilirlik ve homojenizasyon adımlarına önem vererek geliştirilmesi gerekmektedir (Olivares vd., 2018). Üretim sırasında dikkat edilmesi gereken bazı adımlar kısaca aşağıda açıklanmıştır (Walker ve Lumley, 1999; ISO 35, 1989);

- Karakterizasyon: Referans materyalin türüne, kullanım amacına, ilgili laboratuvarların yeterliliğine ve kullanılan yöntemlerin kalitesine bağlı olarak, gravimetrik hazırlama verileri kullanarak karakterizasyon, birincil yöntem kullanılarak karakterizasyon, bağımsız ölçüm yöntemleri ile karakterizasyon veya laboratuvarlar arası çalışmalarla karakterizasyon yöntemlerinden uygun olanı seçilerek yapılmalıdır.
- Homojenizasyon: Referans materyalin homojen olduğundan emin olabilmek için yeterli sayıda numuneyi test etmek gerekmektedir. Diğer bir deyişle, çalışılan materyal kümesinin bir kısmı üzerinde ölçülen özellik değerlerinin, kabul edilebilir belirsizlik sınırları dahilinde çalışılan numune kümesinin diğer herhangi bir kısmı ile uyumlu olması gerekmektedir.

## **1.5. Doğal Maddelerin Ekstraksiyonu**

Bir analitik ölçüm cihazına girmeden önce ölçümü yapılacak materyalin ekstraksiyonu, analizin önemli bir adımıdır. Bu işlem ölçümdeki parazitlerin etkisini azaltacak ve aynı zamanda analit konsantrasyonunu analiz için zenginleştirecektir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) gibi hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli olan geleneksel yöntemlerden, minimum solvent kullanımı ile daha gelişmiş yöntemlere kadar çeşitli ekstraksiyon yöntemleri vardır. Bu teknikler arasında, katı faz ekstraksiyonu (SPE), dağıtıcı katı faz ekstraksiyonu (dSPE), karıştırma çubuğu emici ekstraksiyonu (SBSE), manyetik katı faz ekstraksiyonu (MSPE), katı fazlı mikro ekstraksiyon (SPME), sıvı fazlı mikro ekstraksiyon (LPME) ve dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (DLLME) sayılabilir. LLE çevresel sorunlara neden olabilecek çok fazla solvent kullanımı gerektirir, oysa SPME gibi yeni teknikler, çözücüsüz ekstraksiyon teknikleridir (Nashiri vd., 2020).

### **1.5.1. Katı Faz Ekstraksiyonu**

Katı faz ekstraksiyonu (SPE) ilk olarak 1970'lerin ortalarında çalışılmıştır ve 1978'de ticari olarak piyasaya sürülmüştür (Hennion, 1999). SPE, günümüzde yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden biri olmuştur (Nashiri vd., 2020). Geleneksel LLE teknikleriyle karşılaştırıldığında, SPE basit, uygulanması hızlı ve kolaydır. Ayrıca SPE yöntemi kullanıldığında, yöntemin seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle adsorbanların önemli ölçüde tam zamanlı geldiği bilinmektedir (Augusto vd., 2013). Bütün bunların yanında SPE metodu “çevreci analitik kimya” uygulamalarına uygundur.

### **1.5.2. Dispersif Katı Faz Ekstraksiyonu**

Dispersif katı faz ekstraksiyonu (dSPE), birkaç bileşiğin analizi için bir ön ekstraksiyon yöntemi olarak kullanılmıştır. dSPE, analitik çözeltiliye bir sorbent ilave edilmesine ve ardından sorbent ile analitler arasındaki teması destekleyen dispersiyona dayanır. Dispersiyon işlemi tamamlandığında, analitler yüzeyinde tutulan sorbent, santrifüjleme veya filtrasyon gibi mekanik bir sistemle ayrılır. Bu yöntemin geleneksel tekniklerle karşılaştırıldığında kısa sürmesi, basitlik, uyarlanabilirlik ve kolay kullanım gibi avantajları vardır (Gabriela Islas vd., 2017).

### **1.5.3. Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu**

Manyetik katı faz ekstraksiyonu (MSPE), hedef analitlerin manyetik bir adsorban üzerine adsorpsiyonuna dayanır. Genel olarak, bu prosedürde, ekstraksiyon pahalı ekipmanlara ve büyük miktarda elüente ihtiyaç duyulmadan, basit ve hızlı bir şekilde yapılabilir. Adsorbe edilen analit(ler) harici bir manyetik alan ile kolayca ayrılabilir (Šafaříková ve Šafařík, 1999). Bu prosedür, geleneksel prosedür SPE'ye göre olası bir kolon tıkanmasını önlediğinden, ekstraksiyon verimliliği arttır. Ek olarak, nano doğası nedeniyle manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler) geniş spesifik yüzey alanına sahiptir ve sorbentler ile numune çözeltisi arasındaki denge süresi büyük ölçüde kısalmıştır, bu da nispeten daha yüksek ekstraksiyon kapasitesi ile sonuçlanır (Nashiri vd., 2020).

### **1.5.4. Katı Faz Mikroekstraksiyon**

Katı fazlı mikro ekstraksiyon (SPME), düşük solvent kullanımı, yüksek hız, hassasiyet ve GC ile HPLC'ye kolay bağlantı gibi faydaları olan basit bir numune hazırlama yöntemidir. Bu yöntem ilk olarak 1990'larda Pawliszyn ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. SPME, gıda, biyoloji, klinik tıp, toksikoloji ve adli tıp alanında kullanılmaktadır (Llompart, Vd., 2019; Yin, vd., 2019; Souza-Silva, vd., 2015; Yang vd., 2018; Cerkowniak vd., 2018; Zhang vd., 2019; Filipiak vd., 2019; Tang vd., 2017; Li vd., 2018; Riahi-Zanjani vd., 2018).

### **1.5.5. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu**

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) basitliği, etkinliği ve birçok standart yöntemde geniş kabulü sayesinde numune hazırlama yöntemlerinde çokça kullanılmaktadır (Hosseini vd., 2013; Pinho, vd. 2010). Bununla birlikte, LLE yöntemi zaman alıcıdır, büyük miktarda toksik organik çözücü gerektirir ve analitlerde düşük düzeyde zenginleşme sağlar (Nashiri vd., 2020). LLE'ye dayanan bir başka ekstraksiyon yöntemi de "tuzla çöktürme destekli (salting-out)" sıvı-sıvı ekstraksiyonudur. Yeterli tuz konsantrasyonu sağlanarak sulu fazın ayrılmasına dayanan bir ekstraksiyon yöntemidir. Bu ekstraksiyon yöntemi biyolojik ve yüksek tuzluluk içeren numuneler için etkili bir hazırlama yöntemidir (Noche vd., 2011).

### **1.5.6. Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu**

Sıvı fazlı mikro ekstraksiyon (LPME) yöntemi, son on yılda basit çalışma, düşük maliyet ve yüksek verimlilik sağlayan ön konsantrasyon ve matris ayrımı için güçlü bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Çalışma modu açısından, LPME tek damla mikroekstraksiyon (SDME), DLLME ve içi boş elyaf (HF)-LPME dahil olmak üzere üç tip olarak sınıflandırılabilir (Jeannot ve Cantwell, 1996).

### **1.5.7. Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu**

İlk olarak 2006 yılında açıklanan DLLME, su örneklerinden pestisitlerin ekstraksiyonu için başarıyla uygulanmıştır. DLLME'nin temel kuralı, bir ekstraksiyon çözücüsünün (su ile karışmayan) ve bir dağıtıcı çözücünün (su ve ekstraksiyon çözücüsünde karışabilir) sulu faz ve ekstraksiyon çözücüsü arasında daha büyük bir temas alanı sağlayan sulu bir çözelti içinde dağıtılmasıdır (Berijani vd., 2006). DLLME'nin geleneksel tekniklere göre en önemli avantajları; basit kullanım, hızlı, düşük maliyet, kolay kullanım, organik çözücülerin düşük kullanımı, yüksek geri kazanım, yüksek faktör zenginleştirme ve LC ve GC gibi kromatografik tekniklerle olan uyumudur (Zgoła-Grzeškowiak, A. ve Grzeškowiak, T., 2011).

## **1.6. Kromatografi**

Basitçe kromatografi, geniş yüzey alanına sahip sabit bir faz (SP) ve bu sabit fazda ilerleyen bir hareketli fazdan (MP) -gaz veya sıvı- ve bir kolondan oluşan ayırma yöntemidir. Ayrılmak istenen numune hareketli fazla sabit faz üzerinde kolonda yürütülür ve yürütülen numune iki faz ( sabit ve hareketli faz ) için nispi afinite farklarına dayanarak birbirinden ayrılır. Bu kromatografik sürece elüsyon denir. Çoğu kromatografi cihazı, detektörlerle donatıldığından, hem kalitatif hem de kantitatif analiz için kromatografik verilerin (kromatogramların) kullanılması mümkündür. Tutma süresi veya tutma faktörü gibi kromatografik tutma parametreleri, belirli bir çözüneni karakterize etmeye yarar ve standartlarla karşılaştırıldığında kalitatif tanımlama yapmak için kullanılabilir. Doğru pik atamaları bir literatür kromatogramı ile veya bilinen bir standardın enjeksiyonundan bir kromatogram ile karşılaştırılarak yapılabilir (Miller, 2003).

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) resmi tanımına göre ise; "Kromatografi, ayrılacak bileşenlerin biri sabit diğeri hareketli iki faz arasında dağıldığı ve belirli bir yönde hareket ettiği fiziksel bir ayırma yöntemidir" (IUPAC, 1997). Kromatografi MP'nin fiziksel durumuna göre sınıflandırılır. Dolayısıyla, eğer MP bir gazsa, tekniğe GC denir ve eğer bir sıvı ise, LC olarak adlandırılır. SP'nin durumuna göre bir alt sınıflandırma yapılabilir. SP katı ise, GC tekniğine gaz-katı kromatografisi (GSC) ve sıvı ise gaz-sıvı kromatografisi (GLC) denir (Miller, 2003).

Kromatografilerde çalışma mekanizması basitçe, seçilen malzemeleri bir kolondan elektronik yük dağılımlarından faydalanarak (polar veya apolar olması) farklı hızlarda taşımak ve böylece kolondan farklı zamanlarda çıkmalarıdır. Tipik bir deneyde, bir malzeme karışımı, SP'yi içeren bir kromatografik kolonun tepesindeki bir taşıyıcı ortamın (MP) akan akışına enjekte edilir. MP, bir gaz, bir sıvı veya süperkritik bir sıvıdır. Yaygın SP'ler katı veya sıvıdır. Sıvılar, kolonun iç duvarına kaplanarak veya daha sonra kolonda paketlenen (katılar gibi) katı desteklerle kaplanarak kolonda sabit tutulur (Miller, J.M., 2003). Bu açıklamalarla birlikte önemli görülen birkaç kromatografi yöntemine aşağıda değinilmiştir.

### **1.6.1. Gaz Kromatografisi (GC)**

GC, 1940'larda ve 1950'lerde, bir analitik ayırma tekniği olarak ortaya çıkmıştır (Martin, ve Synge, 1941; James ve Martin, 1952). İlk ticari kromatograflar 1955'te piyasaya sürülmüştür. GC'de taşıyıcı gaz olarak, hidrojen, helyum, argon ve azot kullanılabilir. Bu taşıyıcı gazlar çok saf olmalı ve kullanım noktasında saflığı sağlamak için oksijen, hidrokarbonlar ve suyun uzaklaştırılması için gaz yıkama teknikleri kullanılmalıdır. GC, katıları, sıvıları ve gazları analiz etmek için kullanılabilir (Miller, 2003).

### **1.6.2. Sıvı Kromatografisi (LC)**

HPLC olarak da adlandırılan modern LC, 1970'lerin başında bir analitik ayırma tekniği olarak tanıtılmıştır ve en yaygın kullanılan kromatografik teknik haline gelmiştir. HPLC, katıları veya sıvıları analiz etmek için kullanılabilir. HPLC, GC'yi, GC tarafından yapılması zor veya imkansız olan, termal olarak kararsız, uçucu olmayan bileşiklerin hızlı ve doğru analizini sağlaması açısından tamamlar.. HPLC uygulamalarının bazı tipik örnekleri, kompleks karışımlarda ayrı ayrı bileşenlerin ayrılması ve nicelendirilmesi, eser

miktarda safsızlıklar içeren saf bileşiklerin analizi ve saf bileşiklerin sentetik ve/veya tanımlama amaçları için izolasyonu olarak sayılabilir. MP'nin inert olduğu GC'den farklı olarak HPLC'de MP, analitler için SP ile aktif olarak rekabet eder. Bu nedenle MP'nin bileşimi çok önemlidir. LC'de yaygın olarak kullanılan MP'ler, su, seyreltik sulu pH tampon çözeltileri, asetonitril, tetrahidrofur, metanol, kloroform, heksan ve metilen klorürdür. Bunlarla birlikte bu çözücülerden bir veya daha fazlasından oluşan karışımları içerebilir. Sıvı kromatografisinin en önemli bileşeni, ayrılmanın gerçekleştiği yüksek performanslı kolondur. Tipik kolonlar 3-25 cm uzunluğunda 2-5 mm paslanmaz çelik borudan yapılır, ancak daha büyük çaplı kolonlar (örneğin, 60 cm) gelişmiş dedektörler (MS veya Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi gibi) gerektiren uygulamalar için daha küçük çaplı "mikro delik" kolonları (1 mm) kullanılır. Kolonlar SP'yi oluşturan küçük (3–50 µm) parçacıklar ile doludur. Bu SP'ler çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Kromatografik teori, SP partiküllerinin boyutu küçüldükçe kolon performansının iyileşeceğini öne sürer. Bu nedenle daha küçük partiküller içeren kolonlara doğru bir eğilim meydana gelmiştir. Bunun ötesinde bu küçük parçacıkları sıkıştırmanın çok zor olduğu ve 2 ya da 3 µm çapta bir sınıra ulaşır. Daha iyi performans üreten daha küçük çaplarda hızlı analiz için daha yüksek basınçlar gerektirir ve bu durum, yaygın olarak ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) olarak bilinen HPLC'nin bir sürümünü ortaya çıkartmıştır. UHPLC kolonları mevcut teknolojinin sınırlarında çalışır, ancak kullanımda en verimli olanlar bu sıkıştırılmış kolonlardır (Miller, 2003).

HPLC dedektörleri, çoğunlukla spektroskopik olan mevcut tespit sistemlerinden uyarlanmıştır. En yaygın olanı, klasik UV / Vis absorpsiyon spektrofotometresine dayanan dedektördür. UV / Vis absorpsiyon dedektörleri en popüler LC dedektörleri arasındadır, çünkü organik bileşiklerin çoğu 190-700 nm dalga boyunda absorpsiyon verirler. Bu dalga boyları arasında absorpsiyon vermeyen organik bileşikler ise absorbe edici türler oluşturmak için kimyasal olarak reaksiyona girebilirler. UV / Vis dedektörleri için minimum saptama sınırı  $10^{-9}$  gramdır. UV / Vis dedektörleri üç tiptir:

- Sadece bir dalga boyunda (genellikle 254 veya 280 nm, burada organik bileşiklerin büyük bir yüzdesi en azından bir miktar absorpsiyon gösterir) çalışan sabit dalga boyu dedektörleri.
- 190 ila 700 nm arasında seçilen herhangi bir dalga boyunda çalışan değişken dalga boyu dedektörleri.



- 190 ila 700 nm arasındaki tüm dalga boyu bölgesini izleyebilen fotodiyot dizisi (PDA) dedektörleri (Miller, J.M., 2003).

Floresans dedektörleri UV / Vis dedektörlerinden daha spesifiktir, çünkü ışığı emen tüm bileşikler daha sonra floresanlaşmaz. Floresan dedektörleri tahribatsızdır ve yaklaşık  $10^{-10}$  g algılama sınırlarına sahiptir (Miller, 2003). Birkaç elektrokimyasal dedektör (ECD) mevcuttur. Biri, iki elektrot arasına alternatif bir voltaj uygulayarak ve ortaya çıkan akımı ölçerek LC elüentinin elektrik iletkenliğini ölçer. İletkenlik akım-gerilim oranı ile ilişkilidir ve çözeltilerdeki tüm iyonların tek eşdeğer iletkenliklerinin katkısını temsil eder. Bir diğeri prensip olarak amperometriktir ve analitin kimyasal dönüşümüne neden olur. Amperometrik dedektörün başlıca avantajları hassasiyet ( $10^{-12}$  g) ve seçiciliktir (Miller, J.M., 2003).

Kullanılan diğeri dedektörlerden biri de kırılma indisi (RI) dedektörüdür. RI neredeyse tüm analitlere cevap verir ve minimum saptama sınırı  $10^{-6}$  gramdır. Ayrıca GC'de olduğu gibi MS, HPLC ile kullanılacak en güçlü ve kullanışlı dedektörlerden biridir (Miller, J.M., 2003).

### **1.6.3. Sıvı-Katı Kromatografisi (LSC)**

Ayırma mekanizması esas olarak adsorpsiyon olduğu için LSC'ye adsorpsiyon kromatografisi de denir. Çeşitli LC modlarının en eskisidir ve Tsweet tarafından kullanılan yöntemdir. En çok organik maddelerin ayrılması için kullanılır. Polar SP'yi (silika veya alümina) polar olmayan veya hafif polar MP (örn. Heptan, heksan veya pentan ile, muhtemelen metilen klorür, kloroform veya izopropanol gibi daha polar bir çözücü ile karıştırılır) birleştirir. Yaygın olarak kullanılan bu çözücülerdeki değişken eser miktarda su, stabilite ve tekrarlanabilirlik ile ilgili büyük sorunlar ortaya çıkartmıştır ve bu nedenle yöntem popülerliğini kaybetmiştir (Miller, 2003).

### **1.6.4. İyon Değişimi Kromatografisi (IEC) ve İyon Kromatografisi (IC)**

İyon kromatografisi (IC) ve iyon değişim kromatografisi (IEC), inorganik ve organik iyonik bileşiklerin ayrılması için kullanılır. IEC, sulu, iyon içeren MP'ler kullanılarak yüzeyde iyonik bölgelere sahip SP'ler üzerinde gerçekleştirilir. Kolonlar, yüzeyleri belirli uygulamalar için kimyasal olarak modifiye edilen küçük (5-25  $\mu$ m) polistiren-divinilbenzen reçinesi parçacıkları veya (daha az yaygın) silika ile doldurulur. IC'de yaygın olarak

kullanılan MP'ler, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat karışımları ve oksalik asit, sitrik gibi organik asit karışımlarının seyreltik sulu çözeltileridir. Bu kromatografi yöntemleriyle  $10^{-6}$  g kadar küçük miktarlar analiz edilebilir (Miller, 2003).

### **1.6.5. İnce Tabaka Kromatografisi ( TLC)**

Şimdiye kadar bahsettiğimiz kromatografik sınıflandırma tekniklerin çoğu kolon kullanılarak gerçekleştirilir. İstisna, düzlemsel bir alanda gerçekleşen, kağıt kromatografisi (PC) ve ince tabaka kromatografisine (TLC) olmak üzere iki teknikten oluşan ince tabaka kromatografisidir. PC eski bir tekniktir ve yerini büyük ölçüde TLC'ye bırakmıştır. Klasik TLC'de SP, kare bir cam plaka gibi düzlemsel bir yüzeye dağıtılır ve numuneler, bir pipet veya bir göz damlalığı kullanılarak plakanın bir kenarına noktalar olarak uygulanır. Plaka daha sonra bir çözücü haznesine daldırılır ve kılcal kuvvetlerin bir sonucu olarak SP'den MP akışı meydana gelir. Numunedeki bileşenler plaka yüzeyine uzamsal olarak ayrılır ve kömürleşme, kimyasal boyama, UV / Vis yansıtma, radyografik veya flüoresan teknikleri ile tespit edilir. TLC'de ayırma için fiziksel ve kimyasal mekanizmalar, modern sütun LC'dekilerle aynıdır, ancak MP'nin kuru bir yatakta hareket etmesi ve akışın kontrol edilmemesi nedeniyle bazı küçük farklılıklar ortaya çıkar. En yaygın kullanılan SP silika jeldir. TLC için bazı enstrümantal ve otomatik yöntemler geliştirilmiştir. Ayrıca numuneyi plakaya uygulamak için yeni teknikler de elde edilebilecek çözümlülükleri önemli ölçüde geliştirmiştir. Densitometri, UV / Vis absorbanansı ve flüoresans gibi kromatogramları kaydetmek için kullanılan enstrümantal yöntemler, analiz için gereken süreyi azaltırken,  $10^{-12}$  g kadar düşük saptama sınırları sağlar (Miller, 2003).

### **1.6.6. Kütle Spektroskopisi (MS)**

Daha önce bahsedilen spektroskopik dedektörlerin yanında kütle spektroskopisi (MS) en önemlisi olarak nitelenebilir. MS ile, bilinmeyen bir bileşiğin moleküler ağırlığını ve moleküler formülünü belirlemek mümkündür (Miller, 2003). Modern bir kütle spektrometresi tipik olarak en az bir iyon kaynağı, bir kütle analizörü, bir dedektör ve bir yazıcıya sahip bir bilgisayar içerecek bir cihazdır. İyon kaynağı gaz fazında iyon üretmek için kullanılır, kütle analizörü iyonları m / z oranına göre ayırır ve dedektör her m / z oranı

için iyonları sayar. Bilgisayar verileri analizörden (m / z) ve dedektörden (yoğunluk) kütle spektrumunda dönüştürür. Ek olarak, kütle spektrometresi ile numuneyi doğrudan veya bir ayırma cihazı vasıtasıyla tanıtmak için (örn. gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi veya kapiler elektroforez) bir cihaz gereklidir (De Hoffmann, E., 2005). MS dedektörü kromatografi cihazlarıyla birleştirilebilir. Böyle durumlarda bu cihaz –MS olarak ifade edilir (örn. GC-MS, LC-MS gibi ).

### 1.6.7. Kolon Kromatografisi

İlk olarak bir numunenin bölümlerini asetonitril ve pridin ile art arda yıkamak üzerine bir kolon kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir (Kandiyoti vd., 2017). Bu yöntemde kolonda kalan numunenin yürütülmesi için N-metil prolidon (NPL) kullanılmıştır (Islas, C.A., 2001; Islas vd., 2003b; Suelves vd., 2001a). Bu yöntem numune bölümlerinin kantitatif analizine, gelecek analizler için yeterli malzemeyi sağlamaya ve 1 grama kadar numunelerin ayrılmasına imkan verir. Fakat bu yöntemde %10 civarında bir örnek kaybı meydana gelir ve sabit faz olarak kullanılan silika jel yürütmeden sonra renkli halde kalması nedeniyle farklı analizlerde kullanılamamasına neden olabilir. Daha sonraki çalışmalarla birlikte bu yönteme pentan ve toluen ilave edilmiştir (Kandiyoti vd., 2017).

### 1.7. Önceki Çalışmalar

Brian ve arkadaşlarının 1956' da depolanan elmalarda çürümelere neden olan küfün *Penicillium expansum* olduğunu tespit etmişlerdir. Bunlardan elde edilen meyve sularında yapmış oldukları patulin analizinde 600 -1000 mg/ L aralığında patulin tespit etmişlerdir. Buradan elma depolarında en fazla *Penicillium expansum* küf türünün bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada 0 °C depolanan elmalardan izole edilen *Penicillium expansum* küfleri elmalara aşılansarak 25 °C plastik torbalarda inkübasyona tabi tutulmuştur. Aşılansan eşmalarda 9-146 mg/kg aralığında patulin tespit edilmiştir (Wilson ve Nuvo, 1973).

Doğal olarak dökülen ve ilkel şartlarda depolansan ve çürüyen elmalardan yapılan bir çalışmada üretilen meyve sularında patulin analizi yapılmıştır. 0-240 µg/mL konsantrasyonunda patulin bulunmuştur. Bu elmalarda sadece *Penicillium expansum* tespit edilmiştir (Harwig vd., 1973). Elma, armut, üzüm, trabzon hurması gibi farklı meyve türlerinden elde edilen *Penicillium expansum* ile aşılansan elmalar 23 °C 10 gün süreyle

Golden Delicious elmaları inkibasyona tabi tutulmuştur. İnce tabaka ile yapılan analizlerde patulin miktarları 2-125 µg/g oranlarında patulin bulmuşlardır. Aynı çalışmada yapay sıvı besi yerinde havalı ortamda üretilen (pateto dekstroz buyyon) *Penicillium expansum* küfünden 15-950 µg/mL civarında patulin tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada 0 °C çürüyen elmalardan elde edilen *Penicillium expansum* küfü ile elma, armut, kiraz, kayısı, şeftali ve erik örnekleri aşılansarak 0 °C, 2.2 °C, 5.0 °C ve 20.0 °C’ de inkibasyona tabi tutulmuştur. Elmalarda 300 µg/g, erikte 10 µg/g, kiraz, kayısı, şeftali ve armutta 20-130 µg/g civarında patulin tespit etmişlerdir. Artan sıcaklıkla beraber patulin miktarında artığını bulmuşlardır. Hatta *Penicillium expansum*’un -3 °C ve -2 °C sıcaklarda geliştiğini tespit etmişlerdir (Sommer vd., 1974a; Sommer vd. 1974b).

*Penicillium expansum* ve *Penicillium patulunum* şuşları ile farklı elma çeşitleri kullanılarak farklı sıcaklık ve sürelerde yapılan çalışmada küf suşuna, sıcaklığa ve süreye bağlı olarak patulin miktarının değiştiği tespit edilmiştir. Çürümüş elmalardan yeni izole edilen küflerin daha fazla çürümeye sebep olduklarını tespit etmişlerdir. Yine 0.6 °C de havalı koşullarda yapılan çalışmalarda kontrollü atmosfer % 1 CO<sub>2</sub>, % 3 O<sub>2</sub> ve % 96 N<sub>2</sub> oranında yapılan çalışmada havalı koşullardan daha fazla patulin oluştuğu tespit edilmiştir (Lovett vd., 1975)

Özçelik tarafından Niğde, Amasya ve Erzincan İllerinde üretilen önemli elma çeşitlerinde mikrobiyal bozulmalar ve bozulan elmalarda patulin oluşumu konulu doktora tezinde farklı illerden toplanan farklı elma çeşitlerine saf *Penicillium expansum* aşılansarak patulin oluşumu incelenmiştir. Patulin miktarı analizi TLC ile yapılmıştır. Yapılan çalışmada Niğde ilinden alınan farklı elmalarda 56 -209 µg/g civarında, Amasya ilinden alınan örneklerde 56 -105 µg/g ve Erzincan ilinden alınan elma çeşitlerinde 51- 182 µg/g civarında patulin bulunmuştur. Yapılan çalışmada *Penicillium expansum* HPB 050576’ nın % 3 oranında ayrı ayrı glukoz, fruktoz ve sakkaroz içeren Czapek-Dox sıvı besiyerinde oluşturduğu patulin sırasıyla 1408.75 µg/mg misel, 542.9 µg/mg misel ve 4.4 µg/mg misel olarak bulmuştur. Patulin oluşumunda glikoz ve fruktoz oranının etkili olduğunu tespit etmiştir. Aynı şekilde yüksek oranda fruktoz ve glikoz içeren elmalarda patulin miktarının yüksek olduğunu tespit etmiştir ( Özçelik, 1979).

## 1.8. Çalışmanın Amacı

Mikotoksinler; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi mantar (küf) cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etkiler oluşturmaktadırlar. Mikotoksinleri üreten mantarlar rüzgar ve hava akımlarıyla taşınarak her yerde (atmosferin çeşitli katmanları da dahil) bulunabilirler. Mikotoksin kontaminasyon düzeyi iklim koşullarına, ürünün cinsine ve coğrafi konuma bağlı olarak mevsimden mevsime, yıldan yıla farklılık gösterebilir. Hem sağlık hemde tarımsal açıdan önemli olan bu maddelerin MRL Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar tebliğinde verilmiştir. Bu nedenle bu metabolitlerin üretim esnasında, ihracat esnasında, ithalat esnasında ve rutin Bakanlık denetimlerinde TGK uygunluğu değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme ise üründe bulunan µg/kg birim toksin olarak yapılmaktadır. Örneklerin analizlerinde, µg/kg olarak sonuç verilebilmesi için mutlaka saf analitik toksin standart kimyasallarının kullanılması gerekmektedir. Analiz esnasında kantitatif analiz sonucunun verilebilmesi için cihazların analitik saflıkta mikotoksin standartları ile kalibre edilmesi gerekmektedir. Bu analitik standartlar ülkemizde üretilmeyip ithal edilmektedir. Bu standartlar tahmini olarak 100 den fazla özel ve resmi gıda kontrol laboratuvarı, 100 çeşide yakın gıda maddesi üreten (fındık, antep fıstığı, konsantre meyve suları, baharat vs ) işletmeler tarafından kullanılmaktadır. Bu standartların, konsantrasyonları ve ekonomik değerleri birlikte düşünüldüğünde liste fiyatlarıyla toplamda 1.952 Amerikan Dolar'ına kadar ulaşabilmektedir. Bu standart maddelerin fiyatları müşteriye teslimine kadar olan süreçte, liste fiyatlarına ek olarak vergi ve diğer kalemlerin eklenmesiyle en az 5.000 Amerikan Dolar'ına ulaşmaktadır. Yıllık bazda bunları ortalama 150 analizci ve üretici satın aldığında yaklaşık maliyeti 750.000 Amerikan Dolar'ını bulmaktadır. Mikotoksin standartlarının üretilmesi gerçekleştirilerek ithalatın önüne geçilecek olması, yerli üretimin yapılmış olması, standartların ithalatı esnasında oluşan zaman problem ortadan kalkması, daha az maliyetle üretimi yapılacak bu şekilde dışa bağımlılık ortadan kalkacak olması söz konusu bu tezin amacıdır. Bu çalışma, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde limiti bulunan ve mikotoksin analizlerinde kullanımı zorunlu olan patulinin analitik standardının, ülkemizdeki farklı tarımsal ve / veya diğer yerli kaynaklardan izole edilen toksijenik küf izolatlarından eldesini sağlayacaktır. Mikotoksinleri ürettiği bilinen toksijenik suşlar ülkemizde yer alan tarımsal ve / veya diğer yerli kaynaklardan izole edilmesi, izole edilen suşların tanımlanması ve karakterizasyonu

yapılması, karakterize edilen suşların toksin üretme kapasiteleri belirlenmesi tezin amaçları arasındadır.

### **1.9. Çalışmanın Kapsamı**

Önerilen tezin konusu Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde limiti bulunan ve mikotoksin analizlerinde kullanımı zorunlu olan patulin analitik standardının üretilmesi ile ilgilidir. Tez kapsam olarak elma, armut gibi meyvelerden Patulin üreten örneğin *P.patulum*, *P. Expansum* küflerin izole edilmesi bunların tanımlanmasını, tanımlanması yapılan küflerin Patulin üretme kapasitelerinin tespit edilmesini, üretilen Patulinin saf olarak izolasyonunu, daha sonrada analitik standart haline getirilmesini içermektedir. Tezin amacı bir ithalat kalemi olan patulin standardının ülkemizde üretilmesidir. Bu durum tezin kapsamının ifade edildiği üst kısmında ki amaç ile ilişkilidir. Kapsam olarak patulin üreten küflerin tespiti, bu türlerin toksin kapasitesinin ortaya konması, üretimi yapılan patulinin saf olarak izolasyonunun yapılması, analitik standart olarak hazırlanması, stabilite test parametrelerini içermektedir. Küfler doğal yollarla elde edileceklerinden burada bir sorun ile karşılaşma olmayacaktır. İzolasyondan sonra tekrar patulin üretimi esnasında küçük problemlerle karşılaşılabilir. Bunlar da çözüme kavuşturulabilecek niteliktedirler.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Yapılan çalışmalar esnasında Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümü araştırma laboratuvarı ile Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Merkezindeki laboratuvarındaki cihazlardan yararlanılmıştır.

#### 2.1.1. Cihazlar

- Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) Thermo Finigan marka
- UV lamba (254 nm ve 365 nm) Cole Palmer marka
- Rotary Evaporatör Heidolph marka
- İnkubatör DAIHAN Scientific ThermoStable IG marka
- Terazi Ohaus marka
- Santrafuj Nüve marka
- 35 x 600 mm 29/32 şifli ve musluklu kolon norm cam marka (hava regülatörlü)
- Tüp Karıştırıcı Heidolph marka
- Muhtelif hacimlerde pistonlu pipetler
- 200 x 200 mm CAMAG TLC cam tank
- 100 x 120 mm TLC cam tank
- Otoklav DAIHAN Scientific marka
- Laminer Flow
- Vorteks karıştırıcı.
- Pastör pipeti. Yaklaşık 23 cm.
- Cam tüpler. 120 Teflon astarlı vidalı kapakları olan 150 mm ve 16 adet 150 mm tek kullanımlık cam kültürü tüpleri.
- Santrifuj tüpleri. 25 mL konik taban; polipropilen veya cam.
- Hacimsel pipet. 5 mL, cam.
- Isıtma bloğu veya su banyosu.  $40 \pm 1$  ° C.
- Enjeksiyon sistemi. 50 L döngülü enjektör yükleme enjeksiyon valfi.
- Sıvı kromatografik (LC) pompa. 1,0 mL / dak.

- LC kolonu. Her iki kolon da kullanılabilir: (1) 3.9 250 mm, 5 m, 100 A, C18, uç başlıksız, karbon yükü% 16; (2) 3,9 150 mm, 5 m, 90 A, kapaksız, C18, karbon yükü% 10. Kolonu% 80 asetonitril-su.
- UV dedektörü. D2 veya Xe lambası için 276 nm'de ve Hg lambası için 254 nm'de ayarlanan.
- Hacimsel şişeler. 1, 10 ve 25 mL.

### 2.1.2. Kimyasallar ve Besi Yerleri

- Etilasetat (  $\text{CH}_3\text{COOCH}_3$ ) Isolab marka
- N-Hekzan ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) Merck marka
- Asetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) HPLC Gradient Grade Merck marka
- Sodyumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) analitik saflıkta Merck marka
- Malt Ekstrakt Agar
- Czapek Yeast Ekstrak Agar

Kullanılan çözeltiler HPLC garident grade ve analitik saflıktadır.

### 2.2. Elma Örneklerinin Toplama Çalışmaları

Bu çalışma için 2018 yılı hasat zamanında Erzincan ve Gümüşhane ilinde çeşitli bahçelerden ve yerli elma satışı yapan yerlerdeki (39.804882, 39.407524 Yalnızbağ / Erzincan, Merkez / Erzincan ve 40.525131, 39.393161 İkisü Köprüsü Tufaniye, 29100 İkisü / Gümüşhane, Merkez / Gümüşhane ) Göbek, Misket, Amasya, Satsuma, Bey-1, Sarı Hıdır, Demir, Ekşi-1, Bey-2, Ekşi-2 mahalli elma (*Malus communis* L.) çeşitlerinden küflü ve çürümüş olanlardan farklı yerden gözlemlenen farklı küf türlerden belirlenen alanlardan, her türü temsil edecek şekilde şekil 2.1' de görüldüğü gibi çürümeye başlamış elmalardan 4 kg olarak toplandı. Toplanan örnekler laboratuvar ortamına getirildi. Üstte belirtilen cinslerden elmalar çürümeye başladıkları için bahçe sahiplerinin ve satıcıların beyanlarına göre alınmış oldu.



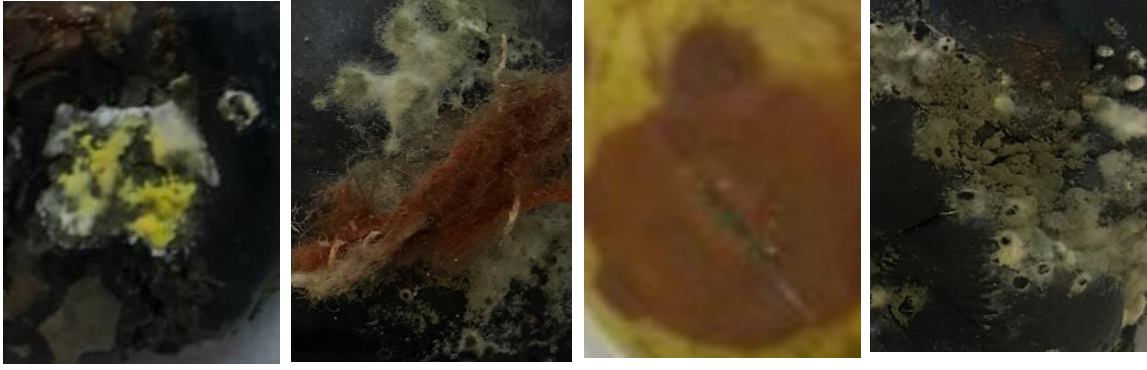


Şekil 2.1. Toplanan çürümüş elmalar

### 2.3. İzolasyonu Yapılacak Olan Küf Türlerinin Belirlenmesi

Küfler tipik bir hasat sonrası patojendir çünkü 0 ° C'nin altında bile enfeksiyon oluşturabilir. Çürüme soğuk depolama sıcaklıklarında yavaş ilerlese de, meyve ılık bir sıcaklığa aktarıldığında hızlı gelişme sağlanır. Örneğin *Penicillium expansum* optimal büyüme koşulları, 25 ila 35 ° C arasında değişen sıcaklıklar ve geniş bir pH 2 ila 10 aralığıdır. Bu tür için bildirilen minimum sıcaklık -3 ° C'dir. 0.82 ila 0.95 arasında değişen su aktivitesi miselyum gelişimi için idealdir, spor oluşumu için minimum su aktivitesi (aw) 0.85'tir (Ostry ve ark., 2004). *Penicillium expansum* düşük sıcaklıklarda iyi büyür ve 37 ° C'de oldukça zayıftır. Düşük su aktivitelerinde ve düşük pH değerlerinde de iyi büyür (Frisvad vd., 2000). Hem oldukça asidik hem de alkali koşulları tolere eder ve psikroleranttır.

Toplamış olduğum elmalar hemen hasat sonrası olduğu için izole ettiğim küfler normal hava koşullarında gelişen ve çalışmış olduğum elma örneklerine bulaşmış olan küflerdi. Bu örnekler üzerinde bulunan küflerin izolasyonları ilk bakışta oluşturdukları renklere göre yapıldı. Şekil 2.2' de görüldüğü gibi sarımsı, yeşilimsi, beyaz, kırmızımsı, pembe, siyah ve gri olanlar seçildi.



Şekil 2.2. Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki küfler

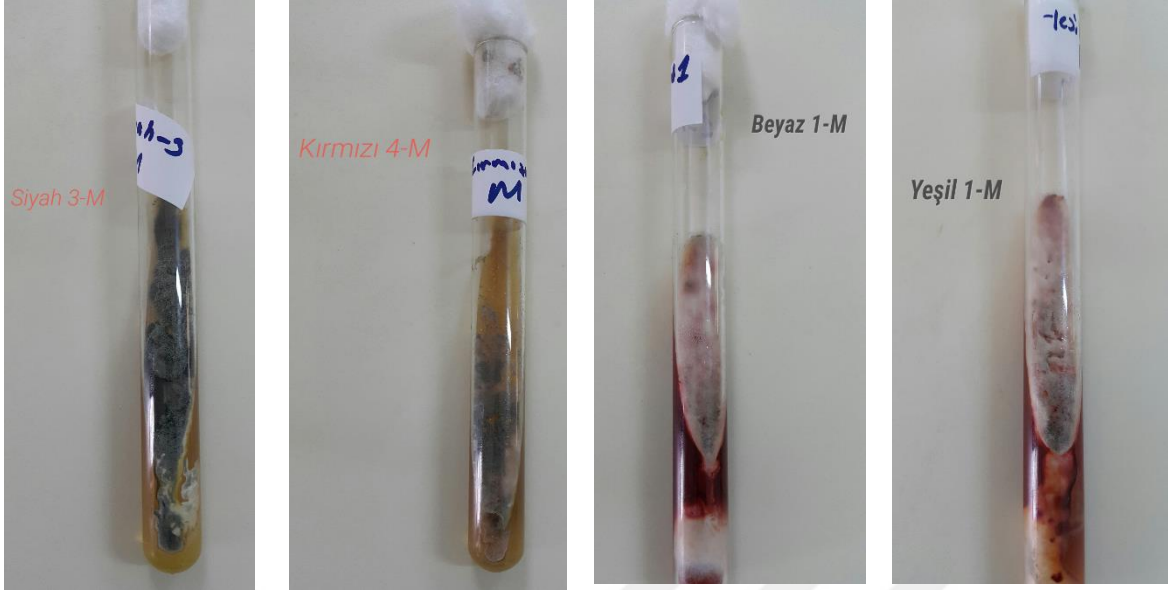
#### 2.4. Besi Yerlerinin Hazırlanması

Malt Ekstrakt Agardan 48 g tartılarak 1000 mL saf suda çözülerek 65 °C su banyosunda çözüldü ve pH 5.60 ayarlandı. pH sı ayarlanan malt ekstrakt agar 16x100 mm tüplere 10 ml hacimde kondu ve ağızları pamuk ile kapatıldı.

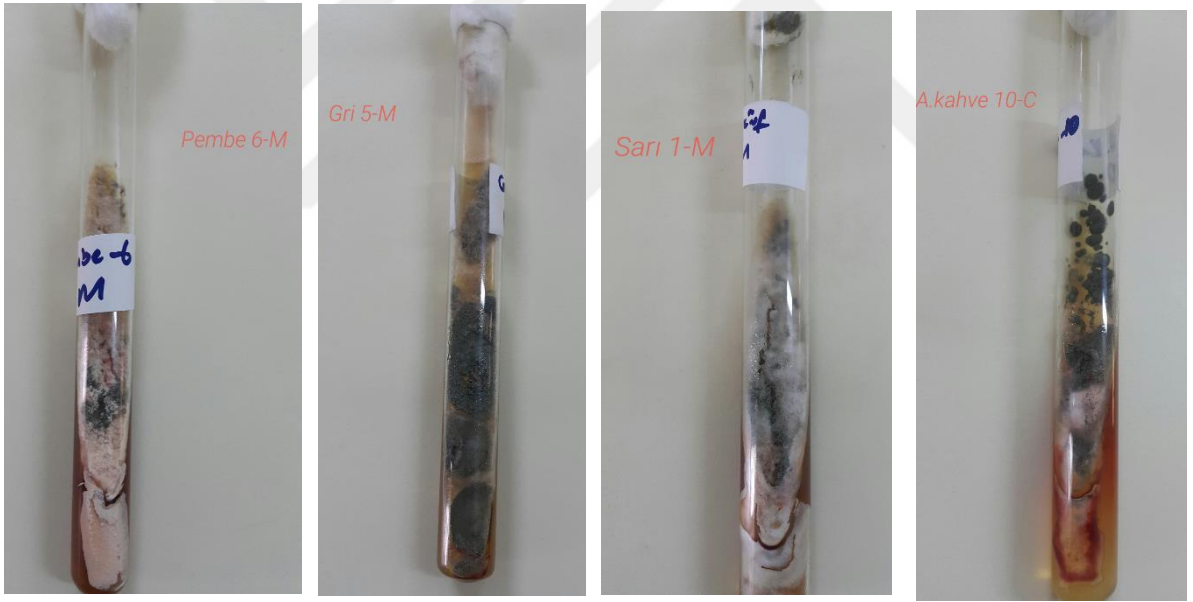
Czapek Yeast Ekstrakt Agardan 51.6 g tartılarak 1000 mL saf suda çözülerek 65 °C su banyosunda çözüldü ve pH 6.20 ayarlandı. pH sı ayarlanan Czapek Yeast Ekstrakt 16 x100 mm tüplere 10 ml hacimde kondu ve ağızları pamuk ile kapatıldı. Her bir besi yerinden 100 adet tüp elde edildi. Tüpler tel sepetlere yerleştirilerek otoklavda 121 °C 15 dk. sterilize edildi. Agar dolu tüplerin sıcaklıkları 90 °C' ye düşünce besi yerinin tüpteki yüzeyi 45 derece açılı olacak biçimde yatırılarak donması sağlandı. Donan besi yerleri küflerin izolasyonuna kadar buzdolabında steril şartlarda saklandı.

#### 2.5. Çürümüş Elmalardan Küflerin İzolasyon Çalışmaları

Başlık 2.3.'de belirtildiği üzere çürümüş farklı elma türlerindeki farklı renklerdeki küfler bir öze yardımıyla laminar flow kabin içinde yatık besi yerlerine aşılama yapıldı. Tüp sporlara ekimleri yapılan yatık agarlar yerleştirildi. 25 °C inkibatörde 5 gün süre ile tutuldu.

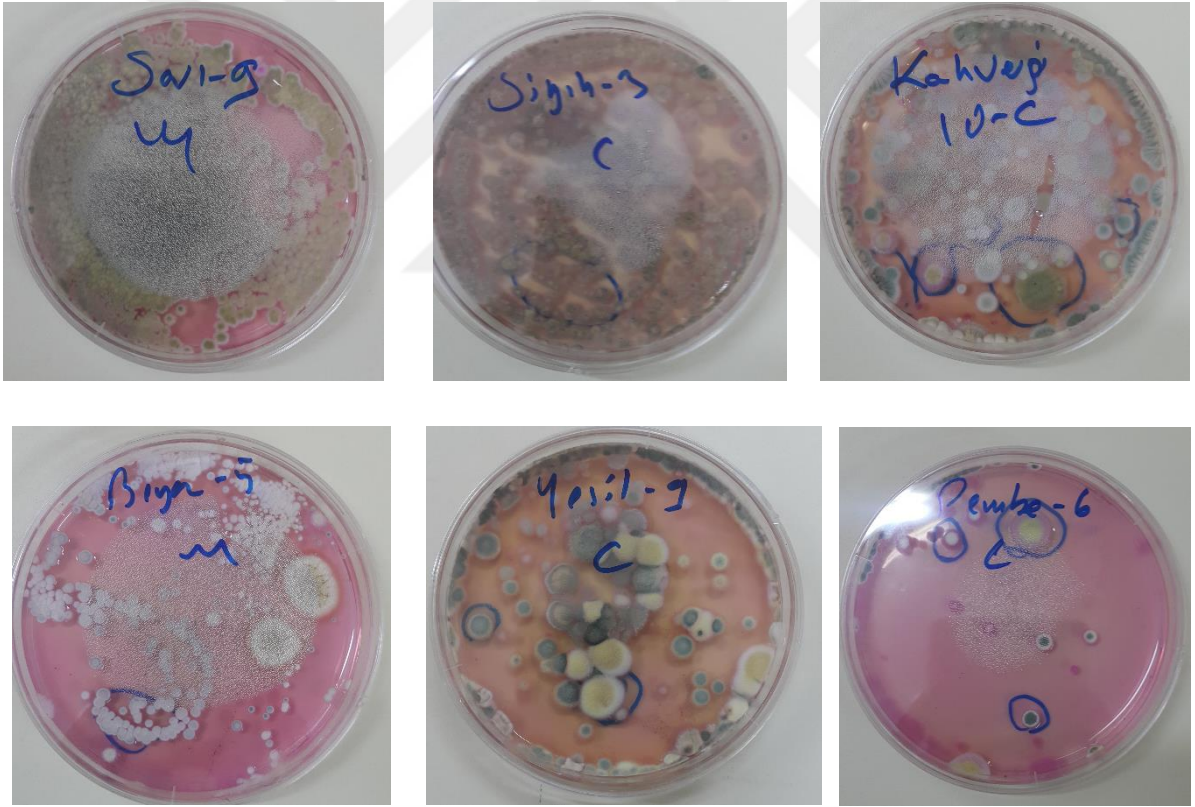


Şekil 2.3. Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki küfler



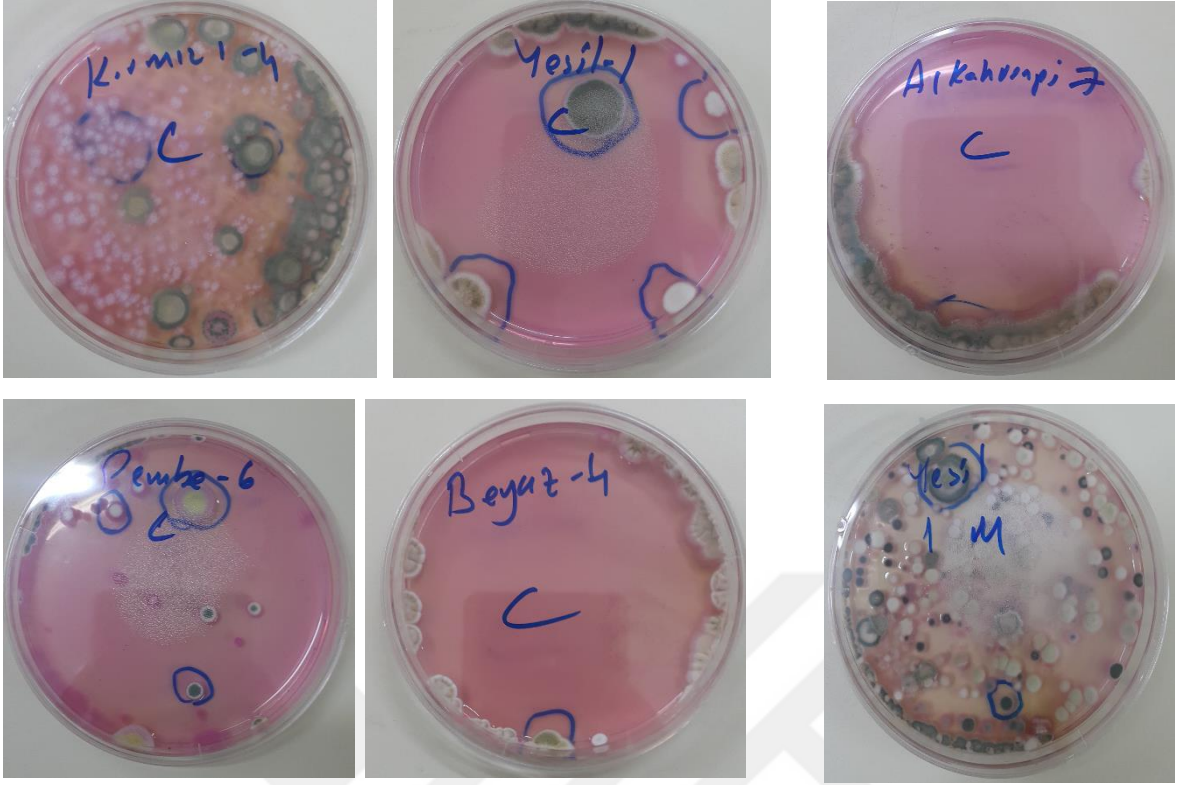
Şekil 2.4. Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki yatık agardaki küfler

Üreme olan yatık agarlara 5 ml peptolu su ilave edildi ve vortekste karıştırıldı. Sıvı kısımdan 1 mL alınarak steril petri kutularına kondu. Üzerlerine 15 mL besi yerlerinin (Malt ekstrak agar ve Czapek yeast extract agar) hazırlanması kısmında belirtildiği gibi 250 mL erlenlere hazırlanan her iki besi yerinden ilave edildi. Petri kutularının homojen olması için iyice karıştırıldı. Petri kutuları 25 °C inkubatörde 5 gün süre ile tutuldu. Üreme gerçekleşen besi yerlerinden farklı renk, şekil ve biçimdeki küf kolonilerinden daha saf şekilde elde etmek için tüplerde bulunan yatık her iki besi yerine öze yardımıyla çizilerek ekimleri yapıldı. Aynı şekilde 25 °C inkubatörde 5 gün süre ile tutuldu. Bu şekilde daha saf küf elde etmek için işlem petri kutularında 4 defa daha tekrarlandı. Bu şekilde farklı renk ve şekilde küfler saf olarak elde edilmeye çalışıldı.



Şekil 2.5. Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki agardaki küflerden görüntüler





Şekil 2.6. Elmalar üzerindeki farklı renklerdeki agardaki küfler

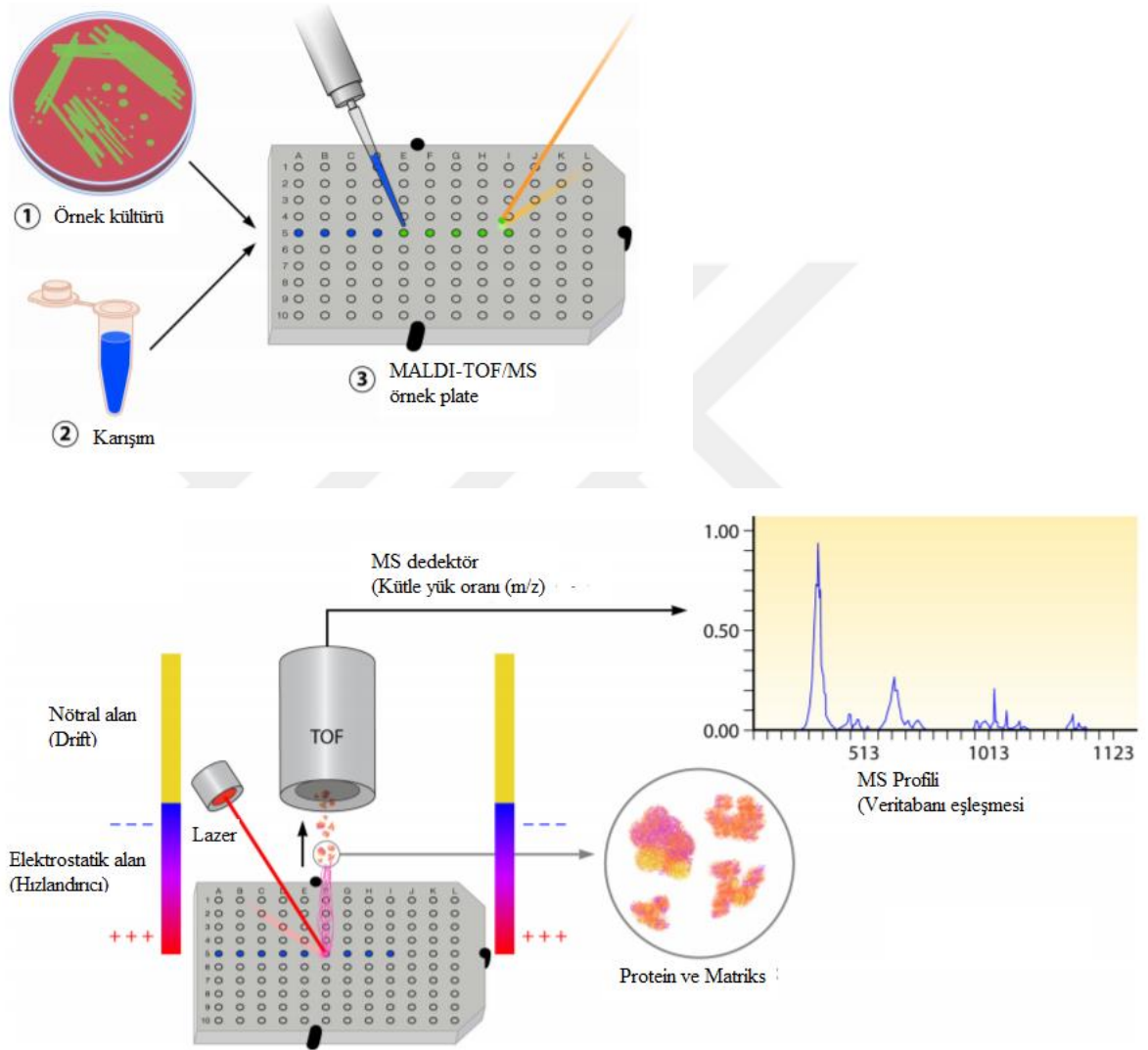
Malt ekstrakt agar ve Czapek yeast extract agarlardan tek şekilde koloni elde edilmek suretiyle saf hale getirilen küfler hem temiz elmalara aşılama işlemi yapılincaya kadar, hem de teşhis çalışmaları yapılincaya kadar zaman zaman yatık malt ekstrakt agarda yenilenerek 25 °C de aktif halde tutuldular.

İzole edilen küfler daha sonra 2.6'da ve 2.7'de belirtilen işlemlerin yapılmasında kullanıldılar.

## 2.6. İzole Edilen Küflerin Teşhis Çalışması

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde hizmet verilmekte olan, Matrix asisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Mikroorganizma Tanımlama cihazında etanol formik asit ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen proteinler, protein parmak izi eşleşmesi şeklinde kütüphane taraması yapılarak mikorganizmaların (bakteri, maya ve fungus) tanısı ortaya konulmaktadır. Cihazın flex kontrol yazılım programı (Biotyper 3.0; Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile elde edilen spektrumlar, Maldi Biotyper

Real-Time Classification (RTC) yazılımı ile karşılaştırılarak tanı işlemi sürdürülmüştür. Analiz sonucunda, 1.700-3.000 arasında sarı/yeşil renkli olarak belirlenen veriler, güvenilir skor değeri olarak kabul edilmektedir. (Kara ve ark., 2017; Uysal ve ark., 2018).



Şekil 2.7. MALDI-TOF/MS analizi şeması (Clark vd., 2013)

Elmalardan izole edilen küfler PDA besiyerine aktarıldı. 1.5 ml'lik eppendorf tüplerinin her birine 50 µl trifluoroasetik asit ilave edildi. Üzerine 10 µl'lik plastik steril özenin tamamını kaplayacak şekilde alınan küfün sporlarından eklendi ve tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Analizin şematik görünümü şekil 2.7'de verilmiştir. Bu şekilde 30 dakika beklendi. Daha sonra bu karışımın üzerine 450 µl DNase ve RNasefree su eklenip tüp

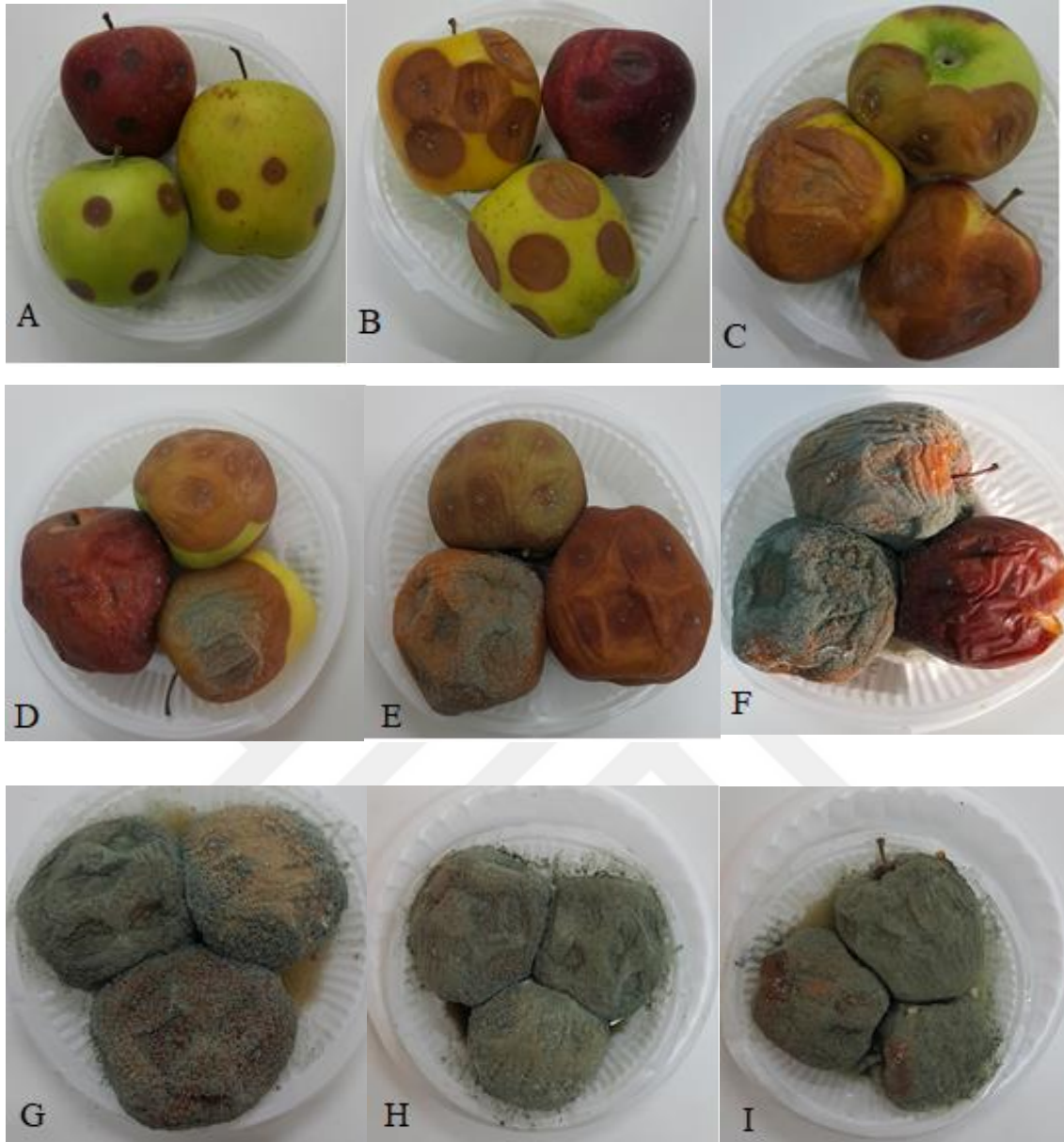
karıştırıcısında karıştırıldı. Cihaz için tasarlanmış 48 bölümlük test plağına her 16 bölümün ortasındaki bölüme pasajlanmış E. coli ATCC 8739 standart suşu bölüm dışına taşırılmayarak ince bir film tabakası oluşturacak şekilde yayıldı. Sonra diğer 48'lik bölüme her bir izolat için taze hazırlanan karışımlardan 1'er µl eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan her bir bölümün üzerine matriks çözeltisi olarak 1µL VITEK MS-CHCA (=α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi ve tekrar oda sıcaklığında kurutuldu. Plağın cihaza yüklenmesinin ardından, MALDI-TOF MS kütle spektrumlarında peptit ve protein profili iyi bilinen, taze pasajlanmış E. coli ATCC 8739 standart suşu kullanılarak cihazın otomatik kalibrasyonu ve kontrolü yapıldıktan sonra değerlendirilme başladı. Plak üzerinde yer alan 9 örnek toplu olarak çalışıldı. Çalışmamızda Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Merkezinde MALDI-TOF MS sistemi olarak VITEK MS (Biomérieux, France) ticari sistemi kullanıldı. Ölçümler üretici firmanın önerdiği ayarlar ile yapıldı. Tüm izolatlardan elde edilen spektrumlar önce güncel IVD (invitrodiagnostik) VITEK MS V.2.0 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

## **2.7. İzole Edilen Küflerin Sağlam Elmalara Aşılması**

Saf olarak izole edilen küfler yıkanmış ve silinmiş sağlam elmalara bir öze yardımıyla 7-8 farklı yerine batırmak suretiyle aşılmaları yapıldı. Aşılana temiz yerli elmalar (Kırmızı ve yeşil göbek elması, sarı demir elması) laboratuvar ortamında yaklaşık 60 gün süreyle küf üremesi ve elmaların durumları takip edildi. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi elmalara aşılana küflerin bir hafta aralıklı gelişimleri fotoğraflandı.

Tamamen küf üreyen elmalar aynı zamanda çürümeye başladı. Tamamen çürüyen elmalar steril poşetlere konularak buz dolabında steril şartlarda diğer patulin analizi yapıncaya kadar saklandı.

Çalışma esnasında laboratuvar ortamın sıcaklığı ve nem oranı takip edildi. Ortalama olarak sıcaklık  $20 \pm 3$  °C nem ise  $\% 43 \pm 5$  olarak kayıtları tutuldu. Şekil 2.7 de verilen A 7 günlük, B 14 günlük, C 21 günlük, D 28 günlük, E 35 günlük, F 42 günlük G 49 günlük, H 56 günlük ve I 63 günlük küf gelişimleridir. 60 günlük bir süreçte elmalar tamamem çürümüştür.



Şekil 2.8. Küflerle aşılanan elmaların 60 günlük gelişim durumları

### 2.8. Aşılanan Elmaların Farklı Küf Türlerine Göre Patulin Miktarlarının Analizlerinin Yapılması

Bu çalışmada analiz metodu olarak AOAC 995.10 kullanıldı. Bu metodun prensibi Patulin, etil asetat ve  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi ile özümleme yoluyla izole edilir. Ekstrakt içerisinde su susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile kurutulup etil asetatın buharlaştırılmasından sonra patulinin, HPLC-UV ile ters fazlı LC kolon kullanılarak tespit edilmesi ilkesine dayanır.



### 2.8.1. Reaktifler

- a) Etil asetat HPLC gradient garde saflıkta
- b) Sodyum karbonat çözeltisi.% 1,5. 1.5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (analitik saflıkta) 100 mL deiyonize  $\text{H}_2\text{O}$  içinde çözündürülür.
- c) LC mobil fazlar (1) 250 mm C18 kolonu için. Ayırma veya alkoyma süresini azaltmak için gerektiğinde çeşitli miktarlarda asetonitril (% 10'a kadar) mobil faz. Kullanmadan önce mobil fazı 0,45 m filtreden geçirilmiş.
- d) Asetik asit çözeltisi.  $\text{H}_2\text{O}$ , asetik asit (analitik saflıkta) ile pH 4'e ayarlanmıştır.
- (e) Patulin standart stok çözeltisi (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). 25 mg volümetrik şişeye yaklaşık 5 mg saf kristalin patulin tartılır, ağırlık kaydedilir ve patulin etil asetat içinde çözülür. Hacmi etil asetat ile seyreltilir. 2–5 ° C'de buzdolabında Alimiyyum folyo içine sıkıca sarılmış patulin standart stok çözeltisi içeren şişe saklanır. Çözelti yaklaşık 1 ay stabildir. 250  $\mu\text{L}$  çözeltiyi 5 mL hacimsel şişeye pipetleyin ve  $\text{N}_2$  altında kuruyana kadar buharlaştırın. Hemen mutlak alkol ekleyin, karıştırın ve mutlak alkol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ile hacme kadar seyreltin.
- f) Patulin standart çalışma çözeltileri. 5, 10, 25 ve 50  $\mu\text{g}$  patulin/mL enjeksiyonuna karşılık gelen 0.1, 0.2, 0.5 ve 1.0  $\mu\text{g}$  patulin / mL asetik asit çözeltisi hazırlamak için 100  $\mu\text{L}$  patulin standart stok çözeltisini (e) 10 mL hacimsel şişeye aktarıldı. Oda sıcaklığında  $\text{N}_2$  akışı altında sadece kuruyana kadar buharlaştırıldı. Hemen asetik asit çözeltisi (d) ile hacme seyreltildi ve iyice karıştırıldı. 1 mL hacimsel şişeleri ayırmak için 50, 100, 250 ve 500  $\mu\text{L}$ 'lik kısımları aktarıldı ve asetik asit çözeltisi ile hacme kadar seyreltildi. Alümiyüm folyoya sarılı patulin çalışma standart çözeltilerini 2-5 ° C'de buzdolabında saklandı.
- g) Sodyum sülfat. Reaktif sınıf, susuz granül veya toz.
- h) 5– (Hidroksimetil) furfural (HMF) çözeltisi. - 5 mg 25 mL etil asetatta çözündürülür.

### 2.8.2. Test Çözeltisinin Hazırlanması

[Not: Tüm cam eşyalar, özellikle patulin tayini için daha önce kullanılmışsa, kullanımdan önce organik çözücü (örn., Etil asetat) ve deiyonize  $\text{H}_2\text{O}$  ile temizlenmelidir.] Tüketim için tavsiye edildiği gibi seyreltilmiş 5 gr olarak elde edilen konsantre numune 20x150 mm cam tüpüne pipetlendi, 10 mL etil asetat ekledi ve Vortex mikseri kullanarak 1 dakika kuvvetlice çalkalandı. Katmanlar ayrıldı ve Pasteur pipetini kullanarak üst organik tabakayı 16x150 mm cam kültür tüpüne aktarıldı. Orijinal 20x150 mm tüpe ikinci 10 mL

porsiyon etil asetat eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. Katmanları ayrıldı ve iki organik katmanı 16x150 mm'lik tüpte birleştirildi. Birleştirilen etil asetat katmanlarına 2 mL % 1.5'lük Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edildi ve tüp Vortex mikseri üzerinde kuvvetlice karıştırıldı. Katmanları ayrıldı. Pasteur pipetini kullanarak tüpü temizlemek için üst kısımdaki etil asetat katmanını aktarıldı ve alt kısımdaki sulu katmanı 5 mL etil asetatla ekstrakte edildi. İlk ekstrakt ile tüpe üst kısımdaki etil asetat tabakası aktarıldı. Alttaki sulu tabaka atıldı. Etil asetat tabakasına 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklendi, tüp sıkıca kapatıldı. Tüp 30 saniye kadar kuvvetlice ters çevrildi ve sallandı. (Not: Etil asetat özütünün susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutulması önemlidir. Islak etil asetat özütü kuruyana kadar buharlaştırıldığında patulin bozulabilir.) Ekstrakt, konik tabanlı 25 mL polipropilene veya cam tüpe kondu. Tüpü 40 ° C'de ısıtma bloğuna yerleştirildi ve N<sub>2</sub> akışı altında 1–2 mL'ye kadar buharlaştırıldı. Tortu 1 mL asetik asit çözeltisi içinde çözündürüldü ve LC tayini için kullanıldı.

### 2.8.3. HPLC-UV Tayini

HPLC akış hızı 0,5 mL / dakikaya ayarlandı. UV detektörünü 276 nm'ye ve duyarlılığı 0.02 absorbans ünitesi tam ölçeğine (AUFS) veya dedektör ve kayıt sistemi için patulin çalışma standart çözeltisi 0.5 g / mL için % 50 tam ölçekli sapma elde etmek için uygun olarak ayarlandı.

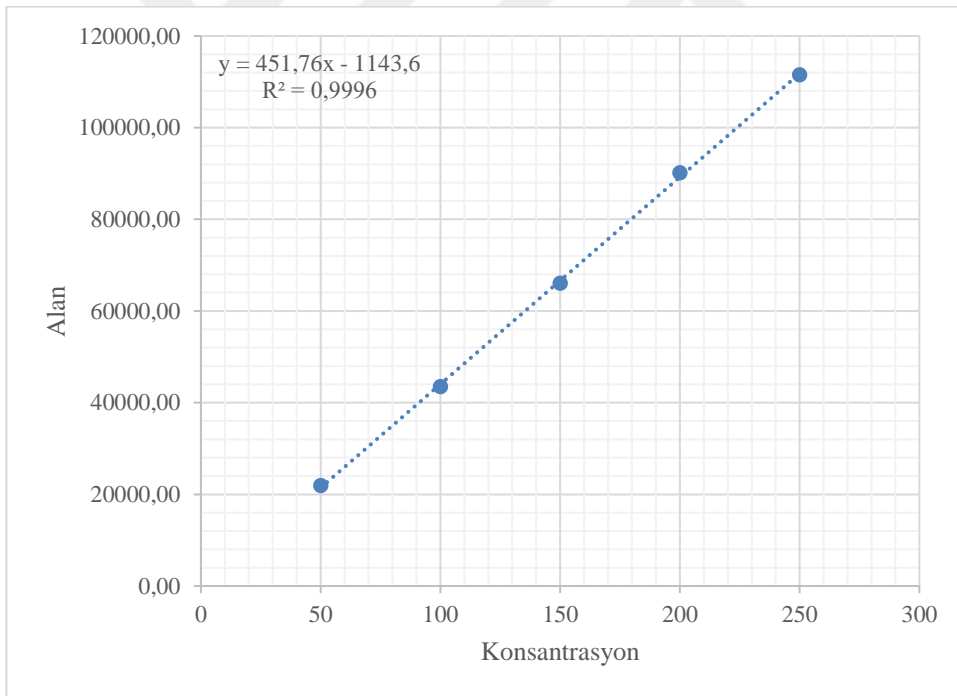
LC kolon performansını değerlendirmek için 100 µL patulin standart stok çözeltisini ve 100 µL HMF çözeltisini 10 mL hacimsel şişeye aktarıldı, çözücüyü N<sub>2</sub> akışı altında oda sıcaklığında buharlaştırıldı ve tortu asetik asit çözeltisi ile 2.5 mL hacme seyreltildi. Enjeksiyon döngüsünün tamamen dolu olduğundan emin olmak için 20 µL fazlalık kullanarak LC kolonuna 50 µL HMF-patulin çözeltisi enjekte edildi. Mobil faz olarak Asetonitril-H<sub>2</sub>O ile 250 mm kolon kullanıldığında, HMF ve patulin, sırasıyla gelmiş olduğu dakika içinde taban çizgisi ayrımı ile 2 ayrı tepe noktası tam olarak ayrıldı. HMF ve patulin tamamen ayrılmazsa, analiz için farklı bir sütun seçilmelidir. HMF ve patulin ayrımı sağlanmadıkça analiz yapılamaz. Standart çözeltinin her birine 50 µL enjekte edildi. Yüksek pozitif test çözeltilerinin enjeksiyonunu takiben mobil faz enjekte edildi. Kayıt cihazından ölçülen tepe yüksekliklerini kullanarak, patulin çalışma standart çözeltilerinin konsantrasyonlarına karşı alanlar çizerek standart eğri hazırlandı. Örnekler cihaza verilerek okumaları yapıldı. Örneklere ait HPLC kromotogramları ek şekil 6.1.-6.44. ' de verilmiştir.

#### 2.8.4. Hesaplamalar

Numunedeki ( $\mu\text{g} / \text{kg}$ ) patulin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi kullanılarak aşağıdaki gibi hesaplandı  $y = ax - b$  ( $y = 451,76x - 1143,6$ ). Kalibrasyon eğrisi şekil 2.9' da verilmiştir.

$$\text{Patulin } (\mu\text{g/kg}) = \left( \frac{y+b}{a} \right) xF \quad (2.1)$$

Burada y miktar tayini yapılacak örneğin LC'nin vermiş olduğu alan. B, y kesen, a, kalibrasyon eğrisi sabiti, F = seyreltme faktörü.



Şekil 2.9. Kalibrasyon eğrisi

## **2.9. Kf Türlerinin Patulin Kapasitelerinin İncelenmesi**

Altmış günlük süre sonunda elde edilen kflendirilmiş elmalar blender yardımıyla homojen hale getirildiler. Homojen numunelerden 5 g örnek tarılarak 2.8’de belirtildiği biçimde analizleri yapıldı.

## **2.10. Patulin Ekstraksiyonu**

Sağlam elmalara bulaştırılarak çürütülmesi sonucunda elde edilen çürütülmüş kütleden 100 g’lık miktarda tartım yapıldı. 200 mL saf su ilave edilerek 5 dk 3600 rpm’ de blenderde karıştırıldı. Süzgeç kağıdından szld. Süzüntüye 100 mL’ lik Etilasetat ile ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi yapıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Elde edilen ekstraktlarda kalan suyun kurutulması için 5 g susuz sodyum sülfat ilave edildi. Evaporatörde yaklaşık 5 mL kalıncaya kadar evapore edildi. Elde edilen kalıntıdan patulin elde edilmesi için kolon kromatografisi safhasına geçildi.

## **2.11. Basıncılı Kolon Kromatografisi İle Patulin Saflaştırma alışmaları**

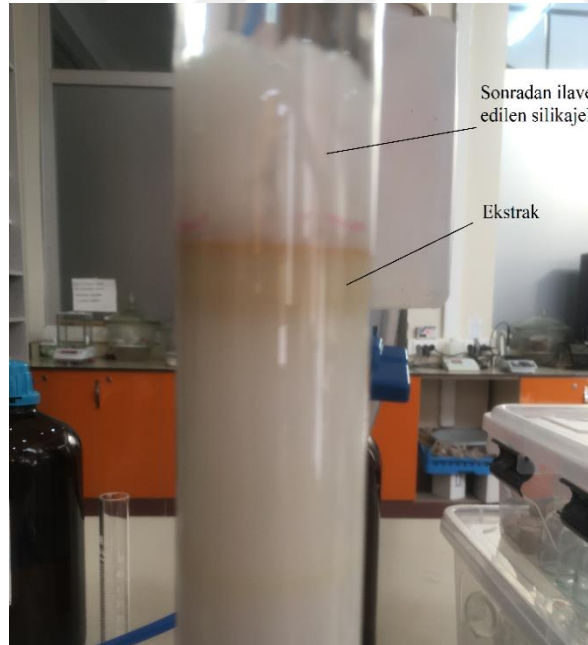
Madde 2.8’ de çürümüş kütleden ekstrakte edilen ekstrakt yaklaşık 5 mL hacime getirildi. Ayrım için; Şekil 2.10’ da görülen 35 x 600 mm uzunluğunda musluklu, 29/32 Őilifli, dakikada 1.5 mL akış sağlayacak hava basıncı sağlayan regülatör ve bunun bağlı olduğu hava komporasr olan cam kolon kullanıldı. Cam kolonda bulunan sinterlenmiş cam disk ile donatılmış olarak borosilikat 3.3 camın üstü silikajelin geçmemesi için cam pamuğu kondu.

Yaklaşık 25 g civarında Silikajel 60 F254 100 ml hekzan içinde tamamen karıştırılarak kolona ilave edildi. Silikajel yksekligi 180 mm olacak biçimde ayarlandı. Silikajelin tamamen oturması için dakikada 1.5 mL akış olacak Şekilde toplamda 300 mL Hekzan geçirildi. Tamamen oturan silikajelin yksekligi 180 mm’ ye ayarlandı. Silikajelin st kısmında 20 mm hekzan olacak biçimde bırakıldı. 2.8’ de anlatıldığı biçimde yaklaşık 5 mL kalacak biçimde evaporatörde buharlaştırıldı. Ekstraktan 2.5 mL kolona dikkatli biçimde yüklendi. Bir miktar akış sağlanarak ekstraktın silikajele geçmesi sağlandı. zerine hareketli faz ilave edildiği zaman ekstraktın silikajelin üzerinde bulunan hareketli faza geçmesini engellemek için 25 mm yseklik olacak biçimde kuru silikajel ilave edilerek

üzerine hemen 40 mm olacak biçimde Hekzan ilave edilerek musluk açıldı. Sonradan ilave edilen silikajelin şekil 2.11 görüldüğü gibi tamamen oturması sağlandı.



Şekil 2.10. Kolon Kromatografisi



Şekil 2.11. Kolon Kromatografisi ekstraktın yüklenmesi

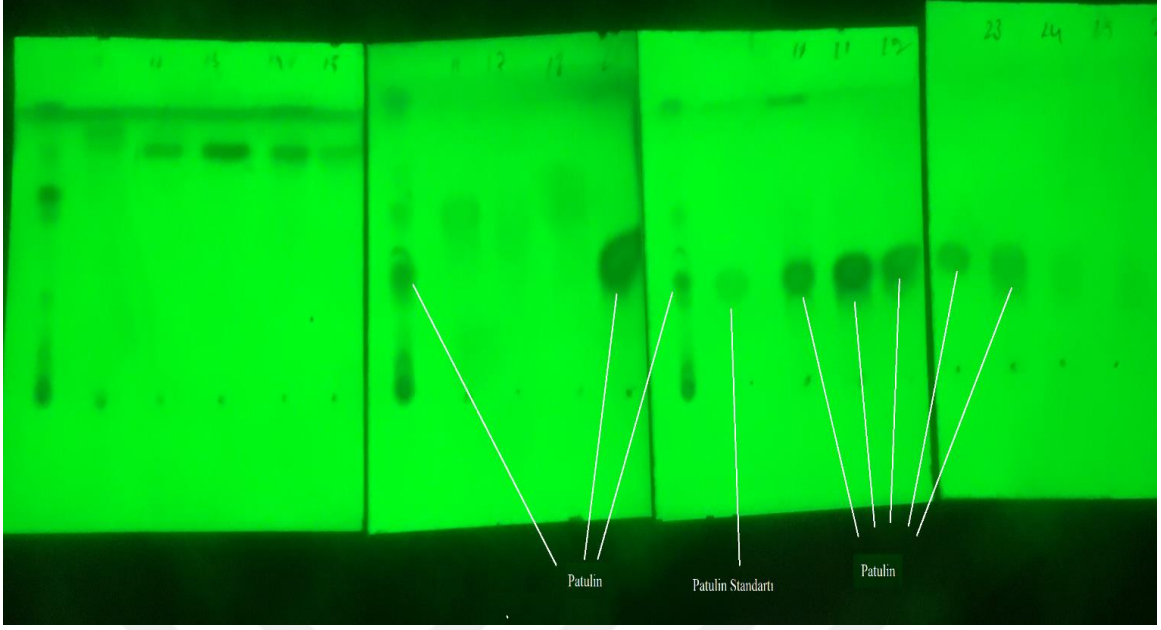
Silikajel üzerindeki hekzan yaklaşık 20 mm seviyeye geldiğinde kolona 250 mL %75 Hekzan - %25 Etilasetat ilave edildi. İlk 100 ml ekstrakt kontrol edilerek atıldı ve ilk 100 mL'

den sonra Şekil 2.12' de görüldüğü gibi 25 mL' lik cam toplama kaplarına 20 mL ekstrak toplandı. Daha sonra kolona 250 mL %50 Hekzan - %50 Etilasetat ilave edilerek 20 mL' lik hacimde ekstraklar toplanmaya devam edildi. Tekrar 250 mL daha 250 mL %50 Hekzan-%50 Etilasetat ilave edilerek toplamda 70 adet ekstrak toplandı. Elde edilen ekstraklar TLC ile kontrol edildi. TLC ile kontrol sonucunda 19, 20, 21, 22, 23 ve 24 nolu kaplarda Patulinin geldiği tespit edildi.



Şekil 2.12. Kolon kromatografisi uygulaması sonucu elde edilen ekstraktlar

Şekil 2.12' de görüldüğü gibi elde edilen 19-24 nolu ekstraktlar birleştirilerek vakum evaporatörde buharlaştırılıp tekrar TLC ile kontrol edildi. Şekil 2.13 ' de görüldüğü gibi bir miktar safsızlık tespit edildi. Tekrar saflaştırmak için kolon kromatografisi uygulandı.



Şekil 2.13. Kolon kromatografisi uygulaması sonucu elde edilen ekstraktlar

Yapılan çalışmada 19-24 nolu ekstraktlar birleştirilmişti. Toplanan ekstraktlar vakum evaparatörde buharlaştırıldı. Tekrar kolon kromatografisi uygulandı.

### **3. BULGULAR VE TARTIŞMA**

#### **3.1 Genel**

Kalibrasyon standartları analitik sürecin anahtarıdır. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılırlar ve kalibrasyon eğrisi ne kadar iyi olursa, elde edilecek olan veriler o kadar iyi olur. Bir standardizasyonun doğruluğu, standart hazırlamak için kullanılan reaktiflerin ve cam eşyaların kalitesine bağlıdır. Örneğin, asit-baz titrasyonunda, analit miktarı, analit ile titrant arasındaki kimyasal reaksiyonun stokiometri tarafından analizde kullanılan mutlak titrant miktarıyla ilişkilidir. Kullanılan titrant miktarı sinyalin (titrant hacmi olan) ürünü ve titrant konsantrasyonudur. Bu nedenle, bir titrimetrik analizin doğruluğu, titrant konsantrasyonunun bilindiği hassasiyetten daha iyi olamaz.

Küresel Analitik Standartlar Pazarı, 2019 yılında 1.16 milyar ABD Doları değerinde olup, 2025 yılına kadar 2.00 milyar ABD Dolarına ulaşarak 2017-2025 yılları arasında % 6.28'lik bir oranda büyüyeceği öngörülmektedir. Analitik standartları, dünya çapında bir çok kuruluş tarafından kullanılabilir olduğu test edilen kimyasal değerler ve özelliklerdir.

#### **3.2. Küflerin Tanılama Sonuçlarının Değerlendirmesi**

Bulaşıcı aspegilos ve diğer fungal enfeksiyonlar yüzünden oluşan ölümlerde gecikmiş ve doğru olmayan teşhis potansiyel bir risk faktörüdür. Gelişme şeklinin çeşitliliği ve standart bir aşı üretiminin zorluğu küfleri bakteri ve mayalardan daha zor bir tespit etme durumu ortaya koyar. Moleküler yöntemler yapılan çalışmalarda örneklerinin lizis ve PCR inhibisyonu ile ilgili zorluklarla ilgili sınırlamalar yaşandığından dolayı küflerin fenotipik tanımlanmasında tecrübeli ve yetenekli mikolojiler gerektirir ki bunlar tüm laboratuvarlarda bulunmazlar. Buna ilaveten, fenotipik tanımlama yavaş ve uğraştırıcıdır, birçok tür fenotipik olarak benzerdir, ancak genotipik olarak farklı veya hastalığa neden olma eğilimlerinde farklıdır. Bu nedenle, bu organizmaların tanımlanması için analizci tarafından minimum numune hazırlama ve analiz gerektiren hızlı bir mekanizma daha uygun görülmektedir. MALDI-TOF MS potansiyel olarak bu boşluğu doldurmak için kullanılmaktadır (Santos vd., 2010).



Günümüzde, matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş süresi (MALDI-TOF) kütle spektrometresi (MS), mikrobiyolojik çalışmalarda, türler bazında bitki ile ilişkili mantar, bakteri ve mayaların tanımlanmasında güncel tanımlama tekniklerine doğru bir alternatif sunan, hızlı, kullanımını kolay başarılı bir analitik teknik olarak kabul edilmiştir. MALDI-TOF MS tarafından yapılan mikroorganizma analiz prosedürleri teknik olarak basit ve hızlıdır. Ayrıca, geniş bir yelpazedeki önemli mikroorganizmaların tanımlanması için tekrarlanabilir ve ticari veri tabanları mevcuttur. MALDI-TOF MS, doğrudan bozulmamış bakteri, mantar ve mayadan spesifik peptidleri veya proteinleri analiz eder (Chalupová vd., 2014; Carolis vd., 2012).

Tablo 3.1. Sonuçlara genel bakış

Analit İsmi	Analit Kodu	Organizma (En iyi eşleşen)	Skor Değeri	Organizma (İkinci en iyi eşleşen)	Skor Değeri
<u>A1</u> (-)(C)	K-45	<i>Penicillium italicum</i>	<u>1.771</u>	<i>Penicillium digitatum</i>	<u>1.746</u>
<u>A2</u> (++)(B)	K-43	<i>Penicillium expansum</i>	<u>2.075</u>	<i>Penicillium italicum</i>	<u>2.028</u>
<u>A3</u> (+)(B)	K-42	<i>Penicillium digitatum</i>	<u>1.811</u>	<i>Penicillium digitatum</i>	<u>1.736</u>
<u>A4</u> (+++)(A)	K-1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<u>2.305</u>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<u>2.23</u>
<u>A5</u> (+)(B)	K-34	<i>Penicillium expansum</i>	<u>1.763</u>	<i>Penicillium expansum</i>	<u>1.759</u>
<u>A6</u> (+)(B)	K-38	<i>Penicillium expansum</i>	<u>2.012</u>	<i>Penicillium expansum</i>	<u>2.000</u>
<u>A7</u> (++)(A)	K-26	<i>Penicillium digitatum</i>	<u>2.026</u>	<i>Penicillium italicum</i>	<u>1.923</u>
<u>A8</u> (+)(B)	K-40	<i>Penicillium expansum</i>	<u>1.829</u>	<i>Penicillium expansum</i>	<u>1.794</u>
<u>A9</u> (-)(C)	K-39	<i>Penicillium digitatum</i>	<u>1.794</u>	<i>Penicillium digitatum</i>	<u>1.765</u>

Hettick ve diğ. *Penicullum'* a ait 12 adet türü tanımlamak için MALDI-TOF MS kullandı. Hücrelerin kesintisiz analizinde sürekli zayıf spektrum oluştuğundan dolayı bozulma protokolü kullanıldı. Yapılan çalışmada conidia ve sporlar kültürlerden toplandı, cam boncuklu TFA-asetonitril ilave edilip, tüp karıştırıcısında karıştırılıp santrifüjlendi, elde edilen süpernat MALDI-TOF MS analizi için kullanılmıştır. Her ne kadar küçük bir izolat

koleksiyonu kullanılmış olsa da, spektral analiz ve standart yazılım yardımı olmadan kurum içinde yapıldı. Çalışmada bu koleksiyondaki *Penicillium* türleri % 100 doğrulukla tür seviyesine tanımlandı (Hettick vd., 2008).

Yapılan çalışmada doğal olarak elmalardan farklı renklerde izole ettiğim dokuz adet küf türü K1, K26, K34, K38, K39, K40, K42, K43 ve K45 olarak kodlanmıştı. Söz konusu küfler yatık agar, malt ekstrakt agar ve czapek yeast extract agar kullanılarak saf koloniler elde edildi. Elde edilen saf koloniler uygun koşullarda kargo ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezine (BİSAK) gönderildi. Tanımlamaları yaptırıldı. Tablo 3.1 ve tablo 3.3' de tanımlanan küf türleri verilmiştir.

Tablo 3.2. Puan değerlerinin anlamı

Aralık	Tanımlama	Sembol	Renk
2.300 ... 3.000	Yüksek olasılıklı tür tanımlaması	(+++)	Yeşil
2.000 ... 2.299	Güvenli cins tanımlaması, muhtemel tür tanımlaması	(++)	Yeşil
1.700 ... 1.999	Olası cins tanımlaması	(+)	Sarı
0.000 ... 1.699	Güvenilir olmayan tanımlama	(-)	Kırmızı

Gelen analiz sonuçları ve söz konusu laboratuvarın değerlendirme sonuçları tablo 3.1 ve 3.3'te verildi. Türlerin tanımlanması ile ilgili renk değerlendirmesi ve sayısal aralıklar tablo 3.2' de verilmiştir. Türlerin tutarlılığında en iyi eşleşme 'yeşil' olarak sınıflandırılmıştır. Tablo 3.1' de verildiği gibi diğer 'yeşil' eşleşme birinciyle aynı türdür. Yine aynı tabloda diğer 'sarı' eşleşmeler en azından birinciyle aynı cinstir. Cins kavramı, en iyi eşleşme 'yeşil' veya 'sarı' olarak sınıflandırılmaktadır tablo 3.1 diğer 'yeşil' veya 'sarı' eşleşmeler en azından birinciyle aynı cinse sahiptir. Kırmızı renk anlamı ne tür ne de cins tutarlılığı yok biçiminde değerlendirilmektedir.

Çalışmamda doğal olarak çürüyen elma türlerinden renklerine göre toplamda 9 adet küf izolasyonu yapıldı. Bunlar, K1, K26, K34, K38, K39, K40, K42, K43 ve K45 olarak kodlanmıştı ve kodlamalara göre küfler K-45 *Penicillium italicum*, K-43 *Penicillium*

*expansum*, K-42 *Penicillium digitatum*, K-1 *Penicillium chrysogenum*, K-34 *Penicillium expansum*, K-38 *Penicillium expansum*, K-26 *Penicillium digitatum*, K-40 *Penicillium expansum*, K-39 *Penicillium digitatum* olarak tablo 3.3' de verildiği gibi tanımlandı. Farklı kodlara sahip olan küflerin bazılarının benzer olduğu tespit edildi. K-45 *Penicillium italicum*, K-43, K-34, K-38, K-40 *Penicillium expansum*, K-26, K-42, K-39 *Penicillium digitatum*, K-1 *Penicillium chrysogenum* şeklinde 4 adet farklı küf türü tespit edilmiş oldu.

Tablo 3.3. İzole edilen küf türlerinin MALDI-TOF/MS analiz sonuçları

Örnek Kodu	Türler
K-1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
K-26	<i>Penicillium digitatum</i>
K-34	<i>Penicillium expansum</i>
K-38	<i>Penicillium expansum</i>
K-39	<i>Penicillium digitatum</i>
K-40	<i>Penicillium expansum</i>
K-42	<i>Penicillium digitatum</i>
K-43	<i>Penicillium expansum</i>
K-45	<i>Penicillium italicum</i>

### 3.3 Altmış Günlük Üreme Sonunda Elde Edilen Patulin Miktarları

Yapmış olduğum çalışmada dokuz adet farklı renklerdeki küfler kodlarına göre farklı elma türlerine aşılandı. Altmış günlük bekletmenin sonunda çürütülen her bir elma türü analizleri yapıldı. Analiz sonuçları tablo 3.4' de verilmiştir. Tablo 3.4' de elma türlerine ve küf türlerine göre oluşan patulin miktarı verilmiştir. Çalışmamda küf türlerinin tespit çalışması sonradan yapıldığından dokuz adet farklı tahmini küf türü ile patulin üretimi gerçekleştirildi. Ancak küf türlerinin tespit çalışması sonucunda dört adet *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* küf türü tespit edilmiş oldu. Tablo 3.4' e baktığımızda göndermiş olduğumuz dokuz adet bilinmeyen türeden dört tanesinin *Penicillium expansum* olduğu, üç tanesinin *Penicillium digitatum* olduğu ve kalan diğer birer izole edilen örneklerde *Penicillium italicum* ve *Penicillium chrysogenum* olarak tespit edildi.

Genel olarak değerlendirildiğinde yapmış olduğum çalışmada dokuz adet aşılama da tek tek bakıldığında *Penicillium expansum* en fazla 49.80 mg/kg patulin üretim yapmıştır. Bunu sırasıyla *Penicillium digitatum* 48.23 mg/kg, *Penicillium chrysogenum* 45.91 mg/kg ve *Penicillium italicum* 22.40 mg/kg miktarlarında ürettiği görüldü.

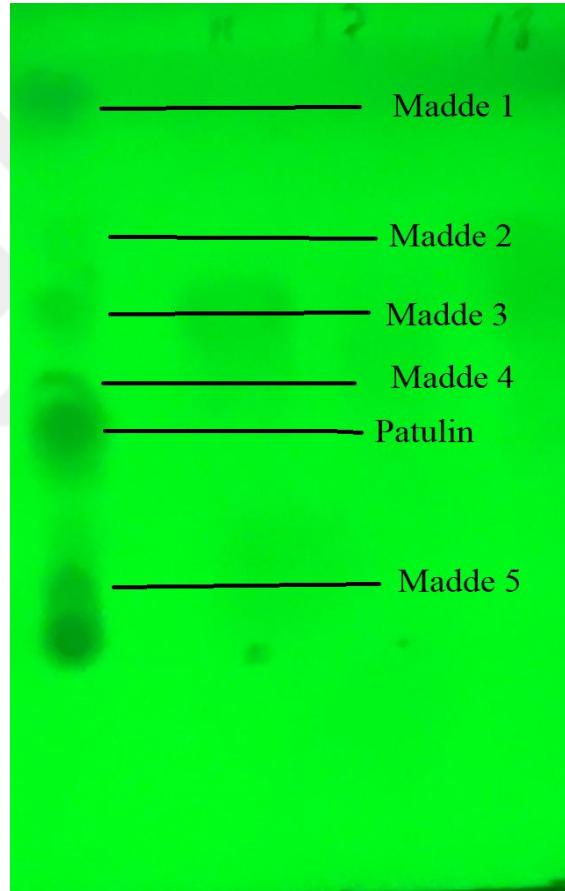
Tablo 3.4. İzole edilen küf türlerinin altmış günlük analiz sonuçları

Numune	A1	A2	A3	Patulin mg/Kg	SD
K-1 K	7623360	7599558	7611959	<b>13.48</b>	<b>0.02</b>
K-1 S	25999029	25894205	25874965	<b>45.91</b>	<b>0.12</b>
K-1 Y	14132665	14172559	14155096	<b>25.07</b>	<b>0.04</b>
K-26 K	4692083	4730939	4735746	<b>8.36</b>	<b>0,04</b>
K-26 S	6094569	6132311	6117350	<b>10.83</b>	<b>0,03</b>
K-26 Y	5360872	5354336	5339033	<b>9.48</b>	<b>0,02</b>
K-34 K	4296308	4273340	4273362	<b>7.58</b>	<b>0.02</b>
K-34 S	7110312	7099469	7120380	<b>12.59</b>	<b>0.02</b>
K-34 Y	7437348	7429616	7445202	<b>13.17</b>	<b>0.01</b>
K-38 K	9327292	9350734	9339013	<b>15.43</b>	<b>0.02</b>
K-38 S	8629689	8797307	8713498	<b>16.54</b>	<b>0.15</b>
K-38 Y	15795046	16079737	15937392	<b>28.22</b>	<b>0.25</b>
K-39 K	4943880	4666699	4642959	<b>8.42</b>	<b>0.30</b>
K-39 S	17777680	17734166	17790239	<b>31.47</b>	<b>0.05</b>
K-39 Y	27298094	27121569	27290756	<b>48.23</b>	<b>0.18</b>
K-40 K	13769146	13839556	13838413	<b>24.47</b>	<b>0.07</b>
K-40 S	27769146	27866255	28720942	<b>49.80</b>	<b>0.93</b>
K-40 Y	13842413	13859516	14053199	<b>24.65</b>	<b>0.21</b>
K-42 K	3373561	3431447	3378386	<b>6.01</b>	<b>0.06</b>
K-42 S	7232840	7235542	7237117	<b>12.81</b>	<b>0.00</b>
K-42 Y	5693348	5695487	5692345	<b>10.08</b>	<b>0.00</b>
K-43 K	22017715	23062393	22540054	<b>8.85</b>	<b>0.92</b>
K-43 S	5001871	4991525	4996698	<b>39.92</b>	<b>0.01</b>
K-43 Y	9221699	9254997	9238348	<b>16.36</b>	<b>0.03</b>
K-45 K	2496058	2791760	2643909	<b>4.68</b>	<b>0.26</b>
K-45 S	12644940	12645782	12645361	<b>22.40</b>	<b>0.00</b>
K-45 Y	4798261	4795896	4797079	<b>8.50</b>	<b>0.00</b>

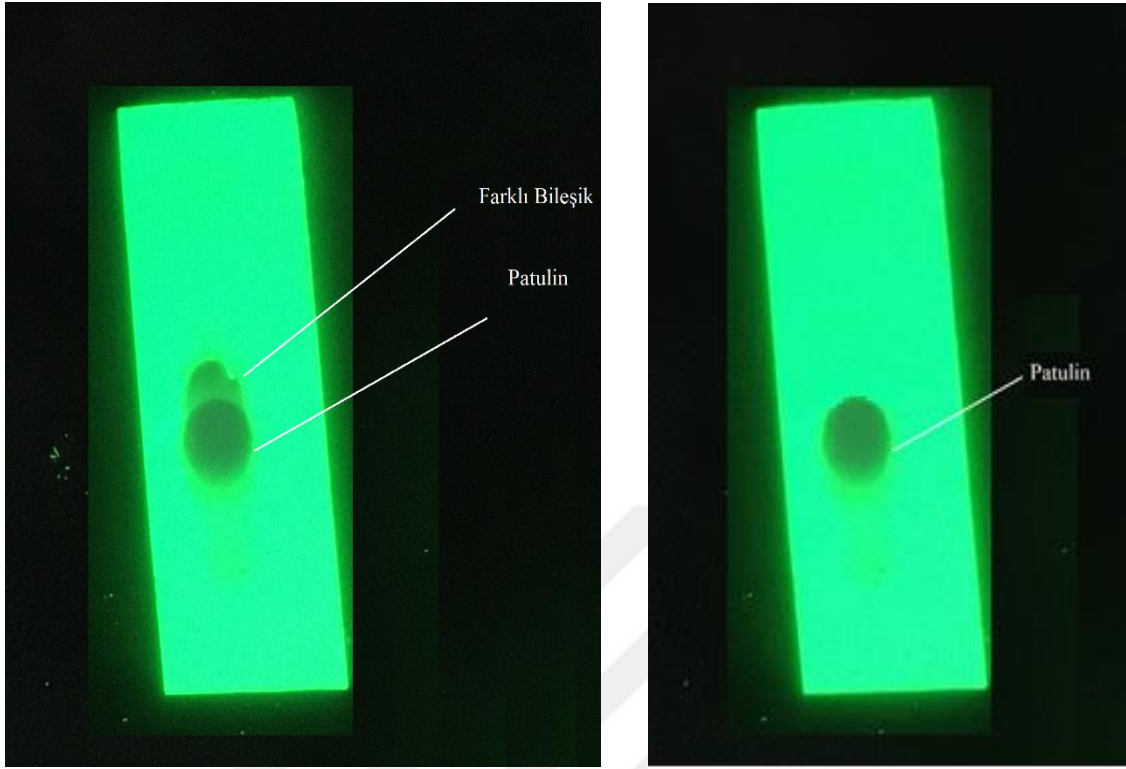
Farklı elma türlerine göre (kırmızı, sarı, yeşil) patulin üretimine bakıldığında genel olarak sırasıyla sarı > yeşil > kırmızı şeklinde olduğu görüldü. Fakat bazı durumlarda yeşil elmalarda patulin miktarının fazla olduğu görüldü. Genel olarak kırmızı elmalarda patulin miktarının düşük olduğu görüldü.

### 3.4. Üretimi Yapılan Patulin Standartına Ait Değerlendirmeler

Madde 2.10' da belirtilen şekilde patulin ekstraksiyonu yapıldıktan sonra etilasetat çözeltisi vakum evaporatörde dibinde yaklaşık 10 mL çözelti kalacak biçimde buharlaştırıldı. İçersinde bulunan patulin ve diğer maddeler hakkında fikir edinmek için TLC Silikajel 60 F<sub>254</sub> ile n-Hekzan-Etilasetat (50-50) ile TLC tankında yürütülerek kontrolü yapıldı. Ekstrakt içersinde şekil 3.1' de görüldüğü gibi patulin hariç beş adet madde olduğu tespit edildi.



Şekil 3.1. Etilasetat ile yapılan ekstraksiyon sonucu organik fazda bulunan maddeler



Şekil 3.2. Kolon kromatografisi uygulaması sonucu birleştirilen 19-24 nolu ekstraktlar

2.11' de belirtildiği biçimde kolon kromatografisi uygulanan örnekten toplamda 70 adet 20 mL civarında toplanmıştı. Bunların TLC ile yapılna kontrolünde 19-24 nolu kaplarda patulinin geldiği tespit edilmiştir. Daha sonra birleştirilen 19-24 nolu ekstraktlar tekrar vakum evaporatörde yaklaşık olarak 5 mL kalacak biçimde birleştirildi. TLC ile kontrolünde 2 adet maddenin kaldığı tespit edildi. Tekrar kolon kromatografisi ile patulin saf hale getirildi.

### **3.5. Üretimi Yapılan Patulin Standartından 100 µg/mL Asetonitril İçinde Hazırlanması**

Kolon kromatografisi ile elde edilen 40 mg patulin saflık analizi madde 2.8.4. belirtildiği biçimde HPLC-UV ile analiz yapıldı. Yapılan çalışmada konsantrasyonun  $\geq 98.0$  % üzerinde olduğu tespit edildi. Saflık analiz ile ilgili değerlendirmeler tablo 3.5'de verildi.

Tablo 3.5 . Üretime yapılan patulinin spesifikasyon analizi

<b>Analiz</b>	<b>Spesifikasyon</b>	<b>Sonuç</b>
Görünüm (Form)	Toz	Toz
Görünüm (Renk)	Beyazdan Beyaza ve Sarı Döküm	Beyaz
Çözünürlük ( Solvent)	Su	Su
Çözünürlük ( konsantrasyon)	9.8-10.2 mg/mL	10.00 mg/mL
Çözünürlük ( Turbidity)	Açık	Açık
Çözünürlük ( Renk)	Renksizden Soluk Sarıya	Renksiz
Su içeriği ( Karl Fischer ile)	≥ 0.00 %	0.21 %
Elemental Analiz	54.05 - 55.05 %	54.54 %
Saflık (HPLC)	≥ 98.0 %	98.8 %
Tanımlama NMR ile	Tutarlı	Yapı ile Tutarlı

Saf olarak elde edilen patulinden 25 mg tartımı yapılarak 10 mL kalibrasyon sertifikalı balon joje içersinde HPLC gradient garade asetonitril ile çözüldü. Elde edilen bu çözelti konsantrasyonu 2.5 mg/mL' dir. Hazırlanan bu ana stok çözülden 4000 µL alınarak tekrar 10 mL balon içersine alındı. Hazırlanan bu çözelti 100 µg/mL oldu. Bu şekilde tezin amacı olan analitik standart üretilmiş oldu. Bu standartın sertifikalı referans madde olarak tescillenmesi için TÜBİTAK ile görüşülmüş olup bunun için en az 2 yıllık bir süreç ve yüksek maliyet gerektirdiği için çalışma bu şekilde tamamlanmış oldu.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikotoksinleri önlemek için gösterilen uğraşılara rağmen, mikotoksinler gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde insan sağlığıyla ilgili hala önemli bir problem teşkil etmektedir. Geleneksel ve organik olarak yetiştirilmiş ve çürümüş elma örneklerinde oldukça yüksek miktarlarda patulin bulunmaktadır. Bu çürümüş elmaların işlenmesiyle üretilen elma sularındaki patulin derişimi çok yüksek seviye olabilmektedir. Patulin gelişmesinde muhtemelen en yaygın karşılaşılan türler olan *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssochlamys* cinsindeki bir dizi küf türü tarafından üretilen ikincil bir metabolittir. Patulin birçok küflü meyve, sebze, tahıl ve diğer gıdalarda bir kirletici olarak tespit edilmiştir. Başlıca bulaşma kaynakları elma ve elma ürünleridir. Patulin esas olarak küf hasarlı meyvelerde görülür. Ancak küf varlığı bir meyvede mutlaka patulinin bulunacağı anlamına gelmez fakat mevcut olabileceğini gösterir. Bazı durumlarda, küflerin iç büyümesi, böcek veya diğer sağlıklı doku istilalarından kaynaklanabilir.

Ülkemizde konuyla ilgili mevzuat olan Türk Gıda Kodeksi bulaşanlar yönetmeliğinde meyve suları, konsantreden üretilen meyve suyu ve meyve nektarlarında 50.0 µg/kg, distile alkollü içkiler , elma şarabı ve elmadan üretilen veya elma suyu içeren diğer fermente içkiler 50.0 µg/kg, katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve doğrudan tüketime sunulan elma püresi dahil), bebek ve küçük çocuklar için üretilen ve bu amaçla piyasaya arz edilen / etiketlenen elma suyu ve katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve elma püresi dahil) 25.0 µg/kg, 10.0 µg/kg ve tahıl bazlı olmayan ek gıdalar 10.0 µg/kg olarak verilmiştir.

İthalat, ihracat ve piyasa denetimi esnasında yönetmelikte belirtilen ürünlerde patulin analizinin yapılma zorunluluğu vardır. Patulinin çeşitli analiz metotları kullanılmak suretiyle analizi yapılmaktadır. Patulin için yapılacak olan miktar tespitlerinde analitik kalibrasyon standartlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapmış olduğum bu çalışmada analitik standart üretimiyle ilgili amaçlanmış olan yol, yöntem ve hedef gerçekleştirilmiştir.

Yapmış olduğum çalışmada doğal olarak çürütülen elmalardaki küf türleri renklerine göre izole edilmeye çalışıldı. Toplamda dokuz farklı renkte izole edilen küf türleri K-1, K-26, K-34, K-38, K-39, K-40, K-42, K-43 ve K-45 şeklinde kodlandı. Kodlanan bu küf türlerinin teşhisi için MALDİ-TOF/MS yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz



sonuçlarına göre farklı olduğu düşünülerek kodlanan 9 adet küf türünün, 4 adet *Penicillium* türüne ait olduğu tespit edilmiş oldu. Bunlar kodlarına göre K-1 *Penicillium chrysogenum*, K-26 *Penicillium digitatum*, K-34 *Penicillium expansum*, K-38 *Penicillium expansum*, K-39 *Penicillium digitatum*, K-40 *Penicillium expansum*, K-42 *Penicillium digitatum*, K-43 *Penicillium expansum* ve K-45 *Penicillium italicum* olmak üzere tanımlanan dört tür;

- *Penicillium chrysogenum*
- *Penicillium digitatum*
- *Penicillium expansum*
- *Penicillium italicum*

Olarak tespit edilmiş oldu.

*P. chrysogenum* sadece potansiyel bir antibiyotik üreticisi değil, aynı zamanda sitrinin, siklopiazonik asit, mikofenolik asit, patulin, penisilin asidi, PR-toksin, okratoksin A ve rokforin gibi mikotoksinleri sentezlediği de bildirilmiştir (Leistner ve Pitt, 1977; Reiss, 1977; Cole vd., 1981; Frisvad 1984). Yapmış olduğum çalışmada *P. chrysogenum* kırmızı elmalarda 13.48 mg/kg, sarı elmalarda 45.91 mg/kg ve yeşil elmalarda 25.07 mg/kg patulin üretti.

*P. expansum*, mikotoksinler olarak bilinen çeşitli toksik ikincil metabolitler üretir. Patulin, *P. expansum* 'un sekonder metabolizmasının ana ürünlerinden biridir. Patulinin insan sağlığı üzerinde çeşitli zararlı etkileri vardır (Assunc vd., 2016; Puel vd., 2010; Zouaoui vd., 2016). Patuline ek olarak, *P. expansum*, sitriline gibi in vitro olarak çok sayıda ikincil metabolit ve mikotoksin üretir; meyvelerde de tespit edilmiştir (Martins vd., 2002). Diğer ikincillere ek olarak *P. expansum* rokforin C sentezleyebilir (Andersen vd., 2004), chaetoglobosins (Andersen vd., 2004), expansolidler (Massias vd., 1990), fumaril-DL-alanin (Birkinshaw vd., 1942) ve andrastin (Kim vd., 2012) ve communesins (Andersen vd., 2004) gibi maddeleri sentezleyebilir. Yapmış olduğum çalışmada *P. expansum* kırmızı elmalarda 24,47 mg/kg, sarı elmalarda 49.80 mg/kg ve yeşil elmalarda 28.22 mg/kg patulin üretti. Küf türleri içerisinde en fazla *P. expansum* patulin üretimi yapmıştır.

*P. digitatum*, triptokuialaninler (TQA) ve fenilalanin-prolin diketopiperazin gibi bilinen sekonder metabolitlerde çok az sayıda üretir (Frisvad vd., 2004). Literatürde patulin üretimi ile ilgili çok bilgi yoktur. Yapmış olduğum çalışmada *P. digitatum* kırmızı elmalarda 8.36 mg/kg, sarı elmalarda 10.83 mg/kg ve yeşil elmalarda 9.48 mg/kg patulin üretti. Küf türleri içerisinde en az *P. digitatum* patulin üretimi yapmıştır.

*P. italicum* sekonder metabolitlerden başta italinic acids olmak üzere, 2,5-dihydro-4 methoxy-2H-pyran-2, Verrucolone Fulvic acids, Deoxybrevianamide, Xanthocillins Shikimic acid, 4-methoxy-6-npropenyl-2-pyrone, 5-hydroxymethyl-2-furic acid gibi metabolitleri üretmektedir (Aria vd., 1989). Literatürde patulin üretimi ile ilgili bir sonuç bulunmamaktadır. Yapmış olduğum çalışmada *P. italicum* kırmızı elmalarda 4.68 mg/kg, sarı elmalarda 22.40 mg/kg ve yeşil elmalarda 8.50 mg/kg patulin üretti. Küf türlerinden *P. italicum*' un patulin üretimi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Litaratürde çok toksik ekstrolit patulin üreten 13 tür belirtilmiştir. Bu türler, *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. kansantricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum.*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* ve *P. vulpinum* olarak verilmiştir (Frisvad vd., 2004).

Farklı elma türlerine göre (kırmızı, sarı, yeşil) patulin üretme kapasitesine bakıldığında genel olarak sıralama sarı > yeşil > kırmızı şeklinde olduğu görüldü. Fakat bazı durumlarda yeşil elmalarda patulin miktarının fazla olduğu görüldü. Genel olarak kırmızı elmalarda patulin miktarının düşük olduğu, sarı ve yeşil olanlarda daha yüksek olduğu görüldü. Çalışmış olduğum elma türleri Gümüşhane ve Erzincan yerel elma türleridir. Literatürde yapılan çalışmalarda farklı elma türlerinde oluşan patulin miktarının farklı olduğu tespit edilmiştir (Marin vd., 2006). Farklı elma türlerinde farklı patulin miktarının elde edilmesi çalışmamın literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

*Penicillium* alt türü olan *Penicillium*'daki 58 tür, birkaç mikotoksin dahil olmak üzere çok sayıda biyoaktif ekstrolit (ikincil metabolit) üretmektedir. *Penicillium* alt türünden 132 ekstrolit familyası tür başına ortalama 5 ekstrolit familyası bildirilmiştir (Frisvad vd., 2004). Bu alt türler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin içersinde birkaç pigment, uçucu madde ve karakterize edilmemiş ekstrolitler bulunmaktadır. Bildirilen birkaç üretici yeniden tanımlanmıştır ve bilinen ekstrolitlerin yeni üreticileri ilk kez rapor edilmiştir. Birkaç ekstrolit bir tür için benzersizdir, ancak ikincil metabolitlerin çoğu birden fazla tür tarafından üretilir. En yaygın ekstrolitler 25 tür tarafından üretilen rokforin C, 17 tür tarafından üretilen siklopininler, 13 tür tarafından üretilen patulin, 10 tür tarafından üretilen penisilik asit ve terrestrik asit ve 2-metil izoborneol idi. 8 tür tarafından üretilmektedir. Çoğu tür hem poliketidleri, terpeni hem de amino asitten türetilmiş ekstrolitleri üretir ve çok sayıda tür biyoaktif metabolit üretirler (Frisvad vd., 2004). Yapmış olduğum çalışmada TLC ' de küfler tarafından florans veren bir çok madde görülmüştür.

Yapmış olduğum çalışmada Gümüşhane ve Erzincan illerinden elde edilen yerel elmalardan küfler izole edilerek türleri tespit edilen bu küflere üretilen patulin çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak üretilmiştir. Üretilen patulinin HPLC ile kontrolü yapıldığında saflığı  $\geq 98.0$  % olarak bulundu. Saf olan patulinden çeşitli aşamalarda 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  analitik standart hazırlanmış oldu.

Ülkemizde mikotoksin analizleri yapılmaktadır. Bu analizlerde kullanılan standartlar yurt dışından alınmaktadır. Yapmış olduğum bu çalışma ile yerli doğal ortamdaki izole edilen küf türlerine yine yerli elma türleri kullanılarak patulin üretimi gerçekleştirilebilir.

Üretilen patulin, tez çalışmamda kullanmış olduğum yöntem kullanılarak saf olarak elde edilip analitik standart olarak üretilimi gerçekleştirilebilir.



## 5. KAYNAKLAR

- Abramson, D., Mills, J.T. ve Boycott, B.R., 1983. Mycotoxins and Mycoflora in Animal Feedstuffs İn Western Canada, Can. J. Comp. Med., 47, 23–26.
- Akhtar, S., Shahzad, M. A., Yoo, S. ve Ismail, A., 2017. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> and Heavy Metals in İnfant Formula Milk Brands Available İn Pakistani Markets, Korean Journal of Food Science of Animal Resources, 37, 79–86.
- Andersen, B., Smedsgaard, J. ve Frisvad, J.C., 2004. *Penicillium Expansum*: Consistent Production Of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products, J. Agric. Food Chem. 52, 2421–2428.
- Arai, K, Miyajima, H, Mushiroda, T. ve Yamamoto, Y., 1989. Metabolites of *Penicillium İtalicum* Wehmer: İsolation and Structures of New Metabolites İncluding Naturally Occurring 4-ylideneacyltetronic Acids, İtalicinic Acid and İtalicic Acid, Chemical and Pharmaceutical Bulletin 37, 3229-3235.
- Asao, T., Büchi, G., Abdelkader, M.M., Chang, S. B., Wick, E.L. ve Wogan, G.N., 1965. The Structures of Aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>, Journal of the American Chemical Society, 87, 882.
- Assunção, R., Alvito, P., Kleiveland, C.R. ve Lea, T.E., 2016. Characterization of in Vitro Effects of Patulin on İntestinal Epithelial and İmmune Cells, Toxicol. Lett. 250-251, 47–56.
- Augusto, F., Hantao, L.W. Mogollón, N.G.S. ve Braga, S.C.G.N., 2013. New Materials and Trends in Sorbents for Solid-Phase Extraction, Trends in Analytical Chemistry, 43, 14-23.
- Barreira, M.J., Alvito P.C. ve Almeida, C.M., 2010. Occurrence of Patulin in Apple-Based-Foods in Portugal, Food Chemistry, 121, 653–658.
- Battilani, P., Barbano C. ve Logrieco A., 2008. Risk Assessment and Safety Evaluation of Mycotoxinsin Fruits. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Rivka Barkai Golan, R. B. and Paster, N. (eds), Elsevier, London. pp. 1-26.
- Bayman, P. ve Baker, J.L., 2006. Ochratoxins: a Global Perspective, Mycopathologia, 162, 3, 215–223.
- Bennett, J.W. ve Klich, M., 2003. Mycotoxins, Clin. Microbiol. Rev., 16, 497–516.
- Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Hosseini, M.R.M. ve Aghaee, E., 2006. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction İn İn combination with Gas Chromatography-Flame

Photometric Detection: Very Simple, Rapid and Sensitive Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Water, J. Chromatogr. A., 1123, 1-9.

- Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O. ve Spiteller, G., 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, Journal of the Chemical Society Chemical Communications, 11, 743-745.
- Birkinshaw, J.H., Raistrick, H. ve Smith, G., 1942. Studies in the Biochemistry of Micro-Organisms: Fumaryl-dl-alanine (fumaromono-dl-alanide), a Metabolic Product of *Penicillium Reticulosum* sp.nov., Biochem. J., 36, 829-835.
- Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F., Tamietti, G. ve Pietri, A. 2009. Influence of Agricultural Practises on *Fusarium* Infection, Fumonisin and Deoxynivalenol Contamination of Maize Kernels, World Mycotoxin Journal, 2, 4, 409-418.
- Bonerba, E., Ceci, E., Conte, R. ve Tantillo, G., 2010, Survey of the presence of patulin in fruit juices, Food Additives and Contaminants: Part B, 3, 2, 114-119.
- Boorman, G.A., 1989. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenic Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9i)n F344/n Rats (Gavage Studies). Department of Health and Human Services, National Institute of Health, Research Triangle Park, NC. NIH Publication No. 89-2813.
- Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E., Colao, V. ve Tantillo, G., 2011. Determination of Ochratoxin A in Eggs and Target Tissues of Experimentally Drugged Hens using HPLC-FLD, Food Chem., 126, 12, 78-1282.
- Bozzo, G., Ceci, E., Bonerba, E., Desantis, S. ve Tantillo, G., 2008. Ochratoxin A in Laying Hens: High-Performance Liquid Chromatography Detection and Cytological and Histological Analysis of Target Tissues, J. Appl. Poult. Res., 17, 151-156.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J. ve Nising, C.F. 2009. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites, Chemical Reviews, 109, 9, 3903-3990.
- Brian, P.W., Elson G.W. ve Lowe D., 1956 Production of Patulin in Apple Fruits by *Penicillium expansum*, Nature, 178, 263-264.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.L., Ferroni, A., Gutmann, L. ve Nassif, X. 2011. MALDI-TOF Mass Spectrometry Tools for Bacterial Identification in Clinical Microbiology Laboratory. Clin Biochem., 44 1, 104-109.
- Cerkowniak, M., Boguś, M.I., Włóka, E., Stepnowski, P. ve Gołębiowski, M., 2018. Application of Headspace Solid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography Coupled With Mass Spectrometry to Determine Esters of Carboxylic Acids and Other Volatile Compounds in *Dermestes Maculatus* and *Dermestes Ater* Lipids, Biomed. Chromatogr., 32, 40-51.
- Chen, A.J., Jiao, X., Hu, Y., Lu, X. ve Gao, W., 2015. Mycobiota and Mycotoxins in Traditional Medicinal Seeds From China, Toxins (Basel), 24, 7, 3858-3875.

- Clark, A.E., Kaleta A.J., Arora A. ve Wolkd D.M., 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology, Clinical Microbiology Reviews, 26, 3, 547-603.
- Claude, B., Morin., P., Bayoudh, S. ve de Ceaurriz, J., 2008. Interest of molecularly imprinted polymers in the fight against doping. Extraction of tamoxifen and its main metabolite from urine followed by high-performance liquid chromatography with UV detection, J. Chromatogr A., 81-8, 1196-1197.
- Cole, R.J. ve Cox, R.H., 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites, Academic Press Inc, New York, p 5209.
- Czerwiecki, D., Czajkowska, A. ve Witkowska, G., 1998. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998, Food Addit. Contam., 19, 1051–1057.
- Çelik, C., 2008. Adana’da Bazı Marketlerde Satışa Sunulan Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde Okratoksin A Varlığının HPLC Yöntemi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 55s.
- Dailey, R.E., Blaschka, A.M. ve Brouwer, E.A., 1977. Absorption, Distribution, and Excretion of [<sup>14</sup>C] Patulin by Rats, Journal of Toxicology and Environmental Health, 3, 3, 479-489.
- Dall’Asta, C., Lindner, J.D., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E. ve Marchelli, R., 2008. The Occurrence of Ochratoxin A in Blue Cheese, Food Chem., 106, 729–734.
- De Hoffmann, E., 2005. Mass Spectrometry, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 101, 122–134.
- De Pinho, G.P., Neves, A.A., de Queiroz, M.E.L.R. ve Silvério, F.O., 2010. Optimization of the Liquid–Liquid Extraction Method and Low Temperature Purification (LLE–LTP) for Pesticide Residue Analysis in Honey Samples by Gas Chromatography, Food Control, 21, 1307-1311.
- Dombrink-Kurtzman, M.A., 2006. The Isoepoxydon Dehydrogenase Gene of The Patulin Metabolic Pathway Differs for *Penicillium Griseofulvum* and *Penicillium Expansum*, Antonie van LeDolarwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 89, 1 –8.
- Drusch, S. ve Ragab, W., 2003. Mycotoxins in Fruits, Fruit Juices, and Dried Fruits, J. Food Prot., 66, 1514–27.
- Duarte, S.C. , Lino, M.C. ve Pena, A., 2011. Ochratoxin A in Feed of Food-PRoducing Animals: An Undesirable Mycotoxin With Health and Performance Effects, Veterinary Microbiology, 154, 1-13.
- Eaton, D.L. ve Gallagher, E.P., 1994. Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis, Annu Rev Pharmacol Toxicol, 34, 135-172.

- Filipiak, W. ve Bojko, B., 2019. SPME in Clinical, Pharmaceutical, and Biotechnological Research – How Far Are We from Daily Practice, TrAC Trends Anal. Chem., 115, 203-213.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Lund, F. ve Samson, R.A. 2000. The Homogeneous Species and Series in Subgenus *Penicillium* are Related to Mammal Nutrition and Excretion. In: Samson, R.A., and Pitt, J.I. (eds.). *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, pp: 265-283. Harwood Academic Publishers, N.Y., USA.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O. ve Samson, R.A., 2004. Mycotoxins and Other Extrolites Produced by Species in *Penicillium* Subgenus *Penicillium*, Stud. Mycol. 49, 201–241.
- Frisvad, J.C., 1984. Expressions of Secondary Metabolism as Fundamental Characters in *Penicillium* Taxonomy. In: Kurata H, Ueno Y (eds) *Developments in Food Science 7. Toxicogenic Fungi — Their Toxins and Health Hazard*. Kodansha Ltd, Tokyo and Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 98–106.
- Gabriela Islas, A.C., Ibarra, I. S., Hernandez, P. ve Miranda, J. M., 2017. Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: a review, Int. J. Anal. Chem., 1-16.
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P. G., Horak, M. J. ve Vleggaar, R., 1988. Fumonisin novel Mycotoxins with cancer Promoting Activity Produced by *Fusarium Moniliforme*, Applied and Environmental Microbiology, 54, 1806-1811.
- Groopman, J.D., Kensler, T.W. ve Wild, C.P., 2008. Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis In developing Countries, Annu. Rev., Public Health. 29, 187–203.
- Groopman, J.D., Scholl, P. ve Wang, J.S., 1996. Epidemiology of Human Aflatoxin Exposures and Their Relationship to Liver Cancer, Prog. Clin. Biol. Res. 395, 211–222.
- Guillamont, E.M., Lino, C.M., Baeta, M.L., Pena, A.S., Silveira, M.I.N. ve Vinuesa, J.M., 2005. A Comparative Study of Extraction Apparatus in HPLC Analysis of Ochratoxin A in Muscle, Anal. Bioanal. Chem., 383, 570–575.
- Hall, A.J. ve Wild, C.P., 1994. Epidemiology of Aflatoxin-Related Disease. Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.), *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. Academic Press. New York, USA. pp. 233–258.
- Harwig, J., Chen, Y.K., Kennedy, B.P.C. ve Scott, P.M., 1973. Occurrence of Patulin and Patulin Producing of *Penicillium expansum* in Natural Rots of Apple in Canada, Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 6, 1, 22-25.
- Hayes, A.W., Phillips, T.D., Williams, L. ve Ciegler A., 1979. Acute Toxicity of Patulin in Mice and Rats, Toxicology, 13, 91-100.

- Hennion, M.C., 1999. Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling With Liquid Chromatography, J. Chromatogr. A., 856, 3-54.
- Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk A.D., Kashon, M.L., Slaven, J.E., Janotka, E., Blachere, F.M., Schmechel, D. ve Beezhold, D.H., 2008. Discrimination of Penicillium Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Fingerprinting, Rapid Commun. Mass Spectrom., 22, 2555–2560.
- Hosseini, M.H., Rezaee, M., Akbarian, S., Mizani, F., Pourjavid, M.R. ve Arabieh, M., 2013. Homogeneous Liquid–Liquid Microextraction Via Flotation Assistance for Rapid and Efficient Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples, Anal. Chim. Acta., 762, 54-60.
- Humpf, H.-U. ve Voss, K.A., 2004. Effects of Food Processing on the Chemical Structure and Toxicity of Fumonisin Mycotoxins, Mol. Nutr. Food Res., 48, 255–269.
- IARC, 1993. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, IARC Press, 56, Lyon.
- IARC, 2002. Fumonisin B1. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene, IARC Press, 82, Lyon.
- IARC. 2002. Aflatoxins. In Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. France: IARC Press. IARC Scientific Publication, Lyon. 82, 9–13.
- Iha, M., H. ve Sabino, M., 2008. Incidence of patulin in Brazilian Apple-Based Drinks, Food Control, 19, 417–422.
- International Organization for Standardization (ISO), 2008. Revision of Definitions for Reference Material and Certified Reference Material, ISO Guide 30:1992/Amd 1:2008, Geneva, Switzerland.
- Islas C.A., 2001. Comparison of Fractionation Methods for the Structural Characterization of Petroleum Residues, Energy & Fuels, 15, 429-437.
- Islas C.A., Suelves, I., Carter, I.E., Apicella, B., Herod, A.A. ve Kandiyoti, R., 2003. The Unusual Properties of High Mass Materials From Coal-Derived Liquid, Fuel, 82, 1813-1823.
- Ismail A., Gonçalves, B.L., de Neeff, D.V., Ponzilacqua, B., Coppa, F.S.C., Hintzschec, H., Sajide, M., Cruz, A.G., Corassin, C.H. ve Oliveira, C.A.F., 2018. Aflatoxin in Foodstuffs: Occurrence and Recent Advances in Decontamination, Food Research International, 113, 74-85.
- ISO, 2006. Standardization I. O. F. reference materials e general and statistical principles for certification.
- IUPAC, 1993. Glossary For Chemists Of Terms Used In Toxicology. Pure & Appl. Chem., 65, 9, 2003-2122.



- James, A.T. ve Martin, A.J.P., 1952. Gas-Liquid Partition Chromatography: The Separation and Micro-Estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid, Biochem. J., 50, 5, 679-690.
- Jeannot, M.A. ve Cantwell, F.F., 1996. Solvent Microextraction Into a Single Drop, Anal. Chem., 68, 2236-2240.
- Jelinek, C.F., Pohland, A.E ve Wood, G.E., 1989. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds – an Update, J. AOAC, 72, 223–230.
- Kandiyoti, R., Herod, A., Bartle, K. ve Morgan, T., 2017. Analytical Techniques for High-Mass Materials, Solid Fuels and Heavy Hydrocarbon Liquids, Elsevier Science, p. 343–436.
- Kara, M., Uysal, A., Soylu, S., Kurt, Ş. ve Soylu, E.M., 2017. Identification of Plant-Associated Microorganisms Employing MALDI TOF Mass Spectrometry as a Rapid Detection Technique. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), 15-17 May, 2017. Nevşehir, p. 1111.
- Karaca, H., 2006. Kuru İncirlerin Aflatoksin, Patulin, Ergosterol İçeriği ve Farklı Koşullarda Aflatoksinlerin Parçalanma Düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 103s.
- Kim, H.Y., Park, H.M. ve Lee, C.H., 2012. Mass Spectrometry-Based Chemotaxonomic Classification of *Penicillium* Species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its Correlation with Antioxidant Activity, J. Microbiol. Methods, 90, 327–335.
- Knaflewski, M., Golinski, P.K., Kostecki, M., Waskiewicz, A. ve Weber, Z., 2008. Mycotoxins in Asparagus Spears and Producing Them Fungi, Acta Horticulture, 776, 183-189.
- Koçkaya, E.A., Selmanoğlu, G., Özsoy, N. ve Gül, N., 2009, Evaluation of Patulin Toxicity in the Thymus of Growing Male Rats, Arti Hig Rada Toksikol, 60, 411-418.
- Koszegi, T. ve Poor, M., 2016. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level, Toxins, 8, 4, 111.
- Köppen, R., Koch M., Siegel D., Merkel S., Maul R. ve Nehls, I., 2010. Determination of Mycotoxins in Foods: current State of Analytical Methods and Limitations, Applied Microbiology and Biotechnology, 86, 1595–1612.
- Lawley, R., Curtis L. ve Davis J., 2008. Patulin, The Food Safety Hazard Guidebook. Royal Society of Chemistry Publishing, p. 213-216
- Lawlor, P.G. ve Lynch P.B., 2001. Mycotoxins in Pig Feeds 2, Clinical Aspects. Ir. Vet. J., 54, 4, 172–176.
- Leistner, L. ve Pitt J.I., 1977. Miscellaneous *Penicillium* Toxins. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlmann MA (eds), *Mycotoxins in Human and Animal Health*, Pathotox Publishers Inc, Park Forest South, II, pp 639–653. 7

- Li, J., Wu R., Hu Q. ve Wang J., 2007. Solid-Phase Extraction and HPLC Determination of Patulin In Apple Juice Concentrate, Food Control, 18, 530–534.
- Li, F. ve Musselman, B., 2018. High-Throughput Extraction and Detection Of Drugs In Urine: Parallel Sampling With Solid-Phase Microextraction (SPME) Fibers Coupled With Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry (DART-MS) Detection. Anal. Drugs Abus. Musah, R.A. (eds), Springer New York. 97-106.
- Llompart, M.M., Celeiro M. ve Dagnac T., 2019. Microwave-Assisted Extraction of Pharmaceuticals, Personal Care Products and Industrial Contaminants In The Environment, TrAC Trends Anal. Chem., 116, 136-150.
- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R. ve Scott, P.M., 2003. Mycotoxins In Infant Cereal Foods From The Canadian Retail Market, Food. Addit. Contam., 20, 494–504.
- Lovett, J., Thompson, R.G. ve Bautin, B.K., 1975. Trimming as a Means of Removing Patulin from Fungus Rotted Apples, J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 58, 5, 909-911.
- Ma, Y.Y. ve Guo, H.W., 2008. Mini-Review Of Studies On The Carcinogenicity of Deoxynivalenol, Environ. Toxicol. Pharmacol, 25, 1–9.
- MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J. ve Felgueiras, I., 2000. Liquid Chromatographic Method For The Determination of Patulin In Clear and Cloudy Apple Juices and Apple Puree: Collaborative Study, Journal of AOAC International, 83, 6, 1387–1394.
- MacDonald, S. ve Illida, F., 1997. Report On Workpackage. Draft of a Method for Patulin In Clear and Cloudy Apple Juices and In Apple Puree In Suitable Format for Intercomparison Purposes. JCR Report SMT-CT96-2045. 0585B-98.
- Manning, B.B., Ulloa, R.M., Li, M.H., Robinson, E.H. ve Rottinghaus, G.E., 2003. Ochratoxin A Fed to Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*) Causes Reduced Growth and Lesions of Hepatopancreatic Tissue, Aquaculture, 219, 739–750.
- Marasas, W.F.O., 2001. Discovery and Occurrence of The Fumonisin: a Historical Perspective, Environmental Health Perspectives, 109, 239-243.
- Marín, S., Morales, H., Hasan, H.A.H., Ramos, A.J. ve Sanchis, V., 2006. Patulin Distribution In The Tissue of *Penicillium Expansum*-Contaminated Fuji and Golden Apples, Food Addit Contam., 12, 1316-22.
- Martin, A.J.P. ve Synge, R.L.M., 1941. A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases: A Theory Of Chromatography. 2. Application to The Micro-Determination of The Higher Monoamino-Acids In Proteins, Biochem. J., 35, 1358.
- Martins, M.L., Gimeno, A., Martins, H.M. ve Bernardo, F., 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots, Food Addit. Contam., 19, 568–574.

- Massias, M., Rebuffat, S., Molho, L., Chiaroni, A., Riche, C. ve Bodo, B., 1990. Expansolides A and B: tetracyclic sesquiterpene lactones from *Penicillium expansum*, J. Am. Chem. Soc., 112, 8112–8115.
- Miller, J.M., 2003. Chromatography: Concepts and Contrasts, 2nd ed.. Encyclopedia of Applied Physics. Wiley, J. and Hoboken, S. (eds) NJ, USA.
- Minervini, F. ve Dell'Aquila, M.E., 2008. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals, Int. J. Mol. Sci. 9, 12, 2570–2584.
- Mishra, S., Dwivedi, D.P., Pandey, P. H. ve Das, M., 2014. Role of Oxidative Stress In Deoxynivalenol Induced Toxicity, Food and Chemical Toxicology. 72, 20-29.
- Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I. ve Worobo, R.W., 2005, Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1, 8-21.
- Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I. ve Worobo, R.W., 2005. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods, Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety, 1, 8-21.
- Monaci, L., Palmisano, F., Matrella, R. ve Tantillo, G., 2005. Determination of Ochratoxin a At Part-Per-Trillion Level in Italian Salami by Immunoaffinity Clean-Up and High-Performance Liquid Chromatography With Fluorescence Detection, Journal of Chromatography A, 1090, 184–187.
- Morales, H., Marin S., Ramos, A., J. ve Sanchis, V., 2010, Influence of Postharvest Technologies Applied During Cold Storage of Apples In *Penicillium Expansum* Growth and Patulin Accumulation: A Review, Food Control, 21,953–962.
- Nagy, C.M., Fejer, S.N., Berek, L., Molnar, J. ve Viskolcz, B., 2005. Hydrogen Bondings In Deoxynivalenol (DON) Conformations – A Density Functional Study, J. Mol. Struct. 726, 55–59.
- Nasiri, M., Ahmadzadeh, H. ve Amiri, A., 2020. Sample Preparation and Extraction Methods for Pesticides in Aquatic Environments: A review, Trends in Analytical Chemistry, 123-148.
- Noche, G.G., Laespada, M.E.F., Pavón, J.L.P., Cordero, B.M. ve Lorenzo, S.M, 2011. In Situ Aqueous Derivatization and Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs By Salting-Out-Assisted Liquid–Liquid Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry, J. Chromatogr. A, 1218, 6240-6247.
- Nwakanma, C. ve Unachukwu, M., 2017. Molds. The Microbiological Quality of Food. Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M, (eds). Foggia, Italy. pp. 133-148.
- Odhav, B., Adam, J. K. ve Bhoola, K. D., 2008. Modulating Effects of Fumonisin B1 and Ochratoxin a on Leukocytes and Messenger Cytokines of The Human Immune System, International Immunopharmacology, 8, 799-809.
- Olivares, I.R.B. ve Lopes, F.A., 2012. Essential Steps To Providing Reliable Results Using The Analytical Quality Assurance Cycle, Trends Anal. Chem., 35, 109-121.

- Olivares, I.R.B., Souza, G.B., Nogueira, A.R.A., Toledo, G.T.K. ve Marcki, D.C., 2018. Trends In Developments of Certified Reference Materials for Chemical Analysis - Focus On Food, Water, Soil, and Sediment Matrices, Trends in Analytical Chemistry, 100, 53-64.
- Ostry, V., Skarkova J. ve Ruprich, J. 2004. Occurrence Of Penicillium Expansum and Patulin in Apples as Raw Materials for Processing of Foods - Case Study, Mycotoxin Research, 20, 24-28.
- Otteneder, H. ve Majerus, P., 2001. Ochratoxin A (OTA) In Coffee: Nation-Wide Evaluation of Data Collected By German Food Control 1995–1999, Food Addit. Contam.,18, 431–435.
- Özçelik, S., 1979. Niğde, Amasya ve Erzincan İllerinde Üretilen Önemli Elma Çeşitlerinde Mikrobiyal Bozulmalar Ve Bozulan Elmalarda Patulin Oluşumu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 81 s.
- Pádua, R.A.F. ve Machinski Júnior, M., 2005. Aspectos Toxicológicos E Ocorrência De Patulina Em Suco De Maça, Semina Ciências Agrárias, 26, 4, 535–542.
- Paterson, R.R.M., Archer, S., Kozakiewicz, Z., Lea, A., Locke, T. ve O’Grady, E., 2000. A Gene Probe for The Patulin Metabolic Pathway With Potential for Use In Patulin and Novel Disease Control, Biocontrol Science and Technology, 10, 509- 512.
- Pestka, J.J. ve Smolinski, A.T., 2005. Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans, J. Toxicol. Environ. Health B., 8, 39–69.
- Pozzo, L., Cavallarin, L., Nucera, D., Antoniazzi, S. ve Schiavone, A., 2010. A Survey of Ochratoxin a Contamination in Feeds and Sera From Organic and Standard Swine Farms in Northwest Italy, J. Sci. Food Agric. 90, 1467–1472.
- Puel, O., Galtier P. ve Oswald I.P., 2010. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin, Toxins, 2, 613–631.
- Quevauviller, P. ve Maier, E.A., 1999. Interlaboratory Studies and Certified Reference Materials for Environmental Analysis-The BCR Approach, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1999.
- Quevauviller, P., 1999. Reference Materials: An Inquiry Into Their Use and Prospects in Europe, 1999/02/01/, TrAC Trends Anal. Chem., 18, 76-85.
- Reiss, J., 1977. Mycotoxins In Foodstuffs. X. Production of Citrinin by Penicillium Chrysogenum in Bread, Food and Cosmetics Toxicol ,15, 303–307.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O. ve Vismer, H.F., 2002. Production of Fumonisin Analogs by Fusarium Species, Appl. Environ. Microbiol., 68, 2101–2105.

- Riahi-Zanjani, B., Balali-Mood, M., Asoodeh, A., Es'haghi, Z. ve Ghorani-Azam, A., 2018. Developing a New Sensitive Solid-Phase Microextraction Fiber Based on Carbon Nanotubes for Preconcentration of Morphine, Appl. Nanosci., 18, 2047-2056.
- Rico-Munoz, E., Samson, R.A. ve Houbraken, J., 2019. Mould Spoilage of Foods and Beverages: Using The Right Methodology, Food Microbiology. 81, 51-52.
- Rogowska, A., Pomastowska, P., Sagandykova, G. ve Buszewska, B., 2019. Zearalenone and Its Metabolites: Effect on Human Health, Metabolism and Neutralisation Methods, Toxicon, 162, 46-56.
- Roll, R., Matthiaschek G. ve Korte A., 1990. Toxicology and Oncology : Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer, Journal of Environmental Pathology, 10, 1, 2, 1-7.
- Roseanu, A., Jecu, L., Badea, M. ve Evans, R., W., 2010. Mycotoxins: An Overview on Their Quantification methods, Rom. J. Biochem., 47, 1, 79–86.
- Sabuncuoğlu, S.A., Baydar, T., Giray, B. ve Şahin, G., 2008. Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degradasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28, 1, 63- 92.
- Šafaříková, M. ve Šafařík, I., 1999. Magnetic Solid-Phase Extraction, J. Magn. Magn. Mater., 194, 108-112.
- Sakthivelan, S.M. ve Rao, G.V.S., 2010. Effect Of Ochratoxin a on Body Weight, Feed Intake and Feed Conversion in Broiler Chicken, Vet. Med. Int., 2010, 1–4.
- Saleeb, P.G., Drake, S.K., Murray, P.R. ve Zelazny A.M. 2011. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrixassisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 49, 1790–1794.
- Santos, C, Paterson, R.R.M., Venâncio, A. ve Lima N., 2010. Filamentous Fungal Characterizations by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, J. Appl. Microbiol., 108, 375–385
- Schiavone, A., Cavallero, C., Giroto, L., Pozzo, L., Antoniazzi, S. ve Cavallarin, L., 2008. A Survey On The Occurrence of Ochratoxin A In Feeds and Sera Collected In Conventional and Organic Poultry Farms In Northern Italy, Italian Journal of Animal Science, 7, 495–503.
- Seefelder, W., Gossmann, M. ve Humpf, H.U., 2002. Analysis of Fumonisin B1 In Fusarium Proliferatum-Infected Asparagus Spears and Garlic Bulbs From Germany by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 10, 2778-2781.
- Shim, W.B., Ha, K.S., Kim, M.G., Kim, J.S. ve Chung, D.H., 2014. Evaluation of The Transfer Rate of Ochratoxin a to Decoctions of Herbal Medicines, Food Sci. Biotechnol., 23, 2103–2108.

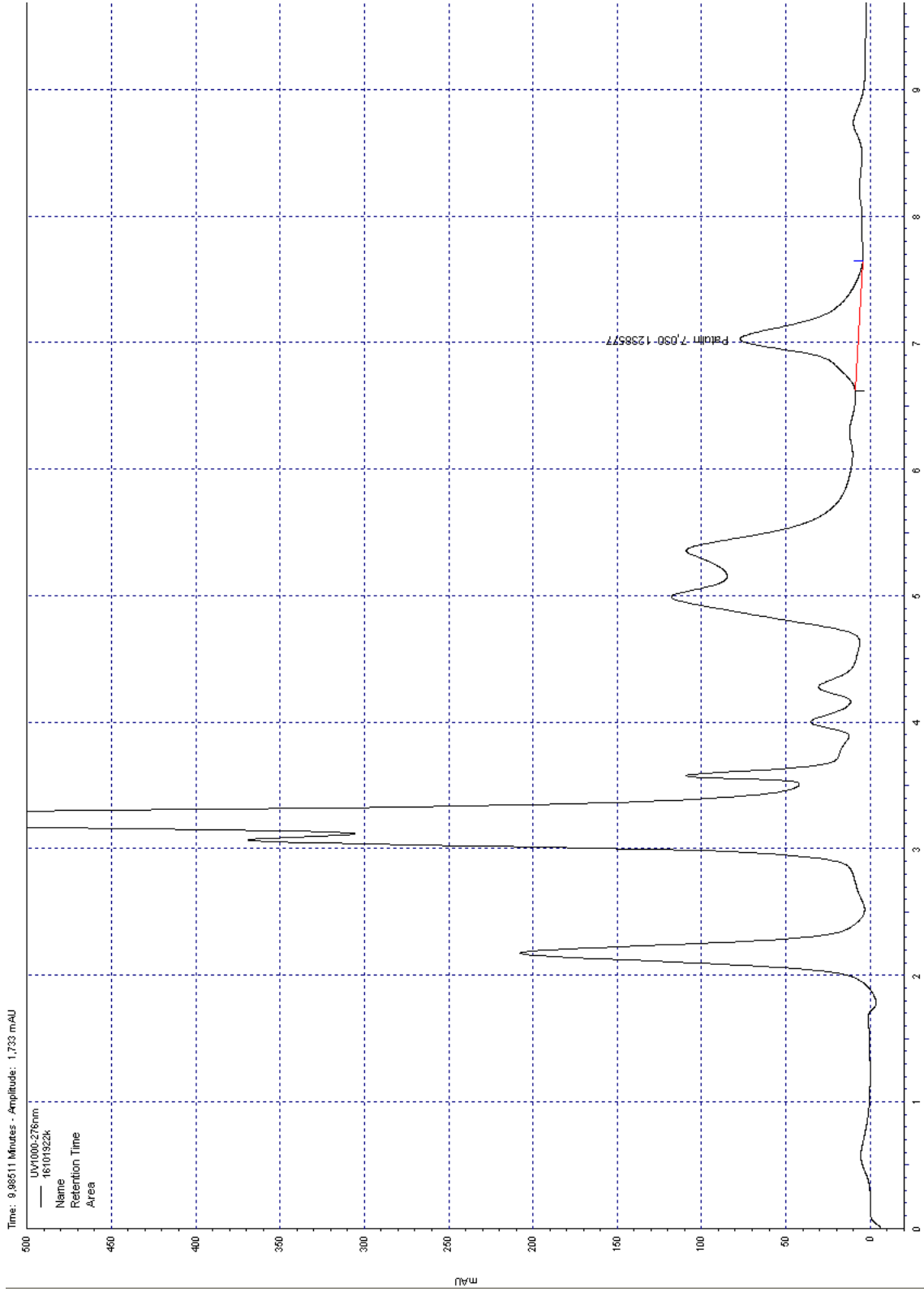
- Silva, S.J.N., Schuch, P.Z., Bernardi, C.R., Vainstein, M.H., Jablonski, A. ve Bender, R., 2007, Patulin in Food: State-of-the-art and Analytical Trends, Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, 29, 2, 406-413.
- Skaug, M.A., 1999. Analysis of Norwegian Milk and Infant Formulas for Ochratoxin A., Food Addit. Contam., 16, 75–78.
- Solfrizzo, M., Piemontese, L., Gambacorta, L., Zivoli, R. ve Longobardi, F., 2015. Food Coloring Agents and Plant Food Supplements Derived From *Vitis Vinifera*: A New Source of Human Exposure to Ochratoxin A, J. Agric. Food Chem., 08, 63, 3609–3614.
- Solti, L., Pe'csi, T., Barna-Vetro', I., Sza'sz, F., Biro', K. ve Szabo, E., 1999. Analysis of Serum and Seminal Plasma After Feeding Ochratoxin A With Breeding Boars. Anim. Reprod. Sci., 56, 123–132.
- Sommer, N.F., Buchanan J.R. ve Fortlage R.J., 1974a. Production of Patulin By *Penicillium Expansum*, Appl. Microbiol., 28, 4, 589-593.
- Sommer, N.F., Buchanan J.R., Fortlage R.J. ve Hsieh D.P.H., 1974b. Patulin, A Mycotoxin, In Fruit Products, Proc. IV Int. Congress, Food Sci. And Technol., 3, 266-271.
- Sorenson, J.A., Yannuzzi, L.A. ve Shakin, J.L., 1985. Recurrent Subretinal Neovascularization, Ophthalmology, 92, 1059-1074.
- Souza-Silva, É.A., Gionfriddo, E. ve Pawliszyn, J., 2015. A Critical Review of The State of The Art of Solid-Phase Microextraction of Complex Matrices II. Food Analysis, TrAC Trends Anal. Chem., 71; 236-248.
- Spadaro, D., Ciavarella A., Frati S., Garibaldi A. ve Gullino M. L., 2007. Incidence and Level of Patulin Contamination In Pure and Mixed Apple Juices Marketed In Italy, Food Control, 18, 1098–1102.
- Speijers, G., J., A., 2004. Patulin, Mycotoxins in Food: Detection and Control, Magan, N., Olsen, M (eds), Cambridge: Woodhead Publishing, 339-352.
- Stevenson, L.G., Drake, S.K. ve Murray, P.R. 2010. Rapid Identification of Bacteria In Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, J Clin Microbiol 48, 444-447.
- Suelves, I., Islas, C.A., Millan, M., Galmes, C., Carter, I.E. ve Herod, A.A., 2003. Chromatographic Separations Enabling The Structural Characterisation of Heavy Petroleum Residues, Fuel, 82, 1–14.
- Tang, Y., Xu, J., Chen, L., Qiu, J., Liu, Y. ve Ouyang, G., 2017. Rapid In Vivo Determination of Fluoroquinolones In Cultured Puffer Fish (*Takifugu Obscurus*) Muscle by Solid-Phase Microextraction Coupled With Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Talanta, 175, 550-556.

- Tangni, E.K., Theys R., Mignolet E., Maudoux M., Michelet J.Y. ve Larondelle, Y., 2003. Patulin In Domestic and Imported Apple-Based Drinks In Belgium: Occurrence and Exposure Assessment, Food Additives and Contaminants, 20, 5, 482–489.
- Tournas, Welke, J.E., Hoeltz, M., Dottori, H.A. ve Noll, I., B., 2010. Fungi and Patulin In Apples and The Role Of Processing On Patulin Levels In Juices: A Study On Naturally Contaminated Apples, Journal of Food Safety 30, 276–287.
- Tsalev, D.L., 1994. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry In Occupational and Environmental Health Practice—A Decade Of Progress And Establishment. A Review. Invited Lecture, J. Anal. At. Spectrom. 9, 405-414.
- Türk Gıda Kodeksi, 2011. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, Resmi Gazete. 28157.
- Udomkun, P., Wiredu A.N., Nagle M., Müller J., Vanlauwe B. ve Bandyopadhyay, R., 2017. Innovative Technologies To Manage Aflatoxins In Foods and Feeds And The Profitability of Application – A Review, Food Control, 76, 127–138.
- Uysal, A., Kurt Ş., Soylu E.M., Kara M. ve Soylu S., 2018. Evaluation of the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Identification of Some Plant Fungal Pathogenic Species. International Agricultural Science Congress. 09-12 May Van/Turkey.
- Van Egmond, H.P., 1987. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis, Food Additives and Contaminants, 6,2, 139-188.
- Venelinov, T. ve Quevauviller, P., 2003. Are Certified Reference Materials Really Expensive, TrAC Trends Anal. Chem., 22, 15-18.
- Veprikova, Z., Zachariasova, M., Dzuman, Z., Zachariasova, A., Fenclova, M., Slavikova, P., Vaclavikova, M., Mastovska, K., Hengst, D. ve Hajslova, J., 2015. Mycotoxins In Plant-Based Dietary Supplements: Hidden Health Risk for Consumers, J. Agric. Food Chem., 29, 63, 6633–6643.
- Voss, K.A., Smith, G.W. ve Haschek, W.M., 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, Mechanism of Action and Toxicity, Animal Feed Science and Technology, 137, 299-325.
- Walker, R. ve Lumley I., 1999. Pitfalls in terminology and use of referencematerials, Trends Anal. Chem. 18, 594-616.
- Wang, L.D., Yang, H.H., Fan, Z.M., Lu, X.D., Wang, J.K. ve Liu, X.L., 2005. Cytological Screening and 15 Years Follow-Up (1986-2001) For Early Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Precancerous Lesions In A High-Risk Population In Anyang County, Henan Province, Northern China, Cancer Detectection and Prevention, 29, 317-322.
- Wanga, L., Liaoa, Y., Penga, Z., Chena, L., Zhanga, W., Nüsslerd, A.K., Shie, S., Liua, L. ve Yanga, W., 2019. Food Raw Materials and Food Production Occurrences of Deoxynivalenol In Different Regions, Trends in Food Science & Technology, 83, 41-52.

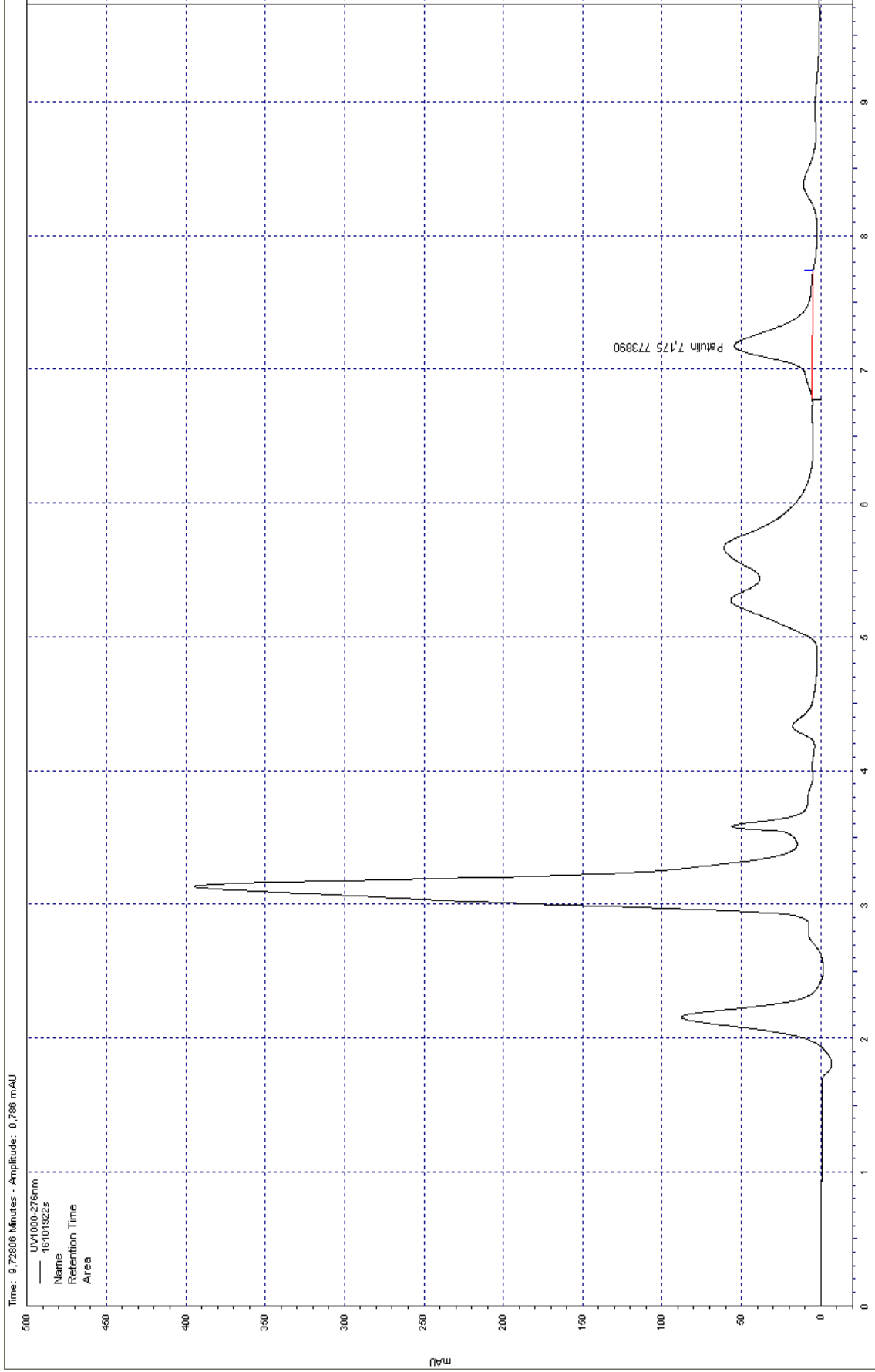
- Waskiewicz, A., Beszterda, M. ve Golinski, P., 2012. Occurrence Of Fumonisin In Food An Interdisciplinary Approach To The Problem, Food Control, 26, 491-499.
- Waskiewicz, A., Golinski, P., Karolewski, Z., Irzykowska, L., Bocianowski, J. ve Kostecki M., 2010. Formation of Fumonisin and Other Secondary Metabolites by *Fusarium Oxysporum* and *F. Proliferatum* - A Comparative Study, Food Additives and Contaminants, 27, 5, 608-615.
- Waskiewicz, A., Irzykowska, L., Bocianowski, J., Karolewski, Z., Kostecki, M. ve Weber, Z., 2010. Occurrence of *Fusarium* Fungi and Mycotoxins In Marketable Asparagus Spears, Polish Journal of Environmental Studies, 19, 1, 219-225.
- Wild, C.P. ve Montesano, R.A., 2009. Model of Interaction: Aflatoxins and Hepatitis Viruses In Liver Cancer Aetiology and Prevention, Cancer Lett. 286, 22–28.
- Wilson, D.M. ve Nuovo, G.J., 1973. Patulin Production In Decayed by *Penicillium Expansum*, Appl. Microbiol., 26, 1, 124-125
- Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food & Nutrition Paper, 64, 1–43.
- Yang, Y., P. Qin P., X. Zhang, X., J. Niu, J., S. Tian, S., M. Lu, M., J. Zhu, J. ve Cai, Z., 2018. Layer-By-Layer Fabrication of G-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Coating For Headspace Solid-Phase Microextraction of Food Additives Followed by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection, Anal. Methods., 10, 322-329.
- Yin, L., Mondal, Q. Hu, S., Xu J. ve Ouyang, G., 2019. Peanut Shell-Derived Biochar Materials for Effective Solid-Phase Microextraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Environmental Waters, Talanta, 202, 90-95.
- Zgoła-Grześkowiak, A. ve Grześkowiak, T., 2011. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, TrAC Trends Anal. Chem., 30, 1382-1399.
- Zhang, J., Li, W., Zhu, W., Qin, P., Lu, M., Zhang, X., Miao, Y. ve Cai, Z., 2019. Mesoporous Graphitic Carbon Nitride@NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanocomposite As A Solid Phase Microextraction Coating For Sensitive Determination Of Environmental Pollutants In Human Serum Samples, Chem. Commun., 55, 10019-10022.
- Zouaoui, N., Mallebrera, B., Berrada, H., Abid-Essefi, S., Bach, a H. ve Ruiz, M.J., 2016. Cytotoxic Effects Induced by Patulin, Sterigmatocystin and Beauvericin On CHO-K1 cells, Food Chem. Toxicol, 89, 92–103.



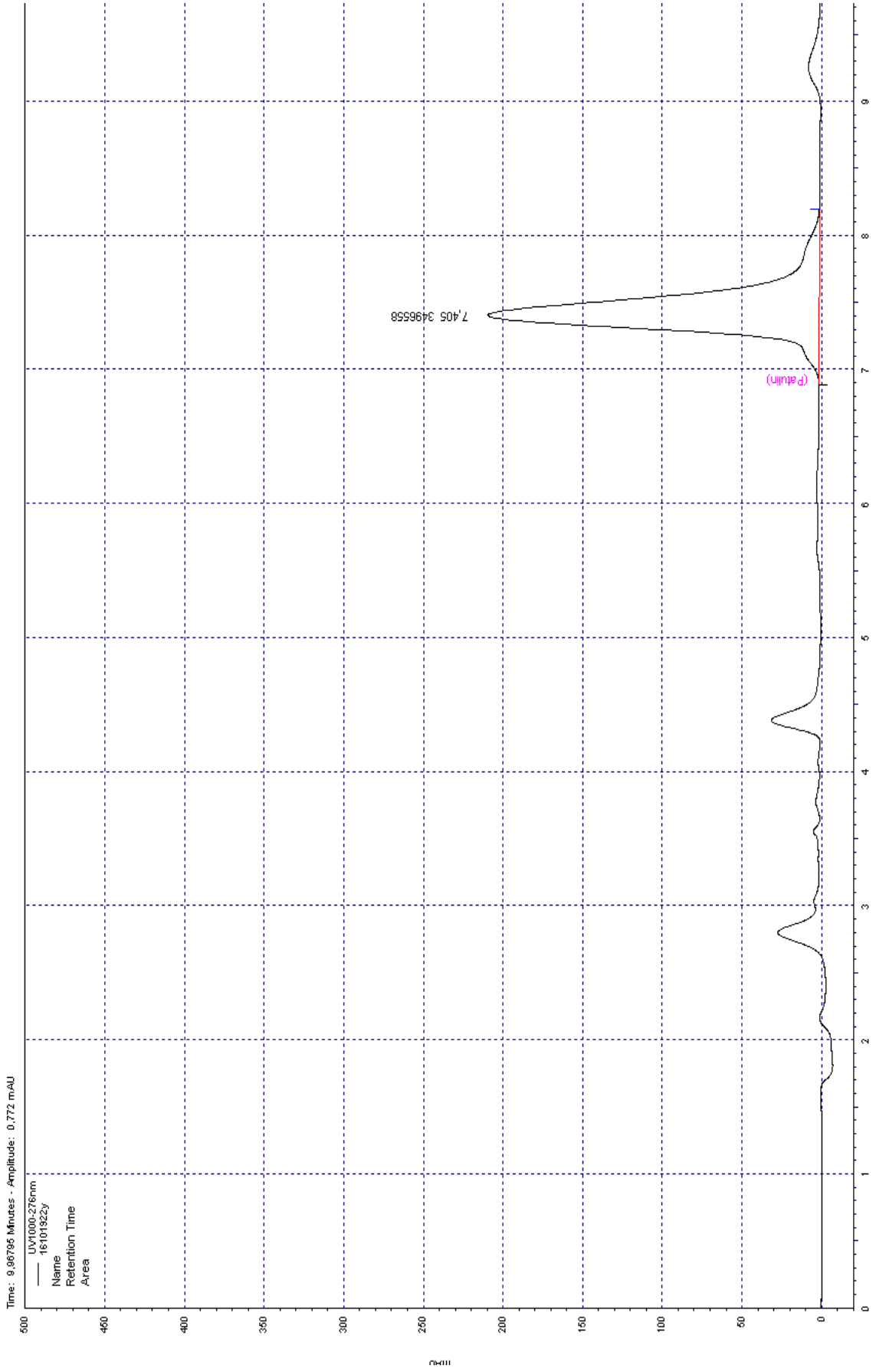
## 6. EKLER:



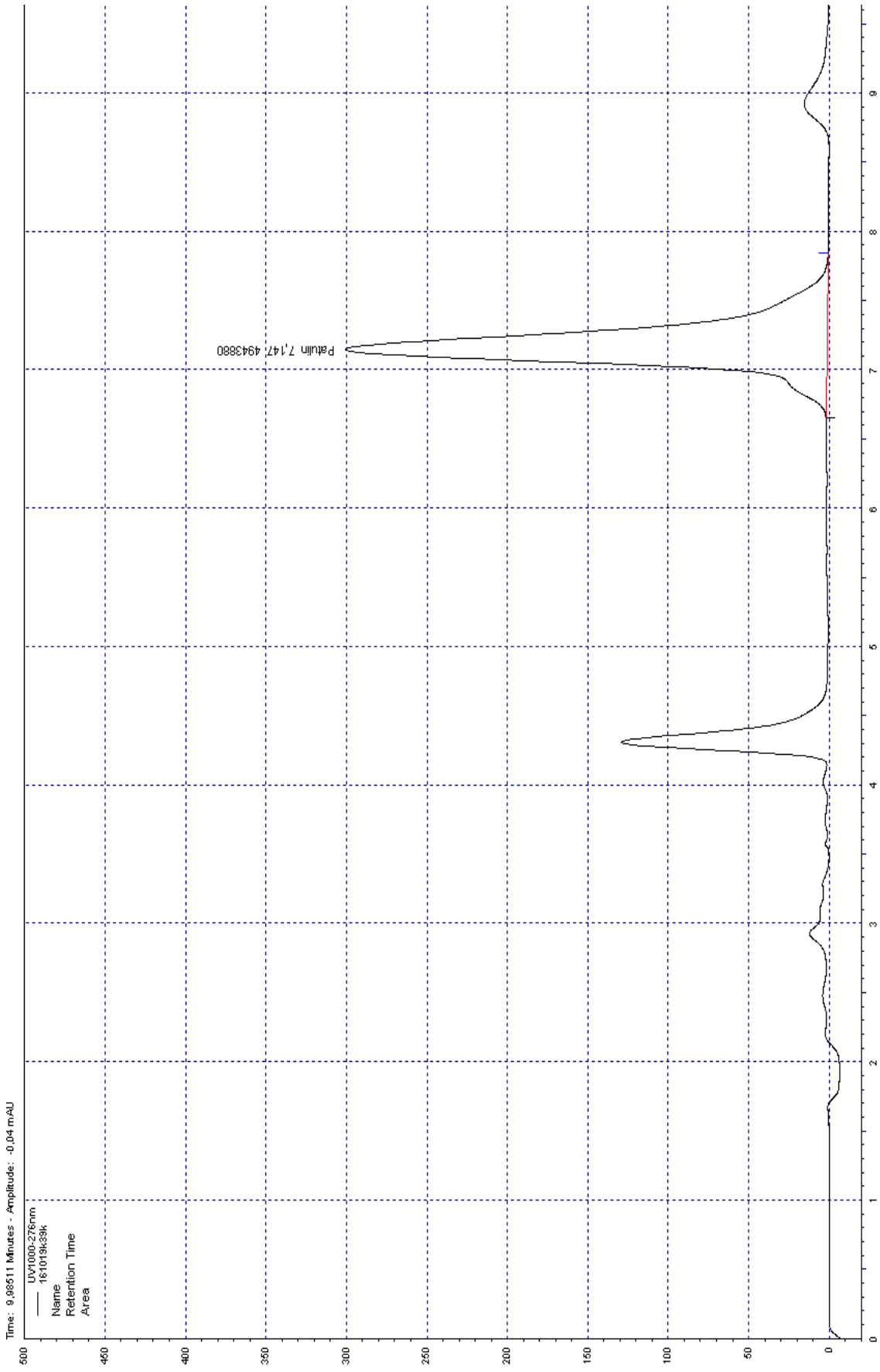
**Ek Şekil 6.1. 22K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



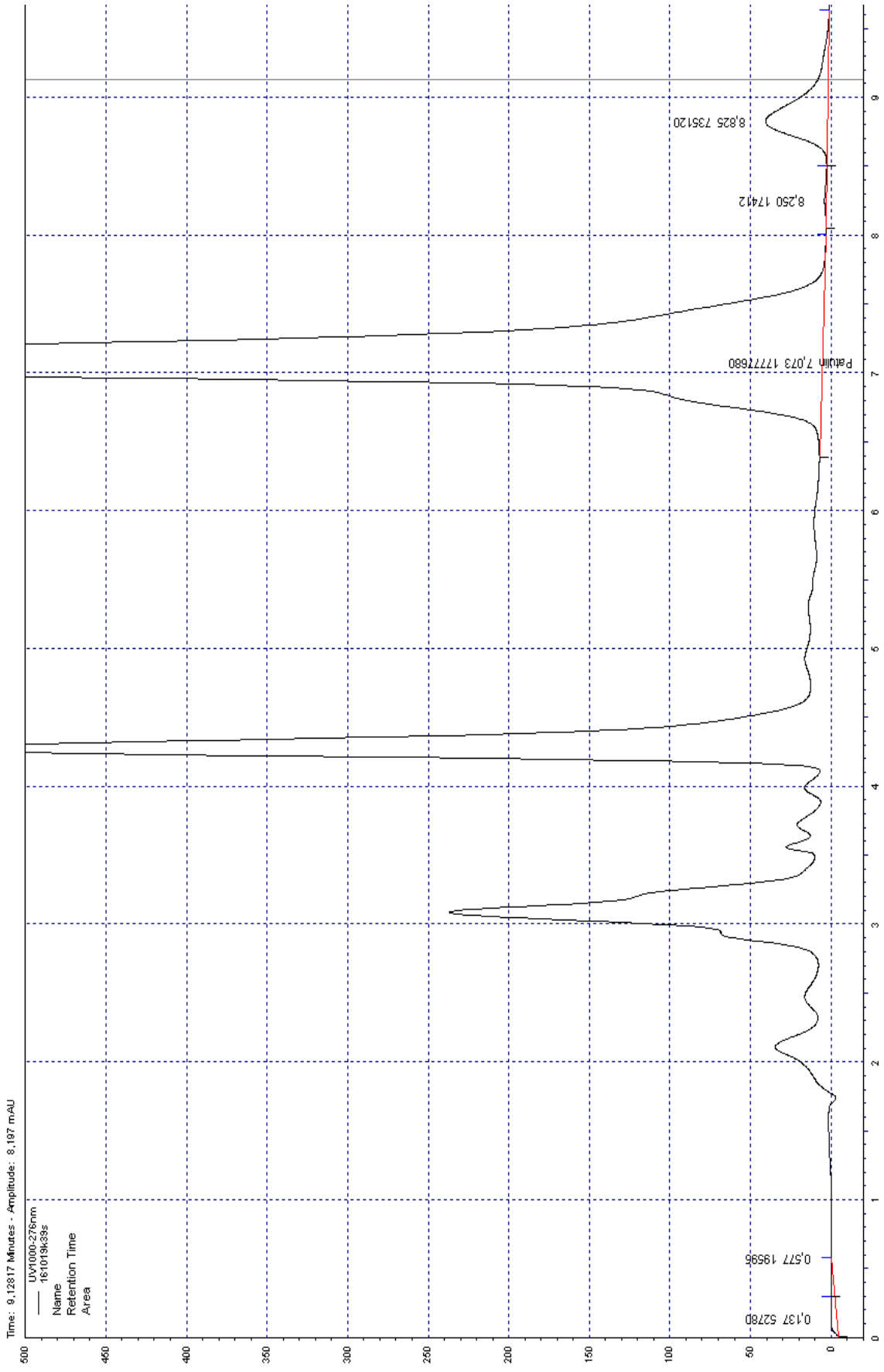
**Ek Şekil 6.2.** 22S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



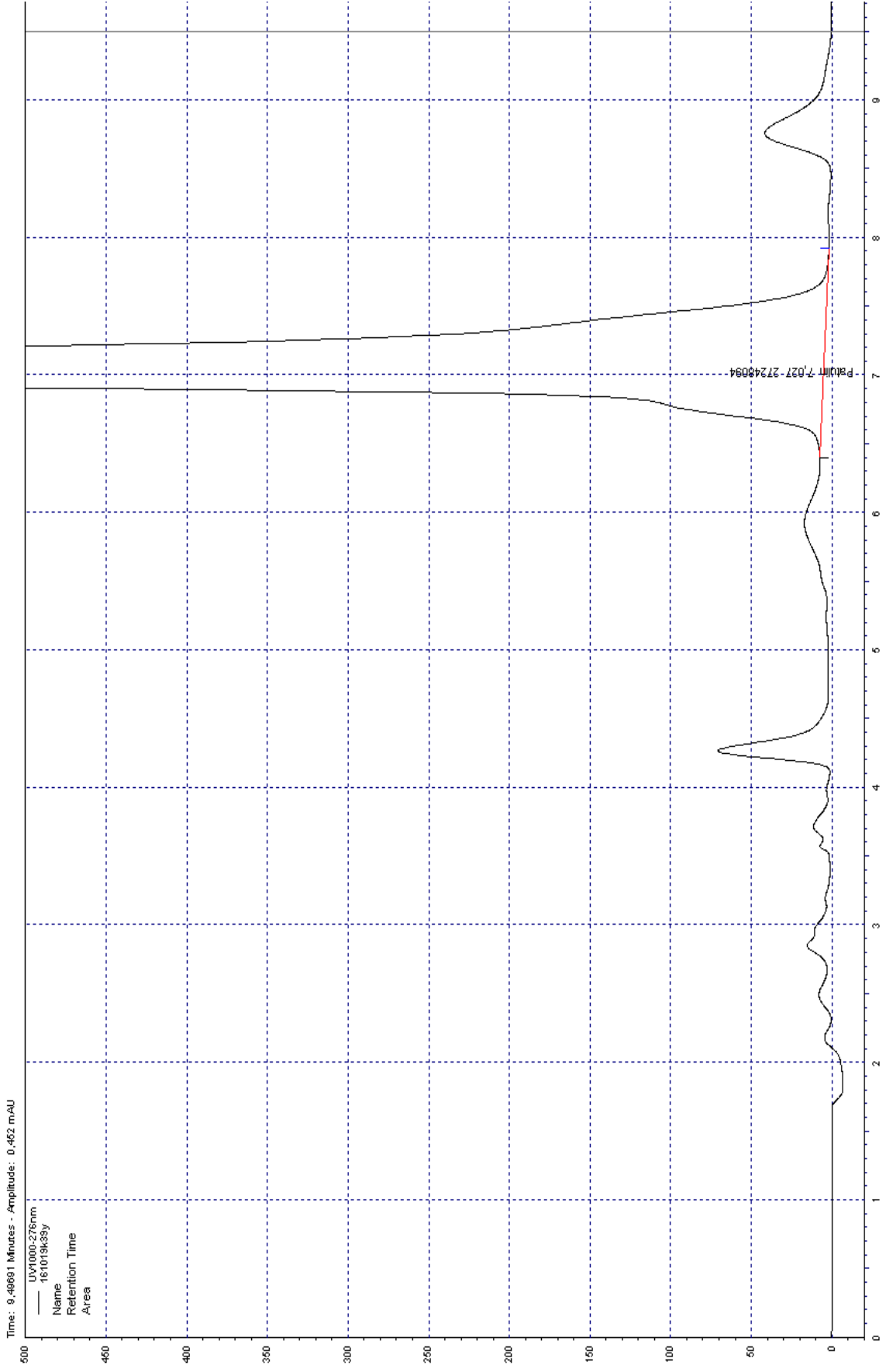
Ek Şekil 6.3. 22Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



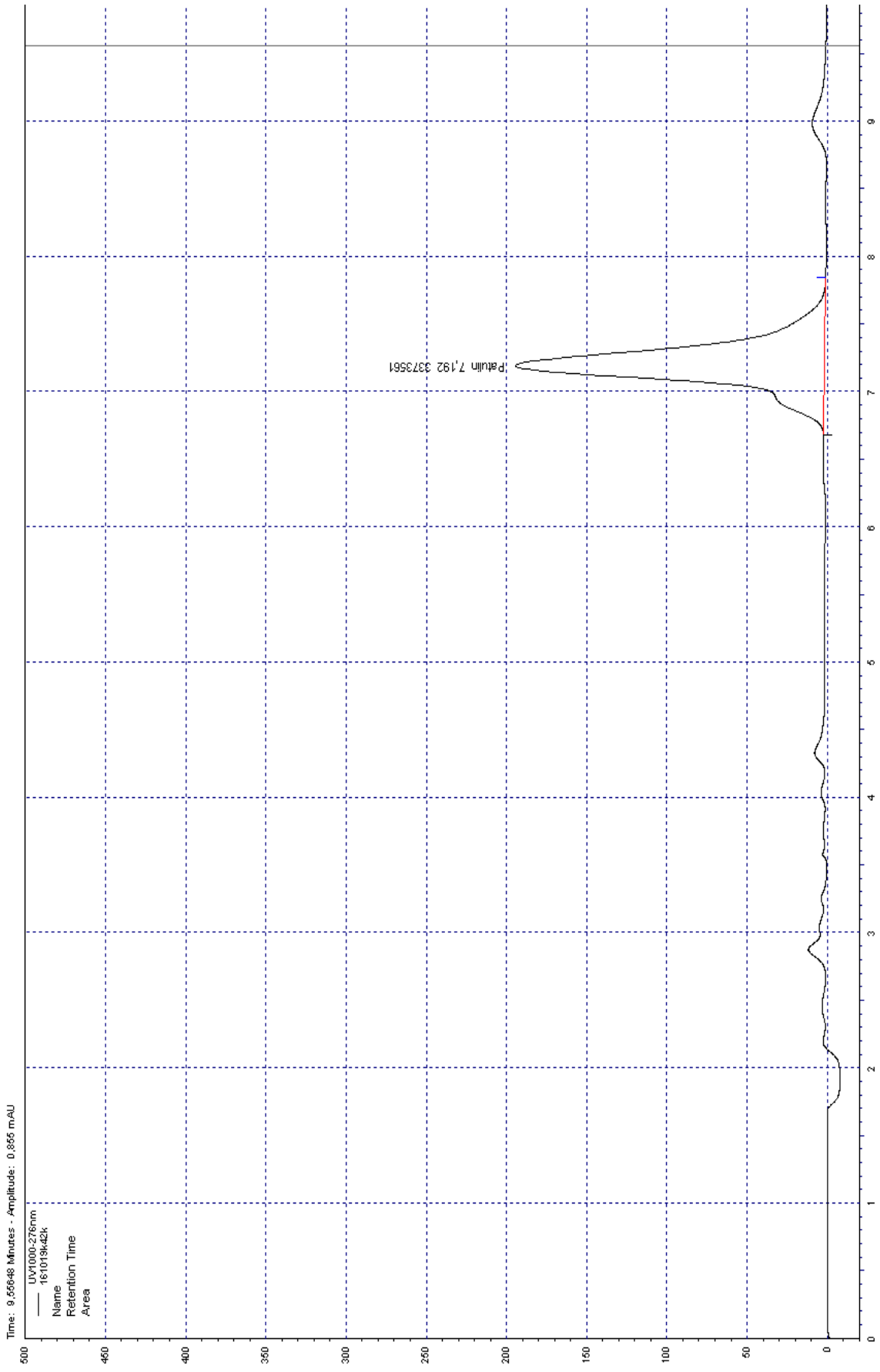
**Ek Şekil 6.4. 39K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



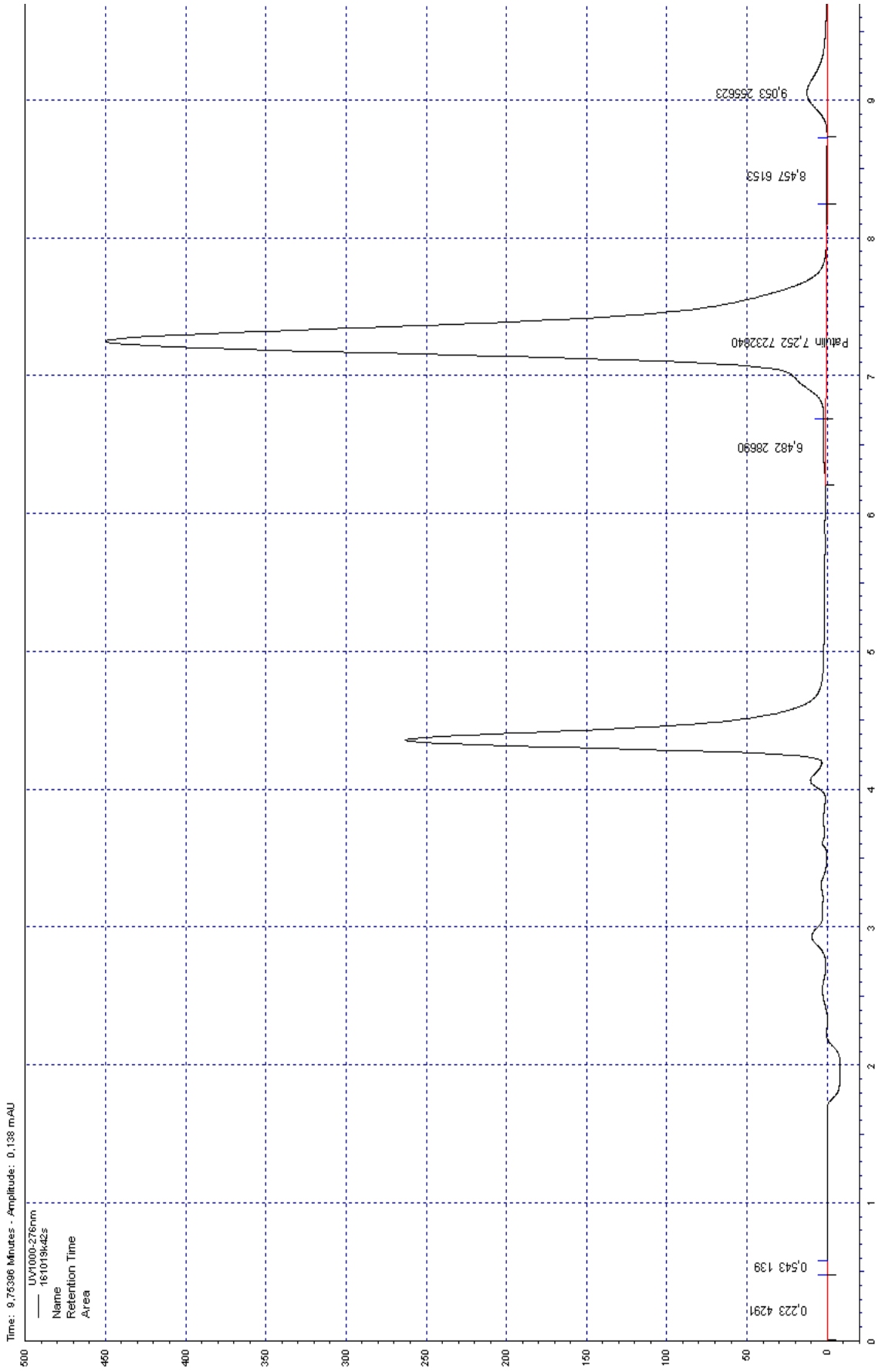
**Ek Şekil 6.5. 39S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



**Ek Şekil 6.6. 39S** Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

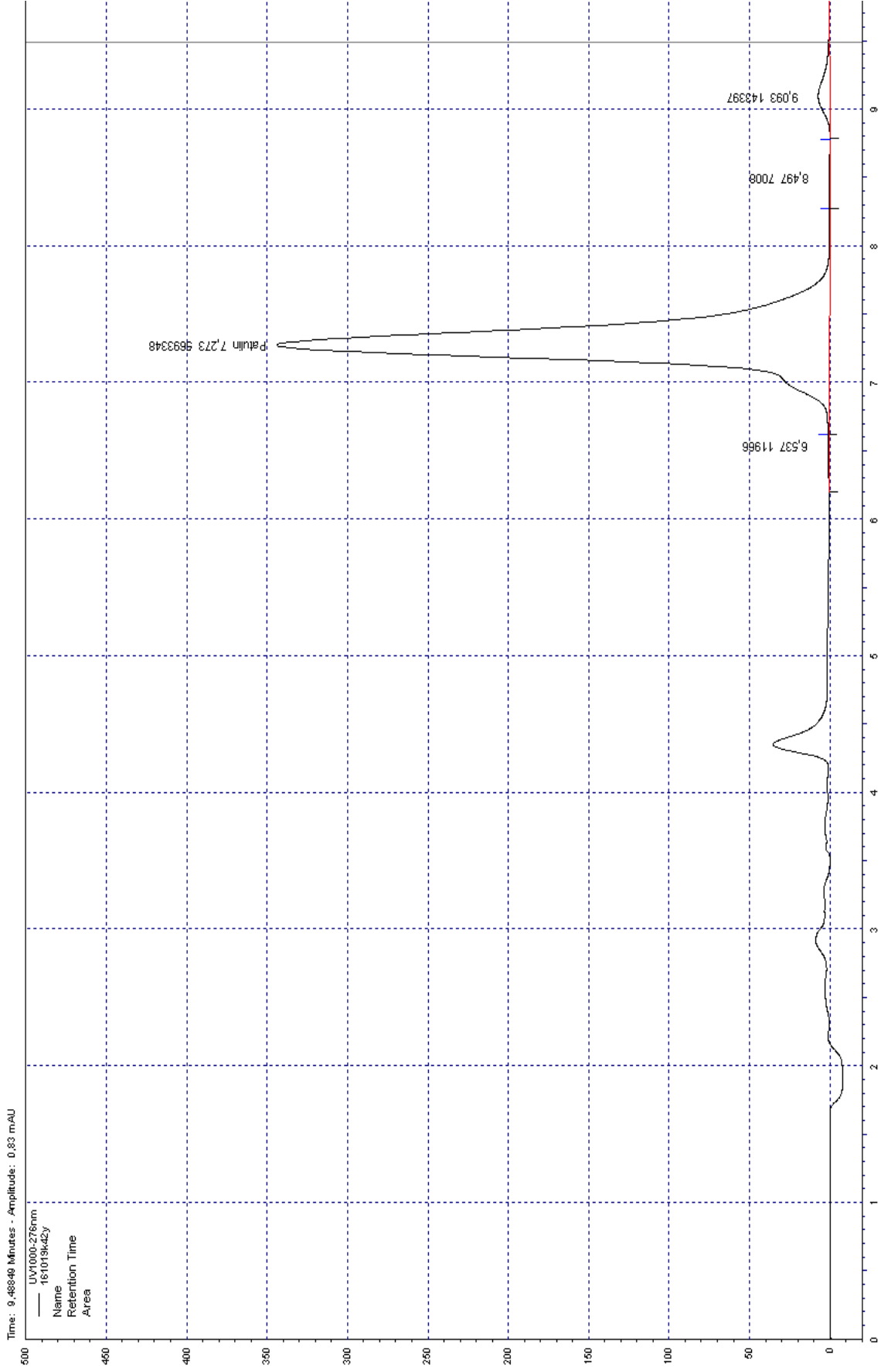


**Ek Şekil 6.7. 42K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**

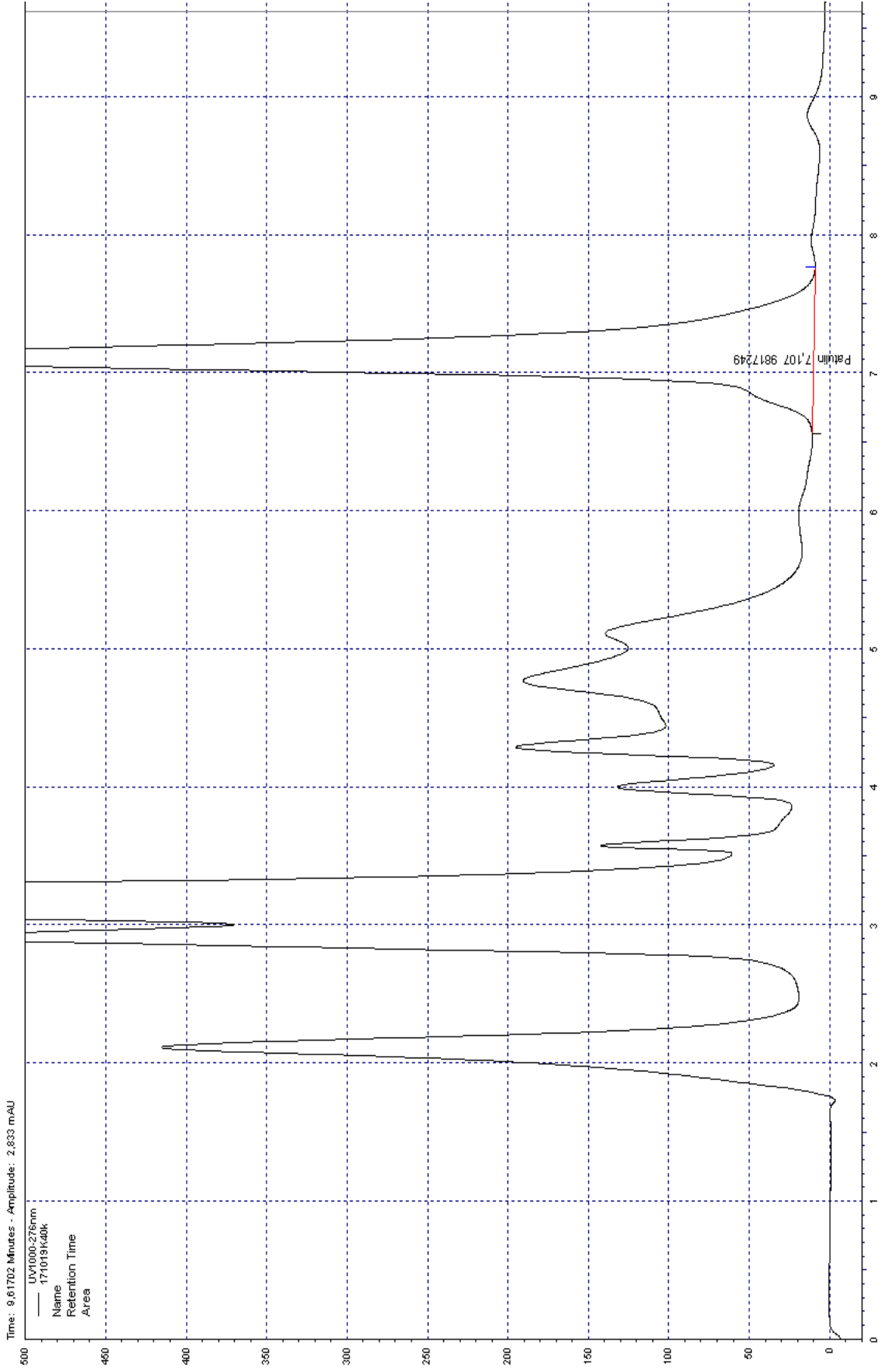


**Ek Şekil 6.8. 42S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**

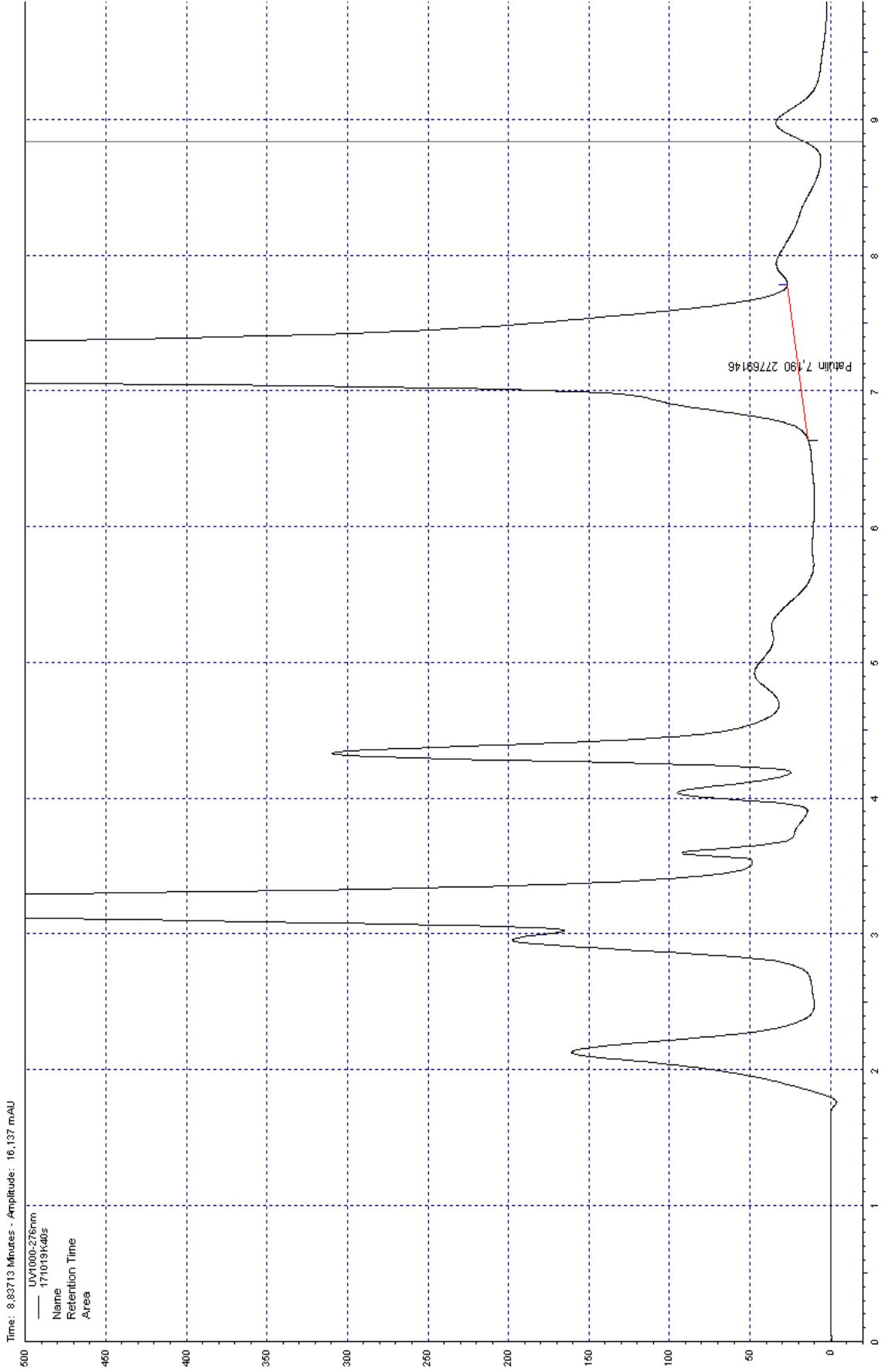




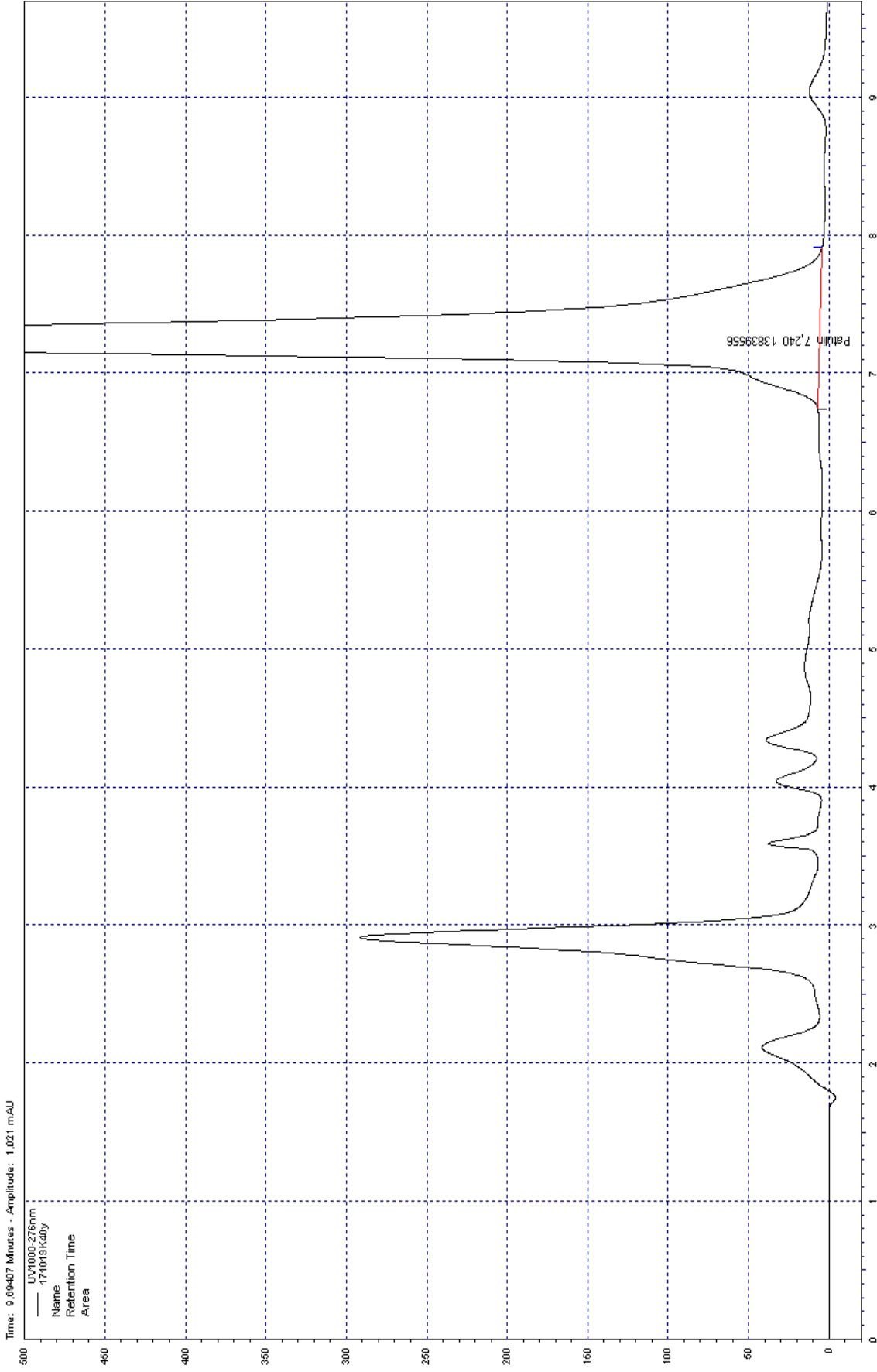
**Ek Şekil 6.9. 42Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



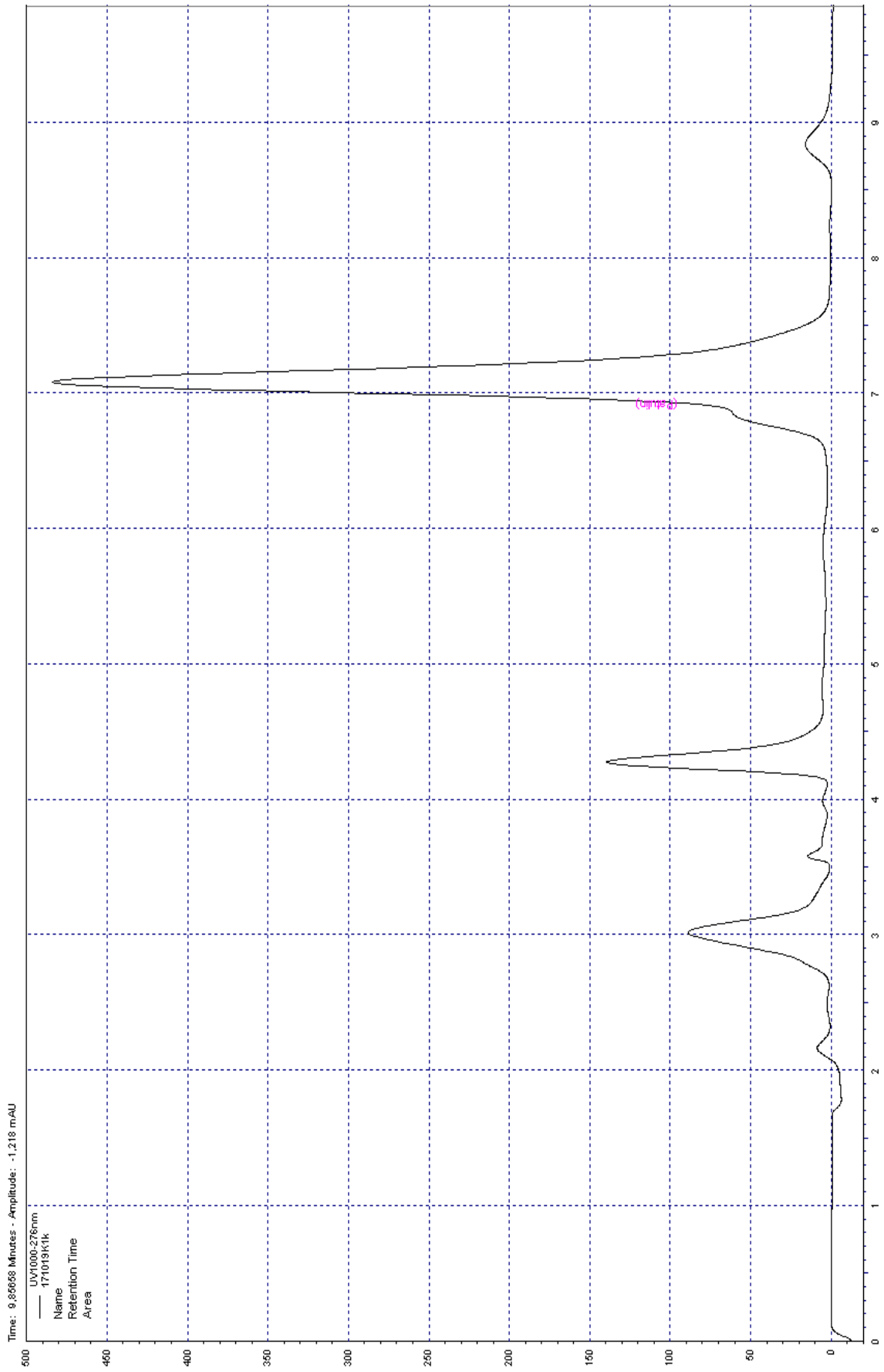
**Ek Şekil 6.10. 40K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



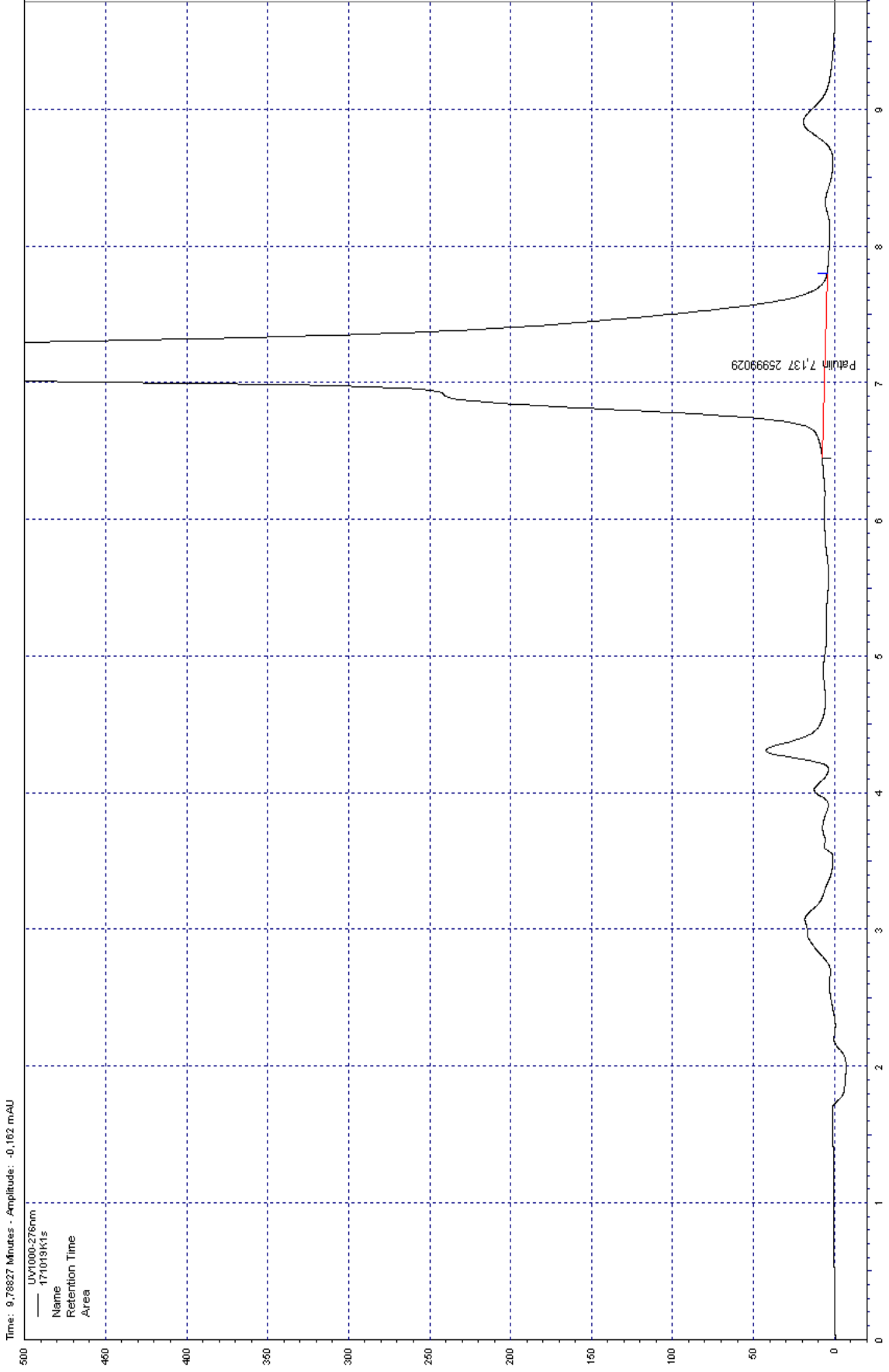
**Ek Şekil 6.11. 40S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



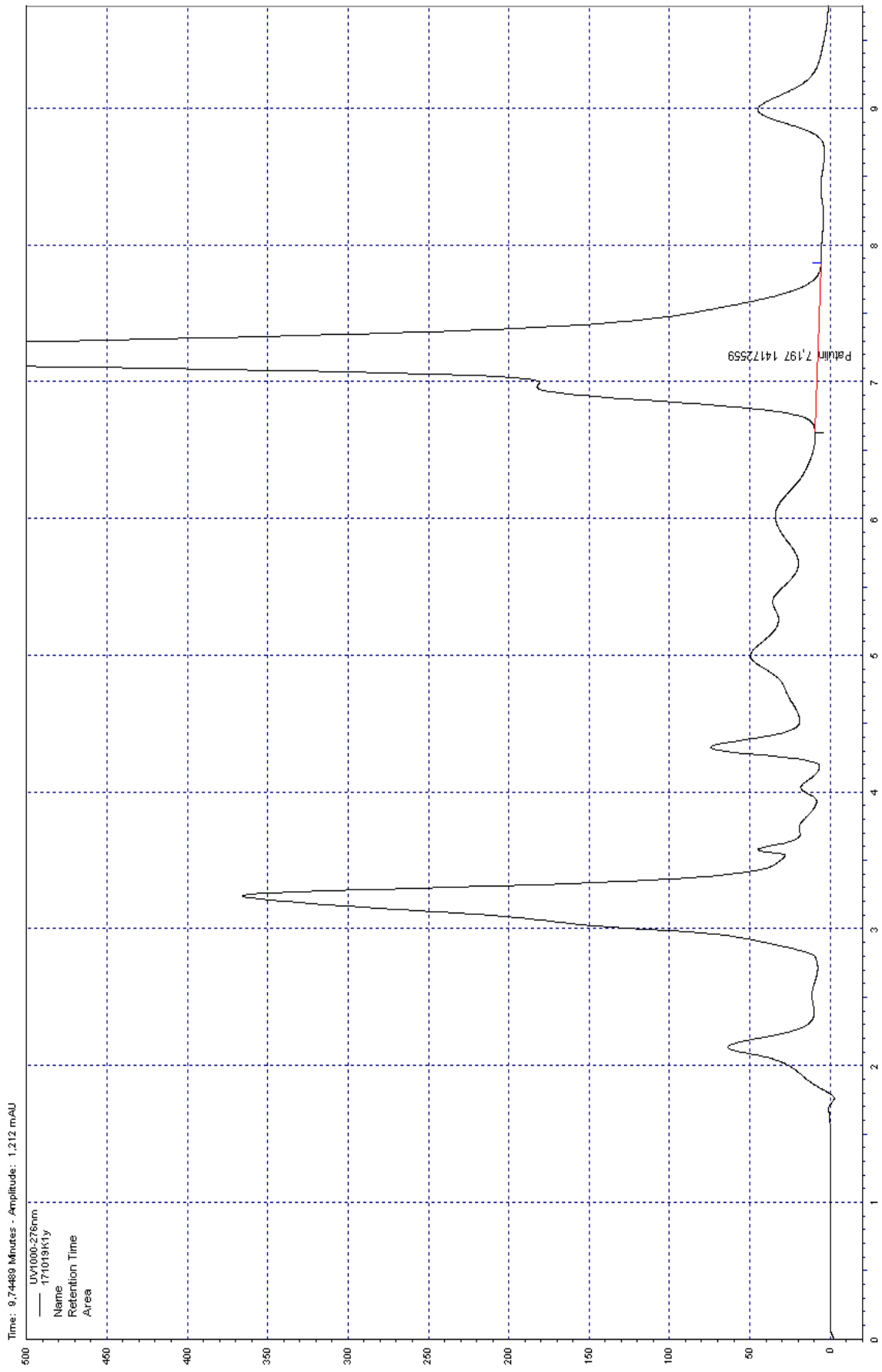
**Ek Şekil 6.12. 40Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



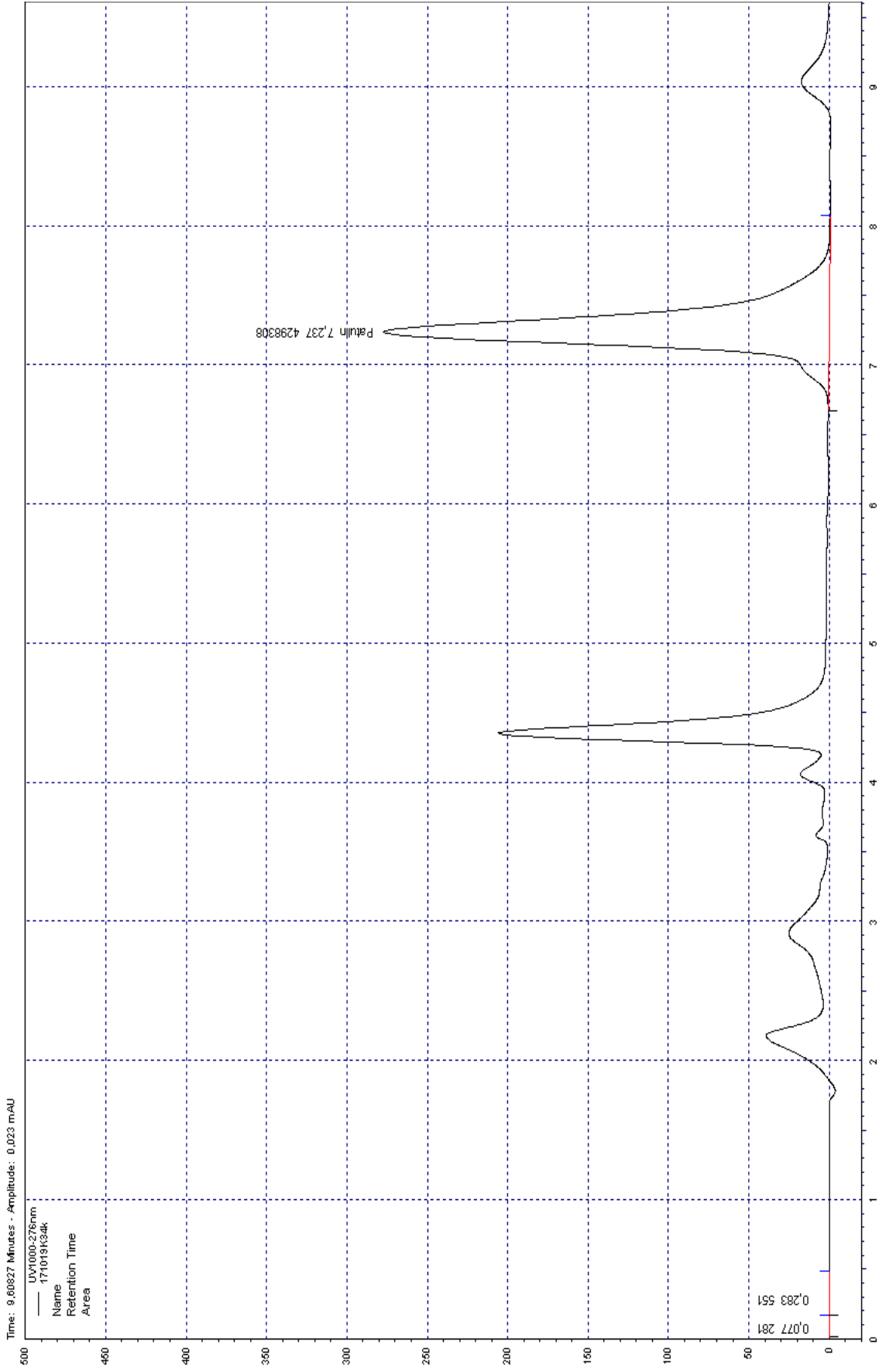
**Ek Şekil 6.13. 1K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



**Ek Şekil 6.14.** 1S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

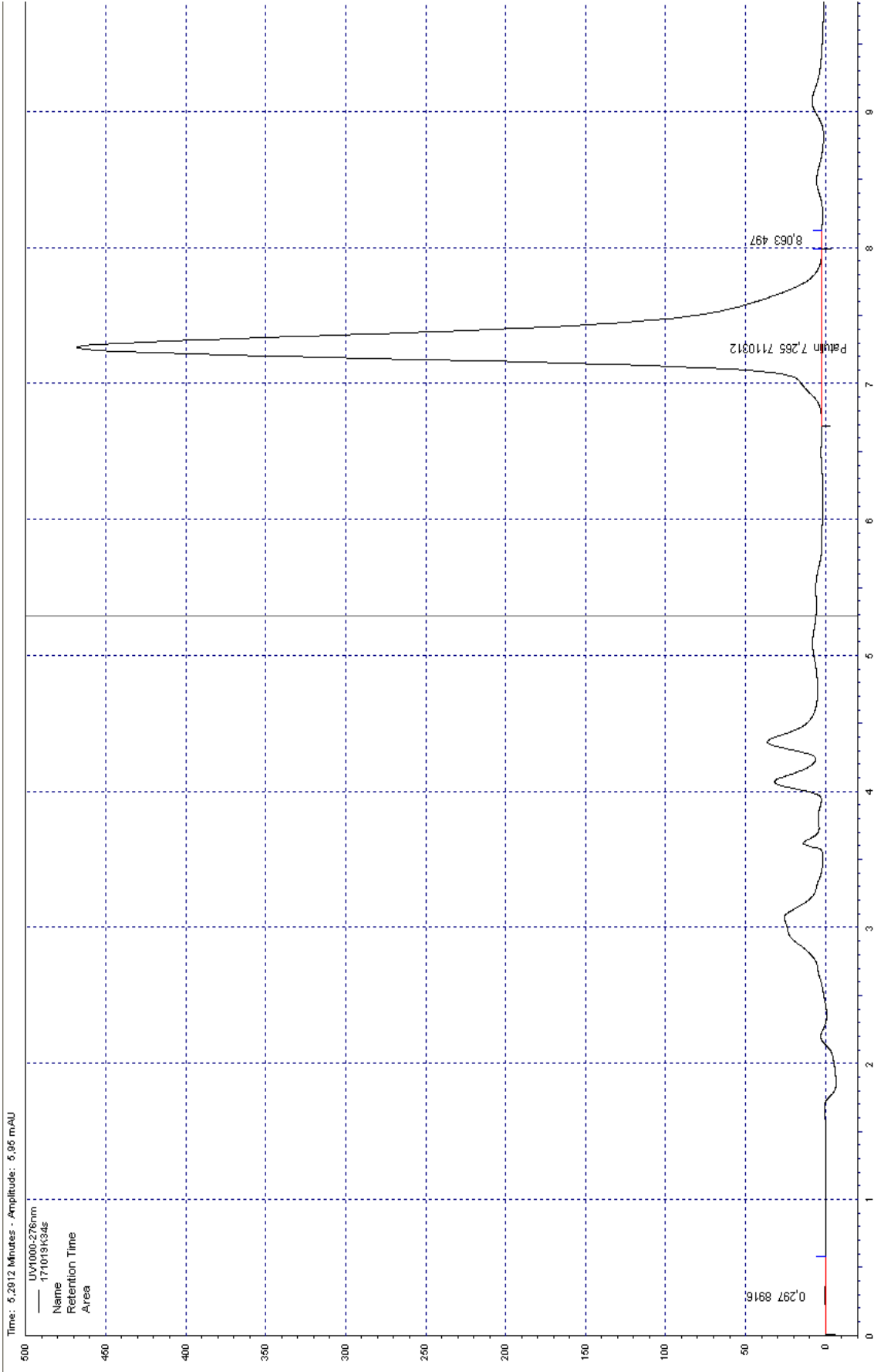


**Ek Şekil 6.15.** 1Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

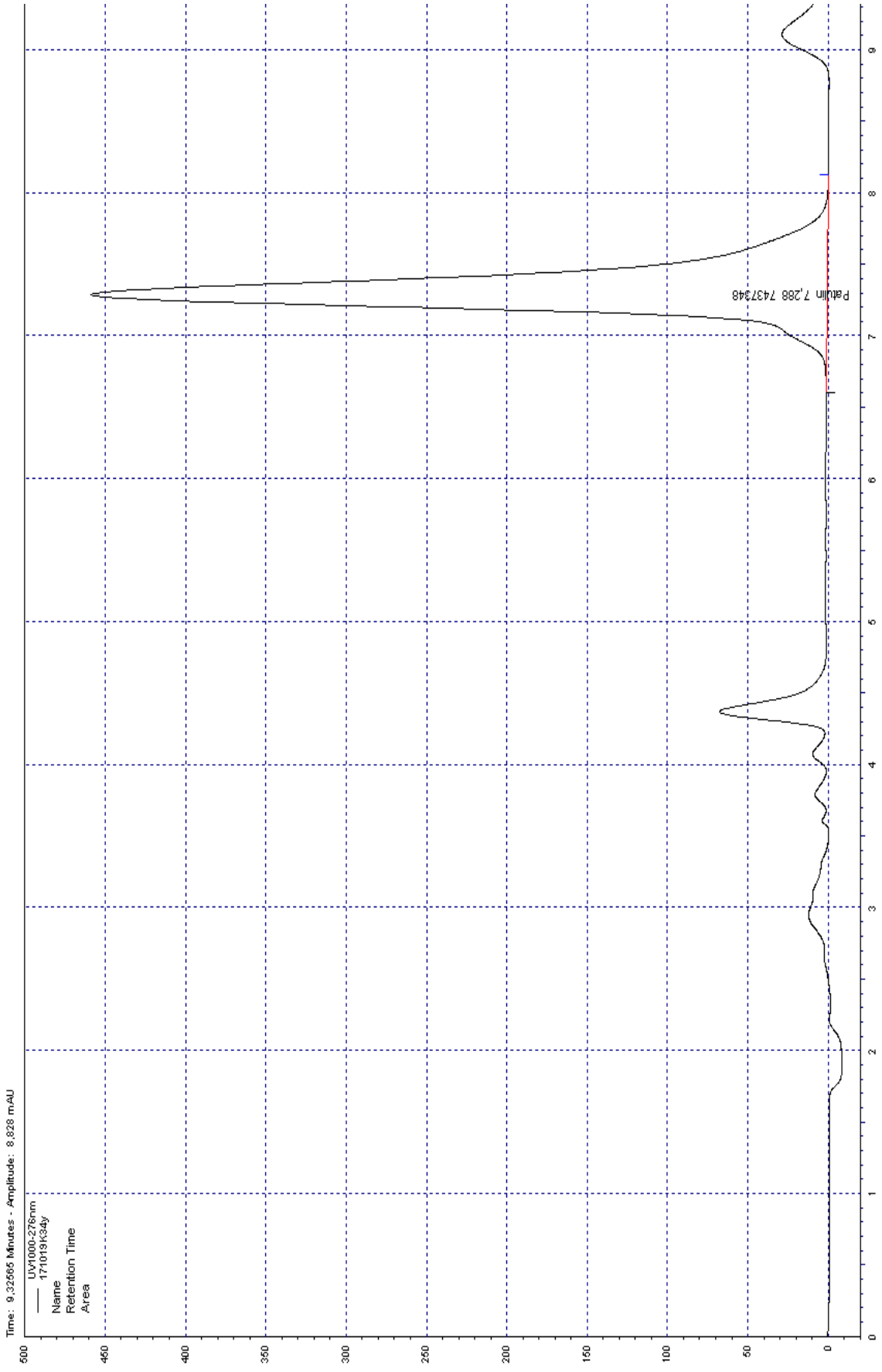


**Ek Şekil 6.16.** 34K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

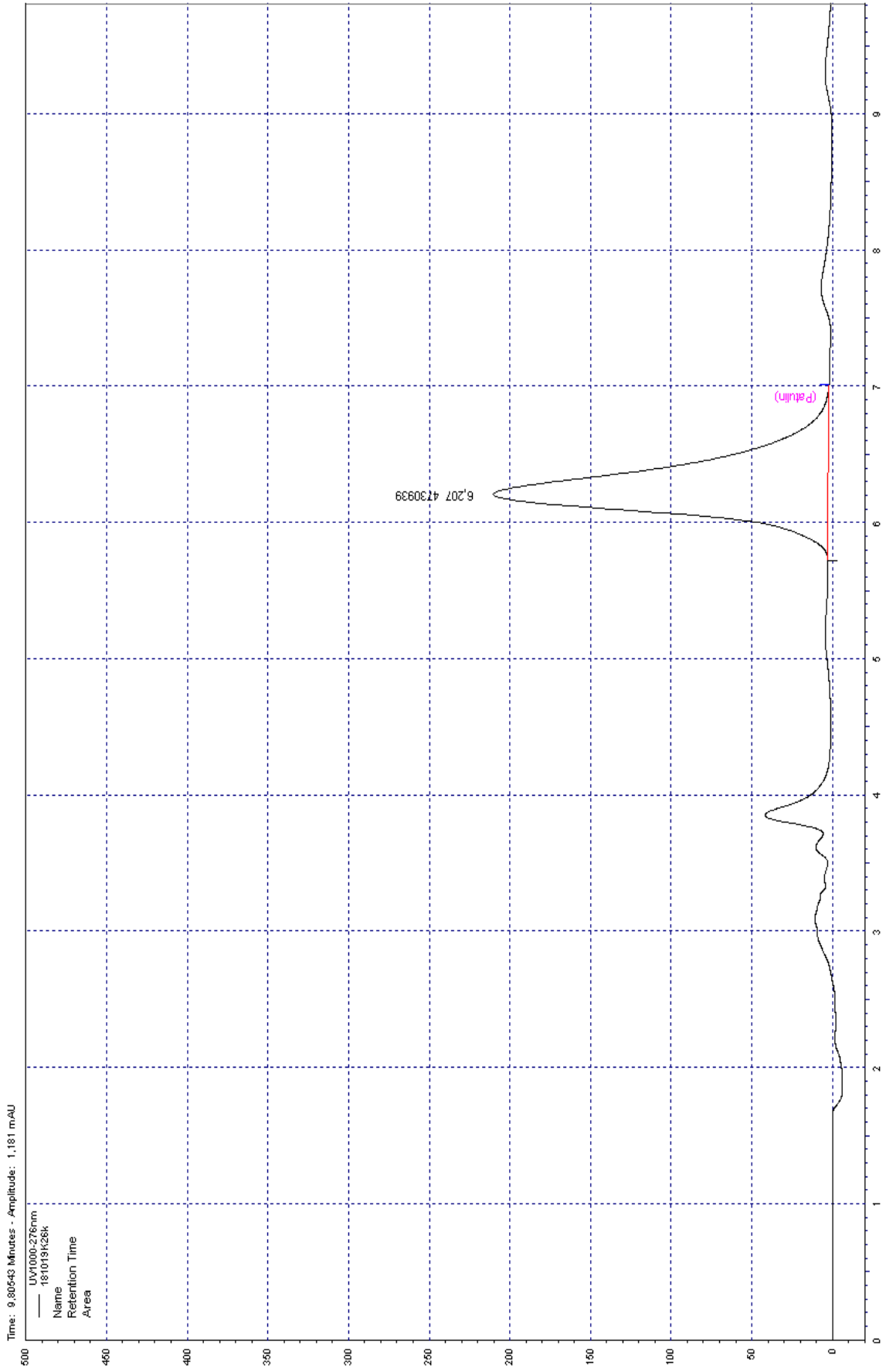




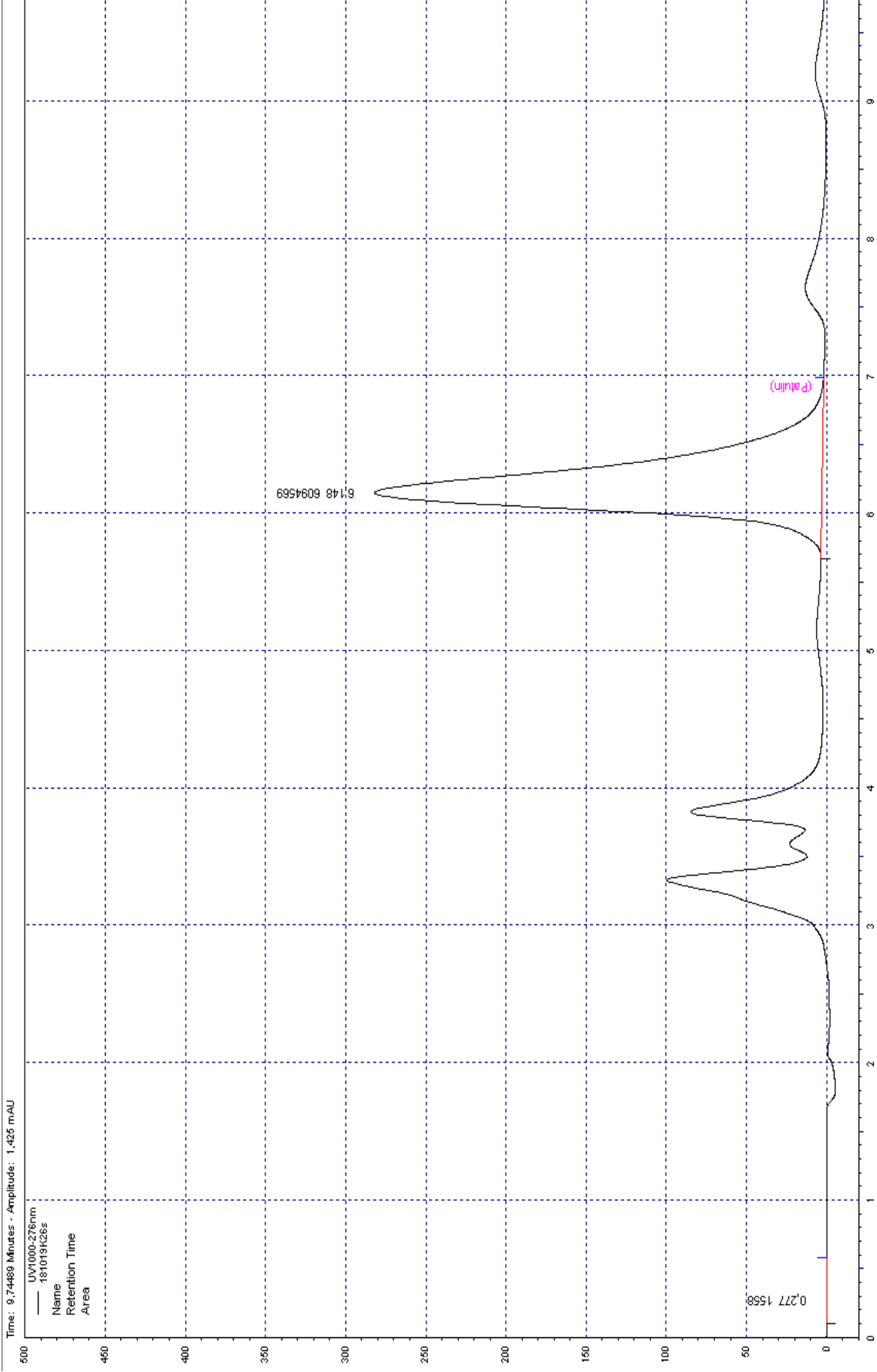
**Ek Şekil 6.17. 34S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



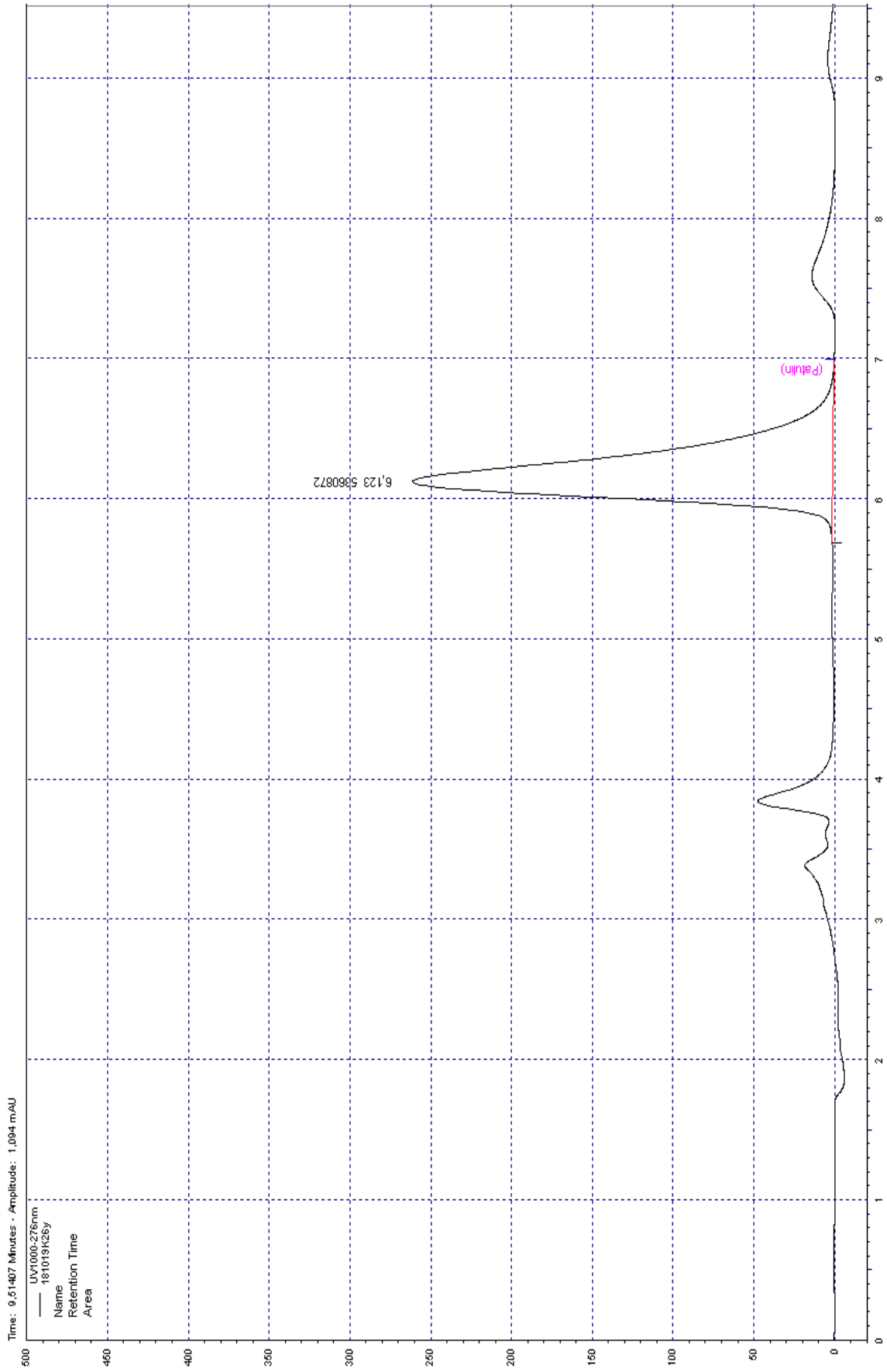
**Ek Şekil 6.18.** 34 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



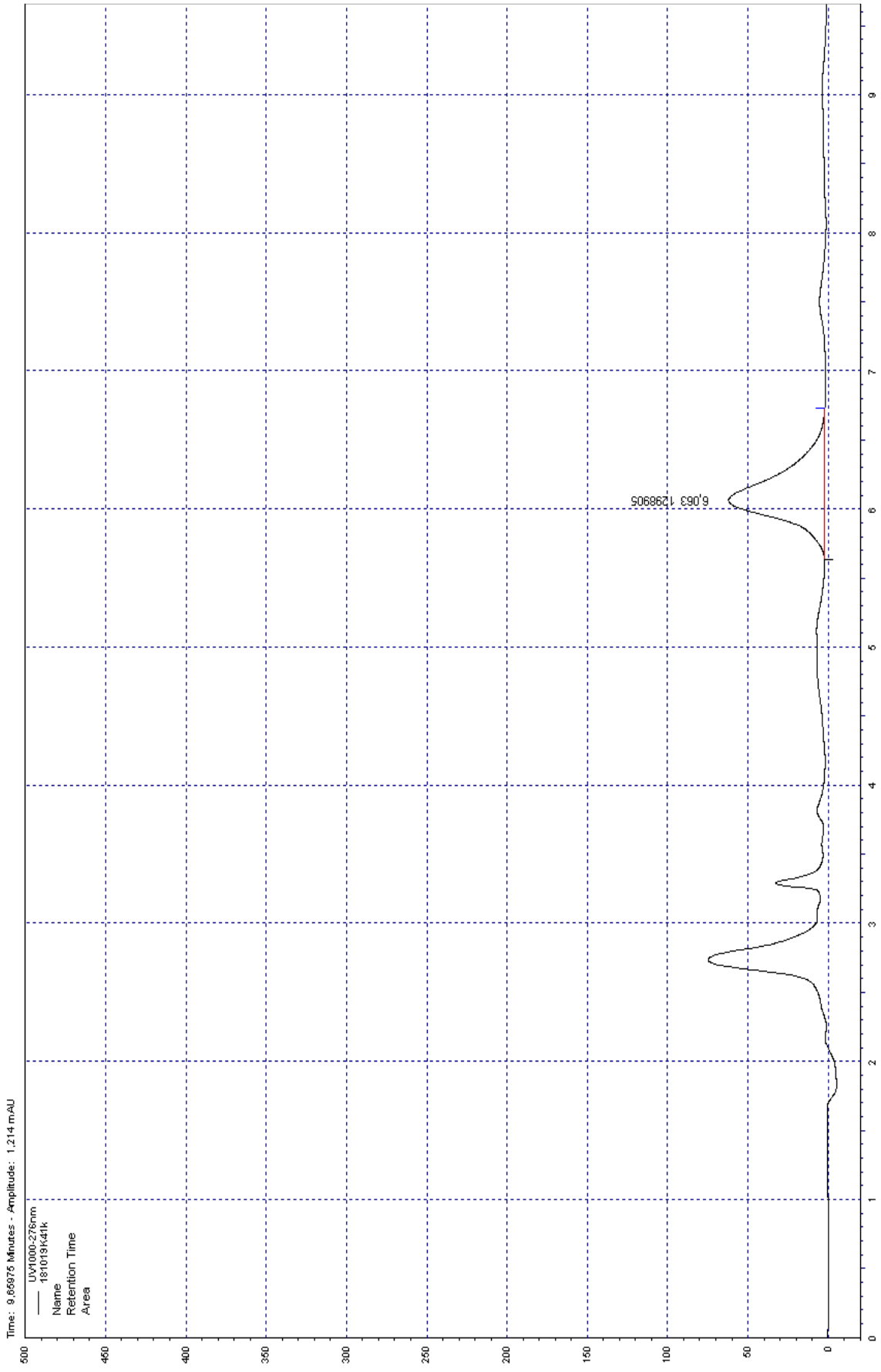
**Ek Şekil 6.19.** 26 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



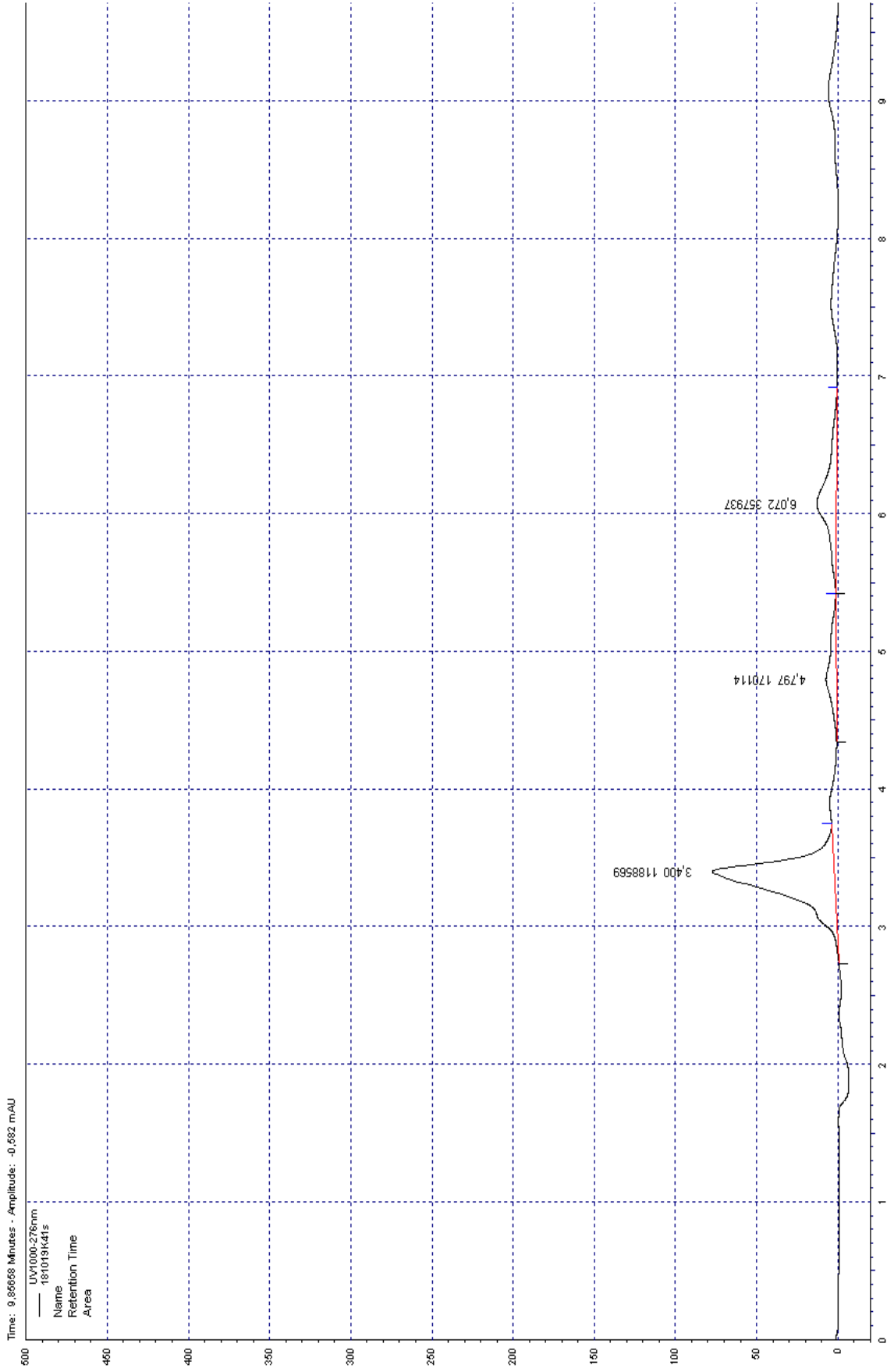
**Ek Şekil 6.20. 26S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



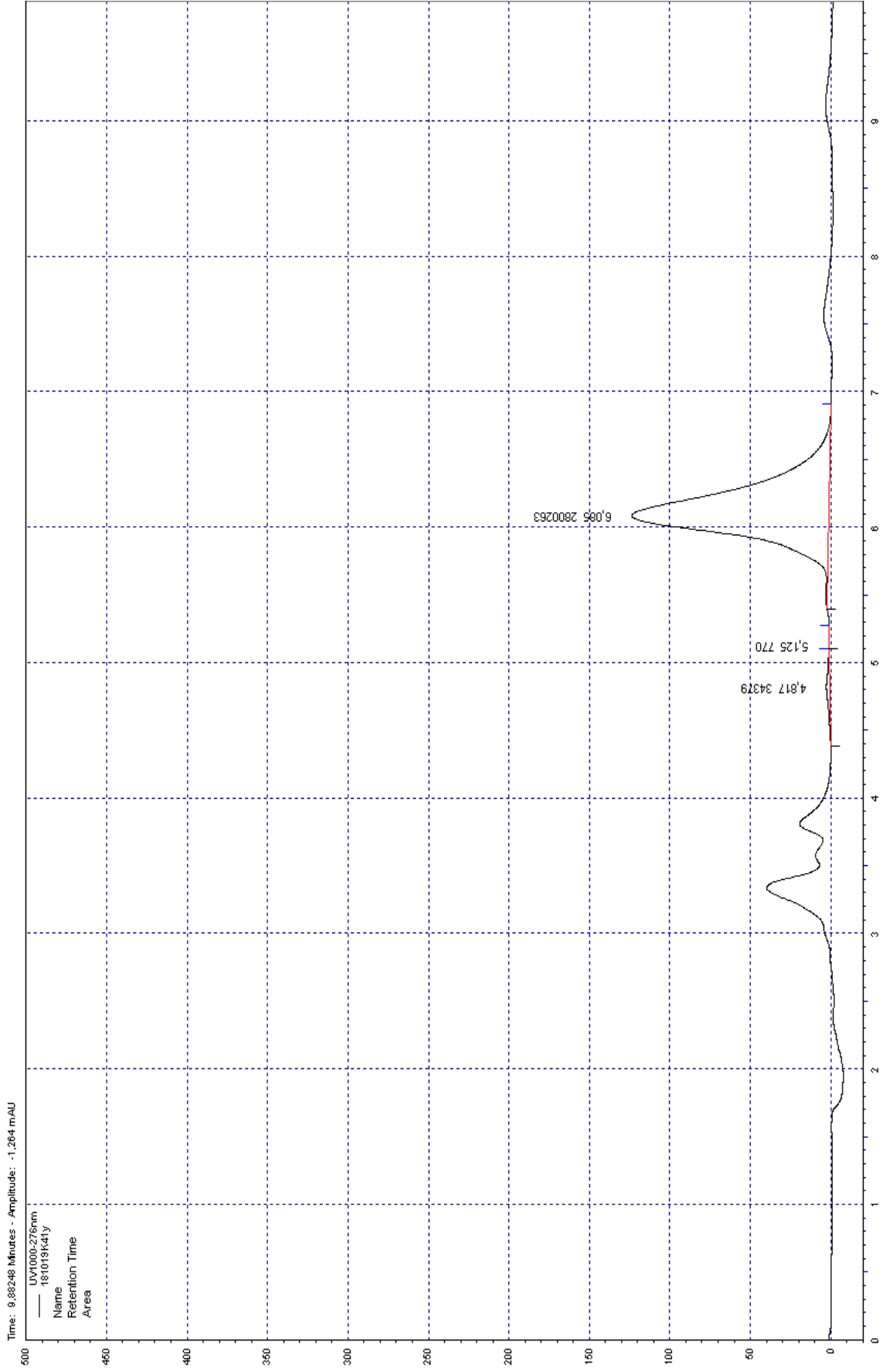
**Ek Şekil 6.21. 26Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



**Ek Şekil 6.22. 41K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**

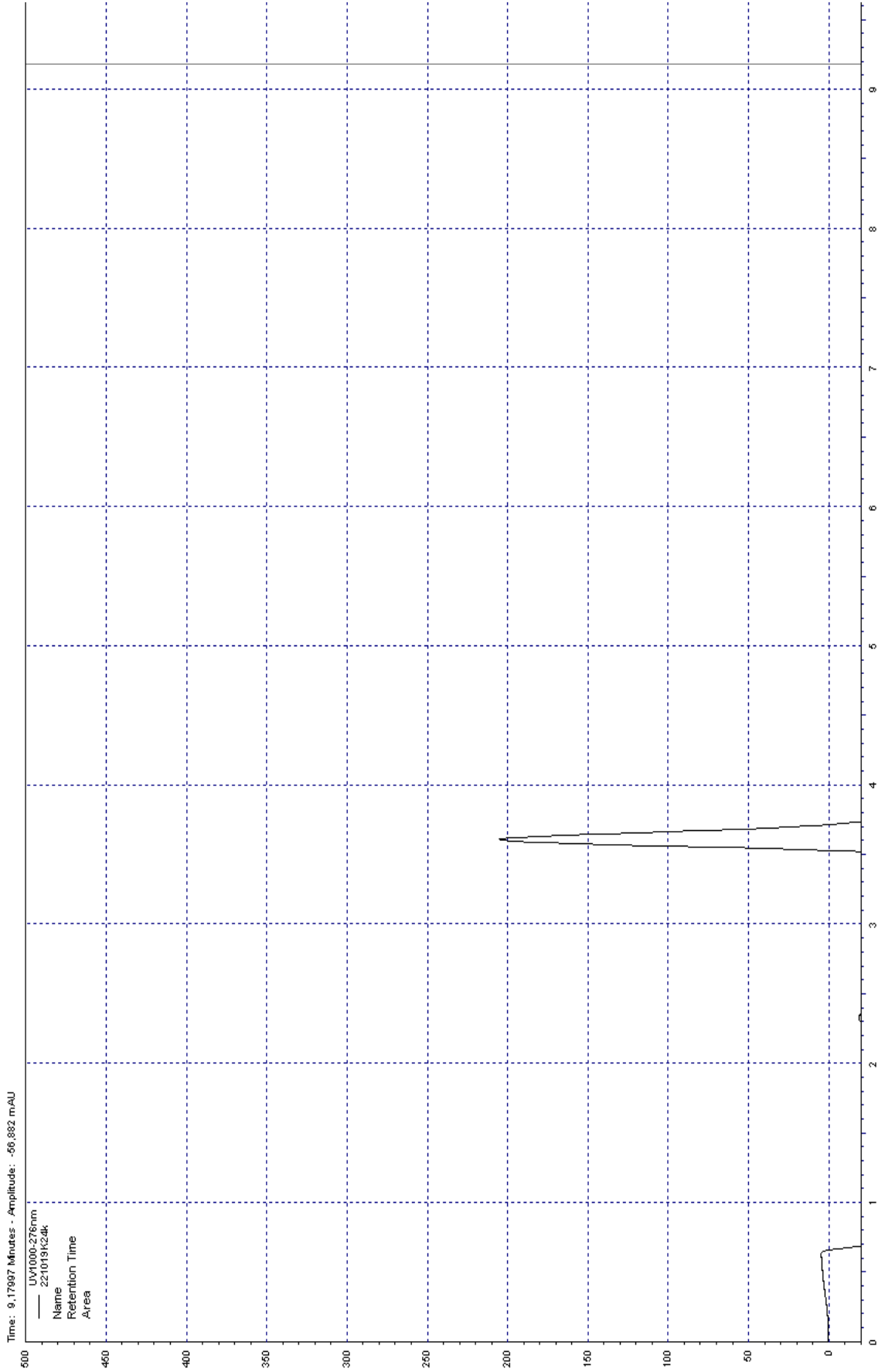


**Ek Şekil 6.23.** 41S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

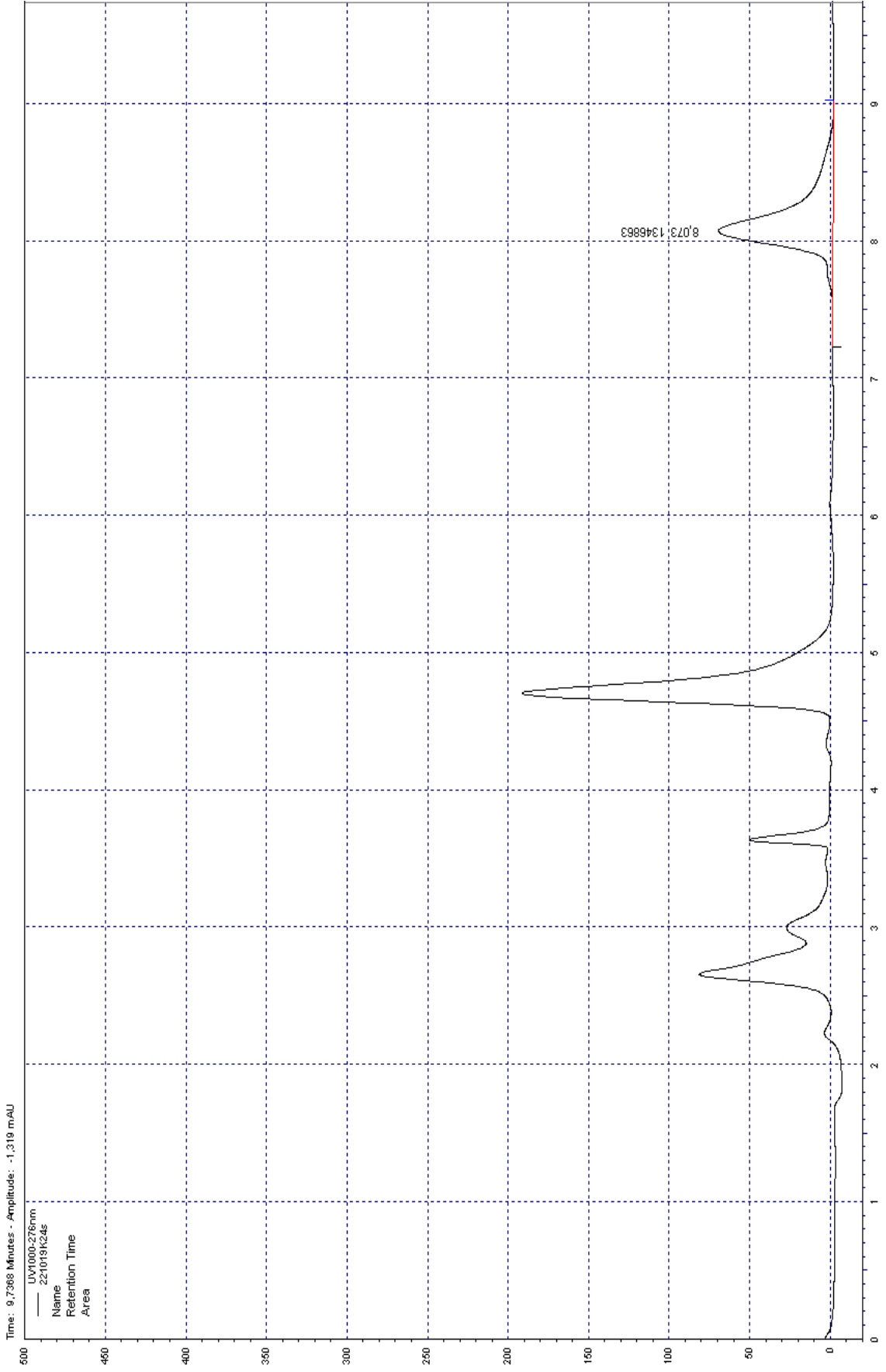


**Ek Şekil 6.24. 41Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**

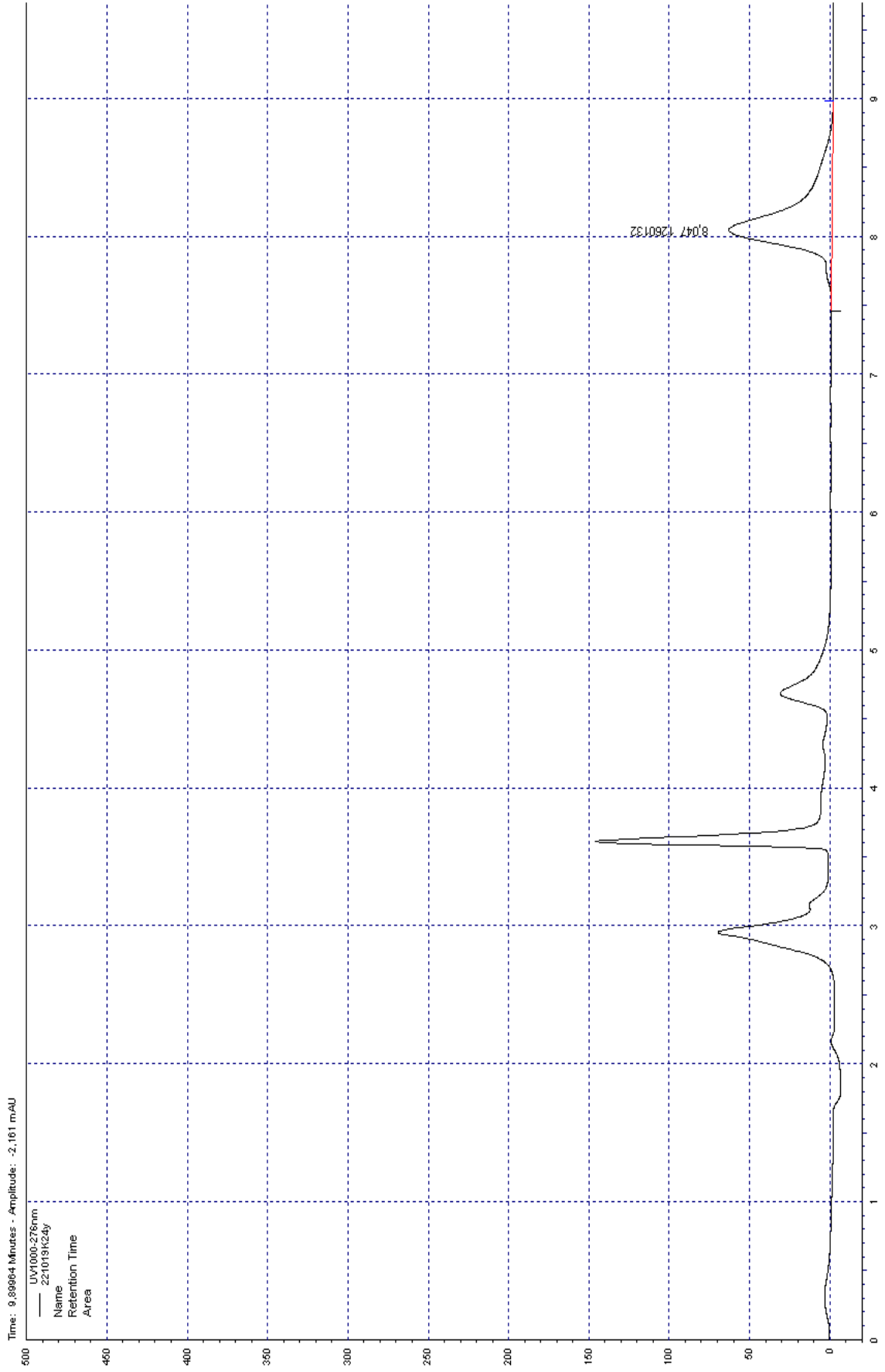




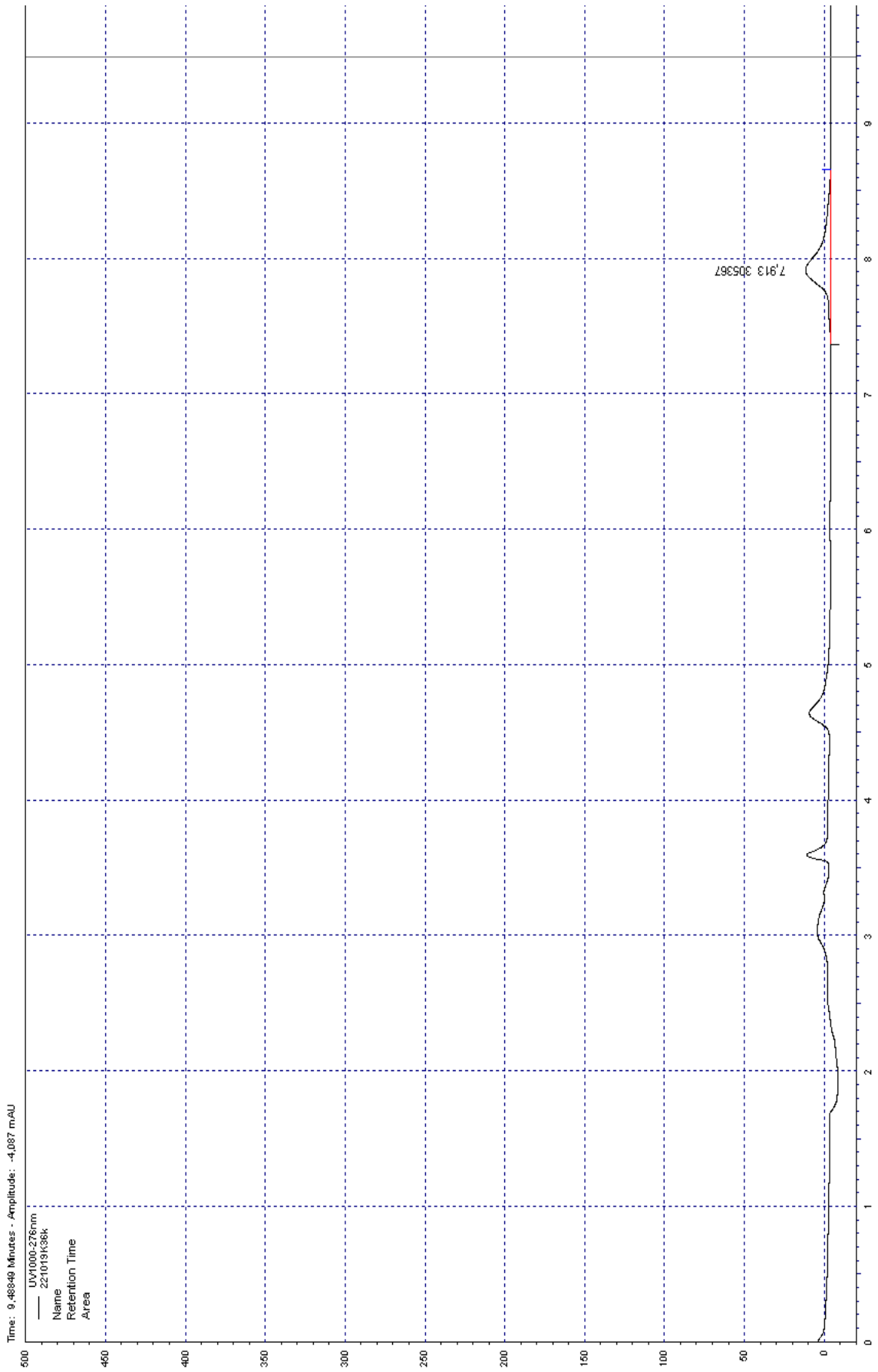
**Ek Şekil 6.25.** 24 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



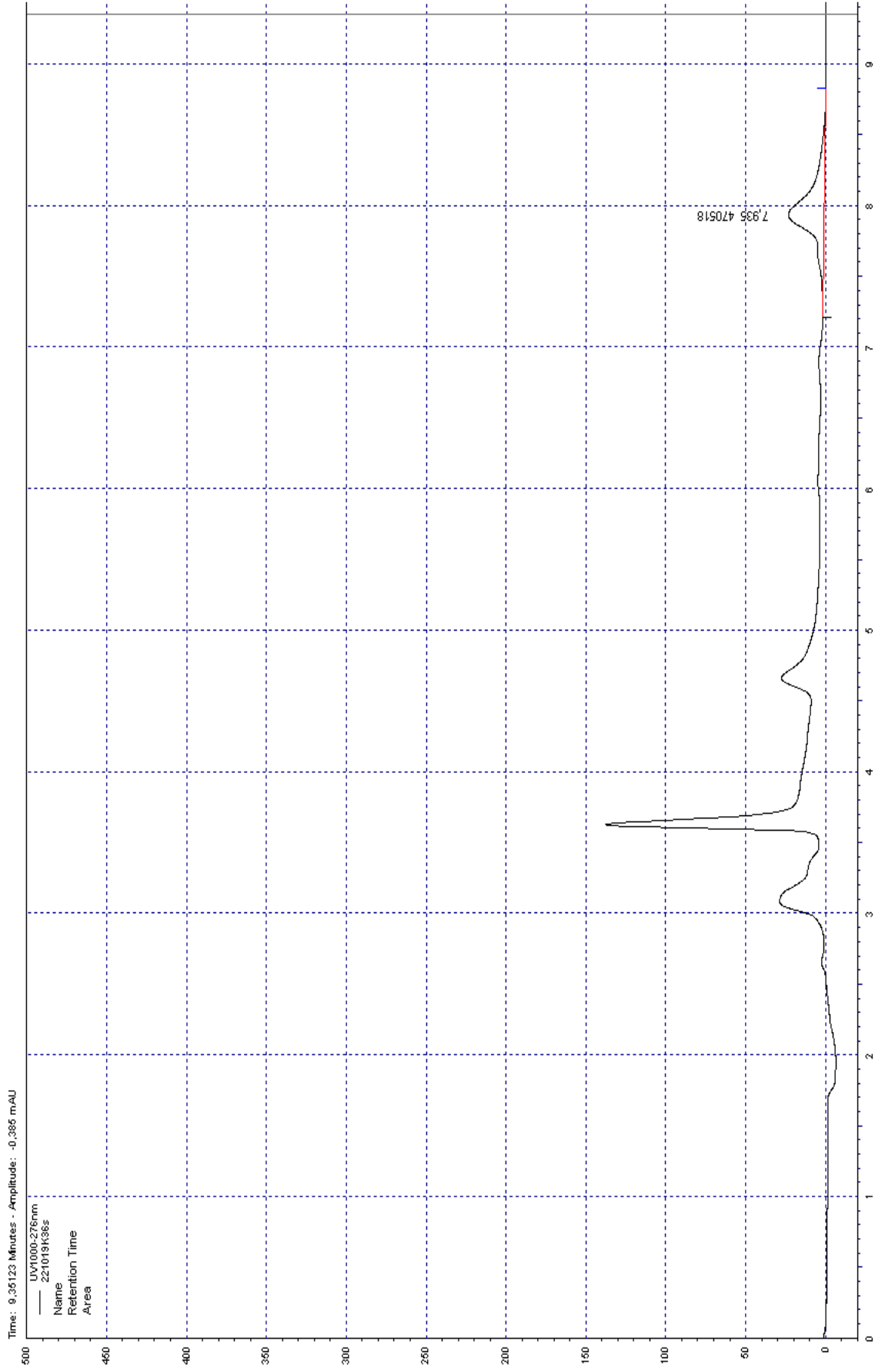
**Ek Şekil 6.26.** 24 S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



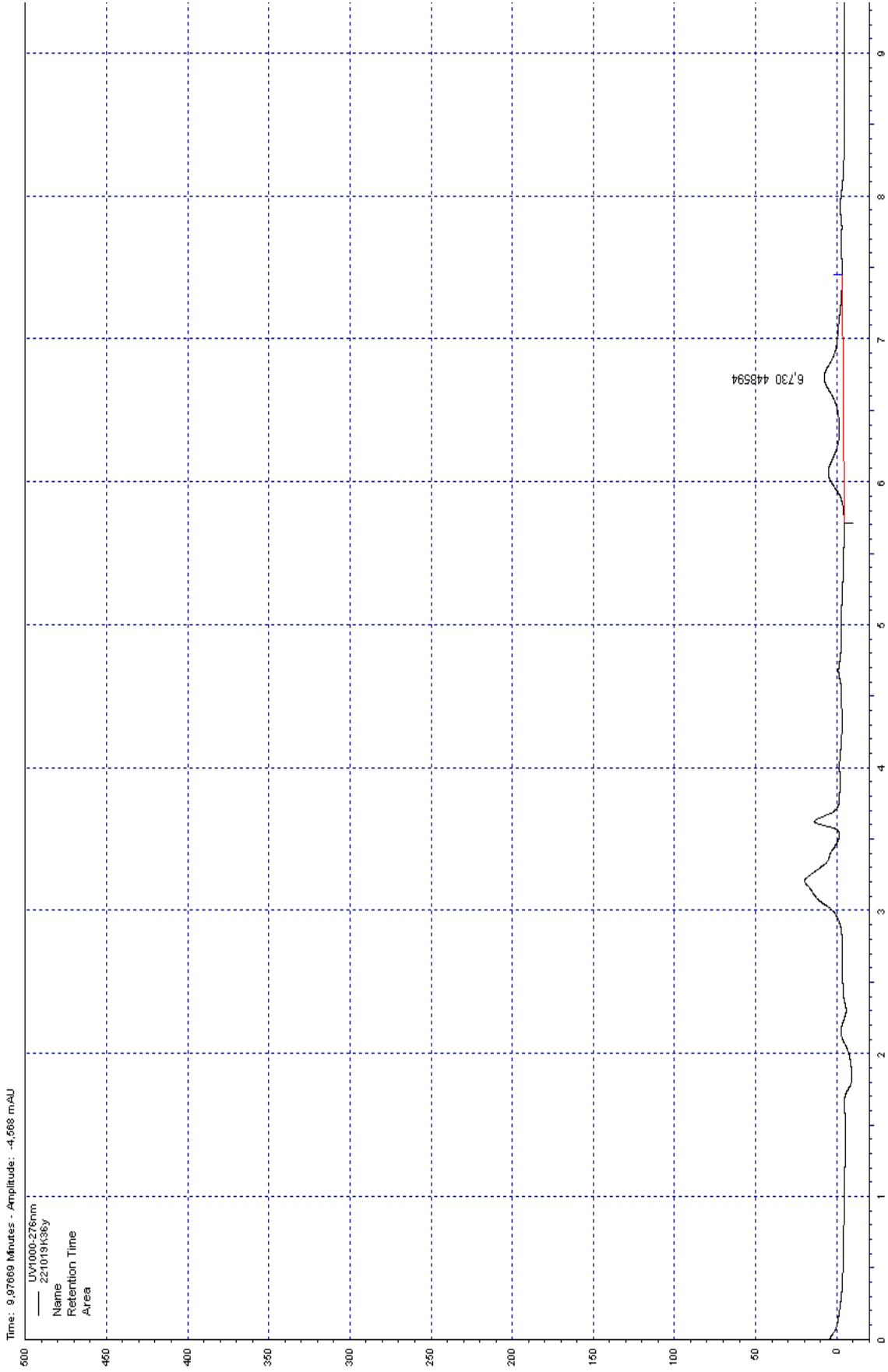
**Ek Şekil 6.27. 24 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



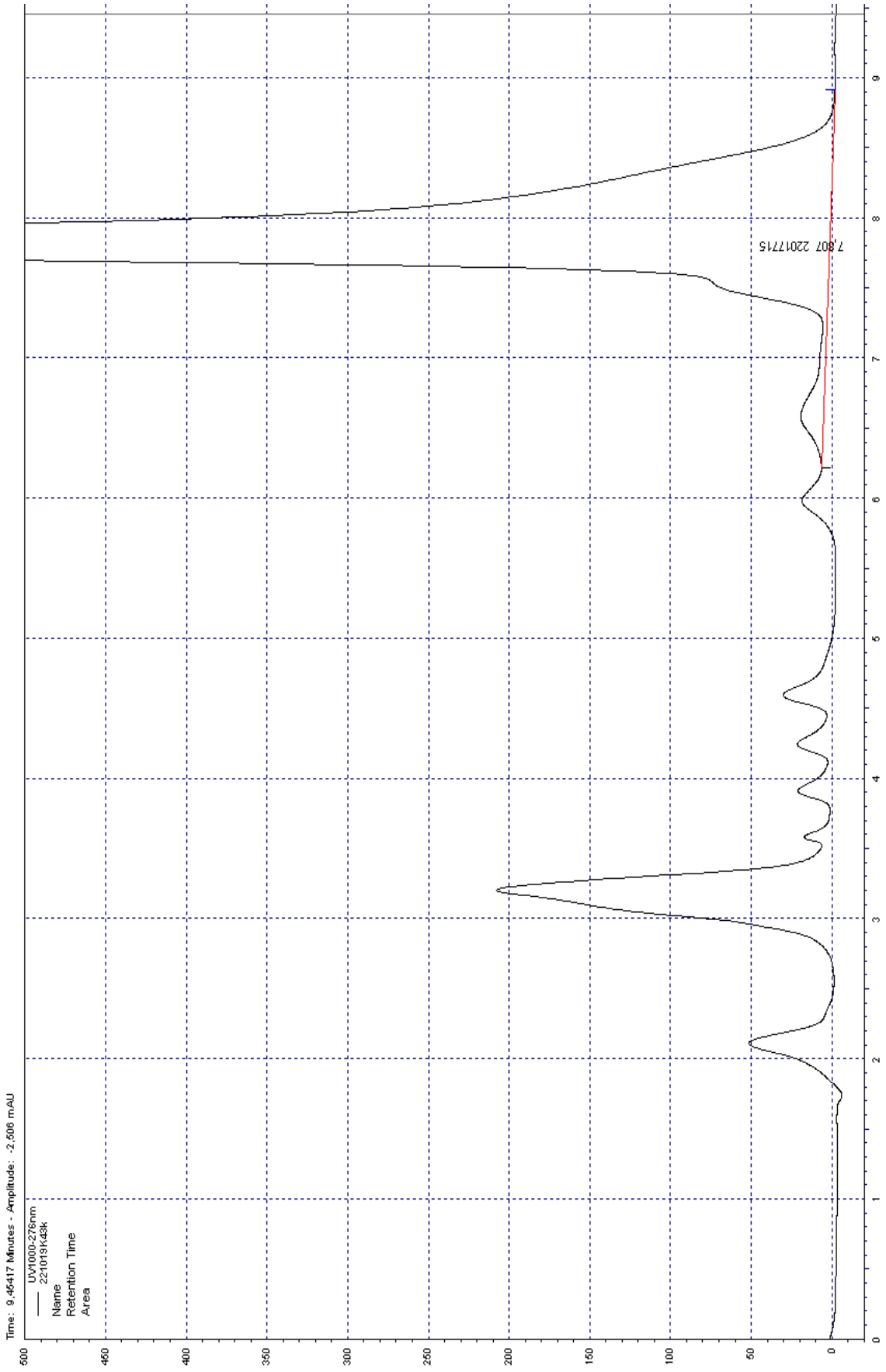
**Ek Şekil 6.28.** 24 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



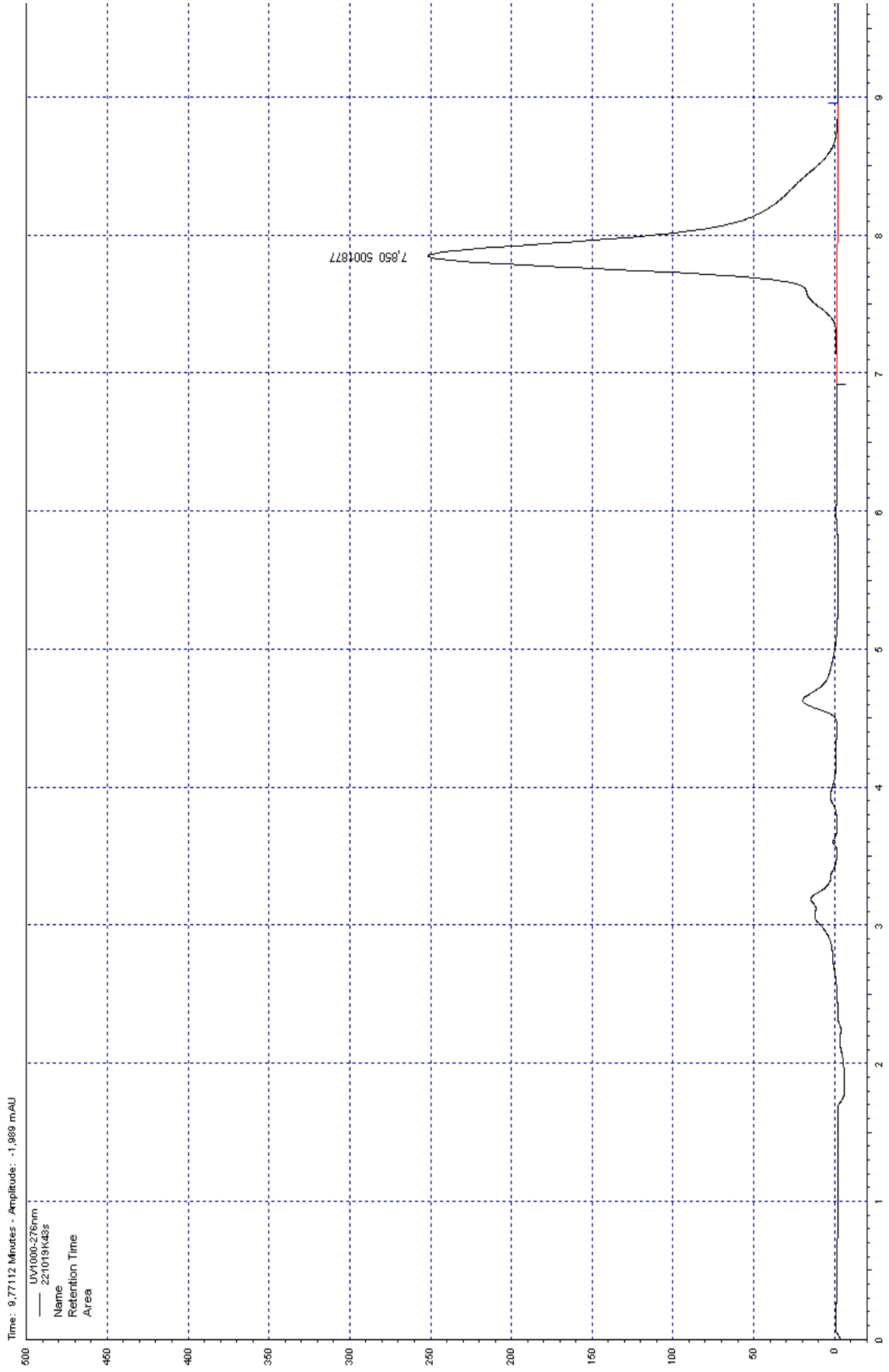
**Ek Şekil 6.29.** 38 S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



**Ek Şekil 6.30.** 38 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

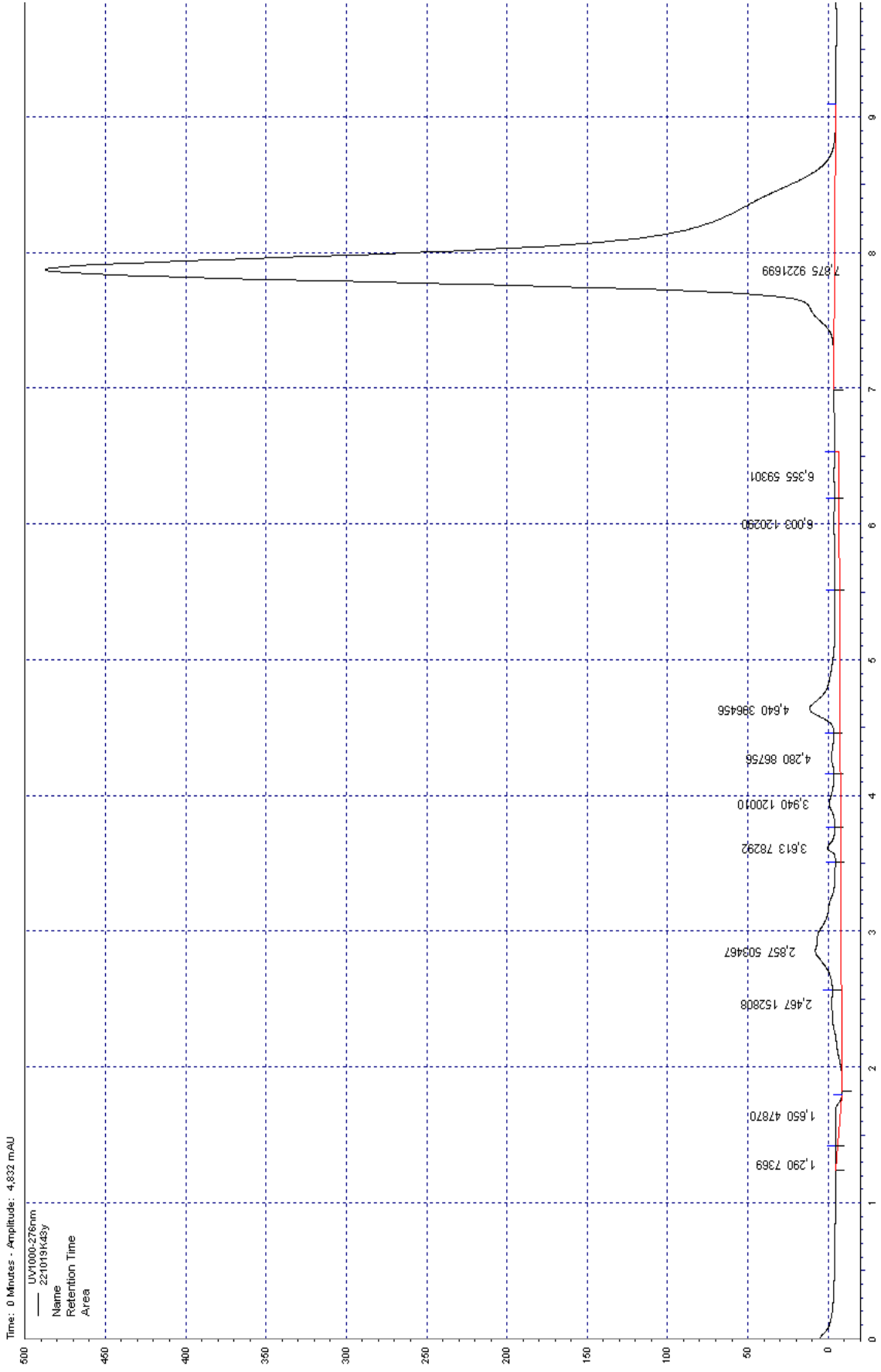


Ek Şekil 6.31. 43 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

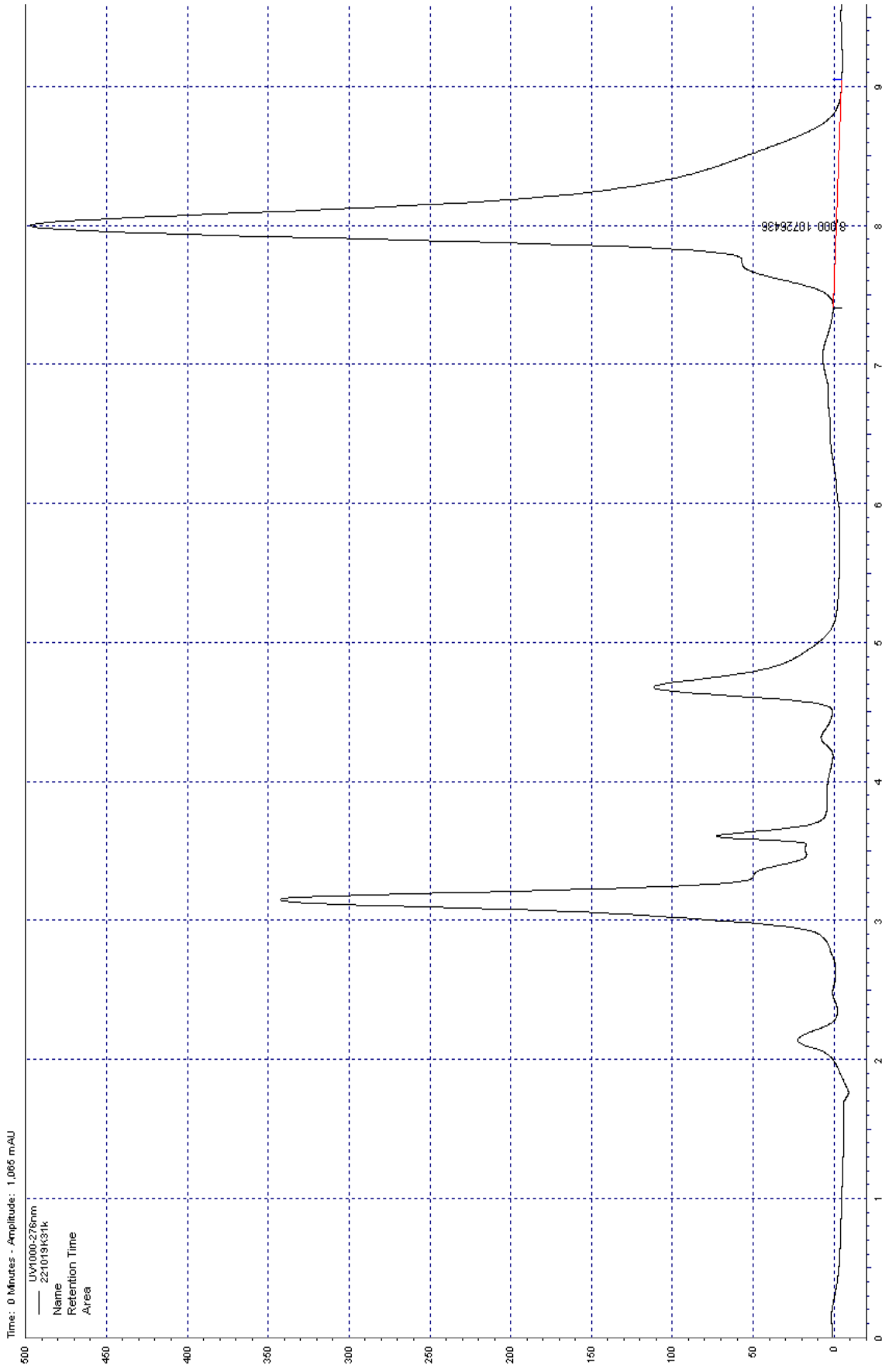


**Ek Şekil 6.32. 43 S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**

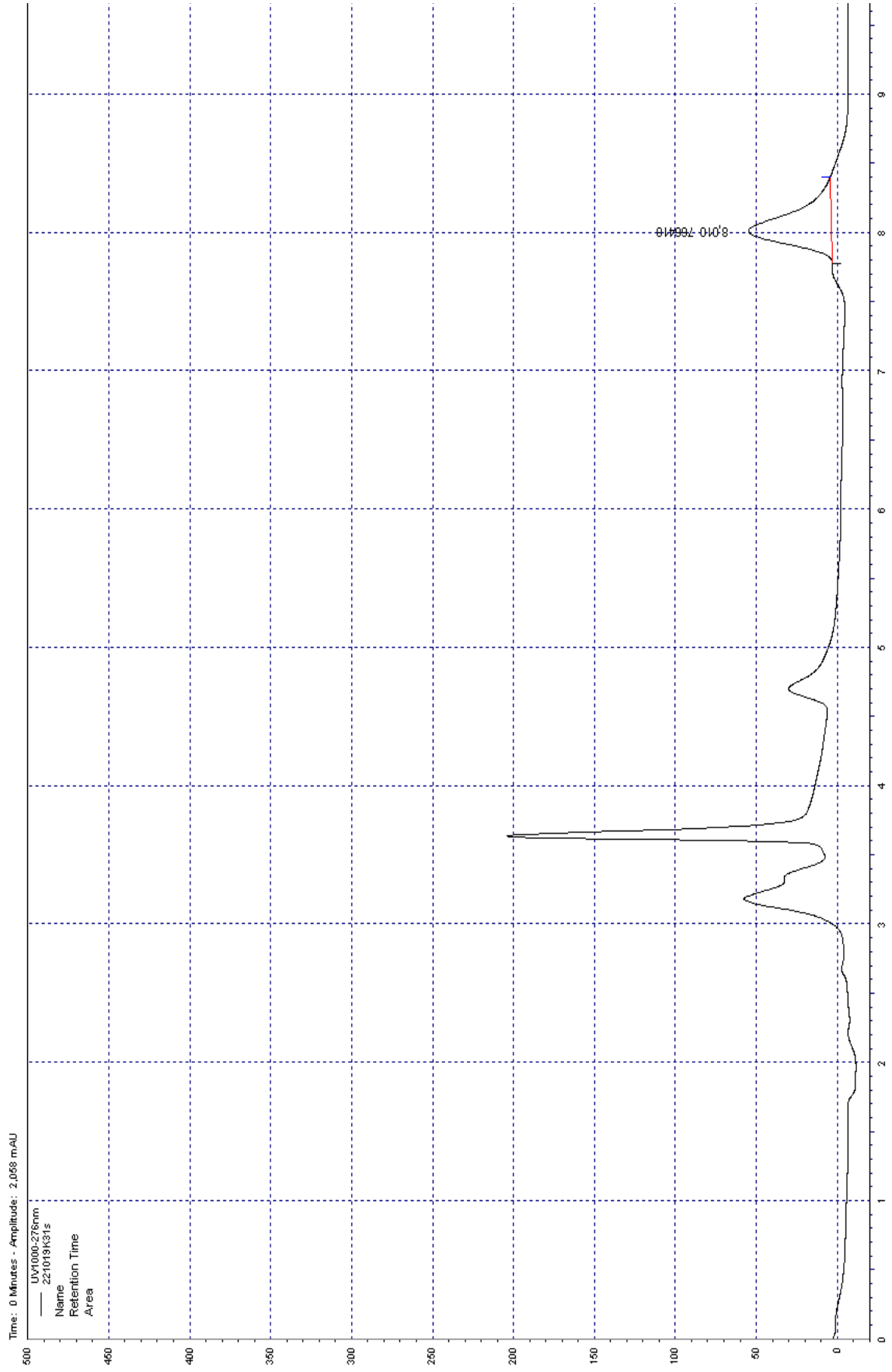




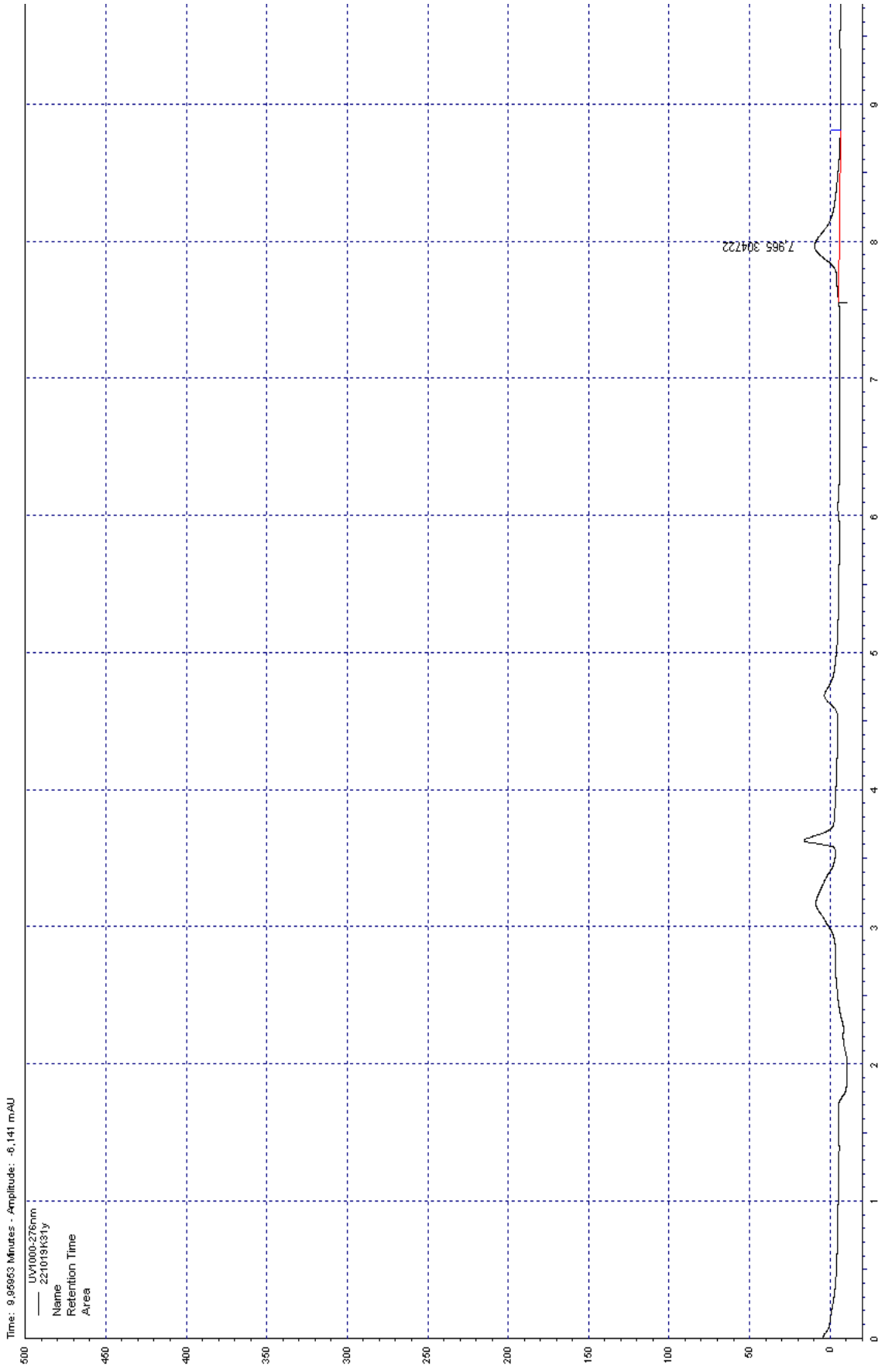
Ek Şekil 6.33. 43 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



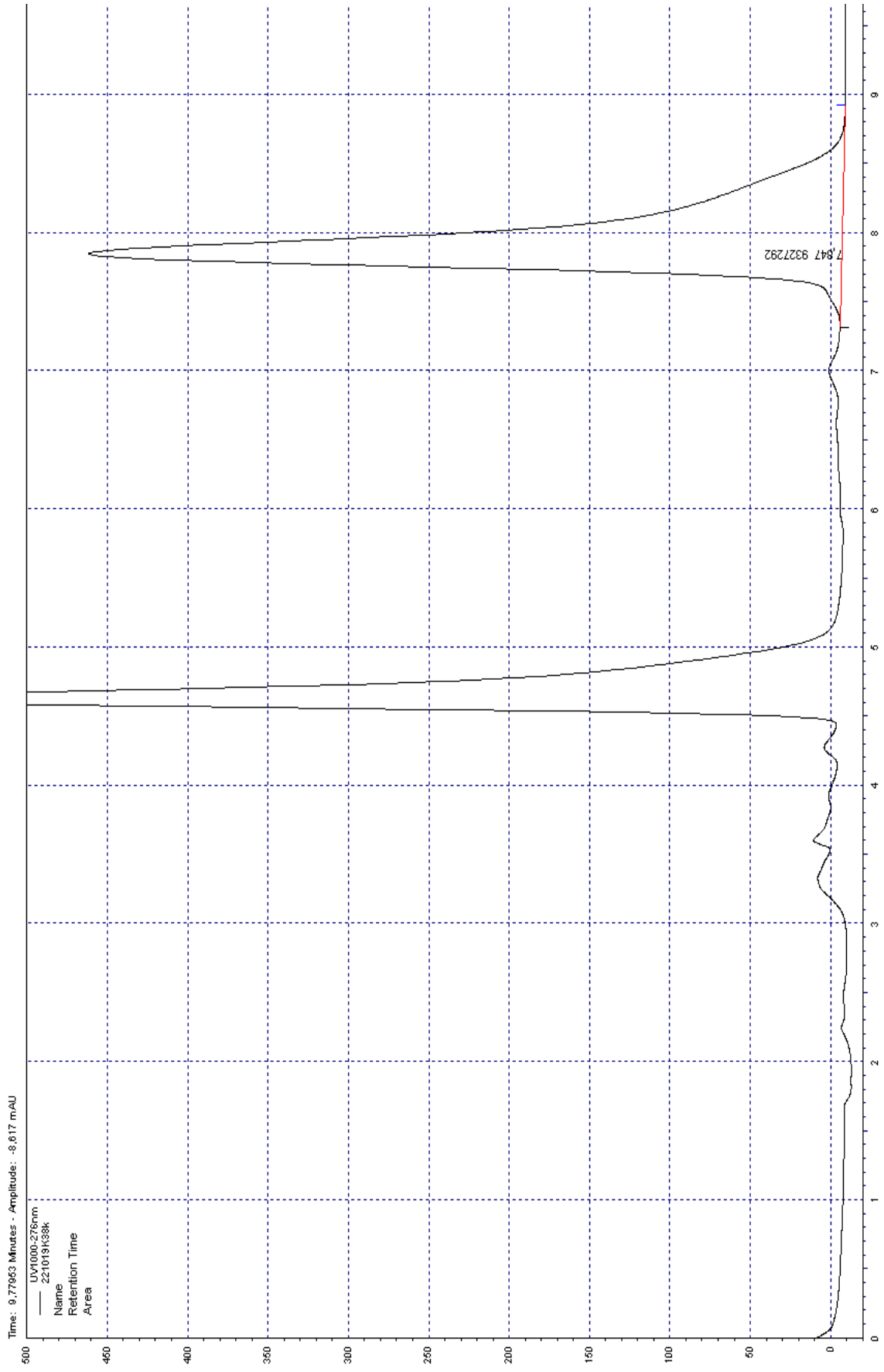
**Ek Şekil 6.334. 31 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



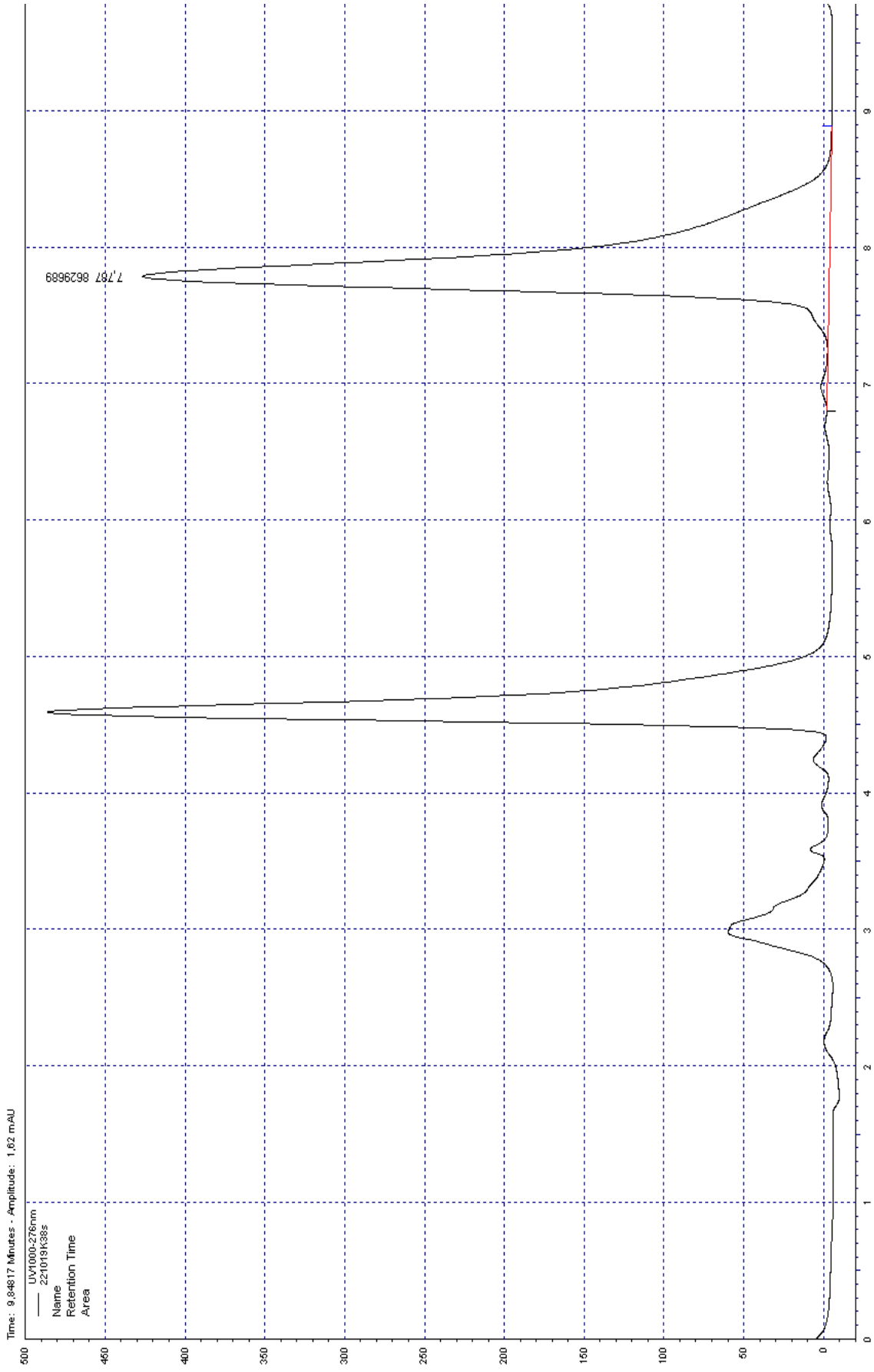
**Ek Şekil 6.35. 31 S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı**



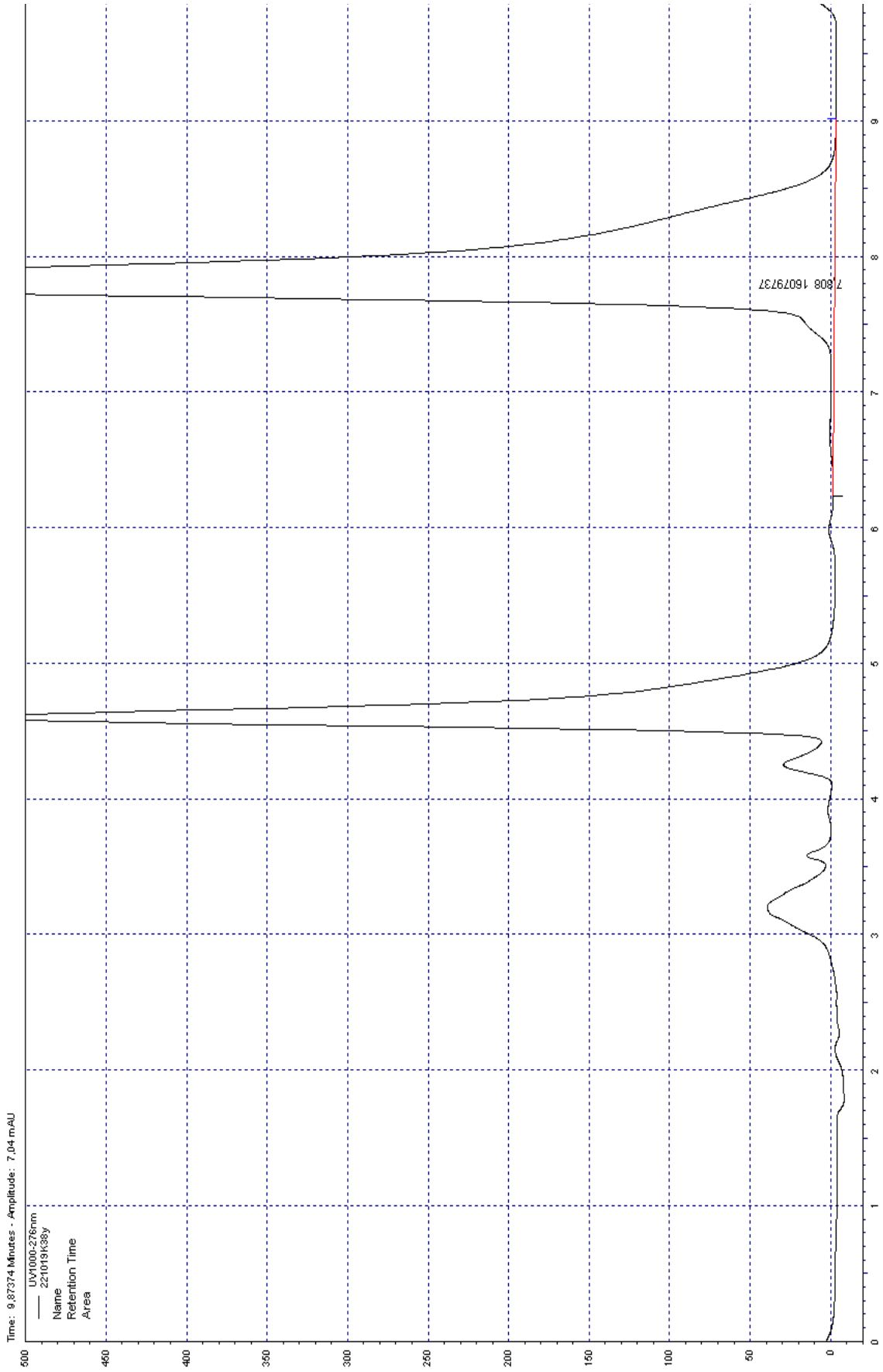
**Ek Şekil 6.36.** 31 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



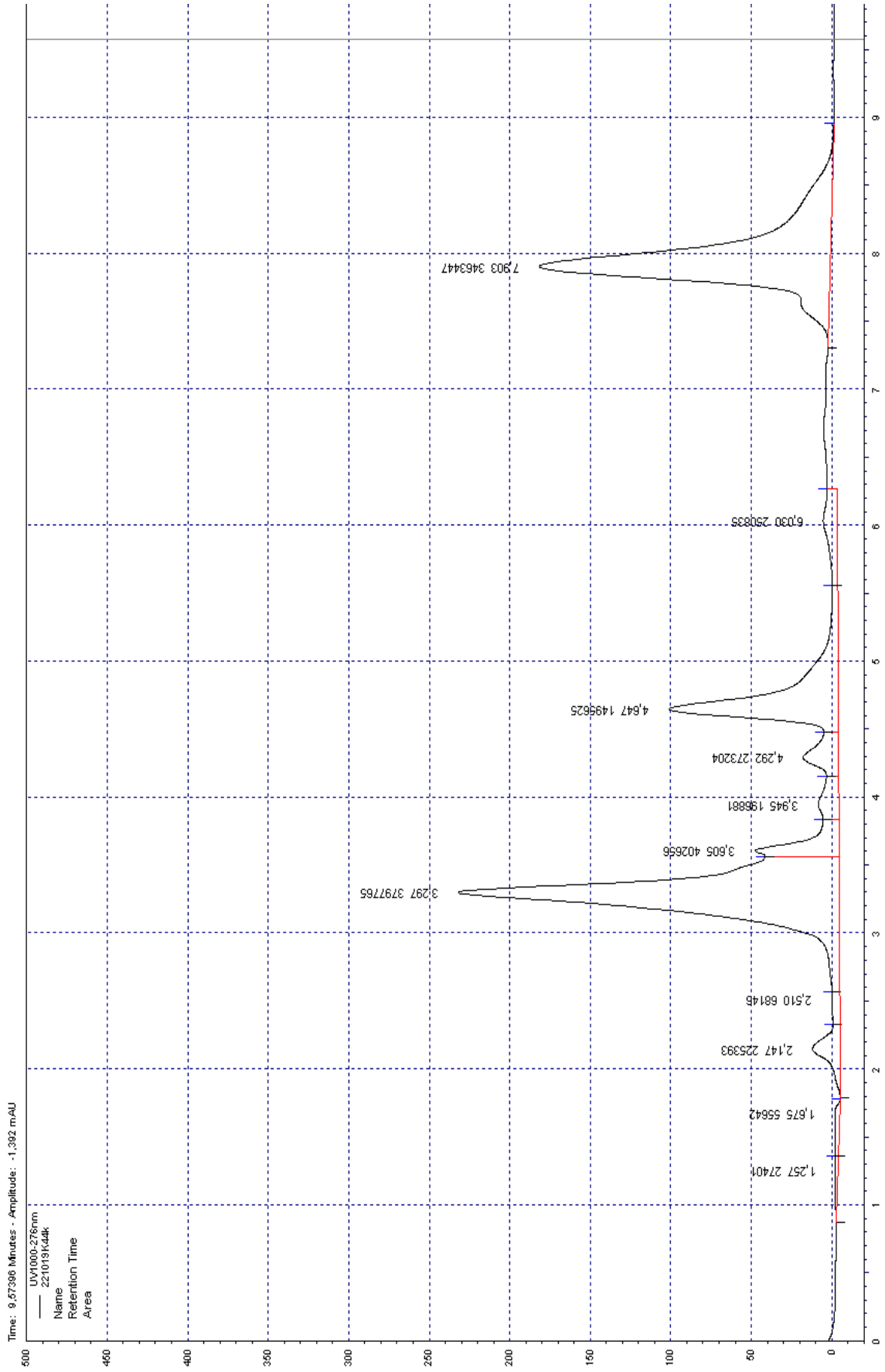
**Ek Şekil 6.37.** 38 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



**Ek Şekil 6.38.** 38 S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

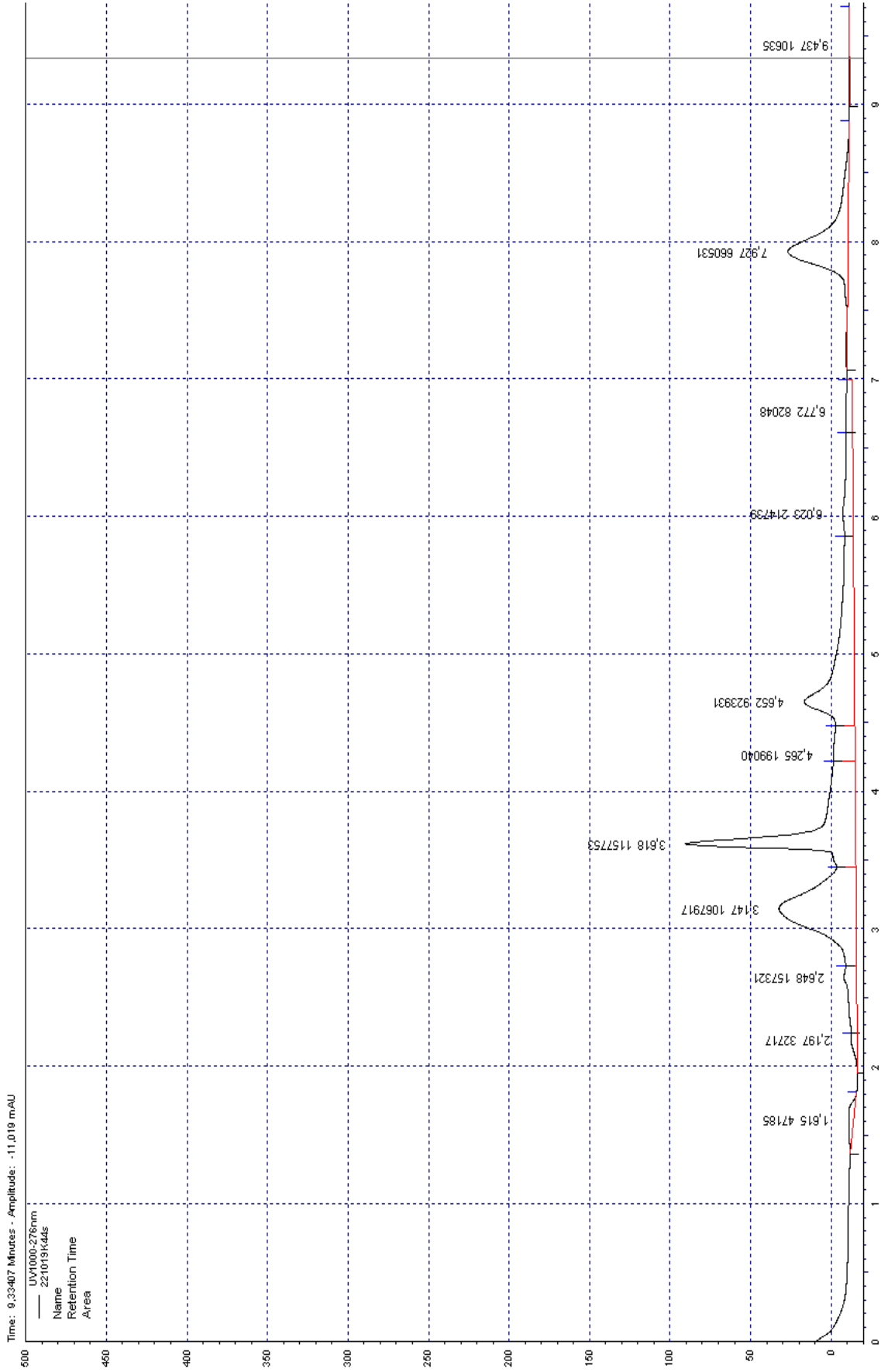


**Ek Şekil 6.39.** 38 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

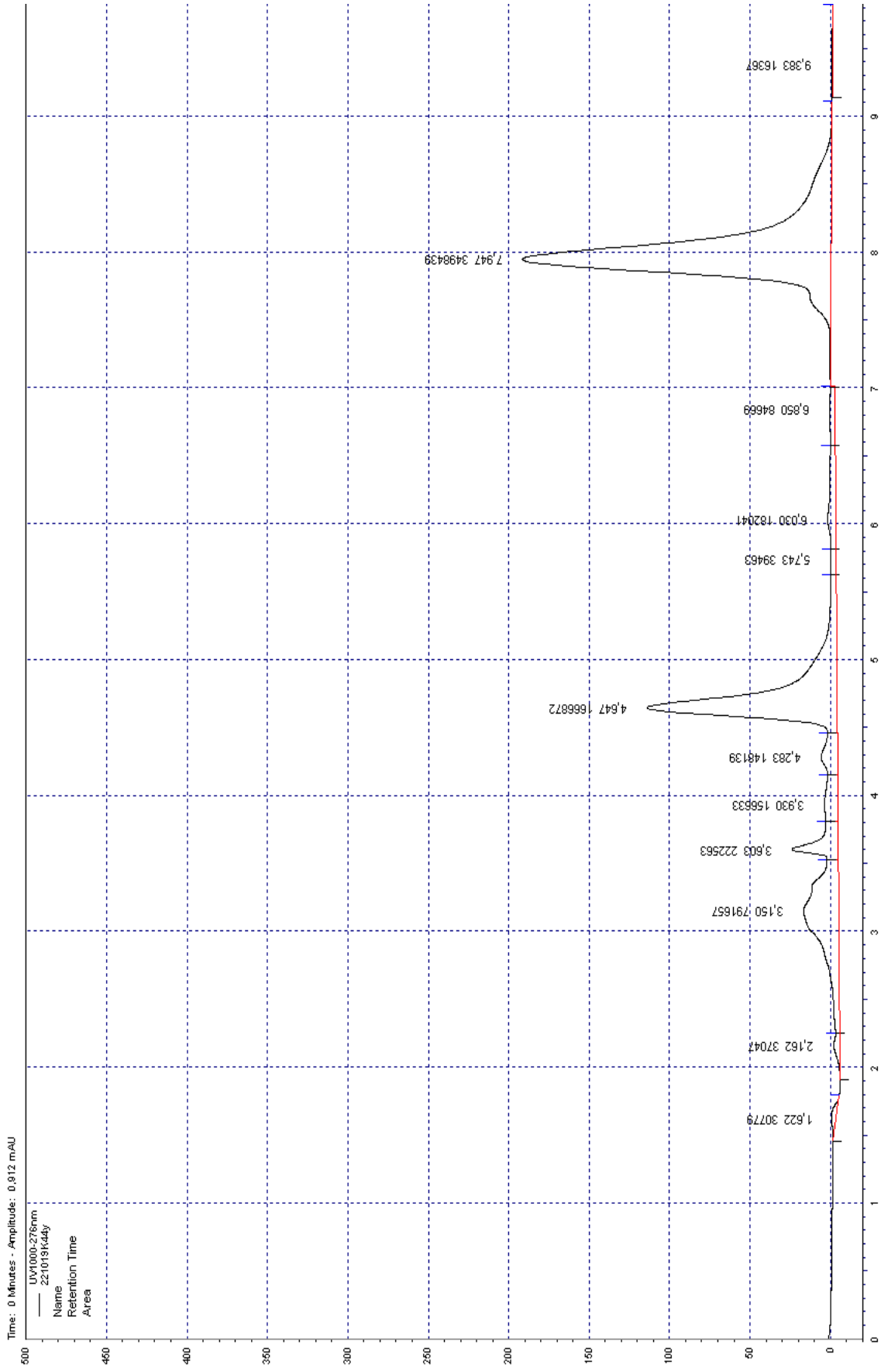


**Ek Şekil 6.40.** 44 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

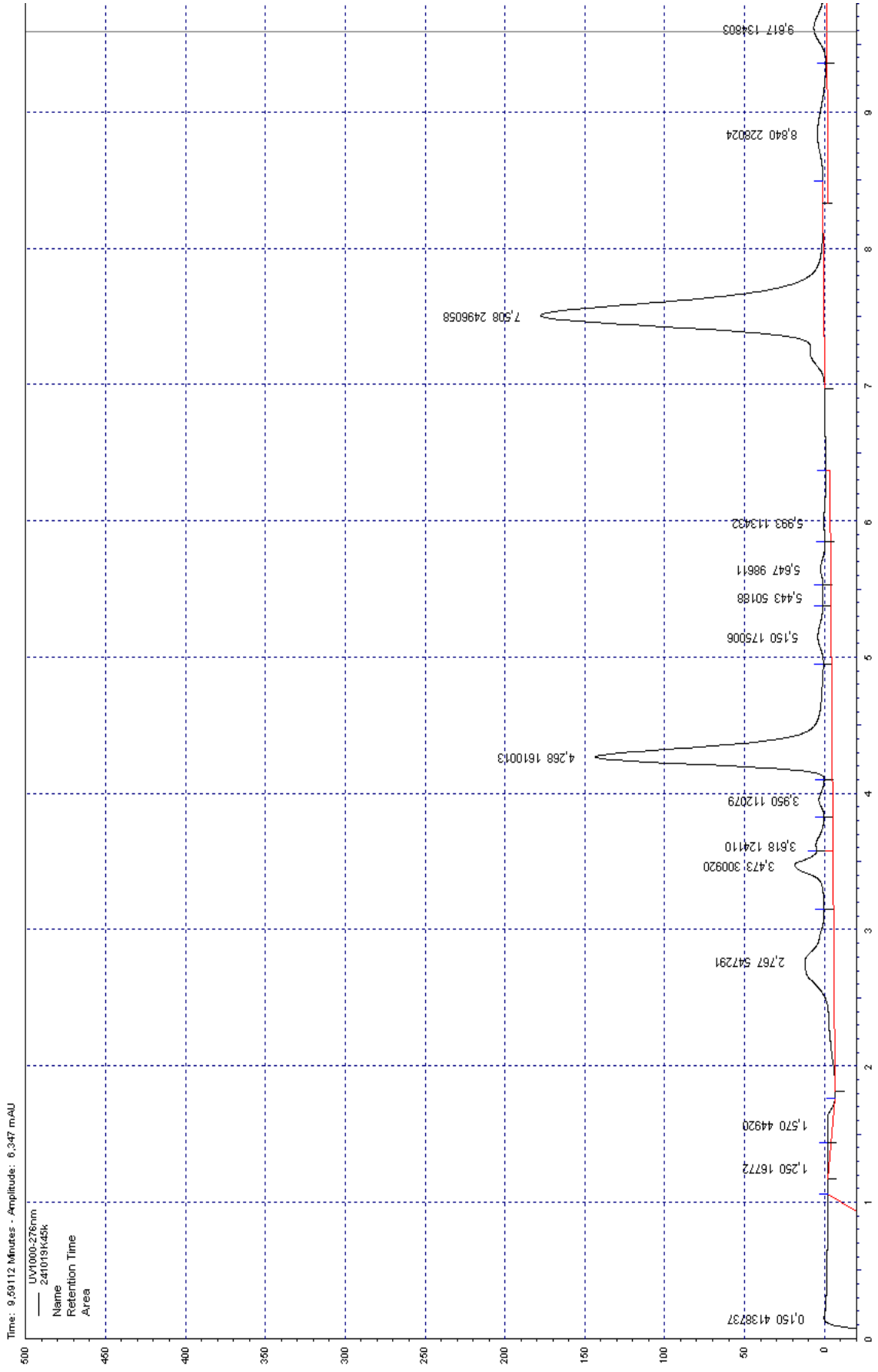




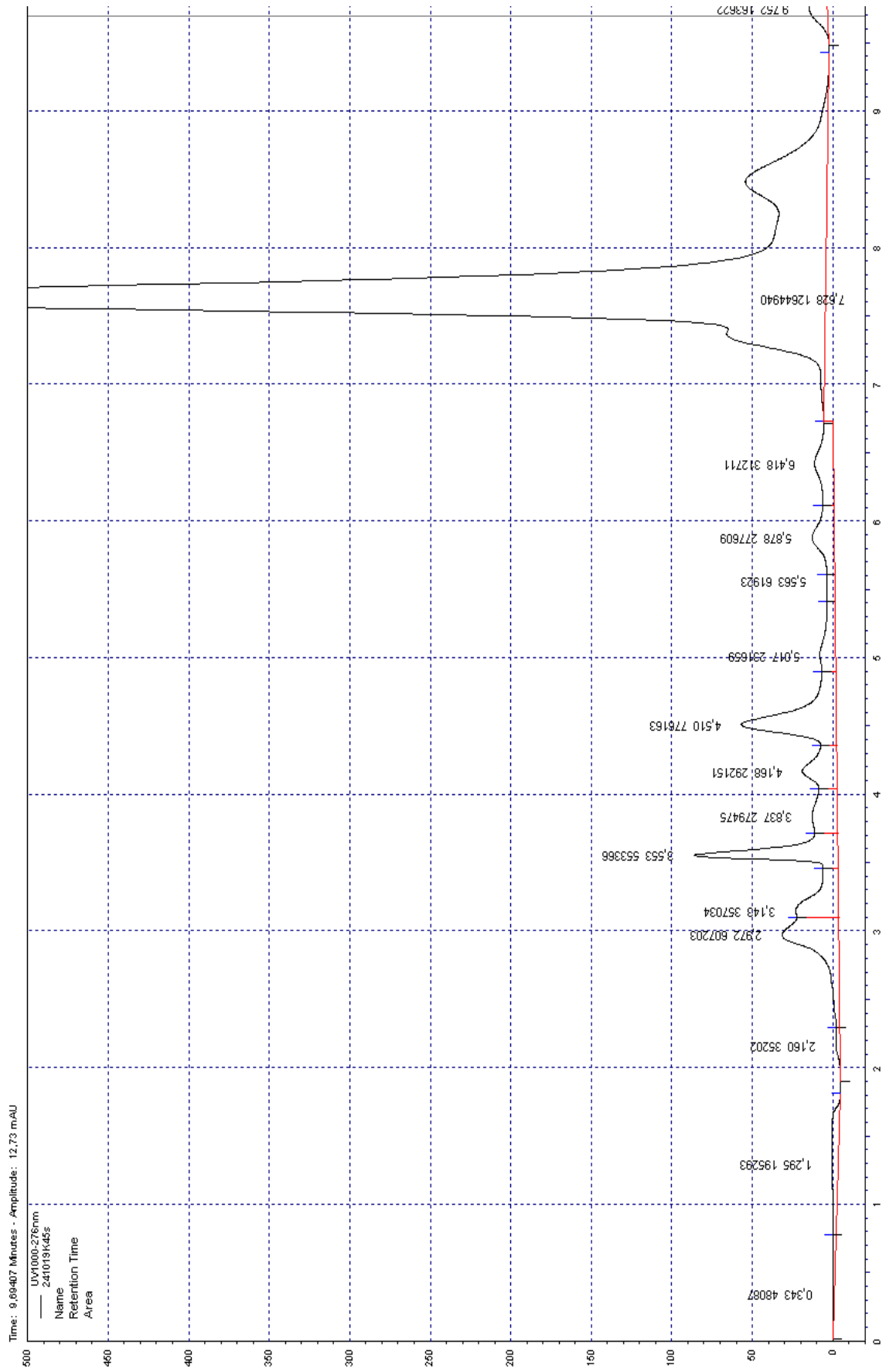
**Ek Şekil 6.41.** 44 S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



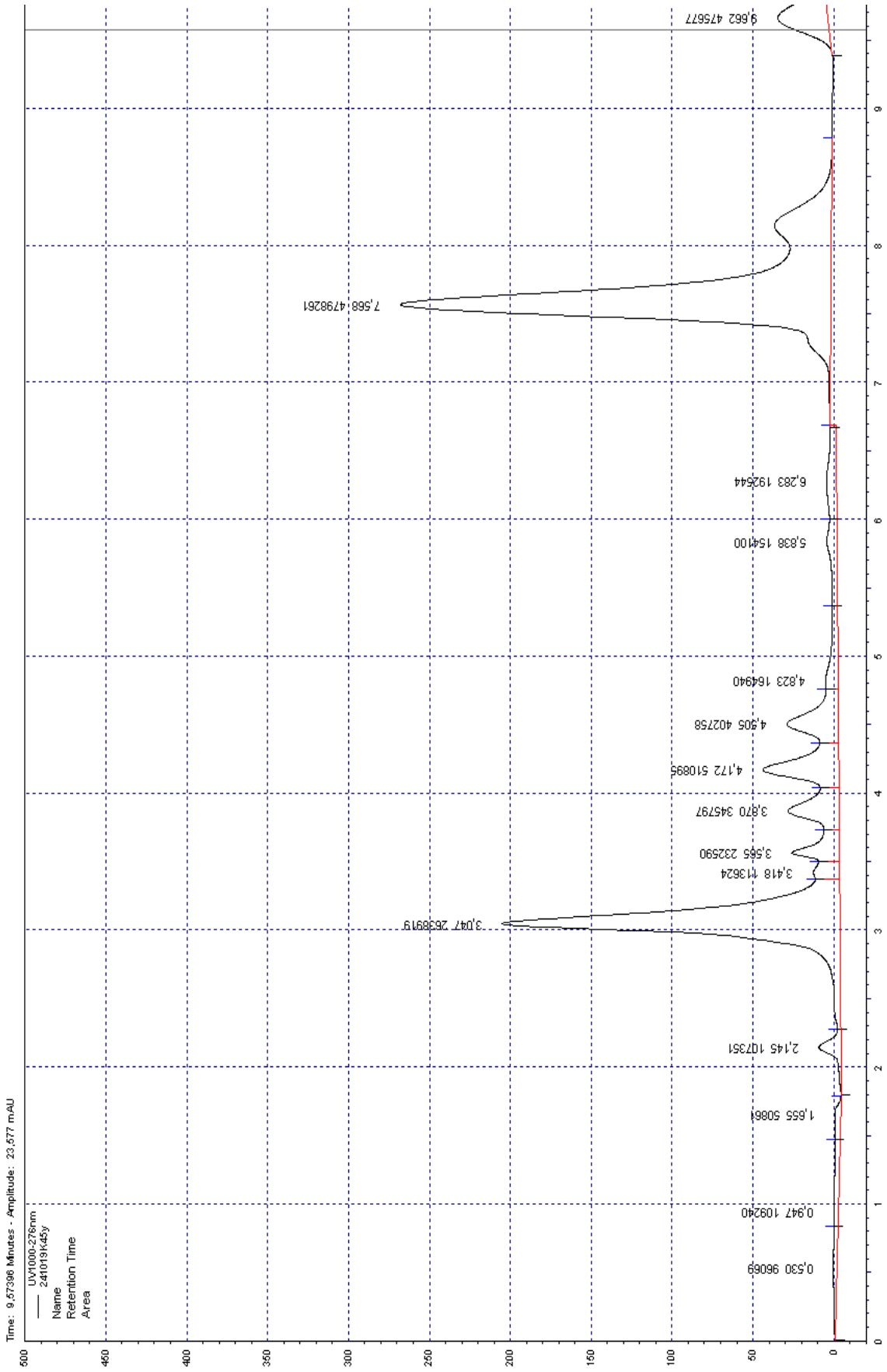
Ek Şekil 6.42. 44 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



**Ek Şekil 6.43.** 45 K Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



**Ek Şekil 6.44.** 45 S Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı



Ek Şekil 6.45. 45 Y Kodlu elma numunesinin HPLC patulin analiz diyagramı

## ÖZGEÇMİŞ

Murat DAĞ, 10.07.1987 yılında Elazığ'da doğdu. 2001 yılında Bursa Hürriyet İlköğretim Okulu'nda ilköğretimini, 2004 yılında Elazığ Balakgazi Lisesi'nde Lise öğrenimini tamamladı. 2006'da İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2013 yılında mezun oldu. 2014 yılında Gümüşhane Üniversitesin'de Kimyager olarak göreve başladı ve halen görevine devam etmektedir.

2017 yılında Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Yüksek Lisans eğitime halen devam etmektedir.

