

Aflatoksinler : Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları ¹

Şennur ÖZKAYA² , Ayhan TEMİZ³

Giriş

Funguslar genellikle üstün antibiyotik kaynakları olarak tanınmakta, insan ve hayvanlarda toksik etki gösteren metabolitler ürettikleri daha az bilinmektedir. Antibiyotikler gibi fungusların ikincil metabolizmaları sonucu sentezlenen toksik maddelere genel olarak “mikotoksin” denilmektedir. 1930 ve 1940’lı yıllarda fungus kaynaklı antibiyotik olarak çalışılan birçok madde, bugün yüksek canlılara gösterdikleri toksik etkiler nedeniyle mikotoksin olarak sınıflandırılmıştır. Mikotoksinler, esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri ve birçok gıda ve yem maddesinde gelişerek toksinlerini oluşturabilmeleri nedeniyle, mikotoksinler çok önemli doğal toksinler olarak kabul edilmektedir (1-3). Üzerinde en çok çalışılmış mikotoksin grubu olan aflatoksinler 1960 yılında keşfedilmiş ve 1962 yılında da güçlü bir “hepatotoksik” ve “hepatokarsinojen” etkisi olduğu anlaşılmıştır (3,4). Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*’un bazı suşları, *Aspergillus parasiticus*’un ise hemen hemen bütün suşları tarafından üretilmektedir (4,5). Ancak 1987 yılında *A.flavus*’a fenotipik olarak benzeyen *Aspergillus nomius* (6) ve son olarak da *Aspergillus pseudotamarii* olarak isimlendirilen bir türün (7) de aflatoksin ürettikleri belirlenmiştir.

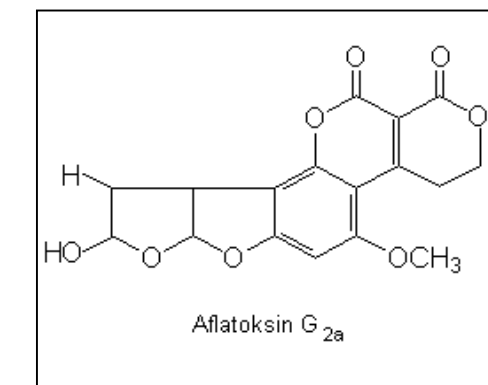
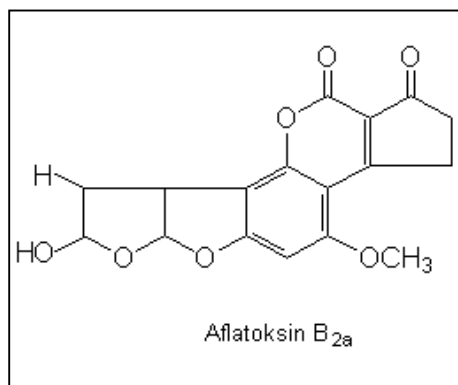
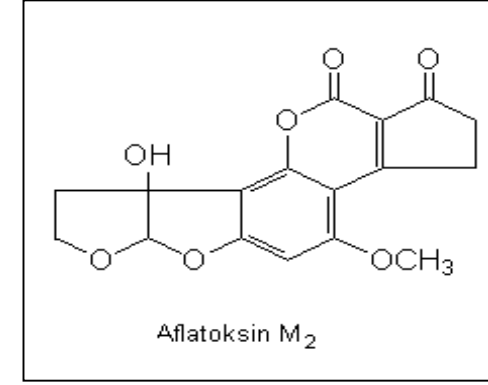
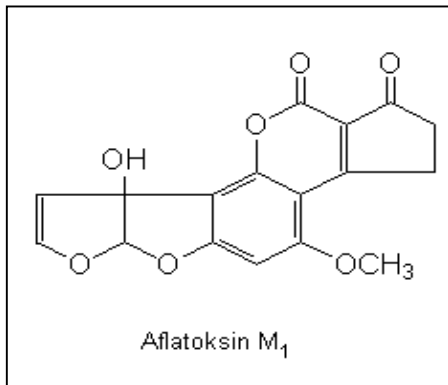
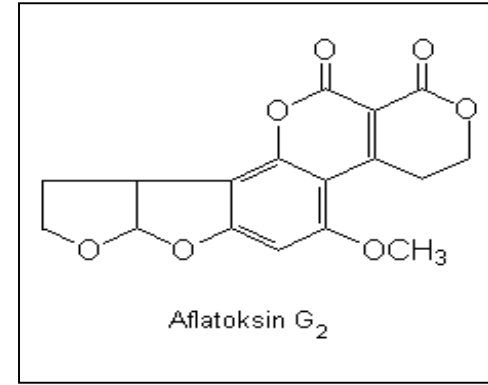
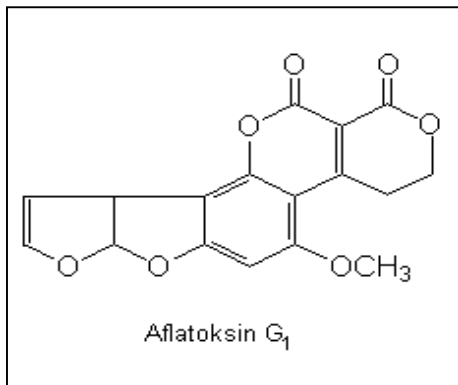
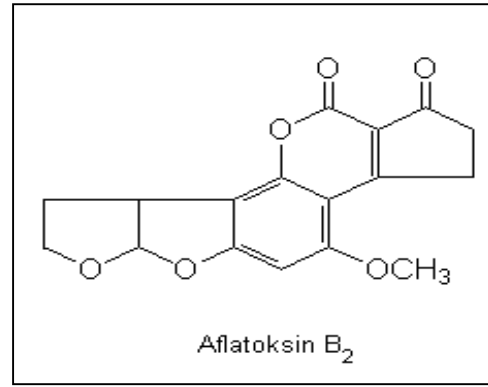
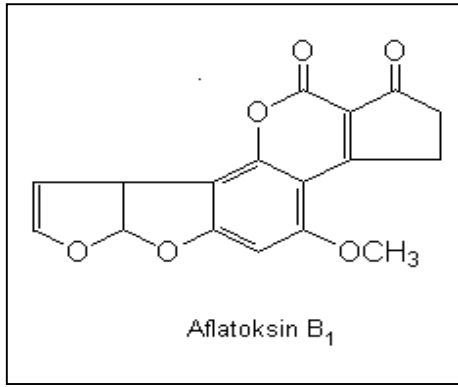
Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı

Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmıştır (6). Aflatoksinlerin aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B₁ ve B₂’nin mavi, aflatoksin G₁ ve G₂’nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir (4,8). B toksinleri kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedir (Şekil 1).

¹ Bu çalışma; Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalında Prof. Dr. Ayhan Temiz danışmanlığı altında Şennur Özkaya tarafından yapılan ve 2001 yılında tamamlanan “Ülkemizde aflatoksin sorunu yaşanan bazı gıdalarda aflatoksin B₁’in azaltılması veya giderilmesinde *Flavobacterium aurantiacum* ’un etkinliğinin araştırılması” adlı Doktora tezinin literatür özeti bölümüdür.

² Dr., Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Yenimahalle Ankara

³ Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Beytepe Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazar, e-posta : temiz@hacettepe.edu.tr



Şekil 1. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları (6)

Toksijenik *A.flavus* kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden aflatoksin B₁ ve daha az olarak da aflatoksin G₁ sorumludur. Bu durum, her iki toksinin terminal furan halkasınının 8, 9 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir (8). Aflatoksin B₂, B₁'in, aflatoksin G₂ de G₁'in dihidro türevleridir (6) ve "in vivo" koşullarda metabolik olarak B₁ ve G₁'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler (8). Bu dört aflatoksin dışında aflatoksin M₁ ve aflatoksin M₂ olarak isimlendirilen önemli iki aflatoksin türevi daha bulunmaktadır. M toksinleri aflatoksinli yemle beslenen laktasyon devresindeki memeli hayvanların sütlerinden ve idrarlarından izole edilmiştir. Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında mavi floresan verirler ve B toksinlerinden daha düşük R_f değerlerine sahip olmalarıyla ayrılırlar (4,6). Aflatoksin M₁ ve M₂, aflatoksin B₁ ve B₂'nin hidroksi türevleridir, aflatoksin M₂ aynı zamanda, dihidro-aflatoksin M₁'dir (Şekil 1). Aflatoksin B₁ ve G₁'in hemiasetal türevleri olan aflatoksin B_{2a} ve G_{2a} da (Şekil 1), *A.flavus*'un doğal metabolitleri olarak izole edilmişlerdir. Bu türevler, aflatoksin B₁ ve G₁'in asit ortamda hidrosillenmesi ile de elde edilmektedir ve bu özellikten aflatoksin B₁ ve G₁'in doğrulanmasında yararlanılmaktadır (6).

Aflatoksinler, metanol, kloroform ve diğer birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. Ancak sudaki çözünürlükleri azdır (10-30 µg/mL). Toksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B₁ ve B₂ için 425 nm de; aflatoksin G₁ ve G₂ için ise 450 nm de floresan emisyonu oluştururlar. Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde çok stabildir, ancak çok düşük veya yüksek pH'larda (3'den az ve 10'dan büyük), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler (8,9).

Aflatoksinlerin Toksisitesi

Aflatoksinler yüksek dozlarda akut, sub-letal dozlarda ise kronik toksisite göstermektedirler. Düşük dozda sürekli alımları, birçok hayvan denemesinde karsinojen etki ile sonuçlanmıştır. Aflatoksinler içerisinde en yüksek toksisiteyi aflatoksin B₁ göstermektedir. Aflatoksinlerden hayvanların birçoğu etkilenmektedir, ancak duyarlılık türden türe değişmektedir ve aynı türün genç olanları yaşlı olanlardan daha duyarlıdır. Ayrıca toksik etki, tüketilme miktarı ve sıklığına, hayvanın cinsine, yaşına, cinsiyetine, sağlık durumuna ve beslenmesine bağlı olarak değişmektedir (4,10,11). Civciv, piliç ve ördek yavruları en duyarlı olanlardır, bunları sırasıyla hindi yavrusu, sülün palazı, tavuklar ve bildircinler izler. Memeliler arasında ise aflatoksinden etkilenme sırası; 3-12 haftalık domuzlar, hamile domuzlar, yetişkin domuz, sığır ve koyunlar şeklindedir. Alabalıklar ve köpekler de aflatoksine duyarlı hayvanlardır. Alabalıklarda, ppb düzeyindeki çok düşük konsantrasyonda bile karaciğer kanseri etkisi görülmektedir (4,12).

Aflatoksinler yüksek dozlarda akut toksisiteye neden olabilirler. Hayvanların çoğunda gözlenen akut aflatoksikozisin klinik bulguları; iştah azalması, ağırlık kaybı, nörolojik anormallikler, mukoz membranlarda sarılık, kasılma ve sonunda ölümdür. Karaciğerde rengin açılması veya tamamen renksizleşme ve yağ birikimi belirgin olarak görülür. Vücut boşluklarında sıvı birikimi ile böbrek ve bağırsaklarda kanama da meydana gelebilir (4).

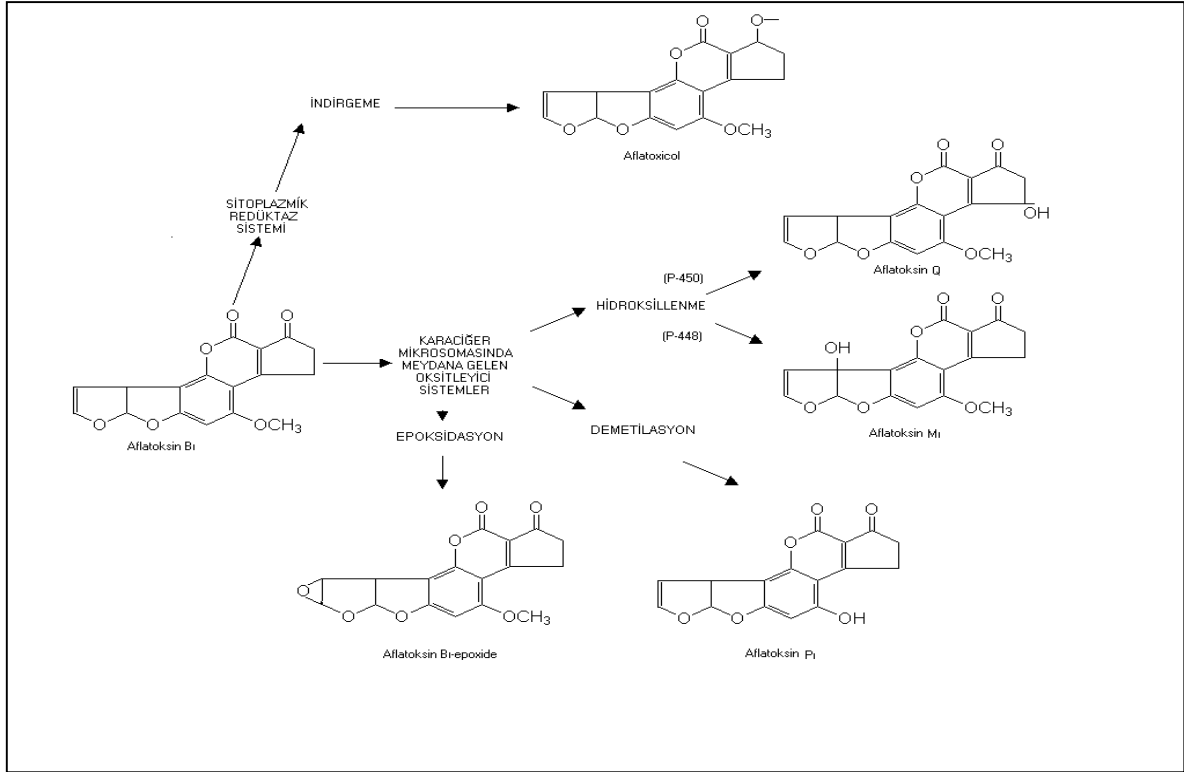
Aflatoksinlerin akut toksisitesi deney hayvanlarında bu şekilde gözleendiği gibi, insanlarda akut zehirlenme yaptığını gösteren olaylar da literatüre geçmiştir. Tayvan'da küflü pirinç tüketen 26 kişi hastalanmış ve bunların arasında 3 çocuk, ayaklarda ödem, karın ağrısı, kusma, karaciğerde büyüme gibi belirtilerden sonra ölmüştür. İncelenen pirinç örneklerinde 200 ppb aflatoksin B₁ bulunmuştur. Uganda'da 15 yaşında bir çocuk, Tayvan'daki çocuklara çok benzer belirtilerle ölmüş ve bu çocuğun da 1.7 ppm aflatoksin içeren "cassava" yediği belirlenmiştir. Patolojik bulgu olarak akciğerde ödem, kalp yetmezliği, karaciğerde nekroz ve yağlanma görülmüştür. Aynı aileden iki çocuk daha hastalanmış, ancak daha az yedikleri için kurtulabilmişlerdir. Tayland'da da 3 yaşındaki bir çocuk "Reye's sendromu" sonucu ölmüş ve çocuğun 2 gün önce yediği pirincin 10 ppm aflatoksin içerdiği saptanmıştır (4). 1974'de Hindistan'da, 15 ppm kadar yüksek düzeyde aflatoksin içeren kontamine mısırı yiyen 320 kişinin %25'i ölmüştür. Ancak bu kadar yüksek bir kontaminasyonla karşılaşma olasılığı çok azdır (3). Birçok araştırmada, çocuklarda görülen ve kusma, hipoglisemi, konvulsiyon (kıvrınma, çarpınma) ve koma ile karakterize olan, çoğu kez de ölüme sonuçlanan Reye's sendromu ile aflatoksin alımının ilişkisi olabileceği birçok araştırmada da ileri sürülmektedir (11,13,14).

Aflatoksinler, sub-letal dozlarda, kronik etki göstermektedir. Sub-letal dozlarda aflatoksin uygulanan hayvanlarda, karkasın sararması ve karaciğerde siroz görülmüştür (4). Düşük düzeyde ancak uzun süreli aflatoksin alımı ise, birçok deney hayvanında karaciğer kanseri ile sonuçlanmaktadır. Deney hayvanlarından alınan bu sonuçlara bağlı olarak aflatoksinin kuvvetli bir hepatokarsinogen olduğunun belirlenmesi üzerine, insanlar üzerindeki etkisini anlamak amacıyla çok sayıda etiyolojik çalışma yapılmıştır. Asya ve Afrika'nın çeşitli ülkelerinde yapılan bu çalışmalarda; karaciğer kanserine yakalanma sıklığı ile, aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketim düzeyi arasında kuvvetli bir ilişki gözlenmiştir (14,15). Bu etiyolojik çalışmalarda bir dönem diğer hepatokarsinogenik etmen olan hepatit B virüsü enfeksiyonunun dikkate alınmadığı gerekçesiyle bir tartışma başlatılmıştır (16). Ancak son yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalarda, aflatoksinin insanlarda karaciğer kanserine neden olduğu konusunda önemli bulgular elde edilmiştir (17).

Aflatoksin B₁'in karsinojenite ve mutajenitesi vücuttaki metabolizması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aflatoksinler, hayvanlarda öncelikle mikrozomal ve stoplazmik oksijenaz enzim sistemleri tarafından metabolize edilmektedir. Bu enzim sistemleri, esas olarak karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan, sitokromla ilişkili enzimlerle, O₂'ye ve NADPH'a bağımlı enzimlerin kompleks bir organizasyonudur. Bu enzimler, çeşitli hidrosillenmiş türevlerin ve yüksek reaktif özelliğe sahip epoksid metabolitin oluşmasıyla sonuçlanan aflatoksin B₁'in oksidatif metabolizmasını katalize etmektedir (15). Bu sistemlerle aflatoksin B₁'in metabolizma yolları ve aflatoksin B₁'in çeşitli metabolitlere biyotransformasyonu Şekil 2'de görülmektedir.

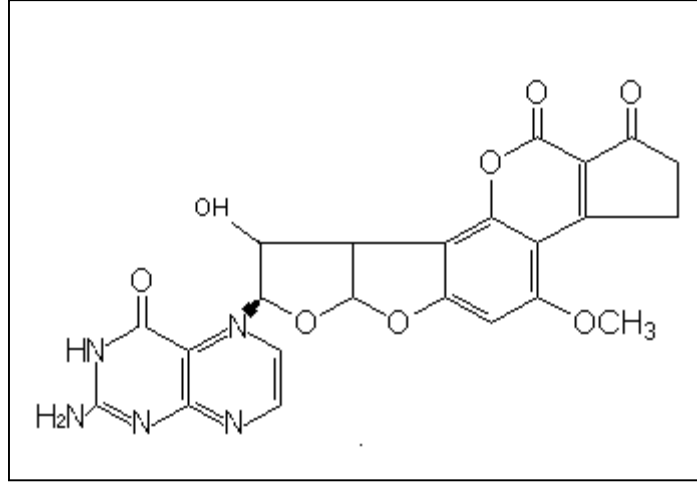
Aflatoksin M₁ daha önce de değinildiği gibi, aflatoksin B₁'in hidrosillenmiş türevlerinden biridir ve karsinojenik gücünün aflatoksin B₁'den 10 kat daha düşük olduğu belirtilmektedir. Mikrozomal hidrosilasyon ve demetilasyon reaksiyonları sonucunda oluşan aflatoksin Q₁ ve P₁ metabolitleri de aflatoksin B₁'den çok daha az aktif olan maddelerdir. Bu nedenle bu reaksiyonlar, detoksifikasyon prosesi olarak kabul edilmektedir. Metabolizmada aflatoksin B₁'in detoksifikasyonu;

hidroksillenmiş metabolitlerin sülfat ve glukuronik asitle birleşerek, suda çözünebilir sülfat veya glukuronid esterlerine dönüşmesi, ardından da idrar ve safra ile atılması ile tamamlanmaktadır. Bu biyotransformasyon olaylarında esas önemli olan proses, yine bu enzim sistemleriyle meydana gelen, aflatoksin B₁'in epoksidasyonu prosesidir. Burada, bifuran halkasındaki çift bağın epoksidasyonu sonucu çok reaktif bir form oluşmaktadır.



Şekil 2. Aflatoksin B₁'in vücuttaki metabolizması (15)

Bu elektrofilik epoksid DNA, RNA ve protein gibi hücresel makromoleküllerdeki çeşitli nükleofilik merkezlere kovalent olarak bağlanabilir. Aflatoksin B₁'in epoksi formunun bu aktifleşme reaksiyonunun sonucunda DNA ile birleşerek AFB₁-N⁷-Gua kompleksini oluşturduğu bilinmektedir. Bu kompleks organizma veya hücreler için biyolojik bir tehlike oluşturmakta ve karsinojenik ve genotoksik etkilerin sorumlusu olarak değerlendirilmektedir. Şekil 3'de AFB₁-N⁷-Gua kompleksinin yapısı görülmektedir. Kenya'nın aflatoksin B₁ alımı ile karaciğer kanseri arasında pozitif ilişki bulunan bir bölgesinde hastalardan toplanan idrarlarda AFB₁-N⁷-Gua kompleksi belirlenmiştir (8,15).



Şekil 3. AFB₁-N⁷-Guanil kompleksi (15).

Bu epidemiyolojik, genetik ve deneysel bulgular sonucunda, Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC; International Agency for Research on Cancer) tarafından 1993 yılında yapılan sınıflamada, aflatoksin B₁ “yeterli kanıt elde edilmiş insan karsinojenleri (sınıf 1)”, AFLM₁ de "muhtemel insan karsinojenleri (2B sınıfı)" içerisinde yer almıştır (18). Avrupa Birliği'nin “Gıda Maddelerinde Bazı Kontaminantların Maksimum Düzeylerini Belirleyen Komisyon Direktifi”nde; özellikle aflatoksin B₁ olmak üzere, aflatoksinlerin genotoksik karsinojen maddeler olduğu, bu nedenle herhangi bir NOEL (No Observable Effect; gözlenebilir etki oluşturmayan düzey) ve ADI (Acceptable Daily Intake; kabul edilebilir günlük alım miktarı) değerinin belirlenemediğine değinilmektedir (19).

Türkiye 'de Aflatoksin Limitleri

Bugün dünyada hemen hemen bütün ülkeler, bu tehlikeden korunmak ve ihrac ettikleri ürünlerin geri dönüşünü azaltmak için gıda ve yemlerde bulunabilecek aflatoksin düzeyleri için limitler belirlemektedir. Avrupa Birliği'nin yukarıda sözü edilen direktifinde; “...bugünkü bilimsel ve teknolojik bilgilerin ve üretim/depolama tekniklerindeki gelişmelerin, bu toksinlerin oluşumunu tamamen önleyemediği ve bu -ve yukarıda sözü edilen- nedenlerle de, mümkün olduğu kadar düşük limitler belirlenmesi gerektiği” belirtilmektedir (19).

Ülkemizde de, Türk Gıda Kodeksi'nde (20) gıdalar, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın Tebliği'nde (21) ise yemler için aflatoksin limitleri belirlenmiştir (Çizelge 1).

Aflatoksinlerin Detoksifikasyon ve Dekontaminasyonları

Aflatoksin sorunu, insan sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmasının yanı sıra, aynı zamanda ekonomik yönden de büyük önem taşımaktadır. Dünyada bu nedenle meydana gelen ekonomik kayıpların milyarlarca dolara ulaştığı belirtilmektedir. FAO, 1985 yılında, dünya gıda üretiminin %25'inin mikotoksinlerle kontamine olduğunu hesaplamıştır. Bu ekonomik kayıplar üreticinin ürün kaybı, hayvan ve süt

kayıpları; işletmecinin ve dağıtımının yüksek maliyetler ve son olarak tüketicinin yüksek fiyatlar ve sağlık giderlerinin artması nedeniyle olumsuz etkilenmesine yol açmaktadır. Ayrıca bu konudaki mevzuat maliyetleri, araştırma ve eğitim maliyetleri de ek bir ekonomik yük getirmektedir (3,18).

Çizelge 1 : Türkiye’de gıda ve yemlerde bulunmasına izin verilen aflatoksin (AFL) düzeyleri (ppb) (20,21)

Gıda ve Yem Türü	AFLB ₁	Toplam AFL (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	AFLM ₁
Gıdalar			
▪ Fındık, yerfıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir, üzüm ve diğer kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5.0	10.0	-
▪ Baharat	5.0	10.0	-
▪ Tahıllar ve tahıl ürünleri	2.0	4.0	-
▪ Peynir	-	-	0.25
▪ Süt	-	-	0.05
▪ Süt tozu	-	-	0.5
▪ Bebek mamaları ve devam formülleri (süt bazlı)	-	-	0.05
▪ Bebek mamaları ve bebek gıdaları	1	2	-
▪ Diğer gıda maddeleri	5	10	-
Yemler			
▪ Yem hammaddeleri	50	-	-
▪ Geviş getiren hayvanların karma yemleri(kuzu-buzağı yemleri hariç)	50	-	-
▪ Kümes kanatlıları karma yemleri (gençlerin yemleri hariç)	20	-	-
▪ Diğer karma yemler	10	-	-

Bütün bu nedenlerle, gıda ve yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde öncelikle hammaddenin tarlada gelişimi, hasatı, depolanması, nakliyesi, ürüne işlenmesi ve ürün elde edilmesi aşamalarındaki küf kontaminasyonunun engellenmesi veya en aza indirilmesi önem taşımaktadır. Mikrobiyal kontaminasyonu tarlada kontrol altında tutmak çok güçtür. Ancak, mikrobiyal kontaminasyon ürünün hasatı ve onu izleyen aşamalarda alınacak hijyen ve sanitasyon önlemleri ve bilinçli uygulamalarla büyük ölçüde engellenebilir. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde ikinci ve daha da önemli adım ise hammadde, ara ürünler ve son ürüne çeşitli şekillerde bulaşan küf/küflerin gelişiminin önlenmesidir. Bu da üretimde iyi bir teknoloji kullanma ve bilinçli uygulamalarla mümkün olabilir. Ancak küflerin gelişme isteklerinin az olması ve buna bağlı olarak da hemen hemen her yerde ve koşulda üremeleri

nedeniyle, mikotoksin oluşumunun önlenmesinde büyük güçlükler yaşanmakta ve çoğu kez başarısız kalılabilmektedir. Aflatoksin kontaminasyonunun önlenemediği durumlarda üründen aflatoksinin uzaklaştırılması ve detoksifikasyon amacıyla çok sayıda araştırma yapılmakta ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik birçok yöntem denenmektedir (22-25).

Fiziksel ayırma yöntemleri arasında, elle veya elektronik yollarla ayıklamadan aflatoksin düzeylerini azaltmak için yaygın olarak yararlanılmaktadır. Rengi değişmiş, bozulmuş, şekli bozuk taneleri ayıklayarak aflatoksini azaltma yönünde en iyi sonuçlar yerfıstığı sektöründe alınmıştır. Mısır veya pamuk tohumu gibi ürünlerde ise bu yöntemi uygulamada güçlüklerle karşılaşıldığından sıklıkla kullanılmamaktadır. Ürünler bir küf bozulması göstermediği halde mikotoksinleri önemli düzeylerde içerebilmektedir. Bu nedenle ayıklama ile son üründe başlangıçtakinden düşük aflatoksin düzeylerine ulaşılsa bile, çoğu kez kontaminasyonun tamamı giderilememektedir (24). Küflerin geliştiği danelerin yoğunluğunun, sağlam danelere göre daha az olmasından yararlanılarak aflatoksinin azaltılmasıyla ilgili çalışmalar da yapılmıştır (26). Fiziksel dekontaminasyon yöntemleri arasında, iyonize ve iyonize olmayan ışınların, solvent ekstraksiyonlarının, adsorbsiyon ve mikrodalga ile ısıl işlemin aflatoksin üzerine etkileri de incelenmektedir (22,27).

Gıda katkıları ve kimyasal adsorbanlar da, potansiyel dekontaminasyon yöntemleri olarak dikkate alınmaktadır. Tabata ve ark..(28), çok sayıda gıda katkı maddesini bu yönden incelemiş ve bazılarının gıda maddesine eklenen aflatoksin düzeyini azalttığını gözlemiştir. Diğer taraftan, patulin ve okratoksin A'nın aktif karbonla giderilmesinde başarılı sonuçlar alınmıştır (29,30). Sindirilmeyen bazı adsorban maddeler ise ticari olarak yemlerde kullanılmaktadır (31). Fiziksel ve kimyasal detoksifikasyon yöntemlerinin birlikte kullanıldığı çalışmalar da yapılmaktadır (32,33). Kimyasal kontaminasyon işlemleri içerisinde amonyaklama işlemi bazı ülkelerde yasal olarak kabul görmüştür ve bu ülkelerde yem hammaddelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (24,31).

Aflatoksinin üründen uzaklaştırılması ile ilgili olarak araştırılan farklı yöntemler, belirli derecelerde başarılı bulunmalarına karşın; yeterli detoksifikasyon düzeylerini sağlayamamaları, besin öğelerinde kayıplara neden olmaları ve yüksek maliyet gerektirmeleri gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Bu alanda çalışan birçok araştırmacı; dekontaminasyon için en iyi çözümün, biyolojik detoksifikasyon olacağı, bunun tehlikeli kimyasalların kullanılmasını önleyeceği ve gıda/yemlerde besin değerleri ve yenilebilme özelliklerinde önemli kayıplara neden olmayacağı konusunda birleşmektedir (31).

Biyolojik yöntemlerden üzerinde en çok çalışılanlardan biri, mikotoksinin fermantasyon yoluyla giderilmesidir. İki farklı çalışmada, zeralenon ve fumonisine kontamine olmuş mısırlardan etanol eldesi sırasında toksin miktarındaki değişim izlenmiş; her ikisinde de üretilen etanolde toksin bulunmazken, toksinin diğer fraksiyonlarda kaldığı belirlenmiştir (34,35).

Alkol fermantasyonunun trikotesenler üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada da, trikotesenlerin kendi türevleri olan maddelere dönüştüğü görülmüştür (31). Bir çalışmada, deoksinivalenol (DON, vomitoksin) ve fumonisin etanol fermantasyonunda stabil olduğu (36); bir başka çalışmada da bira üretiminde alkol

fermantasyonu sırasında, üç *Saccaromyces cerevisiae* suşunun malttaki okratoksin A, fumonisin B₁ ve B₂'yi azalttığı görülmüştür. Ayrıca, üzüm suyunun alkol fermentasyonu sırasında da trikotesenlerin degrade olduğu rapor edilmiştir. Mikroorganizmaların çeşitli mikotoksinler üzerine etkisini inceleyen bir çok çalışma yapılmış; okratoksin A'nın rumenden izole edilen 3 bakteri tarafından, diasetoksisirpenol (DAS) ve bir türevinin topraktan izole edilen bir mikrobiyal karışımla, zeralenonun çeşitli maya kültürleri tarafından degrade edildiği görülmüştür (37). Son yıllarda, laktik asit bakterileriyle aflatoksinin uzaklaştırılması ile ilgili olarak yapılan çalışmalardan da olumlu sonuç alındığı bildirilmektedir (38-41).

Flavobacterium aurantiacum ile Dekontaminasyon

Aflatoksinin keşfedildiği 1960'lı yıllarda, aralarında küf, maya, aktinomiset, bakteri ve alglerin bulunduğu yaklaşık 1000 mikroorganizmanın, aflatoksin B₁ ve G₁'i parçalama veya biyodönüşüme uğratması yönünde etkileri olup olmadığının test edildiği çalışma sırasında bu konudaki ilk bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmada, hiçbir maya, aktinomiset ve algin aflatoksin üzerinde etkili olmadığı belirlenmiş; bazı *Pseudomonas* türlerinin aflatoksini azalttığı görülmüşse de, bunun ortam pH'ındaki yükselmeye bağlı olduğu anlaşılmıştır. Küf ve küf sporları ile yapılan denemelerde, *Aspergillus niger* suşlarının aflatoksin B₁'i belli ölçüde azalttığı, ancak bunun uzun bir inkübasyon süresinde gerçekleştiği; *Penicillium raistrickii* ve bazı küf sporlarının da, aflatoksin B₁'in bir kısmını ince tabaka kromatografisinde farklı R_f'lerde floresan veren maddelere dönüştürdüğü gözlenmiştir. Bu çalışmada *Flavobacterium*'un 7 farklı türü de dahil olmak üzere test edilen bütün bakterilerin aflatoksin üzerinde etkisiz olduğu görülürken, yalnız *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184 suşunun aflatoksini ortamdan uzaklaştırabildiği belirlenmiştir (42).

Flavobacterium, agarlı kültür besiyerlerinde sarı – turuncu renkli kolonileri ile karakterize olan ve karbohidratlardan zayıf asit oluşturabilen, Gram-negatif, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde olan bir bakteri cinsidir (43). *Flavobacterium* cinsine giren türler genelde 30 °C ve hemen altındaki sıcaklıklarda gelişebilmektedir. Bu bakterinin çok az sayıdaki türünün 37 °C'de üreyebildiği belirtilmiştir (44).

Bergey's Manual'in 1984 yılında yayınlanan baskısında (43) *Flavobacterium* cinsi içine *F. aquatile*, *F. breve*, *F. balustinum*, *F. meningosepticum*, *F. odoratum*, *F. multivorum*, *F. spiritivorum* olmak üzere 7 tür dahil edilmektedir. Bergey's Manual'in sekizinci baskısında (44) ise tür sayısı 12 olarak belirtilmektedir. *F. aurantiacum* türüne ise, sözü edilen Bergey's Manual baskılarında rastlanmamıştır. *F. aurantiacum* NRRL B-184 suşu "Northern Regional Research Laboratory, ABD"de tanımlanan ve isimlendirilen bir bakteridir. Ciegler ve ark..(42) gerçekleştirdikleri çalışmada "*Flavobacterium aurantiacum*" olarak izole edilen ve "*F. aurantiacum* NRRL B-184" olarak tanımlanan bu bakterinin Bergey's Manual'in altıncı baskısında yer alan *F.aurantiacum*'un ve diğer *Flavobacterium* türlerinin özelliklerine tam uyum göstermediğine değinmişlerdir. Araştırmacılar *F.aurantiacum* NRRL B-184 olarak isimlendirilen bu bakterinin, aerobik, Gram-negatif, çubuk şekilli, hareketsiz bir bakteri olduğunu ve "tryptone-glucose-yeast extract (TGY)" agarlı besiyerinde, yuvarlak, parlak turuncu renkte, kubbeli, pürüzsüz ve sınırları

belirgin koloniler oluşturduğunu belirtmiştir. Ayrıca çalışmada, bakterinin jelatini sivilaştırmadığı, litmus milk besiyerinde 48 saatte 5mm'nin üstünde alkali reaksiyon verdiği, nitrattan nitrit oluşturmadığı, sitratta gelişmediği ve indol, nişasta hidrolizi, glukoz, sukroz ve laktöz negatif özellik gösterdiği belirtilmiştir.

Ciegler ve ark..(42) tarafından yapılan çalışmada, 10^7 - 10^{10} adet/mL konsantrasyonda *F. aurantiacum* NRRL B-184 bakteri hücresi tarafından, TGY sıvı besiyerinde bulunan değişik konsantrasyondaki (270-5000 µg/50mL) aflatoksin B₁'in 44 saat içinde %38-74 arasında değişen oranlarda uzaklaştırıldığı görülmüştür. Aflatoksinli ve aflatoksinsiz TGY broth besiyerinde geliştirilen durgun faz hücreleri, aflatoksin içeren fosfat tamponunda inkübe edilmiş; her iki durumda da toksinin ortamdaki uzaklaştığı görülmüş ve toksinli besiyerinde geliştirilen hücrelerle, toksinsiz olanlarda geliştirilen hücrelerin aflatoksini uzaklaştırma oranları değişmemiştir. Toksindeki azalma, hücre sayısı ve inkübasyon süresinin artırılmasıyla orantılı olarak artmıştır. Çalışmada, otoklavlanmış *F.aurantiacum* kültüründeki ölü hücrelerin, hücre sayısı ile orantılı olarak aflatoksin B₁'i çözültiden uzaklaştırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, 3×10^{12} /50mL hücreyle inkübe edilen aflatoksin B₁'in yaklaşık olarak %70'i çözültide belirlenmemiştir. Ancak ölü hücreler çözültiden uzaklaştırılıp, hücre peleti suyla yıkandığında toksin tamamen geri alınmıştır. Ayrıca ölü hücrelerle, inkübasyon süresi ve/veya hücre sayısı artırılmasının toksinin %70'inden daha fazlasının uzaklaştırılması üzerine herhangi bir olumlu etkisi olmamıştır. Buna karşılık durgun faz hücreleri (2×10^{13} /50mL hücre) tarafından 1'er mg B₁ ve G₁ içeren fosfat tamponundan, bu toksinler 3-4 saatte tamamen uzaklaştırılmıştır. Canlı hücrelerin ortamdaki uzaklaştırdığı toksin, suyla veya sonik işleme ya da aflatoksinler için kuvvetli bir çözücü olan kloroformla yıkayarak bile geri alınamamıştır. Canlı hücrelerin inkübasyondan sonra otoklavlanması da toksinin geri dönüşünü sağlamamıştır. Bu nedenle araştırmacılar, canlı hücrelerle geri dönüşsüz bir uzaklaşma gerçekleştiği sonucuna varmışlardır.

Aynı yıllarda, bu olayın daha ayrıntılı incelendiği diğer bir çalışmada da (45), 10^{11} /mL düzeyinde canlı hücre içeren bir sıvı ortamda, 7 ppm aflatoksin B₁'in 4 saat inkübasyonla tam olarak uzaklaştığı ve toksinin suyla, kloroformla ve sonik işleme geri alınamadığı tekrar görülmüştür. Aynı deneme otoklavlanmış hücrelerle yapıldığında da, aflatoksin B₁'in hemen hemen aynı oranda ortamdaki uzaklaştırıldığı, ancak buradaki toksinin geri alınabildiği ve canlı hücrelerle elde edilen sonucun tersine, inkübasyon süresi uzadığında toksin azalışının devam etmediği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak araştırmacılar, aflatoksinin geri-dönüşsüz olarak uzaklaşmasının, ancak canlı *F. aurantiacum* hücreleri ile mümkün olduğunu belirtmişlerdir.

Test çözültülerinden olumlu sonuç alınması üzerine aynı araştırmacılar, *F. aurantiacum*'u çeşitli gıdalar üzerinde de denemişlerdir (42). Bu denemelerde, toksijenik bir *A.flavus* suşu geliştirilerek aflatoksin oluşması sağlanan ürünlerde çalışılmış; 2×10^{11} / mL *F. aurantiacum* hücresi ile 28 °C de 12 saatlik inkübasyon sonunda soya fasulyesindeki 8 ppm düzeyindeki aflatoksin 2 ppm düzeyine inerken, mısır ve yerfıstığında, sırasıyla 16 ve 13 ppm düzeyindeki aflatoksin B₁ ve G₁'in, %100 oranında ortamdaki uzaklaştığı görülmüştür. İnkübasyon süresi uzatıldığında soya fasulyesinde kalan aflatoksinin de giderildiği gözlenmiştir. Süt, bitkisel yağ ve fıstık ezmesi gibi sıvı ve yarı-katı ürünlerde ise, 4×10^{11} /mL bakteri

hücreleri ile 12-14 ppm düzeyindeki aflatoksin B₁'in 2-3 saat gibi kısa sürelerde sifira veya iz miktarlara düştüğü belirlenmiştir.

Aynı çalışmada, bakteri hücreleriyle aflatoksinin giderilmiş olan çözeltiler ördek yavrularıyla test edilerek yeni toksik formlar oluşup oluşmadığı toksikolojik yönden incelenmiştir. Buna göre, tek başına 7 ve 8 µg aflatoksin B₁ ve G₁ verildiğinde, ördek yavrularında "bile duct hyperplasia" görülürken; canlı hücrelerle işlem görmüş 30 ve 52.5 µg gibi yüksek düzeydeki aflatoksin B₁ ve G₁ verilen ördek yavrularında herhangi bir histolojik değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak araştırmacılar, canlı *F. aurantiacum* hücrelerinin çözeltideki aflatoksinin detoksifiye ettiğini ve yeni toksik parçalanma ürünlerinin oluşmadığını belirtmişlerdir (42).

Lillehoj ve ark.. (45) tarafından yapılan çalışmada; aflatoksinin *F. aurantiacum* hücreleri üzerine etkisi, toksinin organizmaya bağlanma miktarı ve bağlanma mekanizması incelenmiştir. Bu çalışmada, yüksek konsantrasyonda (5 µg/mL'den fazla) aflatoksin bulunan ortamda gelişen *F. aurantiacum* hücrelerinin morfolojisinin değiştiği; hücre boyunun aflatoksin miktarına ve inkübasyon süresine bağlı olarak belirgin şekilde uzadığı, ipliksi bir görünüm alan bu hücrelerde daha sonra da şişkinlik ve dallanmalar meydana geldiği görülmüştür. Araştırmacılar bu tip bir değişikliğin, penisilin gibi hücre duvarı inhibitörlerinin etkisine benzediğini belirtmişlerdir. Çalışmada, test çözeltilerine eklenen %1 glukoz, 0.01 M azid veya 1000 ünite/mL penisilin, canlı hücreler tarafından toksinin uzaklaştırılmasını etkilememiş ve toksinin en fazla azalışı 35 °C sıcaklıkta ve pH 6.75'de gerçekleşmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan hücre duvarı parçalanmış bakteri ve izole edilmiş hücre duvarı preparatları da toksini uzaklaştırmakta başarılı olmuş, ancak toksin bu preparatlar suyla yıkandığında geri alınabilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçları, toksinin canlı hücreler tarafından metabolik olarak kullanıldığı ve geri-dönüşsüz olarak giderilmesi için sağlam ve tam hücre yapısına ihtiyaç olduğu şeklinde değerlendirmişlerdir. Ayrıca, aflatoksinin muhtemelen başlangıçta hücre dışı yüzeyine hidrojen veya van der Waals bağlarıyla zayıf olarak bağlandığını, geri-dönüşsüz uzaklaştırmanın ise, canlı hücreler tarafından ve daha yavaş olarak gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir. Ancak bunun bir varsayım olduğunu, ölü ve canlı hücreler tarafından uzaklaştırma arasında hiçbir ilişkinin olmayabileceğini de ifade etmişlerdir.

Daha sonra başka bir araştırma ekibi tarafından bu bakteri yeniden ele alınmış ve yarfıstığı sütünde denenmiştir. Araştırmacılar, öncelikle *F. aurantiacum* durgun faz hücrelerinin elde edilmesi için uygun bir besi ortamı ve yarfıstığı sütünde bu bakterinin gelişme karakteristiklerini belirlemek amacıyla çalışmışlar ve triptic soy broth (TSB) besiyerinin bu amaç için uygun olduğunu; yağlı yarfıstığı sütünde *F. aurantiacum*'un, yağı %50 oranında azaltılmış olana göre daha yavaş durgun faza ulaştığını ve bakterinin stabilitesini en iyi pH 7.0'de koruduğunu göstermişlerdir (46). Aynı araştırmacılar, bakteri tarafından yarfıstığı sütündeki aflatoksinin giderilmesi üzerinde de çalışmışlar; 10⁹ hücre/50 mL (2x10⁷ hücre/mL) düzeyinde 24 saat inkübasyon sonunda, aflatoksin miktarında, fosfat tamponu çözeltisi ile yağı alınmamış ve yağı % 50 azaltılmış olan iki tip yarfıstığı sütü ortamlarında, sırasıyla %40, %23 ve %74 bir azalma olduğunu belirlemişlerdir (47).

Line ve Brackett (48) tarafından, aflatoksinin uzaklaşmasını etkileyen faktörler incelenmiş; hücre sayısı ve kültür yaşının aflatoksinin degradasyonunda etkili

olduğu, transfer sayısının ise etkili olmadığı bildirilmiştir. Çalışmada, 72 saatlik geç durgun faz kültürünün, 48 saatlik durgun faz kültürüne göre toksini daha yüksek oranda ortamdan uzaklaştırdığı görülmüştür. Araştırmacılar, bunun nedeninin anlaşılmadığını, ancak bunun bu devrede hücrenin bazı konformasyonel ve metabolik değişiklik geçireyor olmasına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Hücre sayısı ile ilgili olarak da, yaklaşık 1×10^9 kob/mL ve daha fazla sayıdaki hücrenin fosfat tamponunda aflatoksini uzaklaştırabilirdiği, daha az hücreyle ($\sim 1 \times 10^6$ kob/mL) ise, aflatoksinin ortamdan ölçülebilir düzeyde uzaklaştırılmadığı görülmüştür. Diğer taraftan 8 ay boyunca 3 günde bir yapılan kültür transferi işleminin de fosfat tamponu ortamından aflatoksinin uzaklaştırılmasını etkilemediği belirlenmiştir.

Line ve ark. (49)' nın *F. aurantiacum* tarafından gerçekleştirilen aflatoksin degradasyonunun mekanizmasını çözmeye yönelik olarak gerçekleştirdiği bir çalışmada, radyoaktif olarak işaretlenmiş olan aflatoksin B₁, canlı ve ölü bakteri hücreleriyle 72 saat inkübe edilmiş ve belirli periyodlarla sulu fazlar ve bunların kloroform ekstraktları ¹⁴C içeriği yönünden analiz edilmiştir. Bu radyoaktivite analizleri, kloroformda çözünen [¹⁴C] aflatoksin B₁'in canlı *F. aurantiacum* hücreleri tarafından hızla suda çözümlenür ürünlere dönüştüğünü göstermiştir. *F. aurantiacum* hücresi içermeyen kontrol örneklerinde 72 saat sonra bile radyoaktivitenin % 99.7'si kloroform fazında bulunurken, canlı hücrelerin bulunduğu ortamlarda ise 6 saat sonra kloroform fazında radyoaktivitenin yalnız % 24.1'i kalmıştır. Denemenin sürdürüldüğü zaman içerisinde (72 saat) suda çözümlenir degradasyon ürünlerinin artış hızı ve oranı ile, kloroform fazında radyoaktivitenin azalma hızı ve oranının hemen hemen aynı olduğu görülmüştür. Bu durum, "sabit biyokütlede ve sürekli olarak azalan substrat düzeylerinde hız, kalan substratın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır" şeklinde tanımlanan ve sudaki, topraktaki birçok bileşiğin dekompozisyonunda görülmüş olan tipik "birinci derece (first – order)" kinetiğine uygun bulunmuştur.

Aynı çalışmada ölü hücrelerle işlemde sonra da, sulu fazda bulunan radyoaktivite, hiç hücre bulunmayan kontrollerle yakın olmuş, kloroform fazında kontrolden az, canlı hücrelerinkinden fazla bulunmuştur. İnkübasyon sırasında ¹⁴CO₂ de ölçülmüş, kontrol ve ölü hücrelerde hiç radyoaktif CO₂ ölçülmezken, canlı hücreler tarafından giderek artan düzeylerde ¹⁴CO₂ serbest kalmıştır. Ayrıca hücre peletindeki radyoaktivite ölçümlerinde de, canlı hücrelerin peletlerinde başlangıçta görülen radyoaktivite hızla azalırken, ölü hücrelerde başlangıçtan çalışmanın sonuna kadar (72 saat boyunca) değişmemiştir. Bu da, başlangıçta ölü ve canlı hücrelerde, bir olasılıkla aflatoksin B₁'in hücre duvarına bağlanmasının gerçekleştiğini, ancak canlı hücrelerde hızla suda çözümlenir maddelere dönüştüğü halde, ölü hücrelerin üzerinde kaldığı ve geçici bir uzaklaştırma olduğu anlamına gelmektedir. Araştırmacılar çalışmanın bütün bu sonuçlarını, aflatoksin B₁'in canlı *F. aurantiacum* hücreleri tarafından aktif olarak metabolize edildiğinin kanıtı olarak değerlendirmiştir.

Line ve Brackett (50) tarafından yapılan bir çalışmada da, *F. aurantiacum*'un aflatoksin B₁'in degradasyonuna, ortama ikinci bir karbon kaynağı olarak eklenen besin öğelerinin ve toksin konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Bu amaçla bakteri hücresi içeren fosfat tamponu veya triptic soy broth (TSB) test çözeltilerinin bir bölümüne yalnız radyoaktif olarak işaretlenmiş aflatoksin B₁, diğer bir bölümüne de hem işaretlenmiş, hem de işaretlenmemiş aflatoksin B₁ eklenmiş ve 28 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Hücre süpernatantının ve ¹⁴CO₂'in suda ve kloroformda

çözünen kısımlarının analizleri; eklenen besin öğelerinin (TSB) ve işaretlenmemiş toksin ekleyerek toksin konsantrasyonunu artırmanın, aflatoksin B₁'in mikrobiyal dönüşümüne (transformasyon) önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu gözlemin, Lillehoj ve ark.. (45)'un, ikinci karbon kaynağı olarak %1 glukoz ekledikleri ve degradasyona etkisinin gözlenmediği çalışmanın sonuçlarıyla uyum gösterdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, bu çalışmanın sonuçlarına bağlı olarak, *F.aurantiacum*'un aflatoksin B₁'i degradasyonu ile ilgili metabolizması hakkında bazı ipuçları elde ettiklerini belirtmişlerdir. Eklenen besin öğelerinin degradasyon üzerinde etkili olmaması ve canlı hücrelerle aflatoksin B₁'in suda çözünebilir ürünlere dönüşmesi; degradasyonun, "ko-metabolizma"⁴, organik bileşiklerin akümüasyonu⁵ veya konjugasyon reaksiyonları⁶ gibi mekanizmalarla ilişkili olmadığı; ancak, mikroorganizmanın hem karbon, hem de enerji kaynağı olarak tek bir bileşikten yararlandığı metabolizma şekli olan "mineralizasyon" sonucu meydana gelebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Mineralizasyonda, mikroorganizmalar organik substratları inorganik ürünlere dönüştürürken, substrattaki karbonun bir kısmı hücresel yapıların içine asimile olmakta ve bu asimilasyon nedeniyle de biokütle ve popülasyon artmaktadır. Bu durum, mineralizasyonun, çoğalma ile ilişkili bir proses olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar, yapılan çalışmalarda *F.aurantiacum* hücre sayısında, çoğalma olarak değerlendirilecek bir artış görülmemesinin de, mineralizasyonun, deneme süresi olarak alınan süreçten sonra da devam ediyor olabileceğine veya yüksek konsantrasyonlarda aflatoksin B₁'in *F.aurantiacum* hücreleri için toksik olabileceği bulgusuna (45) bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmayla ileri sürülen, "degradasyonun bir mineralizasyon prosesi içerisinde gerçekleştiği ve dışarıdan bir enerji kaynağına ihtiyaç göstermediği" hipotezinin kesinleşmesinin, bu yöntemle detoksifiye edilen yem ve gıdalarda besin kalitesini olumsuz etkilemeyeceğini göstermesi yönünden de önemli olduğu belirtilmektedir.

F.aurantiacum'un aflatoksin B₁'i ortamdan uzaklaştırma yeteneği ile ilgili çalışmalar, bu degradasyonun mekanizmasını çözmeye yönelik olarak sürmüştür. Çünkü mekanizma ve meydana gelen degradasyon ürünleri tam olarak anlayamadığı sürece, bu yöntemin uygulamaya sokulmasının mümkün olmadığı düşünülmektedir. Ancak degradasyon ile ilişkili enzim veya enzim sistemleri ve degradasyon metabolizması belirlendikten sonra; enzimlerin gen kodlaması yapıp, plazmidlerin içine yerleştirilerek veya detoksifikasyonda kullanılacak başka bir organizmaya transfer edilerek ya da daha da ileri giderek, dirençli ürünler elde etmek amacıyla genetik materyal doğrudan bitkide kullanılarak uygulamaya aktarılabilmesini sağlayacak çalışmaların yapılabileceği belirtilmektedir (51).

Degradasyon mekanizmasını çözmeye yönelik bu çalışmalardan birinde, degradasyon prosesleri ile ilişkili olduğu düşünülen bazı enzim sistemlerinde yeralan bazı metal ko-faktörlerin (Cu⁺², Mn⁺², Zn⁺² ve Co⁺²), *F.aurantiacum*

⁴ Ko-metabolizma : mikrobiyal aktiviteye bir karbon bileşiğinin konu olduğu; ancak gelişme için karbonun mikroorganizma tarafından asimile edilmediği reaksiyonlar (50).

⁵ Organik bileşiklerin bir mikroorganizma içinde akümüasyonudur. Bu tip ortamdan uzaklaştırma şekli çeşitli pestisitlerde gözlenmiştir ve yalnız geçici uzaklaştırma meydana getirmektedir (50).

⁶ Konjugasyon, bir organik kimyasalın, aminoasit veya karbohidrat gibi doğal olarak oluşan bileşiklerle birleşmesini sağlayan mekanizmalardır ve proses genellikle geri dönüşlüdür (50).

tarafından aflatoksin B₁'in degradasyonunda etkili olup olmadığı ve eğer bir etki varsa bunun, şelatör (EDTA; etilendiamintetraasetikasit ve OPT ; 1,10 fenantrolin) varlığında da sürüp sürmediği araştırılmıştır (52). 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda iki değerlikli bakır içeren ortamlarda; 4, 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra degradasyonun kontrollerden önemli ölçüde düşük olduğu, 0.1 mM konsantrasyonda ise farklı olmadığı görülmüştür. 1mM EDTA veya 1mM OPT eklenmesi, 1 ve 10 mM Cu⁺² ile, 4, 24 ve 48 saat sonra; 0.1 mM Cu⁺² ile, 24 ve 48 saat sonra meydana gelen degradasyonu inhibe edici etki önlenememiştir. Araştırmacılar, Cu⁺²'in bakteri üzerinde toksik etkiye sahip olabileceğini; yaptıkları bir ön çalışmada da, Cu⁺² ile inkübe edilen hücrelerin sayısında yaklaşık 1.5 – 2 log düzeyinde bir azalma gördüklerini bildirmişlerdir. Ancak bu toksik etkinin bir enzim veya enzim sistemi üzerinde de olabileceği ve aflatoksin B₁ degradasyonu ile ilişkili bir redüktaz sistemini inhibe etme olasılığı üzerinde de durulmuştur. İki değerlikli mangan eklenen hücrelerde ise, 0.1 mM konsantrasyonda etki önemli bulunmamış, 1 ve 10 mM konsantrasyonda ise, 4. ve 24. saatten sonra degradasyonda önemli bir azalma olduğu görülmüştür. Ön çalışmalarda Mn⁺² bulunan ortamlarda hücre sayısında azalma gözlemlendiğinden, iki değerlikli manganın da yüksek konsantrasyonlarda aflatoksin B₁ degradasyon sisteminin genlerini baskılayıcı olabileceği veya enzimin bu degradasyon için daha düşük affiniteye sahip veya inaktif hale dönüştürülebileceği olasılığı belirtilmiştir. 1 mM EDTA veya OPT tarafından 1 mM Mn⁺²'in bağlanması, 4 ve 24 saat sonra aflatoksin B₁'in degradasyonunu önemli ölçüde arttırmış, 1 mM OPT'nin 10 mM Mn⁺² içeren ortama eklenmesi ise artırmamıştır. Bu bulgu, Mn⁺²'in aflatoksin B₁ degradasyonu üzerinde inhibisyon etkisinin yalnız yüksek konsantrasyonlarda olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

İki değerlikli çinko eklenen örneklerde de degradasyon, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda, 4, 24 ve 48 saat sonra önemli ölçüde azalmıştır. 1 mM EDTA, 1 ve 10 mM Zn⁺²'nin bu inhibitör etkisini önleyemezken, OPT Zn⁺²'yu bağlamış ve degradasyonun inhibisyonunu önlemiştir. Ancak, 10 mM konsantrasyondaki Zn⁺² varlığında OPT, yalnız Zn⁺² bulunanlara göre daha yüksek bir degradasyon sağlamıştır. Buna rağmen, yalnız aflatoksin B₁ bulunan ortamdaki kontrol hücrelerinin degradasyon oranından daha az degradasyon gerçekleşmiştir. Zn⁺²'nin degradasyon ile ilişkili olan enzim veya enzim sisteminde konformasyonel bir değişikliğe neden olarak aktiviteyi etkileyebileceği üzerinde durulmuştur. Çalışmada, Co⁺²'in degradasyonda hiçbir değişikliğe neden olmadığı görülmüş ve bu nedenle şelatör denemesi de yapılmamıştır.

Araştırmacılar bu çalışmanın sonuçlarını değerlendirirken başka çalışmalarda elde edilen aşağıdaki bilgileri dikkate almışlardır:

- Cu⁺², *Methylosymus trichosporium*'da “çözünebilir metan monoksijenaz (sMMO)” in redüktaz ve hidrosilaz komponentlerinin bir inhibitörüdür.
- Mn⁺², *Acromobacter* türlerinin karbofuran hidrolaz ve fungal sistemlerde lignini degrade eden peroksidazlar gibi çeşitli enzim sistemlerinin önemli bir aktivatörüdür.

- Zn^{+2} , alkol dehidrogenazların bir ko-faktörü ve transkripsiyon faktörlerinin, DNA polimerazların ve karbonil anhidrazların aktivasyonu ve DNA bağlanmasında düzenleyici bir rol oynamakta olup, aynı zamanda *M.trichosporium*'un hidroksilazı ve glukoz – 6 – fosfat dehidrogenazın bir inhibitörüdür.

Araştırmacılar sonuç olarak, Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} 'nin degradasyonda gösterdiği inhibisyonun, aflatoxin B₁ degradasyon ile ilişkili özel bir enzim veya enzim sisteminin kesin kanıtlarını sağlamadığını; ancak bu organizma tarafından aflatoxinin degradasyonda bir redüktaz sisteminin rol oynadığını ileri sürebileceklerini; bu katyonların hücrel fraksiyonlar ve/veya enzim preparasyonları üzerindeki etkisini belirlemeye yönelik çalışmaların yapılmasını gerektiğini belirtmişlerdir.

Yine aynı araştırmacılar tarafından bu kez, *F.aurantiacum* tarafından gerçekleştirilen aflatoxin B₁ degradasyonu üzerine, divalent katyon olarak Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'un; şelatör olarak da yine EDTA ve OPT'nin etkisi incelenmiştir (D'souza ve Brackett, 2000). Çalışmada Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'un seçilme nedeni olarak, bu elementlerin enzimlerin büyük bölümünde doğal aktivatörler olmaları gösterilmiştir. Mg^{+2} 'un; membranları stabilize ettiği, protein ve nükleik asitlerin yapısal bütünlüğünü koruduğu, ribozomları stabilize ettiği, ATP ile bir ko-faktör olarak davrandığı ve enzimleri aktive ettiği; Ca^{+2} 'un ise, çeşitli enzimlerin fonksiyonları ve yapılarında önemli rol oynadığı, örneğin γ -karboksilglutamat dekarboksilazın önemli bir ko-faktörü olduğu bildirilmiştir. Yalnız aflatoxin B₁ ve bakteri hücresi içeren fosfat tamponunda (kontrol) 48 saat sonra elde edilen degradasyon; 0.1 ve 10 mM Ca eklenmiş olanlarda 16 ve 24. saatlerde de artış göstermiş, ancak yalnızca 48. saatteki artış kontrolden önemli düzeyde farklı bulunmuştur. Benzeri sonuç Mg^{+2} ile de elde edilmiştir. Degradasyondaki bu artışın, bu divalent katyonların glikoliz ve trikloroasetik asit siklusunda çeşitli dehidrogenazlar ve dekarboksilazların önemli ko-faktörleri olmalarına bağlı olabileceği belirtilmiştir.

Hücre preparasyonlarına divalent katyonlar (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) olmaksızın EDTA ve OPT ilavesi ile 24. saatteki degradasyon önemli ölçüde artmıştır, 16 ve 48. saatlerdeki artışlar önemli olmamıştır. Aynı şekilde 0.1 ve 1 mM OPT ilavesi de 24 saat inkübasyondan sonra önemli ölçüde daha yüksek degradasyon sağlamıştır. Ancak 10 mM OPT'de 24 saat inkübasyondan sonra bir azalma görülmüştür. Degradasyonda şelatörlerle elde edilen bu artışın; EDTA'nın metal iyonlarının büyük bölümünü şelatlayabilmesi, ayrıca bir metalloproteinaz inhibitörü olması, OPT'nin ise iki değerlikli Cu, Fe ve Zn ve üç değerlikli Fe'ye yüksek affinite gösteren bir şelatör olması ile ilişkili olduğu ve EDTA ve OPT ile inhibitörlerin (muhtemelen Ca^{+2} ve Mg^{+2} dışındaki katyonların) bağlanmasıyla açıklanabileceği belirtilmiştir.

Ortama 1 mM EDTA'nın Ca^{+2} ile birlikte eklenmesi durumunda, degradasyonda bir değişiklik olmamıştır. Ancak, Ca^{+2} ile birlikte 1 mM OPT'nin eklenmesi önemli ölçüde degradasyonu düşürmüştür. En yüksek degradasyon 1mM OPT + 10 mM Ca^{+2} ile gerçekleşmiş ve 1 mM ve 0.1 mM Ca^{+2} + 1 mM OPT ortamında azalma olmuştur. Mg^{+2} ile birlikte 1 mM EDTA veya 1 mM OPT varlığında da degradasyon kontrollerden daha düşük olmuştur.

Bütün bu sonuçlara bağlı olarak; Ca^{+2} ve Mg^{+2} katyonlarının *F. aurantiacum* degradasyonunu teşvik ettiği, bu katyonların şelatörler tarafından bağlanmasının onları *F. aurantiacum* hücreleri tarafından kullanılamaz hale getirdiği ve Mg^{+2} 'un bu teşvik etkisinin muhtemelen daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, sonuçlarının bu reaksiyonun kesin kanıtını sağlamıyorsa da, degradasyon sırasında bir redüktaz – dehidrogenaz enzim sistemi yoluyla aflatoksin B₁'in furan halkasının redüksiyonunun söz konusu olabileceğini; bir başka olasılığın da, dekarboksilazlar aracılığıyla aflatoksin B₁'in kumarin halkasının dekarboksilasyona uğraması olabileceğini belirtmişlerdir.

Smiley ve Draughon (53), *F. aurantiacum* tarafından aflatoksin B₁ degradasyonunun bir proteine bağlı olup olmadığını araştırmışlardır. İşlenmemiş (crude) protein ekstraktları ile yaptıkları çalışmada, degradasyondaki enzimatik prosesle ilgili bilgi de elde etmek amacıyla; proteinaz K, DNase I ve pH'nın degradasyon üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Protein ekstraktları (800 µg toplam protein/mL) sulu çözeltilerdeki aflatoksin B₁'i % 74.5 oranında ortamdan uzaklaştırmıştır. Isıl işlem görmüş proteinle ise, aflatoksin B₁ kontrolle yaklaşık olarak aynı düzeyde (%5) azalmıştır. Ancak bu bulgu, diğer hücre bileşenleri ve yapılarının da sıcaklığa dayanıklı olmaması nedeniyle, degradasyonun bir enzime bağlı olduğunu kesin olarak kanıtlayamamaktadır. Proteinaz K ile işlem görmüş protein ekstraktlarının da aflatoksin B₁'i % 34.5 oranında azalttığı görülmüştür. Proteinaz K spesifik olmayan bir proteazdır ve protein ekstraktında bulunan bütün proteinlerle reaksiyona girmektedir. Protein ekstraktındaki diğer proteinler de proteinaz K için substrat olabileceği için, degradasyonun % 100 inaktivasyonu beklenmemektedir. Araştırmacılar proteinaz K ile işlem görmüş protein ekstraktlarının degradasyonu azaltmasının, degradasyonun bir proteine ve belki de bir enzime bağlı olduğunu gösterdiğini belirtmiştir. DNase I işlemi sonucunda ise, degradasyon %80.5 oranında gerçekleşmiştir. Bu işlem, degradasyonun bakterinin genomik DNA'sına spesifik olmayan bir bağlanmayla ilişkili olup olmadığını anlamak amacıyla yapılmıştır. DNase, 3'-hidroksil oligonükleotidleri üreten tek ve çift heliksli DNA'yı degrade eden bir enzimdir. Bu sonuç degradasyonun, aflatoksin B₁'in bakterinin kromozal DNA'sına bağlanmasıyla meydana gelmediğini göstermektedir. Aflatoksin B₁'in DNA'ya bağlanmadan önce epoksi forma dönüşmesi gerekmektedir, ancak bakterinin mikrosomal enzimleri olmadığı için epoksidasyon da beklenmemekte ve bu durumda DNA'ya bağlanma gerçekleşmemektedir. DNase I ile işlem görmüş ekstraktta görülen degradasyonun, hiç işlem görmemiş olanlardan biraz daha yüksek olması da (sırasıyla %80.5 ve 74.5) DNA ve aflatoksin B₁ arasında meydana gelebilecek spesifik olmayan interaksiyonlar içerisinde bağlanmada bir rekabetin ortadan kalkmış olmasına bağlanmıştır. pH'nın degradasyona etkisini ölçen bir deneme de yapılmış ve pH 5, 6, 7 ve 8 arasında en yüksek degradasyon, nötral pH da gerçekleşmiştir. Aflatoksin B₁ degradasyonu ile pH arasında bulunan ilişki tipik bir enzimatik reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

D'souza ve Brackett (53), yine degradasyonun mekanizmasını çözmeye yönelik olarak çalışmışlar; indirgenme koşullarının ve seril ve sülfidril grup inhibitörlerinin degradasyon üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, redüksiyon koşullarının etkisini incelemek amacıyla L-sistein kullanılmış; 0.1, 1 ve 10 mM L-sistein konsantrasyonunun degradasyon üzerine bir etkisi görülmemiştir. Bu sonuç, L-sisteinin, *F. aurantiacum* tarafından gerçekleştirilen aflatoksin B₁

degradasyonunda etkili bir redüksiyon ajanı olmadığı ya da redüksiyon koşullarının degradasyonda önemli olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir. Seril ve sülfidril gruplarının degradasyondaki önemini anlayabilmek amacıyla da, bu grupların inhibitörleri olan, sırasıyla fenilmetilsulfonil florür (PMSF) ve Cd^{+2} kullanılmıştır. Eğer seril ve sülfidril grupları degradasyonla ilişkili ise, inhibitörlerin kullanılmasının degradasyonu önlemesi veya azaltması beklenmektedir. 1 ve 10 mM Cd^{+2} varlığında inhibisyon meydana gelmiş; 1 mM EDTA ve 1 mM OPT eklenmesi de inhibisyonu önleyememiştir. PMSF ile inkübe edilen hücrelerde de 1 mM konsantrasyonda önemli inhibisyon görülmüştür. Araştırmacılar, Cd^{+2} ve PMSF çalışmalarında görülen inhibisyonun; degradasyonla ilişkili enzim sistemindeki seril ve sülfidril gruplarının inaktif hale gelmesiyle ilişkili olabileceği gibi; metabolizması için ihtiyaç duyduğu seril ve sülfidril gruplarını inaktif hale getirerek mikroorganizmanın kendisine de toksik etki gösteriyor olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışma ile, seril ve sülfidril gruplarının önemli olduğu anlaşılmışsa da, bunların degradasyonla ilişkisinin esas olarak hücresel fraksiyonlar ve enzimatik preparasyonlarla çalışılarak kesinleştirilebileceği vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Chu, F.S., 1977, Mode of Action of Mycotoxins and Related Compounds. Adv. Appl. Microbiol., 22, 83-142.
2. Hsieh, D.P.H., 1979, Mycotoxins – Their Biosynthesis in Fungi: General Introduction, Journal of Food Protection, 42(10), 804.
3. Pohland, A.E., 1993. Mycotoxins in Review. Food Additives and Contaminants. 10 (1), 17-28.
4. Bullerman, L.B., 1979. Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health: Journal of Food Protection, 42 (1): 65–86.
5. Scott, P.M., 1978. Mycotoxins in Feeds and Ingredients and their Origin, Journal of Food Protection, 41(5), 385-398.
6. Betina V., 1989. Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects, Elsevier, ISBN 0-444-98885-8, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, 437p.
7. Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T., 2001, *Aspergillus pseudotamarii*, A New Aflatoxin Producing Species in *Aspergillus* Section Flavi, Mycological Research, 105(2), 233-239.
8. Groopman, J.D. and Kensler, T.W., 1988, Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer, CRC Critical Review in Toxicology, 19(2), 113-145.
9. Stoloff, L., 1977. Aflatoxins – An Overview : Mycotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (eds), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. 7-29.

10. Hsieh, D.P.H., Wong, Z.A., Wong, J.J., Michos, C., and Ruebner, B.H., 1977, Comparative Metabolism of Aflatoxin: Mycotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (Eds.), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. pp. 37-50.
11. Bullerman, L.B., 1986. Mycotoxins and Food Safety: Food Techonology. A Scientific Status Summary by The Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety & Nutrition, 59-66.
12. Smith, J.E. and M.O. Moss, 1985. Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance, Printed in Great Britain, Sons. Ltd., 143p.
13. Palmgren, M.S. and Hayes, A.W., 1987, Aflatoxins in Food: Mycotoxins in Food. Krogh, P. (Ed.), Food Science and Technology (A Series of Monograph), Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. London – San Diego – New York – Berkeley, pp 65-97.
14. Wilson, B.J., 1978, Hazards of Mycotoxins to Public Health, Journal of Food Protection, 41(5), 375-384.
15. Ueno, Y., 1985, The Toxicology of Mycotoxins, CRC Critical Review in Toxicology, 14(2), 99-132.
16. Denizel, T., 1989. New Perspective in Aflatoxin Toxicology and Dry Figs Dilemma. Uluslararası Kuru İncir ve Aflatoksin Sempozyumu 4-8 Nisan 1989-Çeşme.
17. Öztürk, M., 1995. P53 Mutations in Nonmalignant Human Liver: Fingerprints of Aflatoxins. Hepatology, 21 (2): 600-601.
18. Smith J.E., 1997. Aflatoxins : Handbook of Plant and Fungal Toxicant. J.P. Felix D'mello (Ed.). CRC Press. pp. 269-285.
19. EC, 1998, Commission Regulation (EC) No.1525/98 of July 1998, Amending Regulation (EC No.194/97 of 31 Jan.1997), Setting Maximum Levels For Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal of The European Communities.
20. Resmi Gazete-1997. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına dair Yönetmelik. 23. Eylül. 2002 tarih ve 24885 Sayılı Resmi Gazete. 29-40.
21. Resmi Gazete - 1991. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'ndan: Beyana ve Tescile Tabi Yem Hammaddelerinde ve Karma Yemlerde Bulunabilecek Zararlı Maddelerin En Çok Miktarları Listesi, Tebliğ No: 91/14, Resmi Gazete, 05.09.1991, Sayı No: 20982, Ankara.
22. Goldblatt, L.A., and Dollear, F.G., 1977. Detoxification of Contaminated Crops: Mycotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (Eds.), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. pp. 139-150.

23. Bullerman, L.B, Schroeder, L.L. and Park, K.Y., 1984, Formation and Control of Mycotoxins in Food. *Journal of Food Protection*, 47(8), 637-646.
24. Park, L.D., 1993, Perspectives on Mycotoxin Decontamination Procedures, *Food Additives and Contaminants*, 10(1), 49-60.
25. Tunail, N., Mikotoksinler: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2.baskı, (Yazarlar : Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, İ., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A.K., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, B.F., Tunail, N., Tükel, Ç.), Sim Matbaacılık, Ankara. 116-189.
26. Huff, W.E., and Hagler Jr., W.M., 1982, Evaluation of Density Segregation as a Means to Estimate The Degree of Aflatoxin Contamination, *Cereal Chem.* 59, 152-153.
27. Rustom, I.Y.S., 1997, Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, Legislation and Inactivation by Physical Methods, *Food Chemistry*, 59(1), 57-67.
28. Tabata, S., Kamimura. H., Ibe, A., Hashimoto, H., Tamura, Y., 1994. Degradation of Aflatoxins by Food Additives. *Journal of Food Protection*, 57 (1): 42-47.
29. Mutlu, M. and Gökmen, V., 1998, Determination of Effective Mass Transfer Coefficient of Patulin Adsorption on Activated Carbon Packed Bed Columns with Recycling, *Journal of Food Engineering*, 35, 259-266.
30. Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, A. Chies, L. and Galvano, M., 1998. Activated Carbons: In Vitro Affinity For Ochratoxin-A and Deoxynivalenol and Relation of Adsorption Ability to Physicochemical Parameters. *Journal of Food Protection*, 61(4), 469-475.
31. Bata, Á. and Lásztity, R., 1999, Detoxification of Mycotoxin-Contaminated Food and Feed by Microorganisms, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 223-228.
32. Altuğ, T., Yousef, E. and Marth, E.H., 1990, Degradation of Aflatoxin B₁ in Dried Figs by Sodium Bisulfite with or Without Heat, Ultraviolet Energy or Hydrogen Peroxide, *Journal of Food Protection*, 53(7), 581-582.
33. İçibal, N. and Altuğ, T., 1992, Degradation of Aflatoxins in Dried Figs by Sulphur Dioxide Alone and in Combination with Heat, Ultraviolet Energy or Hydrogen Peroxide, *Lebensm.-Wiss.U.-Technol.*, 25, 294-296.
34. Bennett, G.A., Lagoda, A.A., Shotwell, O.L. and Hesseltine, C.M., 1981, Utilization of Zearalenone-Contaminated Corn For Ethanol Production, *J. Am.Oil Chem. Soc.*, 58, 974-976.
35. Bothast, R.J., Bennett, G.A., Vancauwenberge, J.E., Richard, J.L., 1992. Fate of Fumonisin B₁ in Naturally Contaminated Corn During Ethanol Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 233-236.

36. Bennett, G.A., Richard, J.L., 1996, Influence of processing on Fusarium mycotoxins in contaminated grains. *Food Technology*, 50, 235-238.
37. Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W., 1998, Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 141-158.
38. Gourama, H. and Bullerman, L.B., 1995, Inhibition of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus Flavus* by *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 58(11), 1249-1256.
39. El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. and Ahokas, J., 1998, Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind a Common Food Carcinogen, Aflatoxin B₁, *Food and Chemical Toxicology*, 36, 321-326.
40. Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J. and Salminen, S.J., 2000. Binding of Aflatoxin B₁ Alters The Adhesion Properties of *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG in A Caco-2 Model. *Journal of Food Protection*, 63(3), 412-414.
41. Oatley, J.T., Rarick, M.D., Ji, G.E. and Linz, J.E., 2000. Binding of Aflatoxin B₁ to Bifidobacteria in Vitro. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1133-1136.
42. Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E. and Hall, H.H., 1966. Microbial Detoxification of Aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14(6), 934-939.
43. Holmes, B., Owen, R.J., Mc Meekin, T.A., 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1, Krieg, N.R., Holt, J.G. (eds), The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 351-361.
44. Weeks, O.B., 1974, *Flavobacterium* : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol. 1, Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (eds), The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp 357-364.
45. Lillehoj, E.B., Ciegler, A. and Hall, H.H., 1967. Aflatoxin B₁ Uptake by *F.aurantiacum* *J.Bacteriology*, 93(1),464-471.
46. Hao,Y.Y. and Brackett, R.E., 1989, Growth and Survival of *F.aurantiacum* in Peanut Milk. *J.Food Protection*, 52(3), 165-168.
47. Hao,Y.Y. and Brackett, R.E., 1988, Removal of Aflatoxin B₁ From Peanut Milk Inoculated with *F.aurantiacum* . *J.Food Science*, 53(5), 1384-1386.
48. Line, J.E. and Brackett, R.E., 1995a. Factors Affecting Aflatoxin B₁ Removal by *F.aurantiacum*, *J.Food Protection*, 58(1), 91-94.
49. Line, J.E. and Brackett, R.E., Wilkinson, R.E., 1994. Evidence For Degradation of Aflatoxin B₁ by *F.aurantiacum*, *J.Food Protection*, 57(1), 788-791.
50. Line, J.E. and Brackett, R.E., 1995b, Role of Toxin Concentration and Second Carbon Source in Microbial Transformation of Aflatoxin B₁ by *F.aurantiacum*. *J.Food Protection*, 58(9),

51. D'souza, D.H. and Brackett, R.E., 2000, The Influence of Divalent Cations and Chelators on Aflatoxin B₁ Degradation by *F.aurantiacum*. Journal of Food Protection, 63(1), 102-105.
52. D'souza, D.H. and Brackett, R.E., 1998, The Role of Trace Metal Ions in Aflatoxin B₁ Degradation by *F.aurantiacum*. Journal of Food Protection, 61(12), 1666-1669.
53. D'souza, D.H. and Brackett, R.E., 2001, Aflatoxin B₁ Degradation by *F.aurantiacum* in The Presence of Reducing Conditions and Seryl and Sulfhydryl Group Inhibitors. Journal of Food Protection, 64(2), 268-271.
54. Smiley, R.D. and Draughon, F.A., 2000, Preliminary Evidence That Degradation of Aflatoxin B₁ by *F.aurantiacum* is Enzymatic. Journal of Food Protection, 63(3), 415-418.