

## Mikotoksin Aranmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri

Işıl Var<sup>1</sup> , Bülent Kabak<sup>2</sup> , Meva Özkarslı<sup>3</sup>

### Özet

Mikotoksinler, küfler tarafından üretilen, insan ve hayvanlara toksik etkileri olan ikincil metabolizma ürünleri olup canlılar üzerinde alındıkları dozlara ve kişisel dirence bağlı olarak ölümlerle sonuçlanan akut etkileri olabileceği gibi kanserojen, teratojen, tremorgen, hemoraljik, dermatitik, hepatotoksik, nefrotoksik ve neurotoksik etkilerinden de söz edilmektedir

Gıdalarda eser miktarda olan bu kontaminasyon seviyelerinin tespiti, çok duyarlı ve kesin sonuçlar veren metodların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla, günümüze değin değişik gıda maddelerinden mikotoksinlerin ayırımı ve teşhisi için birçok farklı metod geliştirilmiştir

### Giriş

Mikotoksinler, küfler tarafından üretilen, insan ve hayvanlara toksik etkileri olan ikincil metabolizma ürünleridir. Bu ikincil metabolizma ürünlerinin birçoğunun yapısının bilinmemesine rağmen biyolojik olarak aktif olan bazı gruplarının antibiyotik, phytotoksik, ve insan ve hayvanlara toksik etkisi bulunmaktadır (1).

Mikotoksinlerin canlılar üzerinde alındıkları dozlara ve kişisel dirence bağlı olarak ölümlerle sonuçlanan akut etkileri olabileceği gibi kanserojen, teratojen, tremorgen, hemoraljik, dermatitik, hepatotoksik, nefrotoksik ve neurotoksik etkilerinden de söz edilmektedir (2).

Mikotoksinler, çok sayıda küf cinsi tarafından üretiliyor olmasına karşın, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* en önemlileridir. Mikotoksinlerin toksik olarak oluşturdukları etkiler de farklıdır (1).

Günümüzde Avrupa Topluluğuna üye ülkelerde ticarete konu olan gıda ürünlerinde bulunmasına izin verilen B<sub>1</sub> üst sınırı 5 ppb, süt sığırlarının yeminde 10 ppb, sütte 0.5 ppb M<sub>1</sub>'dir. Ülkemizde son yıllarda tarım ürünleri için bazı yasal düzenlemeler yapılmış ve belli gıda maddeleri standartlarına, izin verilen en yüksek aflatoksin B<sub>1</sub>

<sup>1</sup>Yrd. Doç. Dr., Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balcalı, Adana. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: [ivar@cu.edu.tr](mailto:ivar@cu.edu.tr)

<sup>2</sup>Arş. Grv., Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balcalı, Adana.

<sup>3</sup>Şölen Çikolata Gıda San.ve Tic.A.Ş., Gaziantep

üst sınırı 5 ppb ve toplam aflatoksin (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) üst sınırı 10 ppb olarak belirlenmiştir (3). Çizelge 1'de dünyada çeşitli ürünlerde kabul edilebilir bazı mikotoksin üst limitleri verilmiştir .

Çizelge 1. Dünyada bazı mikotoksinlerin kabul edilen üst limitleri (µg/kg)

Ülke	Gıda Maddesi	Aflatoksin (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> ) / B <sub>1</sub>
Arjantin	Fıstık, Fıstık Ürünleri, Mısır ürünleri	20 / 5
Brezilya	0-2 Yaş ve Okul Çocukları Dışında	
	Endüstriyel Gıdalar	3 / -
	İthal Gıdalar	10 / 5
	Diğer Gıdalar	30 / 5
Kanada	Fıstık ve Fıstık Ürünleri	15 / -
		<i>Patulin</i>
Belçika	Tüm Gıdalar	0
Norveç	Elma Suyu (Konsantre)	50
İsveç	Elma Suyu (Konsantre)	50
İsviçre	Elma Suyu (Konsantre)	50
		<i>Zearelenon</i>
Brezilya	Mısır	200
Belçika	Tüm gıdalar	0
Rusya	Hububat Bitkisel ve hayvansal yağlar için	100

(4, 5)

Böylesine eser miktarda olan kontaminasyon seviyelerinin tespiti, çok duyarlı ve kesin sonuçlar veren metodların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla değişik gıda maddelerinden mikotoksinlerin ayırımı ve teşhisi için birçok farklı metod geliştirilmiştir (3).

Aflatoksinlerin keşfedilmesiyle birlikte araştırmacılar çalışmalarını mikotoksin analiz yöntemleri üzerinde yoğunlaştırmışlardır. Mikotoksinlerin gıda veya tohumlarda tespit edilmesinde başlıca 3 sorundan söz edilmektedir. Bunlar;

1. Mikotoksinlerin kimyasal yapılarının birbirinden farklı olması nedeniyle farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduklarından her bir mikotoksin grubu için bireysel metodların geliştirilmesi gerekmektedir.
2. Gıdada veya tohumda eser miktarda bulunabilecek mikotoksinin gıdadan izole edilebilmesi için çok etkili ekstrakt temizleme işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca her bir mikotoksin grubu için ayrı ekstrakt temizleme işlemi gerekmektedir.
3. Mikotoksinler ürünlere düzensiz bir şekilde dağılmış durumdadır. Bu nedenle analizin hassasiyetini ve kesinliğini arttırmak için çok sayıda test uygulamak gerekmektedir (6).

Bu derlemede mikotoksin aranmasında kullanılan bazı temel ve yeni geliştirilen analiz yöntemleri hakkında bilgi verilmeye çalışılacaktır.

## **Analiz Metotları**

### **İnce Tabaka Kromatografisi**

İnce tabaka kromatografisi ile yapılan mikotoksin analizlerinde analitik işlem basamakları;örnekleme, ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme, yoğunlaştırma, kromatografik ayırım, kalitatif ve kantitatif tayin, doğrulama testleri şeklindedir.

#### **Örnekleme:**

Alınacak örneklerin alındığı kitleyi temsil edebilecek durumda olması gerekmektedir (7).

#### **Ekstraksiyon ve Ekstrakt Temizleme İşlemi:**

Örneklerden aflatoksin ayrıştırılması amacıyla başlıca 3 farklı ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme yöntemi uygulanmaktadır. Bunlardan BF ve CB yöntemleri AOAC resmi yöntemidir. BF yöntemi ayırma hunisinde, CB yöntemi ise kromatografi kolonunda temizleme işlemlerini içermektedir. Üçüncü metod ise zencefil için Stoloff ve Trucksess adlı araştırmacılar tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir ve hem ayırma hunisinde hem de kromatografi kolonunda çok aşamalı temizleme işlemlerini içermektedir. (3).

Son yıllarda özellikle HPLC kullanımında ekstraksiyon immunoaffinity kolonlarda yapılmaya başlanmıştır. Bu ekstraksiyon yöntemi İnce Tabaka Kromatografisi için de önerilmiştir.

Ekstraksiyondaki amacımız mikotoksinin kullandığımız solventle karşı karşıya gelmesi ve bu maddelerin moleküler düzeyde çarpışmasının sağlanmasıdır. Kullandığımız solventin seçiminde ise analizini yapacağımız mikotoksinin polarlık derecesini gözönünde tutmaktayız. Ekstraksiyon işleminde dikkat edilecek diğer bir konu da, ekstraksiyonda kullanılan solventle birlikte su ilave edilmesidir. Bunun nedeni, suyun gıda maddesinin içine penetre olma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Böylece su ile birlikte solventin ürün içine girmesi sağlanmaktadır (8).

Aflatoksin analizlerinde başlıca 3 ekstraksiyon kullanılmaktadır.

1. Kloroform-su ekstraksiyonu
2. Metanol-su ekstraksiyonu
3. Asetonitril-su ekstraksiyonu

Ekstrakte üründe aflatoksinin yanısıra protein, lipit, renk maddeleri gibi analiz sonucunu etkileyebilecek kirlilik maddeleri de bulunmaktadır. Amacımız bu kirlilik maddelerini ortamdaki uzaklaştırmak, toksinin ise fazda kalmasını sağlamaktır. Son olarak da uygun polaritede bir solvent kullanarak toksini fazdan almaktır (8).

#### **Yoğunlaştırma:**

Yoğunlaştırma işlemi, rotary evaporatörde yapılmaktadır.Yoğunlaştırma işlemi sonunda aflatoksine ait olan kalıntı, aflatoksini çok iyi çözen bir solvent olan kloroformla yıkanarak vialle alınır (7).

Aflatoksini vialde almak için kullanılan kloroform azot gazı altında buharlaştırılır. Buharlaştırma sonucu vialde kalan kalıntı 200 mikrolitre benzen+asetonitril (98+2) kullanılarak çözündürülür ve kromatografi işlemine tabi tutuluncaya kadar buzdolabında bekletilir (8, 3).

## **Kalitatif İnce Tabaka Kromatografisi**

Aflatoksin analizlerinde sabit faz olarak silikajel, hareketli faz olarak ise değişik solvent karışımları kullanılabilir. Sabit faz olan silikajel polar özelliktedir. Hareketli faz ise daha az polar özelliktedir. Hareketli faz sabit faz üzerinde belirli bir hızla hareket ederken polaritesi düşük olan moleküller hareketli faz ile daha hızlı taşınırken, polaritesi yüksek olan moleküller silikajele daha sıkı tutulduğundan yavaş taşınırlar (8).

Örnek ekstraktlarının ve standartların, plakaya azaltılmış ışık altında ve mümkün olduğu kadar çabuk bir şekilde spotlanması gerekmektedir(7, 3).

Kromatografi tankında yürütme 2 aşamada gerçekleştirilir. 1.yürütmede eterde geri yürütme işlemi yapılarak renk maddeleri ve benzeri maddeleri ayrılır. 1. Yürütme tankında aflatoksin yürümez, spotlanan yerde kalır. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra plakanın karanlık bir ortamda kuruması için beklenir. 2. Yürütme tankına ise 2 cm derinlik oluşturacak şekilde kloroform-aseton (90+10) çözücü konur. Plaka alt kenarı tankın kanarına dayanarak yerleştirilir ve oda sıcaklığında 40 dakika kadar veya aflatoksinler 0,4-0,7 Rf (Rf değeri :sabit faz üzerinde hareketli faz olarak kullanılan çözücünün aldığı yolun aflatoksinin aldığı yola oranıdır) değerine ulaşacak kadar bir sürede geliştirilir. Geliştirmenin sonunda plaka tanktan çıkartılarak karanlık veya az ışıklı bir yerde oda sıcaklığında kurumaya bırakılır (3, 7).

## **Plakanın Değerlendirilmesi**

Plakada öncelikle rezolüsyon referans standartının (aflatoksin B1+B2+G1+G2) 4 beneginin oluşturduğu hat incelenir. Bu 4 benek birbirinden tam olarak ayrılmış olmalıdır. Bunlar azalan Rf değerlerine göre B1,B2,G1,G2'dirler. Aflatoksin B1 ve B2'nin mavimsi floresanına karşılık G1 ve G2'nin yeşilimsi bir renkte olduğu görülür (7).

İkinci olarak numuneye ait kromatogram incelenir. Numuneye ait benekle standarta ait benek aynı renkte ve aynı Rf değerinde bulunmalıdır. Bu durumda numuneye ait kromatogramdaki benegin aflatoksine ait olabileceği dolayısıyla, numunede aflatoksinin bulunabileceği kabul edilerek doğrulama testlerine geçilir ve kantitatif ince tabaka kromatografisi işlemi uygulanır (7).

## **Doğrulama Tetleri**

1. Sülfirik asit testi : Aflatoksin olduğu şüpheli benekler üzerine % 25'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> püskürtülür

2. Triflor Asetik Asit (TFA) Testi: Bu test sadece aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>'e uygulanabilmektedir. Örnek ve standart noktalarının üzerine 1-2 µl TFA konularak yapılır (8).

## Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi

Kalitatif ince tabaka kromatografisinde belirtilen incelemeler yapıldıktan sonra örnek ve standartlara ait aflatoksin beneklerinin floresans konsantrasyonları birbiri ile karşılaştırılır. Öncelikle numune ve standartlardaki B1 benekleri incelenir. Numunedeki B1 beneklerinin standarta ait hangi konsantrasyondaki beneğe eşit olduğu tespit edilir. Bu tespiti yaparken plaka UV lambasından yavaş yavaş uzaklaştırılır ve örnek beneği ile birlikte kaybolan standart beneği gözlenir ve miktar tayini yapılır (7).

Aflatoksin B1 miktarı şu şekilde hesaplanır.

$$Af\ B1(\mu g/kg) = S \times C \times V / W \times Y$$

S : Örnek ile çakışan standart hacim(µl)

C : Standart konsantrasyonu(µg/ml)

V : Örnek ekstraktının seyreltildiği son hacim(µl)

W : Alınan ekstarkt hacminin temsil ettiği örnek ağırlığı(gr)

Y : Plaka üzerine uygulanan örnek hacmi

## Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), mikotoksinler ve mikotoksinler gibi düşük molekül ağırlığına sahip diğer bileşiklerin analizlerinde son yıllarda üzerinde en çok çalışılan cihazlardan birisidir (6).

HPLC cihazı temel olarak, hareketli faz, pompa, enjektör bloğu, kolon, detektör kısımlarından oluşmaktadır (9).

**Harektli Faz:** Hareketli faz olarak kullanılan çözümler uygulanan kromatografi şekline bağlıdır. Solvent rezervuarının çalışma esnasında ağzının kapalı olmasına özel bir dikkat gösterilmelidir. Buharlaştırmadan dolayı hareketli fazın kompozisyonu değişebilir. Floresans şiddeti hareketli fazın kompozisyonuna göre değişebilir. Örneğin kloroform hareketli faz çözeltisinde aflatoksin B'ler, aflatoksin G'lerden daha az floresans göstermektedir. Aflatoksin analizlerinde hareketli faz olarak genellikle asetonitril+su (28+72) kullanılmaktadır (9, 10).

**Kolon:** Yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazında kullanılan kolonlar 4,5-5 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğunda, 5-10 µm sabit faz partikülleriyle paketlenmiş durumdadırlar. Kolonlar paslanmaz çelikten yapılmışlardır (9).

**Kolon Dolgu Maddesi :** Dolgu maddesi seçiminde tanecik büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynar. Sabit faz olarak genellikle poröz (gözenekli) maddeler kullanılmaktadır. Kullanılan dolgu maddeleri silika ve alimüna esaslıdır (9).

**Detektör :** HPLC için ideal bir detektör, geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine ve bilinen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik resolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Aflatoksinler hem normal hem de ters faz sistemlerde UV absorpsiyon, fluoresans ve MS detektörü ile HPLC'de analiz edilebilmektedir. Aflatoksinler yaklaşık 360 nm'de (metanol çözeltisinde) kuvvetli UV absorpsiyonu göstermektedir (9).

HPLC ile yapılan aflatoksin çalışmalarında genellikle fluoresans detektör kullanılmaktadır. Fluoresans detektörde hücreden hareketli faz içerisinde çözünmüş halde bileşikler geçerken üzerine uzun dalga boyunda monokromatik ışın gönderilir. Bileşik tarafından absorbe edilen bu ışın daha sonra başka dalga boyunda geri verilir. Fluoresans ölçümde bu emisyon analiz için değerlendirilir (9).

Aflatoksinlerin HPLC ile analiz edilmesinde ilk aşama örneğe uygulanacak olan etkili bir ekstrakt temizleme işlemidir. Ekstrakt temizleme yöntemi olarak kullanılan CB, BF yöntemlerine ek olarak son yıllarda immunoaffinite kolon uygulaması yoğunlaşmıştır.

**Immunoaffinite kolonla örnek hazırlama:** Ekstrakte edilen örnekten alınan 10 ml filtrat immunoaffinite kolona aktarılır. Kolonun çıkışına bir toplama kabı konulur. Kolonu yıkamak için 2 defa 10 ml destile su kolondan geçirilir. Son olarak aflatoksinleri kolondan almak için 1 ml metanol uygulanır ve aflatoksinler kolondan alınır. Mikroenjektör vasıtasıyla örnek cihaza enjekte edilir ve örneğe ait kromatogram alınır. İkinci olarak aflatoksin standartı enjekte edilir ve standarta ait kromatogram alınır. Kromatogramlardaki alıkonma zamanlarına bakılarak kalitatif ve kantitatif tayin yapılmaktadır (8).

Son yıllarda aflatoksin analizlerinde çok sık kullanılan HPLC cihazının bazı dezavantajları da bulunmaktadır (6).

1. HPLC cihazının hassasiyetinin yüksek olmasından dolayı, örneklere etkili bir ekstrakt temizleme işleminin yapılması gerekir.
2. Bir kerede sadece bir örnek analiz edilebildiğinden, otomatik enjeksiyon sistemi olsa bile çok sayıda örnek kısa sürede analiz edilemez.
3. Cihazın pahalı olması ve kullanımı için iyi yetişmiş teknik elemana ihtiyaç duyulmaktadır (6).

## **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi, antijen-antikor reaksiyonlarının direk olarak saptandığı bir enzim immunoassay yöntemidir. Mikotoksinler antijenik özellik göstermezler. Mikotoksinlerin antijenik özellik göstermeleri için bir protein veya polipeptid zincirine bağlanmaları gerekir. Mikotoksinlerin antijenik özellik göstermeleri için protein olarak genellikle serum albumini, gamma globulin ve polyisine kullanılmaktadır. Okratoksin, patulin ve penisillik asit gibi reaktif gruplara sahip mikotoksinler direk bağlanma reaksiyonları gösterirler. Buna karşın aflatoksin ve trikotesenleri kapsayan bir çok toksin ise reaktif

gruplara sahip değildirler ve bu nedenle reaktif karboksil veya başka bir grubun öncelikle toksin molekülüne bağlanması gerekmektedir. (6).

Antijenler antikörlara hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals güçleri gibi kovalent olmayan bağlarla geri dönüşümlü olarak bağlanırlar.

Diğer aflatoksin yöntemlerinde olduğu gibi ELISA yönteminde de ilk aşama örneğe uygulanacak olan ekstraksiyon işlemidir. ELISA yöntemi ile yapılan mikotoksin analizlerinde son yıllarda sep-pak kartuşlar kullanılmaktadır. Bu işlem 3 aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada örnek kartuşa ilave edilir. Daha sonra uygun bir solvent kullanılarak örnekte bulunabilecek kirlilik maddeleri ortamdan uzaklaştırılır ve son olarak uygun bir çözücü kullanılarak toksin kartuştan alınır (6).

Ekstrakt temizleme aşamasından sonra yapılan işlem basamakları şu şekildedir.

1. Heterojenik yarışmalı ELISA yönteminde ilk önce spesifik antikörlar katı yüzeye iki ayrı set halinde bağlanır. (12, 6).

2. İki ayrı set halinde ELISA plate'ne bağlanmış serbest antikörlar yıkama tamponu ile yıkanılırlar (6).

3. Birinci sete belirli miktarda enzim bağlanmış aflatoksin ile aynı miktarda ekstrakt solüsyonu aynı anda inkübe edilir. İkinci sete ise sadece enzim bağlanmış aflatoksin inkübe edilir ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır. Bu yöntemde yarışma örnekteki serbest aflatoksin ile spesifik antikörlara bağlanmaya çalışan aflatoksin-enzim konjugatı arasındadır (11).

4. İnkübasyon sonunda ELISA plate'leri tekrar yıkama tamponu ile yıkanılırlar.

5. Enzimle spesifik olarak reaksiyon veren substrat ortama ilave edilir ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır. Süre sonunda asit veya alkali kullanılarak reaksiyon durdurulur (6).

6. Enzim- substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün konsantrasyonu 405 nm'de ELISA okuyucusunda kaydedilir ve standartla karşılaştırılarak kantitatif olarak miktar tayini yapılabilir (6).

Mikotoksin analizlerinde antijenlerin işaretlenmesinde genellikle peroksidaz ve alkali fosfotaz enzimleri kullanılmaktadır (6). Bu enzimlerle reaksiyon veren birçok substrat reaksiyon sonucunda renkli maddeler oluşturarak reaksiyon sonucunun gözle saptanmasına olanak tanırırlar (12).

ELISA yönteminin değişik mikotoksin analizlerinde kullanılması, değişik mikotoksinlere karşı spesifik antikörlar üretimine bağlıdır. Bu nedenle antikörlar üretimi için daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (6).

## Mikotoksin Analizi İçin Yeni Eğilimler

Şu ana kadar mikotoksinlerin tespiti ve analizi için kullanılan testler pahalı ve birçok ekipmana gereksinim duyulan testlerdir. Maragos adlı araştırmacı halihazırda kullanılan ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay) için yeni antikor geliştirerek testin hızlandırılmasını sağlayabilmiştir. Bu yeni antikor ile selektif bir şekilde aflatoksin bağlanabilmekte böylelikle dikkatli ve doğru bir şekilde toksinin tesbiti yapılabilmektedir. Eğer ortamda antikorla bağlanacak toksin bulunmuyorsa koyu portakal renk, eğer toksin varsa oldukça parlak bir renk ya da renksizlik test solüsyonunda gözlenmektedir.

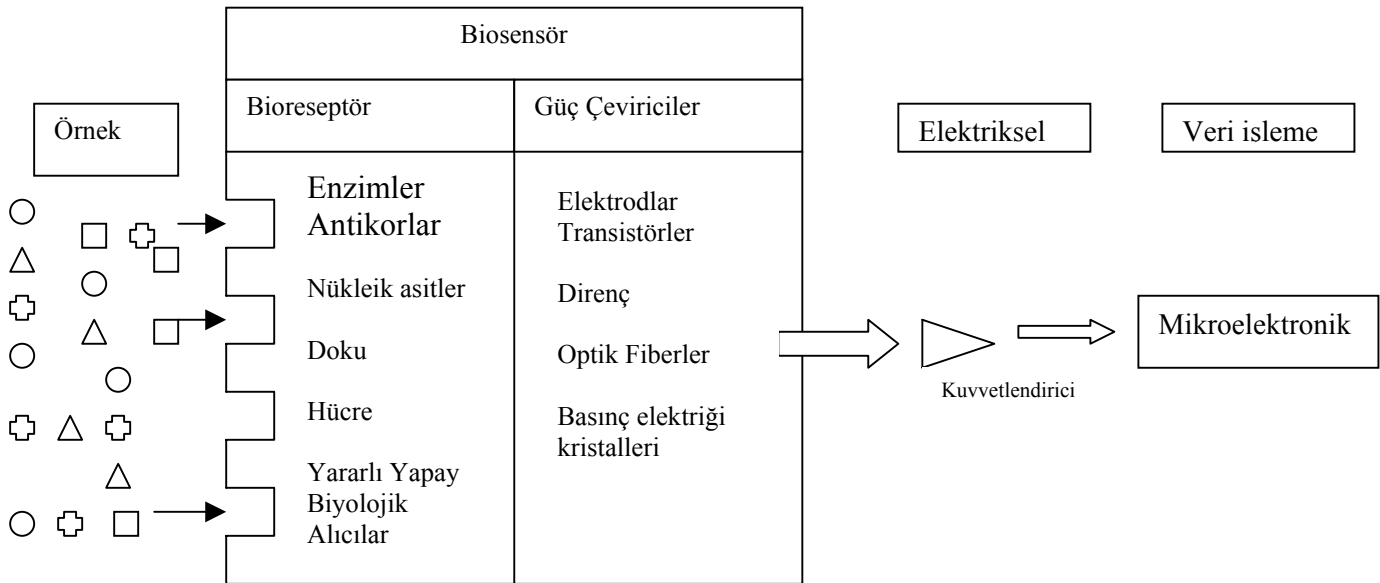
Fungal toksinler için önerilen diğer bir yeni metod kapiler elektroforez metodudur. Örnekler ince, dayanıklı kapilerlerden elektrik akımı ile geçirilmektedir. Bu proses bileşiklerin elektrik yüklerine göre ayrılmasını sağlamakta geleneksel yöntemlerde olduğu gibi herhangi bir çözücü kullanılmamaktadır. (13).

1998'den itibaren Maragos kapiler elektroforez yöntemini diğer mikotoksinlerden deoxynivalenol için de geliştirmiştir.

Son günlerde ise immunoassay metodunun başka bir tipi olan biosensörlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Burada da toksin seviyelerinin ölçümünde ve toksinin yakalanmasında antikorlar kullanılmaktadır.

## Biyosensörler

İlk biyosensörler 1963 yılında elektrokimyasal elektrotlar kullanılarak düzenlenmiştir (14).



Şekil1. Biyosensör işleminin prensibi



Biyosensör sözlük anlamıyla herhangi bir organizmanın, mikroorganizma, enzim sistemi veya diğer biyolojik yapıların indikatör olarak veya örnek olarak kullanılmasıdır (15).

Biyosensörler kompakt analitik cihazlar olup ,güç birleştirici sistemler içine entegre olarak veya bağlantılı bir şekilde biyolojik veya yapay biyolojik hassas elementlerin analizinde kullanılmaktadır.(Şekil 1) (16). Biyosensörler biyolojik olarak tanıyacakları sistemlere göre sınıflandırılabilirler. Biyosensörlerde kullanılan materyaller enzim/substrat, antikor/antijen ve nükleik asit/tamamlayıcı sıraları içeren çiftlerdir.

## **Biyosensörlerin Mikotoksin Analizinde Kullanılması**

Son yıllarda bu konuyla ilgili çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Biyosensörlerin hızlı aflatoksin tayininde kullanılmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada; iki temel immunokimyasal bazlı analizden söz edilmektedir.Birincisi atılabilir DNA bazlı biyosensörlerin kullanılması.Bu analiz yüzey bağlantılı DNA ve hedeflenen toksin veya kirleticiler aasındaki moleküler interaksyonu içermektedir. DNA biyosensörleri polychloimated biphoys (PCBs) aflatoksin B<sub>1</sub> ve aminler gibi bilinen bileşiklerin tespit edilmesinde iyi sonuç vermektedir. İkinci analiz ise çok yeni geliştirilmiş otomatik ve manuel biyosensörler olup aflatoksinlerin tespiti ve miktarları hakkında bilgi verebilmektedir. Bu yeni geliştirilen ekipman immunoaffinity prensiplerine sahip ve kantitatif analizde ise floresans esasına dayandığı bildirilmektedir (17).

Bir başka yapılan çalışmada Aflatoksin B<sub>1</sub>'in kesici dalga bazlı fiber optik immunosensör kullanılarak teşhisi yapılmıştır (18). Gaag ve ark. zearalenone, aflatoksin B<sub>1</sub> ve okratoksin A'nın tespitlerinde biyosensör teknolojisinden yararlanmışlar ve bu amaçla BIACORE kullanmışlardır(19) . HPLC ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen bu çalışma sonucu her iki yöntem arasında sonuçların elde edilmesi anlamında önemli bir fark bulamamışlardır. Fakat, biyosensörlerle çalışmanın daha kolay ve daha az kalifiye elemena ihtiyaç duyduğunu belirtmişlerdir. Gaag ve ark. HPLC ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak çalıştıkları biyosensör kullandıkları çalışmada biyosensörlerin tekrarlanabilirliği, üretilebilirliği gibi özelliklerinden dolayı bir çok çoklu mikotoksin aranmasının tek bir ölçümle yapılmaya çalışıldığı ELISA ve HPLC tekniklerine göre daha iyi bulunmuştur (20).

## **Sonuç**

Sonuç olarak ince tabaka kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemlerinin uzun zaman alması, örneğe kapsamlı bir ekstrakt temizleme işlemi uygulanması, çok fazla miktarda solventle çalışılması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (21). ELISA yönteminin ise basit olması, kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, fazla solventle çalışılmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Buna karşın, mikotoksinlerin ürüne homojen bir şekilde yayılmamasından dolayı, ELISA yönteminde az miktarda örnek kullanılması en önemli sorunu oluşturmaktadır.

Mikotoksinlerin doğru ve kesin sonuç veren ölçümlerini içeren metodlar geliştirilmeye devam etmektedir. Bu yöntemlerin, tarlada bile kullanılabilirliğinin sağlanması

ölçüsünde geliştirilmeleri, toksinsiz gıda ve yemlerin insanlara ulaştırılması umudunu da gerçek kılacaktır.

## Kaynaklar

1. Moss, M.O., 1992. Secondary Metabolism and Food Intoxication-Moulds. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 73: 80-88.
2. Topal, Ş.; Aran, N.; Pembeci, C., 1999. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Mikotoksin Profilleri. Gıda, 24(2), 129-137.
3. Erkahveci, A.; Karaali, A., 1997. Kırmızı Toz Biberde Kullanılabilecek Üç Farklı Analiz Metodunun Karşılaştırılması. Gıda Mühendisliği III. Ulusal Sempozyumu. 22-23 Eylül. ODTÜ Kampüsü. Ankara.
4. FAO, 1987a. Current Limits and regulations on Mycotoxins. Joint FAO/WHO/UNEP Second International Conference on Mycotoxins. Bangkok, Thailand, 28 September to 3 October. 15p.
5. FAO, 1987b. Distribution of Mycotoxins-an Analysis of Worldwide Commodities Data, Including Data from FAO/WHO/UNEP Food Contamination Monitoring Programme. Joint FAO/WHO/UNEP Second International Conference on Mycotoxins Bangkok, Thailand 28 September to 3 October 27p.
6. Chu, F.S.,1984.Immunoassays for analysis of Mycotoxins. Journal of food protection 47 (7):562-569
7. Çoksöyler, N., 1997. Ekstraksiyon ve Ekstrakt Temizleme. Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Seminer Notları, Mersin, 41s.
8. Özkaya, Ş.; Taydaş, E. E.; Başaran, A.; Avcı, B.; Hızlı, S., 1999. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Aflatoksin Analiz Kurs Notları. 7-14 Ağustos. Ankara.
9. Hışıl, Y. 1999. Enstrümental Gıda Analizleri (I). Ege Üniv. Basımevi, Bornova-İzmir, 218s.
10. Galvano, F.; Galofaro, V.; Angelis, A. D.; Galvano, M.; Bognanno, M.; Galvano, G., 1998. Survey of the Occurrence of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Dairy Products Marketed in Italy. Journal of Food Protection. 61(6), p: 738-741.
11. Warner,R.L.,Pestka,J.T.,1987.ELISA Survey of Retail Grain –Bated Food Products for Zearelenone and Aflatoxin B<sub>1</sub> .Journal of Food Protection., 50(6): 502-503.
12. Ünlütürk, A., Turantaş, F., 1998. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, 605 s. Çınarlı, İzmir.
13. Maragos, C.1999. New Ways to Monitor Toxins. Agricultural Research, February. by Linda McGraw, ARS. <http://www.nps.ars.usda.gov/programs/108s2.htm>
14. Palleschi, G. 1999. Introduction to biosensors. Lecture given by author. University Of Rome. "Tor Vergata" April 23.<http://www.inapg.inra.fr/ens.rech>
15. Lawrence, E. 1992.Henderson's Dictionary of Biological Terms, 10<sup>th</sup> Edition. Longman Scientific and Technical. Singapore.
16. Maria, N.,Velesco, G., Mottram, T. 2003. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. Biosystems Engineering 84(1), 1-12.
17. Prudente, A.D. 2002. Use of biosensors for rapid screening of aflatoxin. LSU Food Science Graduate Seminar. March 22.Louisiana State University.

18. Chris, M., Steven, M. 1998. Detection of Aflatoxin B<sub>1</sub> with an evanescent wave-based fiber optic immunosensor.<http://www.nal.usda.gov>
19. Gaag, B.; Stigter, E.; Duijn, G.; Blecker, H., Hofstra, H.; Wahlstram, L. 1998. Application development on BIACORE for the detection of mycotoxins in food and feed. TNO, BIACORE .<http://www.nal.usda.gov.htm>
20. Gaag, B., Edwin, S, Pohl, S. 2000. Multi analyte biosensor for the detection of mycotoxins. TNO.<http://www.nal.usda.gov.htm>
21. Dixon\_Holland, D.E., Pestka, J.T., Bidigane, B.A., Casale, W.N., Warner, R.L., Ram, B.P., Hart, L.P., 1988. Production of sensitive Monoclonal Antisoclies to Aflatoxin B<sub>1</sub> and Aflatoxin M<sub>2</sub> and Their Application to ELISA of Naturally Contaminated Foods. Journal of Food Protection 51(3):201-204