



**YAYGIN MİKOTOKSİNLERİN
AMMONİZASYONLA ELİMİNASYONU**

Veysel DOĞAN

**Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları
Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Armağan HAYIRLI**

Doktora Tezi - 2019

**T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YAYGIN MİKOTOKSİNLERİN AMMONİZASYONLA
ELİMİNASYONU**

Veysel DOĞAN

**Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Armağan HAYIRLI**

**ERZURUM
2019**

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

YAYGIN MİKOTOKSİNLERİN AMMONİZASYONLA
ELİMİNASYONU

Veysel DOĞAN

Tez Savunma Tarihi: 01.02.2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Armağan HAYIRLI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehmet GÜL (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Tarkan ŞAHİN (Kafkas Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Uğur SERBESTER (Çukurova Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Esin GÜVEN (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Küfler	2
2.2. Toksikjenik Küflerin Sınıflandırılması	2
2.3. Toksikjenik Küflerin Üreme Koşulları	4
2.3.1. Nem.....	5
2.3.2. Sıcaklık.....	7
2.3.3. Substratlar	8
2.3.4. Oksijen.....	10
2.4. Toksikjenik Küflerin Yayılışı.....	11
2.5. Mikotoksinlerin Olumsuz Etkileri	12
2.5.1. İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkiler.....	12
2.6. Yaygın Mikotoksinler	16
2.6.1. Aflatoksin.....	16
2.6.2. Okratoksin.....	20

2.6.3. Fumonisin	24
2.6.4. Zearalenon	25
2.6.5. Deoksinivalenol	27
2.7. Mikotoksinlerin Belirlenme Yöntemleri	30
2.7.1. Geleneksel Metotlar	30
2.7.2. Yeni Geliştirilen Yöntemler	30
2.8. Mikotoksinlerin Eliminasyonu ve Detoksifikasyonu	31
2.8.1. Fiziksel Yöntemler	31
2.8.2. Bağlayıcılar	33
2.8.3. Kimyasal Yöntemler	35
3. MATERYAL VE METOT	42
3.1. Yemler ve Yemlerin Hazırlanması	42
3.2. Mikotoksinler	42
3.3. Yemlerin Mikotoksinlerle Kontaminasyonu ve Ammonizasyon İşlemi	42
3.4. Mikotoksin Analizi	45
3.4.1. Yem numunelerinin analiz için hazırlanışı	45
3.4.2. Numunelerin LC/MS MS analizi	45
3.5. Veri Analizi	47
4. BULGULAR	55
4.1. Kontaminasyon ve Ammonizasyonun Sudaki Başarısı	55
4.2. Analiz İçi ve Analizler Arası Varyasyon	58
4.3. Yumurta Tavuğu Yemi	58
4.4. Sütçü İnek Toplam Karma Yemi	61

5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR.....	75
EKLER.....	105
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	106
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	107



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada, mesleki ve kişisel deneyimlerini bir an bile olsa benimle paylaşmaktan geri durmayan değerli hocam Prof. Dr. Armağan HAYIRLI'ya en derin duygularıyla saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımda bilgi ve becerilerini daima benimle paylaşarak bana yol gösteren ve çalışma esnasında laboratuvarlarını kullanmamıza müsaade eden Prof. Dr. Hamza AVCIOĞLU, Prof. Dr. İbrahim BALKAYA ve Doç. Dr. Esin GÜVEN'e; tezimi değerlendiren ve yapıcı eleştirileriyle katkı sunan Prof. Dr. Mehmet GÜL, Prof. Dr. Tarkan ŞAHİN ve Doç. Dr. Uğur SERBESTER'e, TSA-2018-6617 BAP proje kodu ile bu çalışmayı destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, laboratuvar analizlerinde LC-MS/MS cihazını kullanımımıza sunan NanoLab ekibine, Toxifarm temin eden Dr. Ercan PETEKKAYA'ya ve çalışmalarım esnasında her türlü destek sağlayan yakın arkadaşlarım ile aileme sonsuz teşekkür ederim.

Veysel DOĞAN

ÖZET

Yaygın Mikotoksinlerin Ammonizasyonla Eliminasyonu

Amaç: Mikotoksinlerin kimyasal yöntemlerle dekontaminasyon/eliminasyon uygulamalarından birisi olan ammonizasyon yöntemi yaygın mikotoksinlerden aflatoksin ve okratoksinlerdeki lakton halkalarının epoksi bağlarını parçalayarak toksik olmayan yeni metabolitler oluşturur. Bu çalışmanın amacı, kanatlı ve ruminant rasyonlarının yüksek düzeyde aflatoksin B₁ (AFB₁), okratoksin A (OTA) ve zearalenon (ZEA) ile kontaminasyonu sonrası uygulanan ammonizasyon yönteminin etkinliğini belirlemektir.

Materyal ve Metot: Yumurta tavuk yemi ve sütçü inek toplam karma yemi AFB₁, OTA ve ZEA'nın kabul edilen yasal limitlerinin 25 katı ile kontaminasyondan sonra 50°C sıcaklıkta, atmosferik basınç altında 24 saat süreyle NH₄HCO₃ ile ammonize edildi. Mikotoksin seviyeleri LC-MS/MS yöntemiyle ölçüldü.

Bulgular: AFB₁, OTA ve ZEA ile kontamine edilen yumurtacı tavuk yemi ve sütçü inek toplam karma yemi 24 saat süreyle uygulanan ammonizasyon sonrasında AFB₁ için sırasıyla %53 ve %54; OTA için sırasıyla %31 ve %31; ZEA için sırasıyla %22 ve %22 düzeylerinde belirgin düşüşler elde edilmiştir (P<0.001).

Sonuç: Ammonizasyon yöntemi hem ruminant hem de kanatlı yemlerinde yaygın olarak görülebilen mikotoksinlerin eliminasyonu için etkin bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B₁, okratoksin A, zearalenon, ammonizasyon, eliminasyon

ABSTRACT

Elimination of Mycotoxins by the Ammoniation Method

Aim: Ammoniation which is one of the chemical methods for decontamination/elimination of aflatoxin and ochratoxins, common mycotoxins, through disrupting the epoxy bound present in the lactone ring, yielding non-toxic metabolites. Aim of this study was to attain efficacy of the ammoniation method after contaminating poultry and ruminant diets with aflatoxin B₁ (AFB₁), ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEA) at a high level.

Material and Methods: After contaminating laying hen feed and dairy cattle total mixed ration with mycotoxins (contain AFB₁, OTA and ZEA) at 25 times of their accepted legal limits (20 ppb, 200 ppb and 500 ppb respectively), the feeds were subjected to ammoniation with NH₄HCO₃ (10g/kg) at 50 °C for 24 hours under the atmospheric pressure. Mycotoxin levels were analyzed using the LC-MS/MS technique.

Results: Elimination levels of AFB₁, OTA and ZEA in laying hen feed and dairy cattle total mixed were significant ($p < 0.001$). The decreases in mycotoxin levels in laying hen feed and dairy cattle total mixed ration were 53% and 54% for AFB₁; 31% and 31% for OTA and 22% and 22% for ZEA, respectively, 24-hour ammoniation.

Conclusion: The ammoniation is an effective method in eliminating AFB₁, OTA and ZEA from both poultry and ruminant diets.

Key Words: Aflatoxin B₁, ochratoxin A, zearalenone, ammoniation, elimination.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AF	: Aflatoksin
AFB₁	: Aflatoksin B ₁
AFB₂	: Aflatoksin B ₂
AFB_{2a}	: Aflatoksin B _{2a}
AFG₁	: Aflatoksin G ₁
AFG₂	: Aflatoksin G ₂
AFM₁	: Aflatoksin M ₁
AFM₂	: Aflatoksin M ₂
AFD₁	: Aflatoksin D ₁
a_w	: Su aktivitesi
BND	: Bağlı nem dengesi
DON	: Deoksinivalenon
FB₁	: Fumonisin B ₁
FB₂	: Fumonisin B ₂
HBV	: Hepatit B virüsü
HPLC	: High Pressure Liquid Chromotography (Yüksek Basıncılı Likit Kromotografi)
IgG	: İmmunglobülin G
KDS	: Kontamine distile su
LC-MS/MS	: Liquid Chromotography Tandem Mass Spectrometry (Likit Kromotografi Ardışık Kütle Spektrometrisi)
LD₅₀	: Letal doz 50
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OTA	: Okratoksin A

OTAα	: Okratoksin α
OTB	: Okratoksin B
OTC	: Okratoksin C
PTK	: Pamuk Tohumu Küspesi
TLC	: Thin layer chromatography (�nce Tabaka Kromotografisi)
TMR_{si}	: Sütçü İnek Toplam Karma Yem
YTY	: Yumurta Tavu�u Yemi
ZEA	: Zearalenon



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: Mikotoksin yayılım haritası.	12
Şekil 2.2: AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ ve AFG ₂ kimyasal yapıları.....	18
Şekil 2.3: OT'lerin kimyasal yapıları.....	21
Şekil 2.4: FB ₁ kimyasal yapısı.	24
Şekil 2.5: ZEA'nın kimyasal yapısı.	27
Şekil 2.6: DON'un kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.7: Lakton halkasının aminolizis ile açılması.....	38
Şekil 2.8: Aflatoksin B ₁ 'in muhtemel ammonizasyon mekanizması ve moleküler ağırlıkları.	39
Şekil 2.9: Aflatoksinin ammonizasyonu sonucu oluşan 3,5-dimetoksifenolun kimyasal yapısı.	39
Şekil 2.10: Asidik ortamda siklopentan halkalarının hidroksillenmesi ile AFM ₁ oluşur.....	39
Şekil 3.1: Numunelerin LC/ MS-MS analizi için hazırlanış protokolü.....	44
Şekil 3.2: YTY ve TMR _{S1} kontaminasyon öncesi kurutma işlemi.....	48
Şekil 3.3: Kurutma işleminden sonra yemlerin öğütülmesi.....	48
Şekil 3.4: Saf halde temin edilen AFB ₁ , OTA ve ZEA.	49
Şekil 3.5: Mikotoksinlerin distile suda çözündürülmesi.	49
Şekil 3.6: AFB ₁ , OTA ve ZEA ile kontamine edilmiş yemlere NH ₄ HCO ₃ ilavesi....	50
Şekil 3.7: Ammonizasyon işleminden sonra yem numunelerin paketlenmesi.	50
Şekil 3.8: 2 gr halinde tartılan yem numunelerine 10 ml Ekstraksiyon-1 sıvı ilavesi.51	
Şekil 3.9: Ekstraksiyon-1 sıvısı eklenen numunelerin çalkalanması.	51
Şekil 3.10: Santrifüj işlemi.	52

Şekil 3.11: Süpernatanttan 1 ml alınarak ekstraksiyon-2 sıvısı ilave edilmesi.....	52
Şekil 3.12: Ekstraksiyon-2 sıvısı ilave edilen numunenin 0.45 mikronluk filtreden geçirilmesi.....	53
Şekil 3.13: Seyreltme çözeltisi ile 1:1 oranında sulandırılması.....	53
Şekil 3.14: Numunelerin LC/MS-MS analizi için viyallere konulması.....	54
Şekil 3.15: Numunelerin LC/MS-MS cihazında analiz edilmesi.....	54
Şekil 4.1: AFB ₁ ile kontamine edilen distile suya uygulanan ammonizasyonun AFB ₁ düzeyine etkisi.....	56
Şekil 4.2: OTA ile kontamine edilen distile suya uygulanan ammonizasyonun OTA düzeyine etkisi.....	56
Şekil 4.3: ZEA ile kontamine edilen distile suya uygulanan ammonizasyonun ZEA düzeyine etkisi.....	57
Şekil 4.4: AFB ₁ ile kontamine edilen yumurtacı tavuk yemine uygulanan ammonizasyonun AFB ₁ düzeyine etkisi.....	59
Şekil 4.5: OTA ile kontamine edilen yumurtacı tavuk yemine uygulanan ammonizasyonun OTA düzeyine etkisi.....	60
Şekil 4.6: ZEA ile kontamine edilen yumurtacı tavuk yemine uygulanan ammonizasyonun ZEA düzeyine etkisi.....	60
Şekil 4.7: AFB ₁ ile kontamine edilen süt sığırları toplam karma yemine uygulanan ammonizasyonun AFB ₁ düzeyine etkisi.....	62
Şekil 4.8: OTA ile kontamine edilen süt sığırları toplam karma yemine uygulanan ammonizasyonun OTA düzeyine etkisi.....	63
Şekil 4.9: ZEA ile kontamine edilen süt sığırları toplam karma yemine uygulanan ammonizasyonun ZEA düzeyine etkisi.....	63

Şekil 5.1: Uygulanan ammonizasyon sonrasında OTA'dan elde edilen metabolitin tahmini kimyasal yapısı.	66
Şekil 5.2: YTY yemi ammonizasyon işleminin AFB ₁ , OTA, ZEA seviyelerinde meydana getirdiği değişim.	70
Şekil 5.3: TMR _{si} ammonizasyon işleminin AFB ₁ , OTA ve ZEA seviyelerinde meydana getirdiği değişim.	70
Şekil 5.4: KDS ammonizasyon işleminin AFB ₁ , OTA ve ZEA seviyelerinde meydana getirdiği değişim.	71



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1: Mikotoksin üretiminde yaygın olarak bilinen <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ve <i>Fusarium</i> cinslerinin taksonomik sınıflandırılması.	4
Tablo 2.2: Temel toksijenik türler ve üretmiş oldukları mikotoksinler.	4
Tablo 2.3: Bazı toksijenik mantar türlerinin büyümesi ve toksin üretimi için gerekli olan minimum su aktiviteleri.	6
Tablo 2.4: Mikotoksin üremesi için optimum sıcaklıklar.	8
Tablo 2.5: Ammonizasyon uygulaması sonrası mısırdaki bileşimsel değişimler.	41
Tablo 3.1: Yemlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu.	43
Tablo 3.2: LC/ MS MS için kullanılan standartların listesi.	46
Tablo 3.3: LC cihaz koşulları.	46
Tablo 3.4: İyonlaştırıcı kaynağı parametreleri.	46
Tablo 4.1: Distile suyun kontaminasyonu ve ardından uygulanan ammonizasyonun mikotoksin düzeylerine etkisi.	55
Tablo 4.2: Yumurta tavuğu yeminin mikotoksinlerle kontaminasyonu ve ardından uygulanan ammonizasyonun mikotoksin düzeylerine etkisi ..	58
Tablo 4.3: Sütçü inek toplam karma yeminin mikotoksinlerle kontaminasyonu ve ardından uygulanan ammonizasyonun mikotoksin düzeylerine etkisi.	61
Tablo 5.1: Önceki yıllarda yapılan ammonizasyon çalışmalarından elde edilen yıkılma oranları.	69

1. GİRİŞ

Küflere ve salgıladıkları mikotoksin adı verilen bileşiklere bağlı olarak zirai üretim, hayvansal üretim ve insan sağlığı günümüzün en önemli sorunlarından biridir. Mikotoksinler başlıca miselli yapıdaki filamentöz mantarlar tarafından üretilen ve biyokimyasal olarak mantarların büyümesinde ve gelişmesinde bir öneme sahip olmayan sekonder metabolitlerdir.¹ Mikotoksinler “doğal yollarla omurgalılara ve diğer hayvanlara düşük konsantrasyonlarda verildiğinde toksik cevap oluşmasını uyaran, mantarlar tarafından üretilen doğal ürünler” olarak tanımlanmıştır.² Mikotoksin terimi ilk olarak 1962 yılında, İngiltere’de Londra yakınlarında 100,000 kadar hindi palazının esrarengiz bir şekilde ölmesinden sonra kullanılmaya başlanmıştır³ ve bu tarihten itibaren göz ardı edilen bir olgu olmaktan çıkıp bilim adamlarının ilgisini hızla çekmiştir. Bu tarihe kadar Hindi-X-hastalığı olarak adlandırılan ve ölüm nedeni bilinmeyen hastalıkta, *Aspergillus flavus* ile kontamine olan yerfıstığı küspeleri ile beslenen hindilerde ölümün olduğu gözlenmiş, detaylı inceleme sonrasında *A. flavusun* sekonder metaboliti olan aflatoksinlerin ölümlere neden olduğu ortaya konulmuştur.⁴

Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Bu etkiye sahip binlerce mikotoksin arasında en yoğun şekilde tane yemlerde kontaminasyon oluşturan mikotoksin tipleri aflatoksinler (AF), okratoksinler, deoksinivalenol (DON), fumonisinler, zearalenondur.⁵ Bu mikotoksinlerin büyük kısmı *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* gibi üç mantar cinsine ait türler tarafından üretilmektedir.⁶

Bu çalışmada aflatoksin B₁ (AFB₁), okratoksin A (OTA) ve zearalenon (ZEA) gibi yaygın üç mikotoksine karşı uygulanan amonyum bikarbonatın (NH₄HCO₃) detoksifikasyon etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Küfler

Belirli koşullarda üreme özelliği gösteren küfler, mantarlar (fungi) alemi içerisinde yer almaktadır. Günümüzde 100,000'den fazla tarımsal ve gıda ürünlerini kontamine edebilen küf çeşidi bulunmaktadır.⁷ Küfler kendi başlarına hastalık oluşturabildikleri (mikozis) gibi sekonder metabolitleri olan mikotoksinler aracılığıyla da hastalık (mikotoksikozis) oluşturabilmektedirler.

Aspergillus cinsi içerisinde bulunan *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. niger* hayvanlarda hastalık oluşturmaktadır.⁸ *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. niger* bal arılarının larval aşamalarında taş yavru hastalığına⁹, *A. fumigatus* evcil ve yabani kanatlılarda solunum yolları başta olmak üzere diğer organlarında dahil olduğu hastalıklara¹⁰, köpeklerde sinonazal, bronkopulmoner enfeksiyonlara¹¹ ve *A. fumigatus* sığırlarda mikotik pneumoni, gastroenterit, mastitis, plasentit ve abortlara neden olmaktadır.¹² *Candida* spp., *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp., *Microsporum* spp., *Pseudogymnoascus destructans* gibi tür ve cinsler çeşitli hayvanlarda hastalıklar oluşturabilen mantarlardır.⁸

Genetik ve ekolojik faktörlere bağlı olarak var olan küflerin %30-40'ı uygun koşullarda toksin üretebilmektedir.^{13, 14} Zararlı etkileri bilinen yaygın toksinleri üreten *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait türler sırasıyla mantarlar alemi içerisindeki Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota şubeleri altında yer almaktadır.¹⁵ Küfler; nem ve sıcaklığa bağlı olarak üreme kapasitesine sahip zorunlu aerob, ökaryotik organizmalardır. Toksin üreten türleri toksijenik küfler olarak bilinmektedir.

2.2. Toksijenik Küflerin Sınıflandırılması

Bilinen yaygın mikotoksinleri üreten *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait olan toksijenik küf türleri taksonomik olarak mantarlar (fungi) alemine ait olan Ascomycota şubesine aittirler (Tablo 1).

Zirai ürünleri kontamine eden toksijenik küfler bitki gelişimi sırasında tohumla ulaşarak kontamine edebileceği uygun ortamı sağlayan tarla koşullarında (*Fusarium spp.*) ve gelişimi ve çoğalması için uygun ortamı oluşturan depolama koşullarında (*Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*) üreyebilen küfler olmak üzere iki gruba ayrılır.¹⁶ Miller (1995)¹⁷, tarla küfleri ve depo küfleri ayrımının kesin hatlarının olmadığını ileri sürerek toksijenik küfleri:

- 1) *Fusarium graminearum* gibi bitki patojenleri;
- 2) *F. moniliforme* ve *A. flavus* gibi yaşlanmış veya strese maruz kalmış bitkilerde gelişen ve toksin üretebilenler;
- 3) *A. flavus* gibi başlangıçta bitkide kolonize olduktan sonra hasat sonrasında yiyeceklerin depolama koşullarında kontaminasyona daha duyarlı hale gelmesini sağlayanlar;
- 4) *Penicillium verrucosum* ve *A. ochraceus* gibi toprakta veya çürüyen bitki materyalinde bulunup gelişmekte olan tahıl tanesinde meydana gelen ve daha sonra depo şartlarının müsaade ettiği boyutta çoğalabilen küfler şeklinde dört farklı gruba ayırmıştır.

Toksijenik küf türleri bir çeşit mikotoksin üretimini yapabildikleri gibi birden fazla mikotoksin üretimini de gerçekleştirebilmektedirler. Örneğin; *A. flavus* AFB₁ üretimini yaparken *F. culmorum* ve *F. graminearum* DON ve ZEA gibi iki mikotoksinin üretimini yapabilmektedir (Tablo 2).

Tablo 2.1. Mikotoksin üretiminde yaygın olarak bilinen *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerinin taksonomik sınıflandırılması.¹⁵

	Aspergillus	Penicillium	Fusarium
Alem	Fungi	Fungi	Fungi
Şube	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Sınıf	Eurotiomycetes	Eurotiomycetes	Sordariomycetes
Takım	Eurotiales	Eurotiales	Hypocreales
Aile	Trichocomaceae	Trichomaceae	Nectriaceae
Cins	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>

Tablo 2.2. Temel toksijenik türler ve ürettiği mikotoksinler.¹⁸

Mantar Cinsi	Mikotoksin
<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Aflatoksinler
<i>A. ochraceus</i> ; <i>P. viridicatum</i> ; <i>P. cyclopium</i>	Okratoksin A
<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Deoksinivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. poae</i>	T-2 toksin
<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenon
<i>F. moniliforme</i>	Fumonisinler

2.3. Toksik Küflerin Üreme Koşulları

Toksijenik küflerin üremelerini ve mikotoksinlerin oluşumunu etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır, bunlar;

- (1) İç faktörler: nem içeriği, su aktivitesi, substrat tipi, bitki tipi ve besin kompozisyonu;
- (2) Dış faktörler: iklim, sıcaklık, oksijen seviyesi;

(3) İşleme faktörleri: kurutma, karıştırma, koruyucuların eklenmesi ve tahılların taşınması;

(4) İlişkili faktörler: insekt etkileşimi, mantar suşu, mikrobiyolojik ekosistem şeklinde sıralanmaktadır.¹⁹

Gelişmekte olan tahıllar, çevresel şartlar mantar büyümesine ve tahıl duyarlılığının oluşumuna müsaade etmediği müddetçe *A. flavus* enfeksiyonuna ve takiben AFB üretimine dirençlidirler.²⁰ İnsektler, memeliler ve kuşlar, mekanik işlemde kaynaklı zedelenmeler ve/veya sıcak kuru stres koşulları, tahılların hasat öncesi döneminde mantar enfeksiyonları oluştururlar.²¹

Ayrıca; ertelenmiş hasat, geç sulama ve yağmur ve ılıman dönemlerde çığ varlığı AF seviyelerini arttırır. Pamuk kozası açılması esnasında 50 mm üzerinde yağmur alan mahsullerde AF seviyesinin daha fazla olduğu belirlenmiştir.²⁰ ZEA, dolu hasarı olan mısırlarda havaların yağışlı olduğu yaz sonu veya erken sonbahar döneminde oldukça hızlı üreyebilmektedir.²²

2.3.1. Nem

Ortam sıcaklığı ve ortamdaki nem oranı hangi mantar türünün zarar görmüş mahsulde enfeksiyon meydana getireceğini belirler.²¹ Su, mikrobiyal gelişim için temel ihtiyaçtır.²³ Buna bağlı olarak her bir mantarın büyümesi için ihtiyaç duyduğu bir su aktivitesi vardır (Tablo 3). Tohumlar veya tahıllar gibi depolanan ürünlerin birçoğu higroskopik bir doğaya sahiptir dolayısıyla bulundukları ortamın nem miktarı ile dengeye gelene kadar ortamdan nem alırlar veya ortama nem verirler.¹⁹

Higroskopik karakterde olan yem materyallerinde su üç ana fraksiyonda bulunur;

- a) Yem içeriğindeki substratlara kimyasal olarak bağlanmış yapısal su;
- b) Fiziksel etkileşimle substrat yüzeylerine tutunmuş olan adsorbe edilmiş su;

- c) Substrat yüzeylerine zayıf bir şekilde bağlanmış olan absorbe edilmiş su şeklinde bulunmaktadır.²⁴ Burada absorbe edilen su molekülleri substratlara daha zayıf olarak bağlandığı için serbest veya yararlanılabilir fraksiyon olarak görev yapar ve mikrobiyal gelişim için oldukça kullanışlıdır.¹⁹

Toksijenik küflerin gelişim gösterdiği su aktivitesi aralığıyla mikotoksin üretimi için gerekli olan su aktivitesi aralıkları birbirinden farklıdır (Tablo 3). Burada iki kavram bulunmaktadır; bağıl nem dengesi (BND) ve su aktivitesi (a_w). Bağıl nem dengesi ürün ile bulunduğu ortamdaki nem dengesini ifade ederken, a_w mikrobiyal aktivite için gerekli olan ürünün kendisindeki su miktarını ifade etmektedir. Bu iki kavramın birbirleri ile olan ilişkisi formül üzerinde: $a_w = \text{BND}/100$ şeklindedir.^{23, 25} Her bir gıdanın veya yem maddesinin su aktivitesi 1'den küçüktür.

Tablo 2.3. Bazı toksijenik mantar türlerinin büyümesi ve toksin üretimi için gerekli olan minimum su aktiviteleri.²⁶

Mantar Türü	Minimum a_w	
	Büyüme	Toksin Üretimi
<i>A. flavus</i>	0.78-0.84	0.84
<i>A. parasiticus</i>	0.84	0.87
<i>A. ochraceus</i>	0.77	0.85
<i>P. aurantiogriseum</i>	0.82-0.85	0.87-0.90
<i>P. viridicatum</i>	0.80-0.81	0.83-0.86
<i>P. patulum</i>	0.81	0.95
<i>F. vericillioides</i>	0.88	0.93
<i>F. proliferatum</i>	0.88	0.93

2.3.2. Sıcaklık

Toksijenik küflerin üremesi için gerekli olan ortam sıcaklığı cinsler arasında farklılık gösterebildiği gibi optimum gelişme ve AF üretiminin en yoğun olduğu sıcaklıklar arasında da (Tablo 4) büyük farklılıklar gösterebilmektedir.^{27, 28} *Penicillium* türleri -4 ile +35 °C’ de büyüme gösterebilirken *Aspergillus* türleri 10 ile 55 °C gibi daha geniş bir aralıkta büyüme gösterebilir. Küflerin büyük çoğunluğu 10-40 °C sıcaklık aralarında depolanan ürünlerde bozulmalara neden olabilmektedir, bozulma için optimum sıcaklık 25-35 °C olarak kabul edilir.²⁸ Küf gelişiminin olduğu her sıcaklıkta mikotoksin üretimi hiç olmayabilir veya üretim miktarı ve üretim için gerekli olan süre uzayabilir. Örneğin; AF üretimi 25-30 °C sıcaklıkta yüksek olmaktadır, 8-10 °C altındaki sıcaklıklarda da AF üretimi gerçekleşebilir fakat bu miktar olabildiğince azdır ve gereken süre de oldukça uzundur.²⁷ *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus*’un farklı ürünlerde aflatoksin üretimi için gerekli olan optimum sıcaklık değerleri değişkenlik gösterebilmektedir, yerfıstığı ve sıvı ortamda aflatoksin üretimi için optimum sıcaklık *A. flavus* için 25 °C, *A. parasiticus* için 25-30 °C olarak belirlenmiştir.²⁹ Kalıp peynir üzerinde yapılan bir çalışmada 12.8 °C *A. parasiticus* tarafından AF üretimi gerçekleşirken, *A. flavus*’un AF üretmediği gözlemlenmiştir.³⁰

Penicillium ve *Fusarium* cinsleri 5 °C ve hatta donma noktasının altında bile üreme özelliğine sahiptirler.²⁷ *Penicillium cyclopium* ve *P. Viridicatum* tarafından OTA üretimi 4-31 °C’ de gerçekleşebilirken *A. ochraceus* 12 °C altındaki sıcaklıklarda OTA üretimini gerçekleştirememektedir.³¹ *Fusarium roseum* 10 °C gibi düşük depolama sıcaklığında ZEA üretimi gösterebilmektedir. Ayrıca bu sıcaklıklarda *Fusarium spp.* tarafından en yoğun şekilde trikotesen (DON ve T-2 toksin) üretimi gözlenmiştir.³² *Fusarium* tarafından en yüksek miktarda ZEA üretimi 25°C altındaki sıcaklıklarda, gün içerisinde

en yüksek sıcaklık genişliğinin olduğu ve nemliliğin %16 olduğu durumlarda gerçekleştiği belirlenmiştir.³³

Tablo 2.4. Mikotoksin üremesi için optimum sıcaklıklar.²¹

Mikotoksin	Sıcaklık (°C)	Su aktivitesi
Aflatoksinler	33	0.99
Okratoksin	25-30	0.98
Fumonisin	15-30	0.90-0.995
Zearalenon	25	0.96
Deoksinivalenol	26-30	0.995
Sitrinin	20-30	0.75-0.85

2.3.3. Substratlar

Toksijenik küfler geniş yelpazede substratta gelişme özelliğine sahiptir. Bununla beraber bu substratların tamamının mikotoksin üretimi ve küflerin gelişimi için eşit derecede etkiye sahip değildir. Bazı substratlar mikotoksin üretimine az veya hiç katkı sağlamazken aşırı küf gelişimine büyük katkıları olmaktadır.²⁷

Aflatoksin formasyonu için belirli amino asitler, yağ asitleri ve çinko (Zn) gereklidir.³⁴ Yapılan bir çalışmada soya fasulyesindeki AF oluşumunun düşük miktarlarda olması fitik asit tarafından bağlanan Zn'nin küfler tarafında etkin bir şekilde kullanılabilir olmamasına bağlanmıştır.³⁵ Kalsiyum (Ca), demir (Fe) ve bakırın (Cu) AF üretimi üzerine etkisinin az olduğu rapor edilmiştir.³⁶⁻³⁸ Yapılan başka bir çalışma ortamda Ca, Fe ve Cu yokluğu AF üretiminin düşmesiyle sonuçlanmıştır.^{39, 40} Ortamda magnezyum (Mg) varlığının hem küf büyümesi hem de AF üretiminde artışa neden olduğu belirlenmiştir.^{38, 39} Manganez (Mn) seviyesinin düşük olduğu ortamlarda AF

üretimi inhibe olurken, yüksek düzeylerdeki Mn seviyeleri AF formasyonunu arttırdığı fakat orta düzeydeki Mn seviyelerinin AF üretimine etkisinin olmadığı belirlenmiştir.³⁹

Asetik asit ve propiyonik asit gibi 2-10 karbon atomu bulunduran karboksilik asitler küf büyümesi ve toksin üretimi üzerine inhibitör etkiye sahiptir.³⁵ Kaprilik (C₈), nonanoik (C₉) ve andekanoik asidin (C₁₁) %0,2'den yüksek konsantrasyonları toksiktir.⁴¹ Laurik asit (C₁₂) ve behenik asit (C₂₂) gibi doymuş serbest yağ asitleri AF üretimini etkilemeden küf büyümesini iyi bir şekilde desteklemektedir. Serbest yağ asitlerinde doymamışlığın artması küflerin gelişmesinde daha yüksek baskılayıcı etki gösterir (araşidonik asit ve linolenik asit> linoleik asit> oleik asit). Yağ asitlerindeki doymamışlık serbest yağ asitlerine kıyasla daha az toksik etkiye sahiptir. AF üretimi serbest ve esterifiye olmuş yağ asitlerindeki çift bağ sayısı ile direkt ilişki içerisinde bu nedenle linoleik asit ve trilinolein AF üretimini oleik asit, triolen ve diğer doymuş serbest yağ asitleri ve trigliseritlerden daha fazla stimüle etmektedir.⁴¹

Metiyonin, prolin, triptofan, asparjin, aspartik asit, glutamik asit ve alaninin AF biyosentezi üzerine stimüle edici etkisi belirlenmiştir.^{34, 42-44} *A. flavus* mutantlarının metiyonin, lizin ve arjinin gibi amino asitlere farklı AF üretim seviyelerine bağlı olarak farklı düzeylerde ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir.⁴⁵ Prolinin AF üretimi üzerine etkisi asparjinden oldukça fazladır.⁴⁶ Fakat yapılan başka bir çalışmada asparjinin AF üretimine en iyi şekilde destek olduğu ortaya konulmuştur.⁴³

Ortamda glikoz, riboz, ksiloz ve gliserol varlığı hem *A. parasiticus* gelişimi hem de toksin üretimi için oldukça uygun substratlardandır.⁴⁷ *A. flavus* sakkaritleri temel karbon kaynağı olarak kullanarak misel gelişiminin yanı sıra AFB₁ üretimi için kullandığı bildirilmiştir.⁴⁸ Ortamda aseton varlığı küf tarafından glikoz alınımını ve kullanımını arttırdığı için AF biyosentezini arttırdığı gözlenmiştir.⁴⁹ Liu ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada maltoz, glikoz, sükrozun AFB₁ üretimini 1.7-26.6 kata kadar arttırdığını

belirlemişlerdir ayrıca stakiyozun (yapısında iki α D-galaktoz, bir α D-glikoz ve bir β -D-fruktoz bulunur) *A. flavus* gelişimini diğer besin öğelerinden daha iyi bir şekilde sağladığını belirlemişlerdir.³⁴

2.3.4. Oksijen

Ascomycota şubesinde bulunan toksijenik mantarlar germinasyon, gelişme ve spor üretebilmeleri için oksijene (O_2) gereksinim duyduklarından zorunlu aeroblar olarak nitelendirilirler.^{50, 51} Bununla birlikte bu mantarlardan bazılarının fakültatif anaerobik şartlarda gelişebildiklerine dair kanıtlar bulunmaktadır.⁵² Karbondioksitin mantarlar dahil birçok mikroorganizmanın gelişimini baskıladığı bilinmektedir, fakat bu etkiyi gösterdikleri konsantrasyonlar türler arasında belirgin şekilde farklıdır.^{53, 54} Aspergilluslar glikozu hem heksoz monofosfat hem de Embden-Meyerhof yolu ile katabolize edebilmektedirler. Ortamın aerobik olması heksoz monofosfat yolunun kullanımını tetiklerken anaerobik ortamın artması Embden-Meyerhof yolunun kullanımını tetiklemektedir.³⁰ Shih ve Marth (1972), düşük aerobik çevre şartlarında sitrik asit siklusu aracılığıyla AF ön maddesi olan asetat üretiminin artarak daha fazla AF üretimi sağlanacağını belirlemişlerdir.³⁰ Daha az aerobik ortamlarda gerçekleştirilen çalışmalarda heksoz monofosfat yoluyla NADPH üretiminin düştüğü, düşük NADPH/NADP oranının AF sentezini tetiklediği gözlenmiştir.⁵⁵

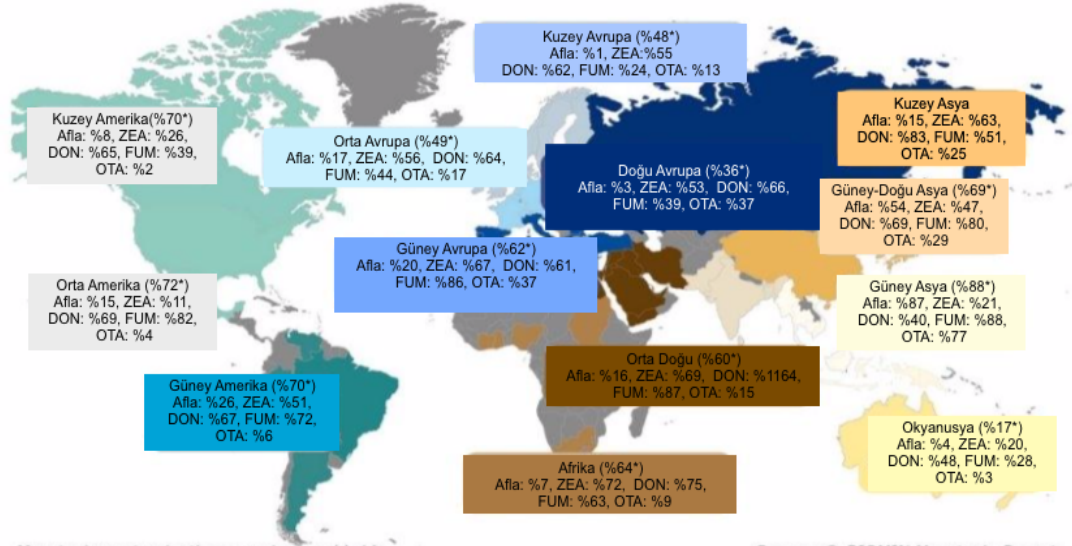
Düşük O_2 seviyelerinin ve %4-20 karbondioksit (CO_2) seviyesindeki ortamların birçok mantarın gelişimine uyarıcı bir etki gösterdiğine yönelik raporlar olduğu⁵⁶ gibi %40 CO_2 oranının birçok toksijenik küfün gelişimini inhibe ettiğine dair raporda bulunmaktadır.⁵⁷ Sabit sıcaklıkta, yüksek düzeyde CO_2 (%20-40) ve düşük nispi nem (%86) varlığında yerfistığında AF üretimi önlenmiştir.⁵⁸ Paralel olarak Lander ve ark. (1967) yaptıkları çalışmada ortamda CO_2 oranının %20 yapılmasının yerfistiklerinde AF üretimini belirgin şekilde düşürmekle birlikte küf gelişimi %80 oranında geriletliğini

gözlemişlerdir.⁵⁹ Giorni ve ark. (2008) CO₂ seviyelerinin %25 olduğu kültür ortamlarında veya mısır tanelerinin olduğu ortamlarda *A. flavus*'un AF üretimini düşürmediğini, üretimin her iki ortamda da inhibe edilebilmesi için en az %50 CO₂ konsantrasyonuna gereksinim olduğunu belirtmişlerdir.⁵⁴

2.4. Toksikjenik Küflerin Yayılışı

Dünya genelinde tahıllar, kabuklu yiyecekler ve meyveler tarla veya depolama koşullarında *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait mantar türleri tarafından enfekte olmakta ve sekonder metabolitler olarak mikotoksinler üremektedir.^{6, 26} İnsan, hayvan ve bitkiler için toksik olduğu düşünülen binlerce mikotoksin içerisinde tahılları yüksek oranda kontamine etme eğiliminde olanlar AFB₁, OTA, ZEA, DON, fumonisin ve patulin gibi mikotoksinlerdir.⁵

Farklı yağış rejimlerine, hasat şekline, taşıma işlemine, depolama koşullarına ve ürün işleme şekillerine bağlı olarak dünya genelinde ürünlerde mikotoksin oluşumu risk oranları farklılık göstermektedir (Resim 1). Dünya genelinde meydana gelen küresel ısınmadan dolayı bölgesel sıcaklıklarda oluşacak dalgalanmalar, bölgesel sera gazlarındaki artışlar ve yağış rejimlerinde ortaya çıkan farklılıklar mikotoksinlerin yayılımlarında değişikliklere neden olmaktadır.⁶⁰ Yaygın mikotoksinlerin oluşum risk oranlarının ülkemiz üzerinde bulunan coğrafik bölgelere göre belirlenmesi için yapılacak spesifik çalışmalar, bu bölgelerde uygulamaya konulabilecek koruma çalışmaları maliyetlerinin ve yaygın toksinlerden kaynaklı oluşabilecek yıllık kayıpların belirlenmesinde daha etkili olacaktır.



Şekil 2.1. Mikotoksin yayılım haritası. (*) Toplam risk oranı. **Afla:** Afler, **ZEA:** Zearalenon, **DON:** Deoxynivalenon, **FUM:** Fumonisin, **OTA:** Ochratoxin A.⁶¹

2.5. Mikotoksinlerin Olumsuz Etkileri

2.5.1. İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkiler

Diğer toksikozislerde olduğu gibi mikotoksikozis de akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır.⁶² Akut olarak toksine maruz kalma durumunda toksik cevap aniden ortaya çıkar ve semptomlar belirginleşir, bununla birlikte kronik durumlarda toksine düşük dozlarda uzun sürede maruz kalınır ve geri dönüşü olmayan etkilerin ve birtakım kanserlerin ortaya çıkmasına neden olur.⁶³ Mikotoksinlerle kontamine olan gıdalar veya yemleri tüketen insan ve hayvanlarda mikotoksinlerin etkileri türe, etki mekanizmasına, mikotoksin metabolizmasına ve konak savunma mekanizmasına göre değişiklik göstermektedir.⁶⁴ Hayvanlarda mikotoksinlerin türe veya bireye özel toksik etkilerini anlamak için mikotoksin metabolizmasını ve savunma mekanizmalarını anlamak önemlidir.⁶⁴ Yapılan *in vitro* çalışmalar rumen içerisindeki mikroorganizmaların mikotoksinleri yıkımladığını belirlemiştir.⁶⁵ Bu yüzden ruminantlar mikotoksinlerin zararlı etkilerine daha dirençlidirler.⁶⁶

Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) yaygın mikotoksinlerden AF, OTA, ZEA ve fumonisinleri karsinogenik potansiyelleri yönünden değerlendirerek gruplandırmaya gitmiştir. Bu gruplandırmaya göre AF insanlar için karsinogenik (grup 1), OTA ve fumonisini insanlar için muhtemel karsinogenik (grup 2B) ve ZEA' yı ise insanlar için karsinogenik olmayan (grup 3) olarak sınıflandırılmıştır.^{64, 67}

Modern değirmencilik uygulamalarının geliştirilmesinden ve uygulamaya konulmasından önce *Fusarium* türleri ile kontamine olmuş tahılların insanlarda mikotoksikozis salgınlarının oluşumuna neden olduğu ortaya konulmuştur. Bu durumla ilgili olarak 1932 ile 1947 arasında Rusya'da *F. sporitrichoides* ve *F. poae* ile kontamine olmuş tahılları tüketen insanlarda beslenmeye bağlı toksik aleukia (lökopeni) ortaya çıkmıştır.⁶² Semptomlar müköz membranların hiperemisi, oesophageal ağrı, larenjit, asfeksiyon, gastroenterit ve vertigo şeklinde sıralanmaktadır.⁶⁸

Protein/enerji dengesizliği yönünden beslenme bozukluğu ile karakterize olan Kwashiorkor sendromu ve karaciğer, böbrek büyümesi ve serebral ödemle sonuçlanan ensefalopati ve viseral organların zarar görmesi ile karakterize Rye sendromlarından mustarip olan çocukların dokularında AF'lerin tespit edilmesi bu hastalıklarda AF'lerin de katkısı olduğunu akla getirmiştir.⁶⁹ Çocukların AF'e maruz kalmaları kanlarında immunoglobulin A seviyelerinde düşüşle ilişkilendirilmiştir.⁷⁰

Hindistan'da insanlar tarafından, yüksek düzeyde fumonisinle kontamine olmuş mısır ve sorgumun tüketimi sonucunda mide gurultusu, karın ağrısı ve ishale karakterize olan gıda kaynaklı akut hastalık meydana gelmiştir.⁶¹ Çin'de fumonisinden kaynaklı oesophagus kanserleri rapor edilmiştir.⁷¹ Fumonisinler folat reseptörleri tarafından folik asit alımını inhibe ettikleri için fumonisinle kontamine mısırı tüketen kırsal kesimdeki insanlarda neural tüp defekt vakalarının arttığı bildirilmiştir.⁷²

Geçtiğimiz yıllarda yapılan vaka araştırmaları neticesinde, nemli ve küfün var olduğu binalarda yaşayan insanlarda küfler ve mikotoksinlerinin bağışıklığın baskılanması, bronşit, astım, solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmalarının yanı sıra⁷²⁻⁷⁸ sindirim sisteminde bulunan belirli organları etkileyerek hastalık meydana getirebildiği ortaya konulmuştur.⁷⁹

Mikotoksinlerin hayvanlar üzerinde verim kaybı, yemden yararlanmada düşüş, teratojenik, hepatotoksik, nefrotoksik, immunotoksik, kanserojenik ve genotoksik etkileri bulunmaktadır.⁸⁰⁻⁸³

Broylerler üzerine yapılan yüksek düzeyde AF karması ile besleme (%79 AFB₁, %16 AFG₁, %4 AFB₂ ve %1 AFG₂) çalışması sonucunda vücut ağırlıklarında düşüş, karaciğer ve böbrek ağırlıklarında artış belirlenmiştir.⁸² OTA ile kontamine gıdalarla beslenen broylerlerde (0.3-1 mg/kg yem) glikojenolizisin bozulmasıyla karaciğerde doza bağlı olarak glikojen birikimi gözlenmiştir.⁸³

Mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde ki olumsuz etkilerine ilave olarak zirai ürünler ve gıda maddelerinin tüketimine engel olmasından dolayı dünya genelinde yıllık bazda ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu bilinen bir gerçektir.^{84, 85}

Gıda ve Tarım Örgütü' ne ait veriler^{86, 87} her yıl tarımsal ürünlerin %25'inin (yaklaşık olarak 1 milyar ton gıda ve gıda ürünü) mikotoksinlerden etkilendiğini ortaya koymaktadır. Meydana gelen ekonomik kayıplar;

- 1) Toksik mantarların insan ve hayvanlarda tetiklediği hastalıklardan kaynaklı kayıplar,
- 2) Mikotoksin kontaminasyonu sonucu mahsullerde meydana gelen değer kayıpları,
- 3) Hayvanlarda mikotoksin kaynaklı sağlık problemlerinden ileri gelen verim kayıplarının neden olduğu maliyetler,

- 4) Mikotoksinlerin yem maddelerinden elimine edilmesi için gerekli olan maliyetler,
- 5) Ticari ürünlerde ülkelerin belirlemiş olduğu mikotoksin limitlerine göre ihracatın engellenmesinden kaynaklı olan maliyetler
- 6) Mikotoksin yönünden yasal limitlerin üstünde olan maddelerin ihracının engellenmesi ile tekrar iç pazarda bu ürünlerin tüketilmesinden kaynaklı maliyetler olarak sınıflandırılabilir.

Mikotoksinlere bağlı ekonomik kayıplar düşük gelirli ülkeler için daha trajik bir tabloyla karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, mikotoksinlerin eliminasyonu ve koruma çalışmaları için gerekli olan uygulamaların yetersiz olması veya bu uygulamaların maliyetlerinin bu ülkeler için fazla olmasından ileri gelmektedir. Düşük gelirli ülkelerde insanlar beslenme yetersizliklerine bağlı hastalıkların yanı sıra yaygın mikotoksinlerden olan AF'lere kronik olarak maruz kalabilmektedirler. Bu nedenle bu insanlarda aflatoksikozise bağlı ölümler, kanser ve diğer hastalıklarda görülebilmektedir.⁸⁸ Bunlara ilave olarak, düşük gelirli ülkelerde altyapının yetersiz olmasından ileri gelen Hepatit B virüsünün (HBV) prevalansı yaygındır, AF'lerin HBV ile sinerjik etki göstererek karaciğer kanseri (hepatosellüler karsinoma) riskini arttırdığı ortaya konulmuştur.⁸⁹ Ayrıca, düşük gelirli ülkeler, kendi topraklarında üretilen iyi kalitedeki (mikotoksin seviyelerinin yasal limitlerde veya daha altında olduğu) gıda maddelerini ihraç ederler, bu durum ülke ekonomisine bir katkı oluştururken düşük kalitedeki gıda maddelerinin iç pazarda tüketime sunulması⁹⁰ mikotoksikozislerden ileri gelen halk sağlığı ve hayvan sağlığı problemlerine bağlı büyük ekonomik kayıpların oluşmasına neden olmaktadır. Son olarak, ihraç edilmek istenilen ürünlerin diğer ülkeler tarafından reddedilmesi milyonlarca dolarlık kayıpların oluşmasıyla sonuçlanmaktadır.⁹¹

2.6. Yaygın Mikotoksinler

2.6.1. Aflatoksin

Aflatoksinler (AF) ilk olarak 1960 yılında, İngiltere’de binlerce hindi palazının ölümü ile sonuçlanan “Hindi-X-hastalığı” olarak isimlendirilen hastalık üzerine yapılan araştırmalar sonrasında belirlenmiştir.³ *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* gibi *Aspergillus* türüne ait cinsler tarafından üretilmektedir.⁹²

Aflatoksinler bilinen mikotoksinler arasındaki en toksik ve kanserojenik olan poliketitlerden türetilen furanokumarinlerdir.⁹³ AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ olmak üzere dört ana grup bulunmaktadır.⁹⁴ AF ailesinin diğer önemli üyeleri olan AFM₁ ve AFM₂ sırasıyla, AFB₁ ve AFB₂’nin bazı hayvanların sindirim sisteminde geçirmiş olduğu hidroksilasyon sonrasında meydana gelen ve süt, idrar ve dışkılarından izole edilebilen formlarıdır.^{95, 96} Her ne kadar AFM₁ ve AFM₂ süt ile ilişkilendirilmiş olsalar da aflatoksijenik mantarlar bu iki bileşiği de üretebilmektedir.⁹⁷ AFB₁ ve AFB₂ siklopentan ile birleşmiş bir difuranokumarosiklopentenon yapısındayken, AFG₁ ve AFG₂ laktonla birleşmiş difuranokumarolakton yapısındadırlar.⁹⁴

Aflatoksinlerin mantarlar tarafından sentezlenmesi için gerekli olan ana maddeler poliketitler olan asetat ve malonatlardır.⁹⁸ İzotop işaretleme ile yapılan çalışmalarda AFB₁’in asetat tarafından üretildiği belirlenmiştir.⁹⁹ AFB₁ yapısında bulunan metoksi grubu metiyoninden türetilmiştir.¹⁰⁰

AF’ler yoğun olarak sıcak ve nemli iklimlerde yetişen mısır, yer fıstığı ve pamuk tohumunda bulunurlar. AF’ler etkilenen bitkilerde klorofil sentezini baskılayarak albinizm meydana getirirler.¹⁰¹ Yaklaşık olarak 18 AF kimyasal olarak karakterize edilmiştir.⁵ Ultraviyole (UV) ışık altında AFB₁ ve AFB₂ mavi renk, AFG₁ ve AFG₂ yeşil, AFM₁ ise mavi-mor renk verir.¹⁵

AF'ler polar olmayan solüsyonlarda çözünmezken, su içerisinde hafif (10-20 µg/mL) hafif çözünebilir. Polar organik solüsyonlar (kloroform, metanol gibi) içerisinde özellikle dimetil sülfoksitte rahat bir şekilde çözünür.¹⁰² Oksijen varlığında UV ışığında, uç pH'larda (<3 veya >10), okside edici ajanların varlığında kararsız yapıdadır.¹⁰³ Ammonizasyon ile AF'lerin lakton halkaları açılır ve dekarboksilasyon şekillenir bu reaksiyon geri dönüşümsüzdür.¹⁰⁴

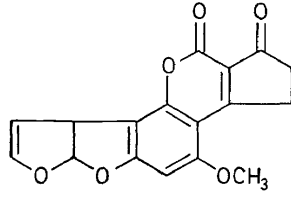
AFB₁ en güçlü AF'dir ve bu kimyasal form gıdalarda ve gıda maddelerinde yaygın olarak bulunur.⁵ Yumurtadan yeni çıkmış ördek yavruları baz alınarak yapılan toksikasyon denemelerinde AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ için LD₅₀ dozları sırasıyla 0.37 mg/kg, 1.69 mg/kg, 0.79 mg/kg ve 2.5 mg/kg olarak belirlenmiştir.¹⁰⁵ Genç hayvanlar aflatoksinleri yaşlı hayvanlardan daha etkili bir şekilde absorbe ederler.¹⁰⁶ Gebe ve büyümekte olan hayvanlar genç hayvanlardan daha az duyarlıdır fakat yetişkinlerden daha duyarlıdır.¹⁰⁷

AF'ler gastrointestinal sistemden etkili bir şekilde emilerek bağırsaklardan hepatik portal kan dolaşımına transfer edilirler.¹⁰⁸ Çok az miktarda AF lenfatik dolaşım içerisinde taşınır halde görülebilir.¹⁰⁹ Cook ve ark. (1986) yaptıkları bir çalışmada sığırlara pirinç kültüründe AF'i oral yolla tek doz olarak (%42 AFB₁ ve %27 AFB₂) vermiş ve yüklemenden 30 dakika sonra AFB₁ ve AFM₁'i venöz kanda ve dozlamadan sonraki 4-8 saat sonra ise maksimal düzeye ulaştığını tespit etmişlerdir.¹¹⁰ AFM₁, AFB₁'den önce maksimal seviyeye ulaşmıştır ve AFB₁'in kandaki maksimal seviyesi AFM₁'den genellikle daha yüksektir. Bu bulgular aflatoksinlerin rumenden hızlı bir şekilde emildiğini düşündürmektedir.

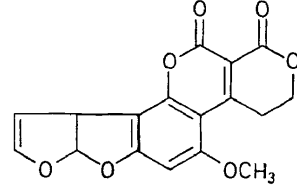
AF'ler redüksiyon, hidratasyon, epoksidasyon, hidroksilasyon ve ortodemetilasyon olmak üzere temelde dört mekanizma ile metabolize olmaktadır.⁹² AFB₁ karaciğerde NADPH' a bağlı sitoplazmik enzim aracılığıyla redüksiyona uğrayarak aflatoksikole

dönüşmektedir.⁹³ Aflatoksikol oluşumu geri dönüşümlü bir reaksiyondur ve hücre içi boşluktaki dehidrojenaz enzimi ile tekrar AFB₁' e dönüşebilmektedir.⁹² Aflatoksikol AFM₁' e metabolize olabilmektedir.¹¹¹

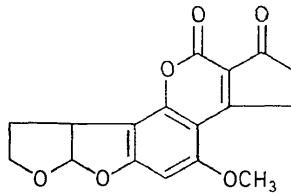
Difurokumarosiklopentenon Difurakumarolakton



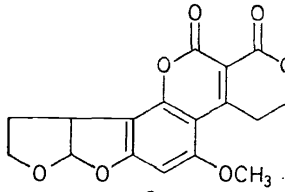
AFB1



AFG1



AFB2



AFG2

Şekil 2.2. AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ kimyasal yapıları.⁹³

Hidratasyon reaksiyonu sonrasında AFB_{2a} meydana gelmektedir bu metabolit, karaciğer ve diğer dokularda protein sentezinin azalmasına neden olacak enzimleri inhibe etmektedir.¹¹²

Difuran parçasının 2,3 noktasında çift bağ içeren versikolorin A AFB₁'in üretim yolundaki ilk moleküldür bu yapıdaki çift bağ, AFB₁'in yüksek reaktif epoksidinin oluşturulması için sitokrom P450 tarafından aktive edilerek AFB₁'in mutajenik etkisinden sorumlu AFB₁-8,9-epoksida dönüştürülür.⁹³ AFB₂' de bu çift bağ bulunmadığı için AFB₁'den binlerce kat daha az karsinojeniktir.¹¹³ Bu metabolitin hücre içerisindeki DNA, RNA ve proteinlere bağlanma afinitesi vardır.¹¹⁴ AFB₁ DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ederek immun baskılayıcı, hormonal ve teratojenik etkiler meydana

getirir. AFB₁'in insanlarda karsinojenik etkiye sahip olduğu iyi bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü hepatosellüler karsinoma veya karaciğer kanserinin dünya genelindeki kanser kaynaklı ölümlere neden olan üçüncü hastalık olduğunu rapor etmiştir. Aflatoksikozisin hepatosellüler karsinomanın gelişmesine karıştığı gösterilmiştir.¹¹⁵

AF'lerin ruminantlarda immunotoksik oldukları gösterilmiştir. Kuzulara 2 ppm AF (%83,4 AFB₁, %12,3 AFB₂, AFG₁ ve AFG₂) 37 gün boyunca verildiğinde serum γ -globulin seviyesini arttırdığı, serumda bakteriyostatik etkiyi azalttığı ve hücresel bağışıklığı düşürdüğü gözlemlenmiştir.¹¹⁶ Kanatlılarda yapılan çalışmalarda AF'lerin immunotoksik etkileri, lenfositopeni, düşük T hücre sayısı ve hastalıklara karşı doğal bağışıklığın düştüğü gösterilmiştir.¹¹⁷ Sur ve Çelik (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, inkübasyonun 7. gününde yumurtalara 10 μ g AFB₁ enjekte edilmesinden sonra civcivlerin *Bursa fabricius* gelişiminde azalma olduğu gösterilmiştir.¹¹⁸ Ortatatl ve ark. (2002) yapmış oldukları bir çalışmada *A. parasiticus* kullanarak buğdayda ürettikleri AF'i 8 hafta süre ile 0, 2.5, 10 ve 20 ppm düzeyinde yetişkin horozlara vererek horozlarda testiküler dejenerasyon ve plazma testosteron seviyesinde düşüş tanımlamışlardır.¹¹⁹ Ayrıca aflatoksinle muamele edilen gruplarda anormal spermatozoa gözlemlemişlerdir. Pirinç kültüründe *A. parasiticus* kullanılarak üretilen AF'lerin 0, 5 ve 10 μ g dozunda 4 hafta boyunca broiler tavuklarına verilmiştir. AF alımı verimini 3 ve 4. haftalarda belirgin bir şekilde yumurta düşürmüştür.¹²⁰

Akut aflatoksikozisin memelilerdeki başlıca semptomları iştahsızlık, letarji, ataksi, kaba tüy yapısı ve solgun büyümüş yağlı karaciğerdir. Kronik olarak AF'e maruz kalmış hayvanlarda yem etkinliğinin ve süt üretiminin düşmesi, sarılık ve iştahın azalması gibi semptomlar görülür.¹²¹ Aynı zamanda AF'ler hastalıklara karşı direnci azaltır ve aşılama ya bağlı bağışıklığın oluşmasına müdahale ederek aşılamanın etkisini azaltır.¹²² AF selüloz sindirimini, uçucu yağ asit oluşumunu, proteolizisi ve motiliteyi azaltarak

ruminal fonksiyonları değiştirir.¹²³ Laktasyondaki sütün ineklerin saha şartlarında 120 ppb AF tüketmesi durumunda reproduktif etkinliğin düştüğü, hayvanların AF'den ari rasyonla beslenmesi durumunda ise süt üretiminin %25 arttığı gözlemlenmiştir.¹²⁴ Bir başka çalışmada 120 ppb düzeyinde AF'e kronik olarak maruz kalan süt ineği sürüsünde küçük hayvan doğumu, sağlıksız buzağılar, ishal, akut mastitis, solunum bozuklukları, prolapsu recti, tüy kaybı ve yem tüketiminin düşmesi gibi ciddi problemler gözlenmiştir.¹²⁵

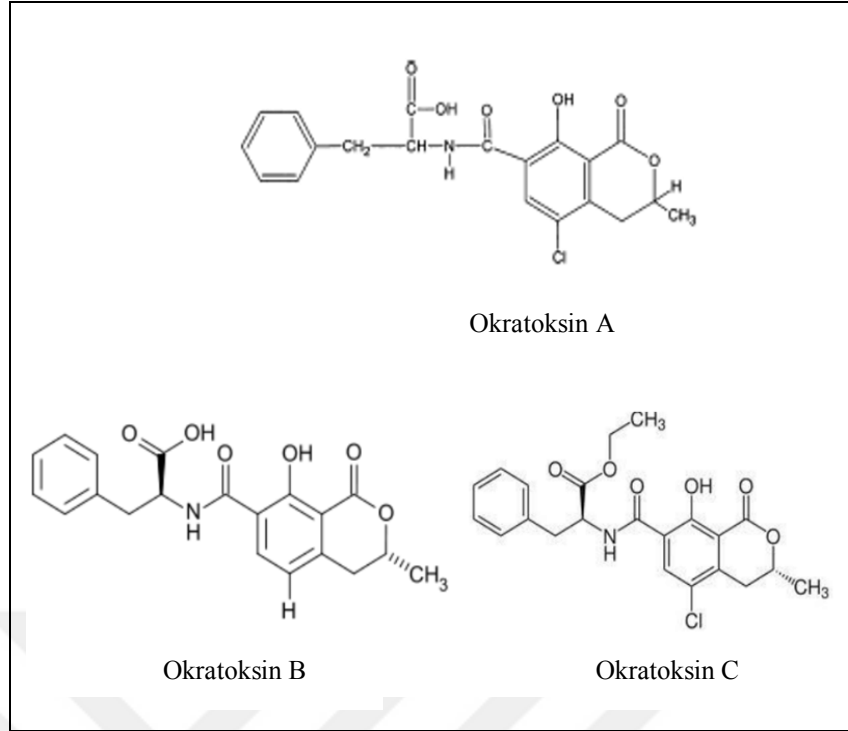
2.6.2. Okratoksin

Okratoksinler (Okratoksin A, OTA; Okratoksin B, OTB; ve Okratoksin C, OTC) *A. ochraceus* ve *P. verrucosum* tarafından üretilen¹²⁶, 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-4,4-dihidro-3R-metillisokumarin (Okratoksin α, OTAα) yapısının L-β-fenilalanine peptit bağı ile bağlanmış, lakton halkası bulunduran kimyasal bir yapıya sahip olan beyaz kokusuz kristal katı yapıdadırlar.¹²⁷

Asit ve alkalın solüsyonlarda açık veya kapalı lakton halkası yapısından dolayı sırasıyla yeşil ve mavi renk veren L-fenilalaninle bağlantılı, para-klorofenolik parça içeren dihidroizokumarin grubu bulunan kimyasal yapıya sahip metabolitlerdir.¹²⁸ Klor (Cl) içermeyen derivatı OTA B'dir, etil ester derivatı ise OTA C dir.¹⁵ OTA mısır, arpa, buğday, yulaf ve çavdar gibi tahıllarda bulunabilir.²¹

Polar organik solüsyonlarda (kloroform, etanol ve metanol) orta düzeyde çözünür. Normal pişirme şartlarında kısmen parçalanır.¹²⁹ OTA'daki lakton halkaları alkali ortamlarda açılır fakat reaksiyon geri dönüşümlüdür. Okratoksin solüsyonları aşırı sodyum hipoklorit muamelesiyle tamamen bozular.¹²⁹

Aspergillus türlerinin OTA'yı yüksek sıcaklık ve nemli şartlarda ürettiği görülürken *Penicillium* 5 °C gibi bir sıcaklıkta üretebilir. OTA'nın aksine OTB ve OTC oluşumu nadirdir.¹³⁰ Sıcaklığın azalması durumunda bağıl neme olan ihtiyaç artar.¹⁵



Şekil 2.3. OT'lerin kimyasal yapıları¹³⁰

Okratoksin A'nın bütün metabolitleri ana bileşikten daha az toksiktir. Toksik sıralama OTA> OTB> OTC şeklindedir.¹³⁰ OTA, test edilen bütün hayvanlarda nefrotoksik, immun baskılayıcı, karsinojenik ve teratojenik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.¹³¹ OTA yarılanma ömrü uzun olduğu için besin zincirinde birikebilir.

Yağda çözünen, iyonize olmamış ve asidik özelliklerinden ($pK_a=7.1$) dolayı OTA birçok türde mideden emilir.¹³² Gastrointestinal bölümleri birbirine bağlanmış olan laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda maksimal emilimin proximal jejunumdan olmasıyla birlikte emilimin gerçekleştiği bölgenin ince bağırsaklar olduğu bulunmuştur.^{133, 134} OTA'nın tam emilim oranları domuzlarda %66, ratlarda %56, tavşanlarda %56 ve tavuklarda %40 olarak belirlenmiştir.¹³⁵ Kana ulaştığında, OTA, serum albumine ve diğer makromoleküllere kolayca bağlanır.^{136, 137}

OTA emildiğinde, toksinin ve metabolitlerinin dokulardaki konsantrasyonu beslenme uzunluğuna, doza, OTA'nın doğal veya kristal halinde oluşuna, alınma yoluna, seruma

bağlanma derecesine, OTA'nın yarılanma ömrüne ve kesimden önce OTA'dan ari rasyonlarla beslenme süresine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu faktörler, rezidülerin hayvan dokularında doğal olarak birikmesinin değerlendirilmesinde önemlidir.¹³⁸

Domuzlarda OTA'nın kandan temizlenme oranı böbrek, karaciğer ve diğer dokulardakinden düşüktür.¹³⁹ Laktasyon dönemindeki ratlarda oral olarak 250 µg/kg vücut ağırlığında tek doz verildiğinde toksini sütle attıkları gösterilmiştir.¹⁴⁰

OTA hayvanlar tarafından sindirildikten sonra böbrek, karaciğer ve bağırsaklarda metabolize edilerek birçok farklı ürüne dönüştürülür.¹⁴¹ OTA metabolizması hidroliz, hidroksilasyon, lakton halkasının açılması ve konjugasyon olmak üzere dört temel yolla olmaktadır.¹⁴² OTA, vücudun farklı bölgelerinde toksik olmayan OTα şekline hidrolize edilir. Ratlarda OTα'ya hidrolize olma sekumda yerleşmiş olan bakteriyel mikrofloranın fonksiyonudur.¹⁴² Rumen içeriği ile inkübasyon yapılması sonucunda OTA'nın OTα'ya hidrolizinde ruminant protozoalarının ve bakterilerinin etkili olduğu gösterilmiştir.¹⁴¹ *In vivo* olarak yapılan benzer reaksiyon hız çalışmasında rumen mikroorganizmalarının 12 mg/kg yemi hidrolize edebildikleri gösterilmiştir.¹⁴³ OTA rumen mikroorganizmaları tarafından hidrolize edildiklerinde ortamda OTα ve fenilalanin belirlenmiştir.¹⁴⁴ Bu durum ruminantların yemdeki OTA'ya karşı nispeten dirençli olduğunu düşündürmektedir. Koyunlar, kana ulaşmadan önce iyi bir OTA detoksifiye etme kapasitesine sahiptirler.¹⁴⁵ Ayrıca, samanla beslenmiş koyunların OTA'yı hidrolize ederek OTα'ya dönüştürmesinin tane yemle beslenmiş koyunlarınkinden 2-5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum ruminantların beslenme şeklinin OTA transformasyonunda etkili olduğunu göstermektedir.¹⁴¹

OTA antikor cevabını baskılar, bağışıklık hücrelerinin fonksiyonunu ve sayılarını azaltır ve sitokin üretimini hafifletir.¹⁴⁶ OTA'nın immunotoksik aktivitesi, bağışıklık hücrelerinin nekrotik ve apoptotik ölümü yanı sıra zarar gören hücrelerin yenilerinin

gelmesinin yavaşlamasının da bir sonucudur.¹⁴⁷ Tavuklarda, 2-4 mg/kg düzeyinde OTA içeren diyetle 20 günlük besleme sonrasında immun organlardaki lenfoid hücre popülasyonunda azalma gözlenmiştir.¹⁴⁸ Bir diğer çalışmada, tavuklar 5 mg/kg OTA içeren rasyonla 56 gün beslenmiş ve plazmada *alfa1*-, *alfa2*-, *beta*- ve *gama*- globülin içeriğinde düşüş olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁹

OTA'nın fare, rat ve domuz gibi memeli türlerinde plasental geçişi oldukça iyi bilinmektedir. Buna karşılık ruminantlarda plasental geçiş oldukça azdır. OTA ile kotamine olmuş yemle beslenen domuzların yavrularında OTA seviyeleri 0.075-0.12 ng/mL olarak belirlenmiştir.¹⁵⁰ Bir çalışmada, 1 mg/kg vücut ağırlığında intravenöz olarak koyunlara OTA verilmiş ve amniyotik sıvıda ölçülebilir düzey belirlenemezken yavru dokularında maternal dokulardan 400-1000 kat daha düşük miktarlar belirlenmiştir.¹⁵¹

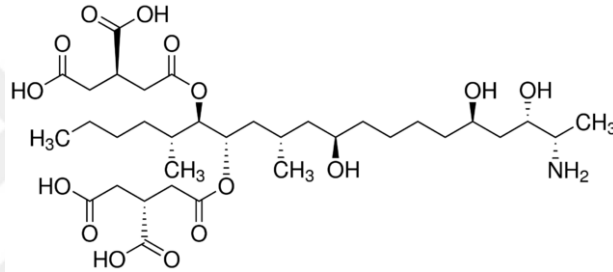
Protein sentezinin engellenmesi spesifik ve post-transkripsiyonel aşamadan sonra meydana gelir. OTA'nın protein sentezinde translasyon basamağına direkt etkisi vardır. Fenilalanin-tRNAPhe sentetaz inhibisyonu rekabete dayanır, bu nedenle amino-açılasyon ve peptid uzaması durur. Bu reaksiyon bütün canlı organizmalar için temeldir.¹⁵² Ayrıca OTA, endoplazmik retikulum membranında lipid peroksidasyon yoluyla hepatik mikrozomal Ca dengesini bozmaktadır.¹⁵³

Yüksek dozlarda OTA, böbrek ağırlığının, idrar volümünün, kan üre nitrojenin, glukozuri ve proteinürinin artması şeklinde belirtildiği gibi böbrek fonksiyonu ve morfolojisinin her ikisini birden etkiler. Son iki bulgu reabsorbsiyon bölgesinin hasara uğradığını gösterir. OTA spesifik olarak proximal kıvrımın fırçamsı kenarı ve bazolateral membranlarda yerleşmiş olan organik anyon transportunda bozulmaya neden olur.¹³⁰ OTA tavuklarda böbrek ödemi ve renal tubüler nekroza neden olur.¹⁵⁴ Domuzlardaki böbrek lezyonları proximal tubül dejenerasyonu ve intersitisyel fibrozis ve mononükleer

hücrelerin infiltrasyonunun olduğu böbrek atrofisini içermektedir. Akut vakalarda böbrek çevresinde ödem oluşabilir.¹⁵⁵

2.6.3. Fumonisin

Fumonisinler (FB₁ ve FB₂) *Fusarium verticillioides* tarafından üretilen, beyaz higroskopik toz şeklinde, metanolde çözülebilen toksik metabolittir. FB₁ 1,2,3-trikarboksilik asit ve 2-amino-12,16-dimetil 13,5,10,14,15-pentahidroksieikozonun diesteridir.¹⁵⁶



Şekil 2.4. FB₁ kimyasal yapısı.¹⁵⁶

Fumonisinin yapısal olarak spingozine ile bağlantılıdır. Sfingolipid biyosentezin anahtar enzimi olan sfinganin N-açiltransferazın potansiyel bir inhibitörüdür.¹⁵⁷ Bu enzimin fumonisin tarafından inhibisyonu hayvanların serum ve dokularında kompleks sfingolipitlerin azalmasıyla birlikte sfinganin ve sfingozinde artışla sonuçlanan sfingolipit metabolizmasını bozar. Sfingolipitlerin metabolizmasındaki bu bozulma fumonisin toksikasyonunun muhtemel mekanizmasıdır.¹⁵⁷

Domuzların fumonisin tüketmesiyle birlikte sfingozin konsantrasyonu artar ve miyokardial kalsiyum kanalları bloke olur ve kalp kontraktilesi düşer.¹⁵⁸ Domuz pulmaner ödemi, plazma ve miyokardiyal sfinganin ve sfingozin konsantrasyonlarının artmasıyla ilişkili olan sol kalp yetmezliğinin direkt sonucu olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁹ Domuzlarda yüksek dozda fumonisine maruz kaldıktan sonra pulmoner ödem

şekillendirmeden hayatta kalanlar iştahsızlık, ağırlık kaybı ve genel sarılık gibi tipik karaciğer hastalığı belirtilerini gösterir.¹⁶⁰

Atlardaki equine leukoencephalomalciada aynı zamanda fumonisin tetiklediği sfingozin konsantrasyonunun artmasının direkt sonucu olabilir. Yapılan bir çalışmada, fumonisin verilen atlarda kardiyovasküler bozukluğun tetiklendiği gösterilmiştir.¹⁶¹ Ayrıca fumonisin verilen atların serebrospinal sıvı içerisinde artmış protein, albümin ve IgG seviyeleri gözlenmiştir.¹⁶² Bunun yanı sıra atların nekropsilerinde serebral ödemin histolojik kanıtları görülmüştür, bu durum fumonisinin kan beyin bariyerinin geçirgenliğini arttırarak vazojenik ödemin gelişmesine neden olduğunu akla getirmektedir. FB₁ içirilen tavşanlarda fūmonisinin tetiklediği beyin lezyonları ve hemorajiler olduğu belirtilmesine rağmen bu ölümcül hastalık sadece atlarda meydana gelir.¹⁶³ Yeni doğan ratlarda FB₁'in kan-beyin bariyerini geçerek beyin sfingolipit metabolizmasını bozduğuna dair kanıtlar vardır.¹⁶⁴

Fumonisin toksikasyonunda kanatlılarda görülen klinik özellikler sıklıkla ishal, ağırlık kaybı, karaciğer ağırlığında artış ve zayıf performansı içermektedir. *Fusarium* farklı izolatları ile kültüre edilmiş mısırla beslenen tavuklarda immun baskılanma gözlenmiştir.¹⁶⁵ Saflaştırılmış FB₁ ve *F. proliferatum* kültür ekstraktı kuluçkadaki yumurtalara inoküle edildiğinde embriyotoksik etkili olduğu gösterilmiştir.¹⁶⁶

2.6.4. Zearalenon

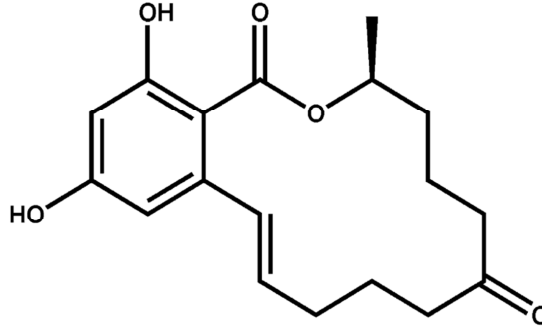
Zearalenon (ZEA) *Fusarium* türleri özellikle *F. graminearum* tarafından üretilen rezorsilik asit lakton yapıya sahip, beyaz kristal yapıdaki stereodial olmayan östrojenik metabolittir. 120 °C'ye ısıtıldığında bozulmadan, 150 °C'de 60 dakika ısıtıldığında %29 bozulma ve 200 °C'de 60 dakika ısıtıldığında %69 bozulma gözlenmiştir.¹⁶⁷ Nötral veya asit tamponlu solüsyonlarda hidrolize dirençlidir.¹²⁹ Zearalenon pH 7'de stabil değildir ve 175 °C üzerinde büyük kayıplar oluşur.¹⁶⁸ ZEA, buğday, arpa, mısır, mısır silajı, pirinç,

sorgum ve bazen kaba yemde üreyebilmektedir. Nem içeriği ve oksijen varlığı ZEA üremesi için uygun ortamlardır. *Fusarium* laboratuvar şartlarında %20 üzerinde nem ve 20-25 °C sıcaklıkta 3 haftalık bir periyotta üreyebilmektedir.²²

ZEA oral yolla maruz kalmayı takiben oldukça hızlı bir şekilde absorbe edilir.¹⁶⁹ ZEA verilmesinden sonra reproduktif dokuda (ovaryum ve uterus), adipoz dokuda ve testislerin intersitisyel hücrelerinde lokalize olabilir.¹⁷⁰ Domuzlarda oral yolla verildikten sonra biyolojik yarılanma ömrü 86 saat olarak belirlenmiştir.¹⁷¹ Yüksek dozlarda ZEA verildiğinde koyun, inek ve domuzlar ZEA, α - ve β -zearelenol (α - ve β -ZOL) şeklinde süte geçirdikleri tespit edilmiştir.¹⁷²

Rat, fare, domuz, inek ve tavşan hepatosit kültürlerinde NADH veya NADPH ile birlikte pH 4.5'te ve NADH ile birlikte pH 7.4'te baskın metabolitni α - ZOL olduğu, bununla birlikte pH 7.4'te NADPH ile birlikte en baskın metabolitinin β -ZOL olduğu gösterilmiştir.¹⁷³ Ayrıca, türler arasında ZEA'nın hepatik biyotransformasyonunda farklılıklar olduğu rapor edilmiştir.¹⁷⁴ Bu çalışmaya göre domuzlar baskın olarak ZEA'yı α - ZOL'e, sığırlar β -ZOL'e ve koyunlarda ise post-mitokondrial fraksiyon ağırlıklı olarak α - ZOL'e çevirdikleri tespit edilmiştir. ZEA'nın, α - ZOL'e hidroksilasyonu aktivasyon işlemi gibi görülürken, β -ZOL üretimi daha çok etkisizleştirme işlemi olarak görülmektedir.¹⁷⁴

ZEA ve metabolitleri 17 β -östradiolün bağlandığı sitoplazmik reseptörle direkt olarak etkileşimdedir ve reseptör bölgelerinin çekirdekte yerini değiştirir.¹⁷⁵ Resorsiklik asitler içerisinde α -ZOL, β -ZOL'den ve ZEA'dan daha güçlü bağlanma özelliğine sahiptir.¹⁶⁷



Şekil 2.5. ZEA'nın kimyasal yapısı.¹⁶⁸

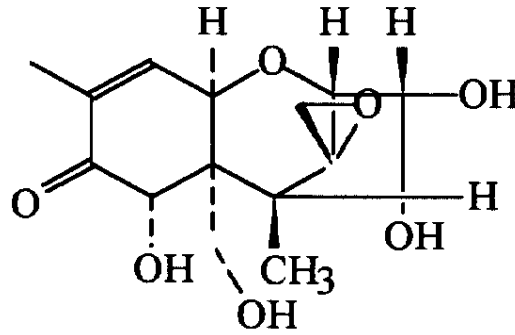
ZEA birçok türde düşük akut toksisiteye sahiptir. Prepubertal domuzlar ZEA'ya karşı en fazla hassasiyete sahiptirler, ruminantlarda bazı olumsuz etkiler gösterebilir ve kanatlılar en az hassasiyete sahip türler olarak görülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda (1-30 ppm), ovulasyon, gebelik, implantasyon ve yavru gelişimine olumsuz etkisi vardır.¹⁷⁶ Gebe domuzlarda abort, ölü doğum oranında artma, yavru sayısında ve yavruların hayatta kalma oranında azalma görülebilir. Sütten kesilme süresini uzatarak servis aralığının artmasına neden olabilir.¹⁷⁷ Düvelerde 250 mg ZEA jelatin kapsülle verildiğinde gebelik oranının %25 düştüğü görülmüş, bunun dışında belirgin bir etki gözlemlenmemiştir.¹⁷⁸ Düvelerde vajinit, vajinal akıntı, zayıf üreme performansı ve meme bezinde genişleme şeklinde semptomlar bulunmaktadır. ZEA'nın (660 ppb) ve DON (440 ppb)'un rasyonla birlikte verildiği bir çalışmada hayvanlarda yem tüketiminde düşme, süt üretiminin baskılanması, ishal, reproduktif sistemin enfeksiyonlarında artış ve total üreme kayıpları gözlemlenmiştir.¹⁷⁹ Koçlar 12 mg/kg ZEA içeren rasyon ile sekiz hafta kadar bir süre ile beslendiklerinde semen miktarında, konsantrasyonunda, sperm motilite ve morfolojisinde olumsuz etkiler gözlenmiştir. Denemeden sonra altı hafta boyunca normal yemle beslendiklerinde bu etkiler kaybolmuştur.¹⁸⁰

2.6.5. Deoksinivalenol

Beyaz, iğnemi yapıda, kloroform, etanol, metanol ve etil asetat içerisinde

çözülebilir, ısıya karşı duyarlı, *Fusarium culmorum* ve *F. graminearum* ve diğer ilişkili olan türler tarafından üretilen bir mikotoksindir. Düşük sıcaklık ve yüksek nem varlığında *Fusarium* türleri tarafından toksin üretimi artar. Ortam pH'sının 4.0 olduğu durumlarda deoksinivalenol oldukça sabit görünür, 100 °C veya 120 °C'de herhangi bir yıkımlanma gözlenmez 170 °C kısmi bir yıkımlanma belirlenmiştir. Ortam pH'sının 7.0 olduğu durumlarda 170 °C'de 15 dakika gibi bir sürede daha fazla yıkımlanma göstermiştir, pH 10'da 170 °C'de tamamen yıkımlanma tespit edilmiştir.¹⁸¹ Tetrasiklik 12,13-epoksi-trikotesen iskeletine sahip sesquiterpendir ve C-7'de hidroksil grup C-8'de keto grup bulunur.¹⁸²

Deoksinivalenol (DON) ve ZEA'yı üretebilen aynı *Fusarium* türü ZEA üretmek için yüksek oksijene ihtiyaç duyarken, DON üretmek için düşük oksijene ihtiyaç duyar.¹⁸³ Bu durum aynı yem bitkisinde, oksijen durumuna göre DON ve ZEA üretiminin aynı anda olabileceğini akla getirir.



Şekil 2.6. DON'un kimyasal yapısı.¹⁸¹

DON ökaryotik hücreler üzerinde, protein sentezi, RNA ve DNA sentezinin baskılanması, membran yapısını ve mitokondri fonksiyonunu bozma, lipid peroksidasyonunun stimülasyonu, apoptozis veya programlı hücre ölümünün

tetiklenmesi ve sitokinlerin aktive edilmesi gibi çeşitli etkilere sahiptir.¹⁸⁴

DON, domuzlarda ishal, üreme yetersizlikleri, ölüm gibi etkilerin yanı sıra kusturma etkisine sahiptir ve bu yüzden vomitoksin olarak adlandırılmıştır. Bu semptomla bağlı olarak hayvanlarda yemi reddetme ortaya çıkar. Bu durumun mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Genç domuzlarda yapılan bir çalışmada, 0.25 mg DON/ kg vücut ağırlığı dozunda intravenöz olarak verilmiş, uygulamadan 8 saat sonra kontrol grubuna kıyasla hipotalamus, frontal korteks ve cerebellumda norepinefrin seviyesinde düşme, dopamin seviyesinde belirgin bir artma tespit edilmiştir. Serotonin ve 5-hidroksitriptamin seviyeleri uygulamadan bir saat sonra hipotalamusta artmaya başlamış ve uygulamadan sonraki 8 saatte hipotalmus ve frontal kortekste belirgin bir şekilde düşüş göstermiştir.¹⁸⁵ Bu verilere bağlı olarak, meydana gelen değişikliklerin kimyasal olarak tetiklenen anoreksi ile ilişkisinin olmayacağını fakat kusma gibi diğer toksikolojik yanıtlara neden olabileceğini sonucuna varılmaktadır.¹⁸⁵

DON'un sığırlar üzerine etkileri belirlenmemiştir, fakat klinik verilere bakıldığında sütçü sürülerde DON kontaminasyonu ile yemden yararlanmada düşme ve performans kaybı arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir.¹⁸⁶

DON ile muamele edilmiş farelerin fetüsleri üzerinde yapılan bir çalışmada, DON'a maruz kalmanın yanlış hizalanmış veya kaynaşmış sternebra ve vertebra, ayrık veya kaynaşık kaburgalar ve polidaktili, yarım vertebra, kısa parmaklar ve kuyruk anomalileri gibi iskelet hasarlarına neden olduğu gösterilmiştir.¹⁸⁷ İlk laktasyondaki 18 sığır üzerine yapılan bir çalışmada sığırlar laktasyon ortasında DON ile kontamine rasyon (2.6-6.5 ppm) tüketen sığırların daha az süt ürettikleri gösterilmiştir.¹⁸⁸

Kanatlılar DON'un olumsuz etkilerine domuzlar kadar duyarlı olmasalar da ruminantlardan daha fazla duyarlılık göstermektedir. Günlük tavuklara 7 gün boyunca 9-18 mg DON/kg yem ile beslendiğinde karaciğerlerinde ağırlık kaybı gözlenmiş fakat

buna rağmen yem alımında değişme olmamıştır.¹⁸⁹

2.7. Mikotoksinlerin Belirlenme Yöntemleri

2.7.1. Geleneksel Metotlar

İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography; TLC), mikotoksinlerin belirlenmesi için kullanılan geleneksel metotlardan birisidir. Bu tekniğin çok sayıda örneğin taranması, mikotoksinlerin kolay belirlenmesi ve uygun maliyetli olması gibi özellikleri vardır.¹⁹⁰ UV ışık altında TLC tabakasında veya mikotoksinlerin florasan özelliğini arttıran kimyasalların püskürtülmesi ile mikotoksinler görülür.¹⁹¹ AFB ve AFG sırasıyla mavi ve yeşil renkte belirlenirken, sitrinin sarı renk verir.¹⁹¹

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (High-Performance Liquid Chromatography; HPLC), mikotoksinlerin belirlenmesinde daha yüksek doğruluk ve hassasiyet sağlar. Normal ve ters-faz HPLC değişik belirleme sistemleriyle kullanılır. En yaygın olarak UV ve florasan dedektörleri kullanılır.¹⁹² Florasan dedektörü ile birlikte HPLC pirinç içerisindeki AFB₁, sitrinin ve OTA belirlenmiştir, bu mikotoksinler için belirlenme limitleri sırasıyla 0.07, 0.11 ve 0.08 µg/kg olarak rapor edilmiştir.¹⁹³

Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry; LC-MS) mikotoksinlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için seçici ve hassas bir metottur.

Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography; GC) metodu özellikle gıda örneklerindeki trikotesenleri belirlemek için kullanılır.¹⁹²

ELISA birçok gıda maddesinde AF ve fumonisini belirlemek için kullanılmıştır. Bu yöntem direkt ya da indirekt rekabete dayanan tanı yöntemidir.

2.7.2. Yeni Geliştirilen Yöntemler

Mikotoksinleri belirlemek için immunosensör (işaretlenmiş ve işaretlenmemiş immunosensör), aptasensör (işaretlenmiş ve işaretlenmemiş aptasensör), enzimatik

inhibisyon ve mimotop yöntemleri son olarak geliştirilmiş yöntemlerdir. Geleneksel yöntemler mikotoksinleri doğru ve kesin bir şekilde belirlemelerine rağmen, tecrübeli elemanlar, örneklere kapsamlı bir ön muamele, ekipman ve düşük analiz konsantrasyonlarında doğruluğun düşmesi gibi olumsuzlukları olduğu için hızlı, hassas ve spesifik teknikler geliştirilmesine ihtiyaç vardır.¹⁹⁴

2.8. Mikotoksinlerin Eliminasyonu ve Detoksifikasyonu

Mikotoksinlerin insan ve çiftlik hayvanları sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ve bu etkilerden ileri gelen ekonomik kayıpları ortadan kaldırabilmek için yem yem hammaddelerinde var olan mikotoksinlerin detoksifikasyonu amacıyla fiziksel ve kimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Günümüze kadar geliştirilen fiziksel ve kimyasal detoksifikasyon yöntemlerinin farklı derlemeler içerisinde, belirli kriterlere göre değerlendirilmesi¹⁹⁵ sonucunda, yöntemlerin uygun maliyetli olması ve yem bileşenlerinde minimal derecede kayıplara yol açması gerektiği bildirilmiştir.¹⁹⁶

Yem maddelerinde oluşan mikotoksinlerin detoksifikasyonu için geliştirilen yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik uzaklaştırma veya fiziksel kimyasal inaktivasyon olmak üzer iki ana başlıkta toplanır. Bu başlıklar altında birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardaki temel prensip; toksinin inaktive edilmesi, yıkımlanması veya uzaklaştırılması, ürünlerdeki besinsel değerlerin korunması, dekontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen gıdalarda toksik kalıntıların bırakılmaması şeklindedir.¹⁹⁷ Detoksifikasyon yöntemlerinin daha etkin bir şekilde dönüştürülebilmeleri için mikotoksinlerin fiziko-kimyasal ve biyokimyasal karakteristiklerinin çok iyi anlaşılması gerekir.

2.8.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler, mikotoksinlerin enerjiyi absorbe ederek uyarılmış forma dönüşmesi ve bunun neticesinde toksik olmayan veya daha az toksik olan moleküllerinin

oluşturulması ilkesine dayanmaktadır. Bu işlem için gerekli olan enerjiyi; ısıtma, gamma radyasyon, UV, mikrodalga veya görülebilir işık gibi yöntemlerle sağlamak mümkündür.¹⁰⁴

Mikotoksinler ısıya dayanıklı olduklarından yıkımlanmaları kolay değildir.¹⁹⁸ Geleneksel gıda ve yem işleme tekniklerinde kullanılan 80-121  C sıcaklık aralıklarında bozulmadan kalabilmektedirler.¹⁹⁹ Bu yüzden normal kaynatma, pişirme veya pastörizasyon koşullarında mikotoksinlerde az veya hiçbir yıkımlanma gerçekleşmeyebilir. Dolayısıyla, yüksek derecelerde ısı uygulamalarına gereksinim duyarlar, örneğin, yüksek seviyelerde aflatoksinin yıkımlanması için uzun süreli 200  C'ye kadar ısıtmaya gereksinim vardır.²⁰⁰ Katı AFB₁ 260  C kuru ısıtma sıcaklığında erimeye başlar, termal yıkımlanma sıcaklığı 269  C olarak belirlenmiştir.²⁰¹ Bunla birlikte AFB₁'in bazı yem maddelerinde yıkımlanması için 300  C kadar yüksek bir sıcaklığın gerekli olduğu belirlenmiştir.²⁰² 150-200  C sıcaklıkta 30 dakika süreyle uygulanan kavurma işlemlerinde kalıntı seviyelerinin %20-60 oranlarında olduğu gözlenmiştir.⁸⁷

Mikotoksinlerin ısıtmaya karşı hassasiyeti yemin nem içeriği, pH ve iyonik güç tarafından etkilenebilmektedir.^{104, 203} Nemin var olduğu durumlarda AFB₁ ısıtma ile lakton halkalarında hidrolize bağlı açılmanın olmasıyla karboksilik asitler oluştururlar ve bu basamaktan sonra ısıya bağlı dekarboksilasyon şekillenir.²⁰⁴ Yem maddelerindeki mikotoksinlerin yıkımlanması mikotoksin tipine ve konsantrasyonuna, mikotoksinin yem bileşenlerine bağlanması ve ısının penetre olma derecesine bağlıdır.²⁰⁵

ZEA ısıya karşı oldukça dirençlidir ve 120  C sıcaklıkta dört saat süreyle bozulmadan kalabilmektedir. Farklı pH'lardaki tampon solüsyonlarıyla yapılan yıkımlanma çalışmalarında 225  C sıcaklıkta 30 dakikadan daha az sürede tam yıkımlanma gözlenmiştir.^{87, 168}

OTA diğer mikotoksinler gibi geleneksel pişirme yöntemlerinde yıkımlanmadan

kalabilmektedir.²⁰⁶ OTA ile kontamine kuru buğdaya 100 °C’de 700 dakika ve 150 °C’de 200 dakika süreyle uygulanan ısıtma uygulamalarında OTA konsantrasyonunda %50 yıkımlanma olduğu belirlenmiştir.²⁰⁷ 200 °C sıcaklıkta 10 dakika uygulamada OTA seviyelerinde %22 düşüş sağlanmışken 220 °C’de 15 dakika süreyle yapılan uygulamada %94’e kadar bir düşüş gözlenmiştir.²⁰⁸

Gama radyasyonla mikotoksinlerin inaktivasyonu radyasyon dozuna, gıda ve mikotoksin tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.⁸⁷ AF’ler direkt olarak gama ışınlarına karşı dirençlidirler, indirekt olarak gama ışınlarının suyu ve diğer temel yem bileşenlerini hidrolize etmesi sonucunda serbest radikaller oluşarak AF’lerin yıkımlanmasına katkıda bulunmaktadır.¹⁰⁴

UV ışınlamada AF’lerin 222, 265 ve 362 nanometre (nm) dalga boylarına karşı hassas oldukları bilinmektedir.²⁰⁹ UV ışınlarına karşı hassasiyet AFB₁’in kimyasal yapısındaki furan halkası üzerindeki C8-9 noktalarında çift bağ bulunduğundan yıkımlanma için 362 nm gibi bir dalga boyuna ihtiyaç duymaktadır, AFG₁’de aynı noktalarda çift bağa sahip olduğu için hemen hemen aynı dalga boyuna ihtiyaç duymaktadır.²⁰⁹ AFB₂ ve AFG₂’nin furan halkalarındaki C8-9 noktalarında çift bağ bulunmadığından, yıkımlanma için 254 nm gibi daha düşük dalga boylarına ihtiyaç duymaktadırlar.²¹⁰ UV ışın ve gama radyasyonun OTA üreten mantarların üremesini durdurduğunu fakat bunlardan sadece gama radyasyonun tek başına OTA’yı yıkımladığı gösterilmiştir.²¹¹⁻²¹³

2.8.2. Bağlayıcılar

Bağlayıcılar bir başka fiziksel yöntem olup, dış yüzeyleri veya iç tabakalarındaki boşluklarda veya bu bölgelerdeki katyonlarla yer değiştirerek organik maddeleri bağlama özelliğine sahiptirler.²¹⁴ Bağlayıcılar ve mikotoksinler arasında oluşan bu kompleks yapı mikotoksinlerin kan dolaşımına geçerek hedef organlarda meydana getireceği olumsuz etkileri önlemiş olur. Mikotoksinleri bağlamak için kapasite ve etkinliklerine göre farklı

kaynaklardan çeşitli bağlayıcılar geliştirilmiştir.²¹⁵ Bu bağlayıcıların ilk jenerasyonu olarak bilinenler, mineral veya inorganik bağlayıcılar olarak isimlendirilenlerdir ve yaygın olarak kullanılanları smektit, sulu sodyum alluminosilikatlar ve özellikle bentonit veya montmorillonittir. Organik bağlayıcı olarak kullanılanlar aktif kömür, kolestiramin, polivinilpolipirrolidon, maya hücre duvarı ve bileşenleridir.²¹⁴ Mineral bağlayıcıların etkinliği bağlayıcı ve mikotoksinlerin yapısıyla ilişkilidir. Bağlayıcıların yük dağılımı, yüzey alanı, gözenek boyutu ve mikotoksinlerin yük dağılımı polaritesi ve şekli tam olarak bağlanmaya belirgin bir katkı sağlar.⁸⁷

Mineral bağlayıcılar aynı anda farklı mikotoksinleri bağlama özelliğinde değillerdir. Bu problemi çözebilmek için mineral bağlayıcılar kuarterner uzun zincirli alkyl/aryl aminlerle modifiye edilmişlerdir, böylece AF olmayan mikotoksinlerin bağlanmasını sağlamışlardır.²¹⁶ Bunun yanı sıra bu bağlayıcılar sindirim kanalında, yem maddelerinden gelecek olan bir takım besin maddelerini de bağlama özelliğine sahiptirler. Bu dezavantajların bazılarının üstesinden gelebilmek için bazı girişimler yapılmış ve mikroorganizmaların hücre duvar bileşenlerinden ikinci jenerasyon bağlayıcılar geliştirilmiştir. Detoksifikasyon mekanizması, inaktive edilmiş hücre duvarlarının kolaylaştırdığı fiziksel bağlamaya dayanmaktadır.²¹⁵ Maya hücre duvarındaki d-glukan zincirinin ZEA'yı etkin bir şekilde inaktive ettiği gösterilmiştir.²¹⁷

Maya hücre duvarı ve mineral bağlayıcıların kombine edilmesinin önemli ölçüde mikotoksin bağlama kapasitesini artırdığı gösterilmiştir. Howes ve Newman (1999) yaptıkları bir çalışmada, *in vitro* olarak bu kombinasyonla AF, ZEA ve fumonisini bağlama kapasitelerinin arttırıldığını, bununla beraber DON, OTA ve T-2 toksinlerini bağlama yeteneklerinin %60 ın altında olduğunu rapor etmişlerdir.²¹⁸

Kararsız proteinler ile modifiye edilmiş ligno-selülozik materyallerin kullanıldığı bağlama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde tahıllar, baklagiller ve bitki yan

ürünlerinden köken alan lingo-selülozik materyaller mekanik ve enzim ile muamele edilerek hemiselüloz içeriği, bağlama alanı ve yüzeylerin hidrofobikliği artırılmıştır.²¹⁹

Bir diğer geliştirilen bağlayıcı humik asit içerenlerdir, bu bağlayıcılar yem maddesi içerisindeki ZEA'yı bağlayabilmektedir.²²⁰

İstenilen mikotoksin bağlayıcılar şu özelliklere sahip olmalıdır: bağlama yeteneği, özellikle düşük hidrofobik olan mikotoksinleri içine alan değişik mikotoksinleri bağlama özelliğinde ya da spesifik mikotoksinlere karşı yüksek bağlama etkinliğinde olmalıdır. Kontamine mikotoksinlerin yüksek miktarlarını detoksifiye edebilmek için yüksek bağlama kapasitesine sahip olmalı. Yem maddesinin içerisinde olan mineraller, vitaminler ve aminoasitler gibi besin maddelerini bağlama özellikleri düşük olmalıdır. Yem bileşenleriyle benzer karakterde olanların ilavelerine hayvanlar daha iyi tolerans gösterir.²¹⁵

2.8.3. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal yöntemler, mikotoksinlerde var olan lakton halkalarının oksidasyon veya hidrolizle açılması, furan halkalarına klor bağlanması veya furan halkalarında var olan çift bağların oksidasyonu sonucunda toksik olmayan veya daha az toksik olan moleküllere dönüştürülmesi ilkesine dayanmaktadır.²²¹ Bu yöntemler içerisinde sıklıkla; klor [sodyum hipoklorit (NaClO)], hidrojen peroksit (H_2O_2) veya sodyum hidroksit (NaOH), ozon (O_3), bisülfid [Sodyum bisülfid (NaHSO_3)], amonyak [amonyum hidroksit (NH_4OH)], amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3)], alkaliler [potasyum hidroksit (KOH)], potasyum bikarbonat (KHCO_3), sodyum bikarbonat (NaHCO_3)] ve asitler kullanılmaktadır.¹⁰⁴

Klorlama ajanlarından olan sodyum hipoklorit (NaClO) AF'lerin kontamine olmuş yüzeylerden ve cam eşyalardan uzaklaştırılması için önerilmiştir ve kontamine yemlerde de etkili olabileceği gösterilmiştir.^{222, 223} Klorinizasyonda pH önemli rol oynamaktadır ve

asidik ortamlarda klorinasyon oksidasyona baskın gelmektedir ve bu durumda 8,9-dikloro-AFB₁ ve 8,9-dihidroksi-AFB₁ oluşmaktadır.²²⁴ 8,9-dikloro-AFB₁'in kanserojenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir fakat kararsız yapısından dolayı hızlıca 8,9-dihidroksi-AFB₁'e dönüşmektedir.²²¹ Klor uygulamasından dolayı yemlerdeki triptofan miktarında düşüşler gözlenmiştir.²²⁵ OT α 'nın klorlanması OT α 'dan OTA biyotransformasyonu için bir basamak olmasıyla birlikte,²²⁶ OTA üzerinde yapılan NaClO ile detoksifikasyon denemelerinde de başarılı sonuçlar elde edilmiştir.²²⁷

Hidrojen peroksitin (H₂O₂) farklı düzeyleri ve farklı pH'da yapılan detoksifikasyon çalışmalarında, AFB₁'in hemen hemen tamamının yıkımlandığı gözlenmiştir.^{225, 228} NaOH ile birlikte uygulandığında ise 8,9-dihidroksi AFB₁ oluşumundan sonra süksinit asit oluşumuyla sonuçlandığı gözlenmiştir.²²⁹ H₂O₂'in %0.05-0.1 konsantrasyonuyla yapılan çalışmada, OTA'nın detoksifiye olmadığı gözlenmiştir.²³⁰ Bununla birlikte, Jalili ve Jinap (2012) yaptıkları çalışmada, H₂O₂ ile birlikte ısı uygulamasının sinerjistik etkisinden faydalanarak OTA seviyelerinin düştüğünü belirlemişlerdir.²³¹ H₂O₂'in %3-6 konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmada ZEA üzerinde yıkımlayıcı etkisi tespit edilememiştir.²³² Bununla birlikte, Abd Alla (1997) H₂O₂'in %3-10 arasındaki konsantrasyonları farklı sıcaklıklarda uygulayarak yaptığı çalışmada, ZEA yıkımlanmasının sıcaklık ve H₂O₂ konsantrasyonlarına bağlı olduğunu göstermiştir.²³³ Yapılan çalışmada, %10 H₂O₂ konsantrasyonunda 80 °C sıcaklıkta 16 saat bekleme süresinde %83.9 oranında yıkımlama tespit edilmiştir.²³³

Ozon (O₃) AFB₁'in furan halkasında bulunan C8,9 noktasındaki çift bağ üzerinde oksidasyon etkisiyle aflatoxin ozonit meydana getirir.²³⁴ AFB₂ ve AFG₂'nin furan halkalarındaki C8,9 noktalarında çift bağ olmadığı için bu aflatoksinler O₃ ile oksidasyona dirençlidirler ve yıkımlanma için daha fazla konsantrasyonlara ihtiyaç duyarlar.²³⁵ %22 nem içeriği olan pamuk tohumu küspesinde 100 °C' de 1 saat süreyle

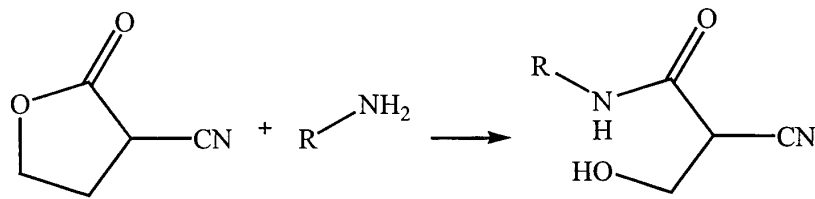
uygulama sonrasında, AFB₁'de %91 oranında yıkımlanma belirlenmiştir.²³⁶ %2-10 O₃ konsantrasyonlarında yapılan çalışmalarda OTA ve ZEA düzeylerinde düşme gözlenmiştir.²³⁷

Kimyasal yöntemlerden birisi olan ammonizasyon uygulamasında lakton halkasının hidrolize edilmesi ve dekarboksilasyon olmak üzere iki aşamalı kimyasal reaksiyon gerçekleşmektedir.^{237, 238} Bu iki aşama sonrasında AFB₁ toksik olmayan aflatoksin D₁ (AFD₁) ve dihidro-4-hidroksi-6-metoksifuro[2,3-b] benzofuran gibi iki yeni bileşik meydana gelir.²³⁸ Ammonizasyon metodunda amonyum hidroksitin sıvı veya gaz formu ile yem maddelerinde var olan aflatoksinlerin yıkımlanma çalışmaları önceki yıllarda yoğunlukla yapılmıştır.²³⁷⁻²⁴⁵ Yapılan bu çalışmalarda yüksek basınç ve yüksek sıcaklık kullanıldığı^{246, 247} gibi ortam sıcaklığı ve atmosferik basınçta da 2-11 gün süre ile uygulamalar yapılmıştır.^{239, 242} Bu çalışmaların tamamında mikotoksinlerden sadece AFB₁ materyal olarak kullanılmıştır. Bu uygulamalarda AF'de %95'ten fazla indirgenme olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, AF'nin indirgenmesindeki etkili kombinasyonun %5'e kadar amonyum, %10-20 nem ve ısı-zaman olduğunu göstermiştir. 80-120 °C ve yüksek basınçta, 15-30 dakikalık bir maruz kalma zamanına ihtiyaç vardır. AF'lerin tamamına yakın bir oranda indirgenmesi, ortam sıcaklığında örneklerin 1-3 hafta tutulmasıyla gerçekleşmiştir.¹⁰⁴

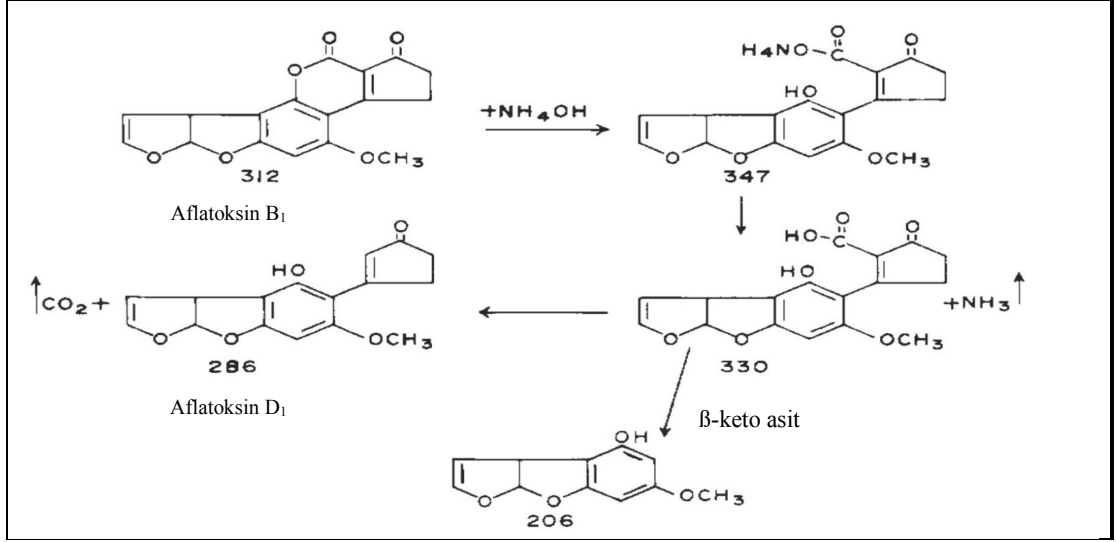
Ammonizasyon uygulaması kimyasal metotlar içerisinde en fazla araştırma konusu olmuş yöntemdir. Bu yöntemin yoğun olarak incelenmesi AF ile kontamine olmuş yemlerin dekontamine edilmesinde etkili ve güvenli olduğunu göstermiştir.²⁴⁸ Ammonizasyon öncelikli olarak mısır, yerfıstığı ve pamuk tohumu küspesindeki AF kontaminasyonuna karşı iki şekilde kullanılmıştır: yüksek basınç/yüksek sıcaklık (YB/YS) ve atmosferik basınç/ortam sıcaklığı (AB/OS). İlk uygulama yöntemi yem fabrikalarında kullanılabilirken (YB/YS), ikinci uygulama çiftlik şartlarında kullanım

alanı bulmuştur (AB/OS).²⁴⁹

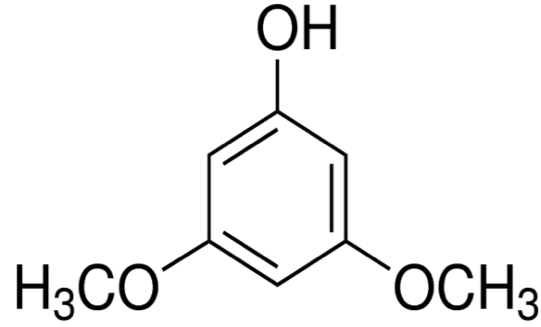
Amonyum uygulamalarındaki AF üzerinde gerçekleşen kimyasal reaksiyonları sıralanacak olursa: aflatoksinde bulunan lakton halkası hedef alınarak aminolizis reaksiyonu ile lakton halkası açılır (Şekil 2.7) ve amonyum, karboksil grubunun asidik olmasından dolayı bu gruba bağlanarak bir amid oluşturur. Lakton halkasının açılması asidik ortamda (mide gibi) geri dönüşümlüdür, bu durum siklopentan yapılarının hidroksillenmesine ve AFM₁ in oluşmasına sebep verir (Şekil 2.10). Ayrıca, AFB₁ molekülü yeteri kadar amonyağa maruz kalırsa geri dönüşümsüz olarak kimyasal yapısı değişir, aksine süre yeteri kadar uzun tutulmazsa, molekül orijinal durumuna dönebilir.²⁵⁰ Bu aşamada kumarindeki benzen halkasının da hidroksillenme reaksiyonu gerçekleşir, bu reaksiyon ile bir fenol oluşur (3,5-dimetoksifenol) (Şekil 2.9). Bir sonraki aşamada oluşan amiddan amonyağın (NH₃) uçmasıyla geriye bir β-keto asit kalmaktadır. Ortamda H₂O, H⁺ veya OH⁻ iyonlarının varlığı veya ısının olması β-keto asitin dekarboksile olmasına ve bu yapıdan bir CO₂'in uzaklaşmasına neden olacaktır. Geriye kalan yapı AFD₁ olarak isimlendirilen toksik olmayan bir bileşiktir (Şekil 2.8). Oluşan AFD₁ orijinal molekülü olan AFB₁'den 2000-20000 kat daha az toksik olduğu gözlenmiştir.²⁵¹



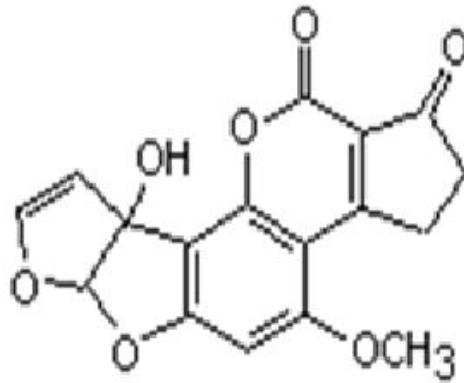
Şekil 2.7. Lakton halkasının aminolizis ile açılması.



Şekil 2.8. Aflatoxin B₁'in muhtemel ammonizasyon mekanizması ve moleküler ağırlıkları.²⁴⁰



Şekil 2.9. Aflatoxinin ammonizasyonu sonucu oluşan 3,5-dimetoksifenolün kimyasal yapısı.²⁵⁰



Şekil 2.10. Asidik ortamda siklopentan halkalarının hidroksillenmesi ile AFM₁ oluşur.²⁵¹

Ammonizasyon uygulanan pamuk tohumuyla beslenen sığırların sütlerinde aflatoksin M₁ seviyesinde %90'a kadar düşüş sağlanmıştır.²⁴²

Bir çalışmada, doğal olarak *F. moniliforme* ile kontamine olmuş mısır kültüründeki Fumonisin B₁ seviyeleri amonyum uygulaması ile %30-40 düşmüştür. *F. moniliforme* ile kontamine olmuş mısırların detoksifikasyonunda atmosferik ammonizasyon uygulaması etkili bir metot olmadığı görülmüştür.²⁵²

Aflatoksin ile kontamine olmuş mısır ve pamuk tohumu küspesinin, amonyakla muamelesinden sonra kimyasal ve biyolojik özelliklerinde değişiklik olduğunu gösteren raporlar vardır. Amonyak ve metilamin uygulanan küspelerin NPN içeriğinde artış olduğu gösterilmiştir.²⁵³ Amonyak uygulamasıyla yem maddesinin kalitesi kısmen düşer, örneğin mevcut lizin ve metiyonin içeriği azalır.²⁴⁰ Atmosferik oksijen varlığında AF kontamine mısırın ammonizasyonu ile linoleik asitte önemli kimyasal değişiklikler olduğu görülmüştür.²⁵⁴ Kontamine mısıra uygulanan ammonizasyon işlemi sonrasında, amonyaktan gelen azot, toplam azot, çözünebilir katı maddelerin miktarlarında artışla birlikte, indirgenen ve indirgenmeyen şeker miktarlarında ve linoleik asit yüzdesinde belirgin düşüşler gözlenmiştir (Tablo 2.5).²³⁹

Tablo 2.5. Ammonizasyon uygulaması sonrası mısırdaki bileşimsel değişimler.

Bileşen	Numune	
	A	B
Suda ekstrakte NH₃		
Başlangıç	0	0
Ammonize edilmiş	0.07	0.11
Amonyaga ait azot		
Başlangıç	0.04	0.06
Ammonize edilmiş	0.32	0.39
Toplam Azot		
Başlangıç	1.42	1.50
Ammonize edilmiş	1.72	1.71
İndirgenen şeker*		
Başlangıç	0.34	0.32
Ammonize edilmiş	0.32	0.24
İndirgenmeyen şeker**		
Başlangıç	1.16	1.22
Ammonize edilmiş	0.94	1.11
Çözünlenebilir katı maddeler		
Başlangıç	6.0	5.9
Ammonize edilmiş	7.3	7.1
Linoleik asit yüzdesi***		
Başlangıç	48.6	59.1
Ammonize edilmiş	43.5	53.9
Solventle ayrılmayan kısım	6.8	6.0

Bütün veriler yüze olarak bildirilmiştir. (*) Dekstroz olarak rapor edilmiştir. (**) Sükroz

olarak rapor edilmiştir. (***) Hekzanda ekstrakte edilmiş yağ asidi yüzdesi.²³⁹

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Yemler ve Yemlerin Hazırlanması

Çalışmada ticari olarak mevcut olan “Yumurta Tavuğu Yemi” (%17 ham protein, %4 ham selüloz, %3.4 ham yağ ve %12.5 ham kül) ile saha şartlarında sütçü inekler için yaygın olarak kullanılan “Sütçü İnek Total Karma Yemi” (TMR_{Si}) [kuru madde (KM) bazında; %19.4 çayır otu, %19.2 arpa silajı, %24.0 mısır silajı, %9.7 kırılmış arpa danesi ve %27.8 ticari süt yemi] kullanıldı. 60 °C sıcaklıkta üç gün süreyle kurutma işlemi yapıldıktan sonra yemler değirmende öğütülerek un haline getirildi (Şekil 3.1, Şekil 3.2).

3.2. Mikotoksinler

Çalışmada gerek ruminantlar, gerekse kanantlılar için en riskli ve yaygın olan mikotoksinlerin saf formları yurt dışındaki bir firmadan temin edildi [AFB₁ (A6636-1 mg Aflatoxin B₁, SIGMA, Almanya), ZEA (Z2125-25 mg Zearalenone, SIGMA, Almanya) ve OTA (32937-5 mg Ochratoxin A, SIGMA, Almanya)] (Şekil 3.3).

3.3. Yemlerin Mikotoksinlerle Kontaminasyonu ve Ammonizasyon İşlemi

AFB₁, OTA ve ZEA'nın %88 KM düzeyindeki yemlerde kabul edilebilir yasal limitleri sırasıyla 20 µg/kg, 200 µg/kg ve 500 µg/kg'dır.²⁵⁵ Çalışmada deneysel etkiyi görebilmek amacıyla yemler yasal kabul edilebilir üst düzeyin 25 katı mikotoksin içerecek şekilde deneysel amaçla kontamine edilmiştir (Tablo 3.1) (Şekil 3.4).

Bu amaçla hesaplanan değerlerdeki mikotoksinler tedrici olarak 1.500 ml distile suda homojen kontaminasyon sağlamak amacıyla süspansiyon haline getirilmiştir. Kontrol grubu yemleri hariç (800 gr), deneme gruplarına ait yemler (1600 gr) plastik kova içinde mikotoksin ile kontaminasyon yapıldıktan sonra 60 °C'de 3 gün boyunca kurutmaya tabi tutuldu. Yemler (kontamine ve ammonize grubuna ait yumurtacı tavuk yemi ve TMR_{Si}) kurutma sürecinde her üç saatte bir çalkalanarak karışımın homojen olması sağlandı.

Kontaminasyona tabi tutulmuş yumurtacı tavuk yemi (400 gr) ve TMR_{Si} (400 gr)

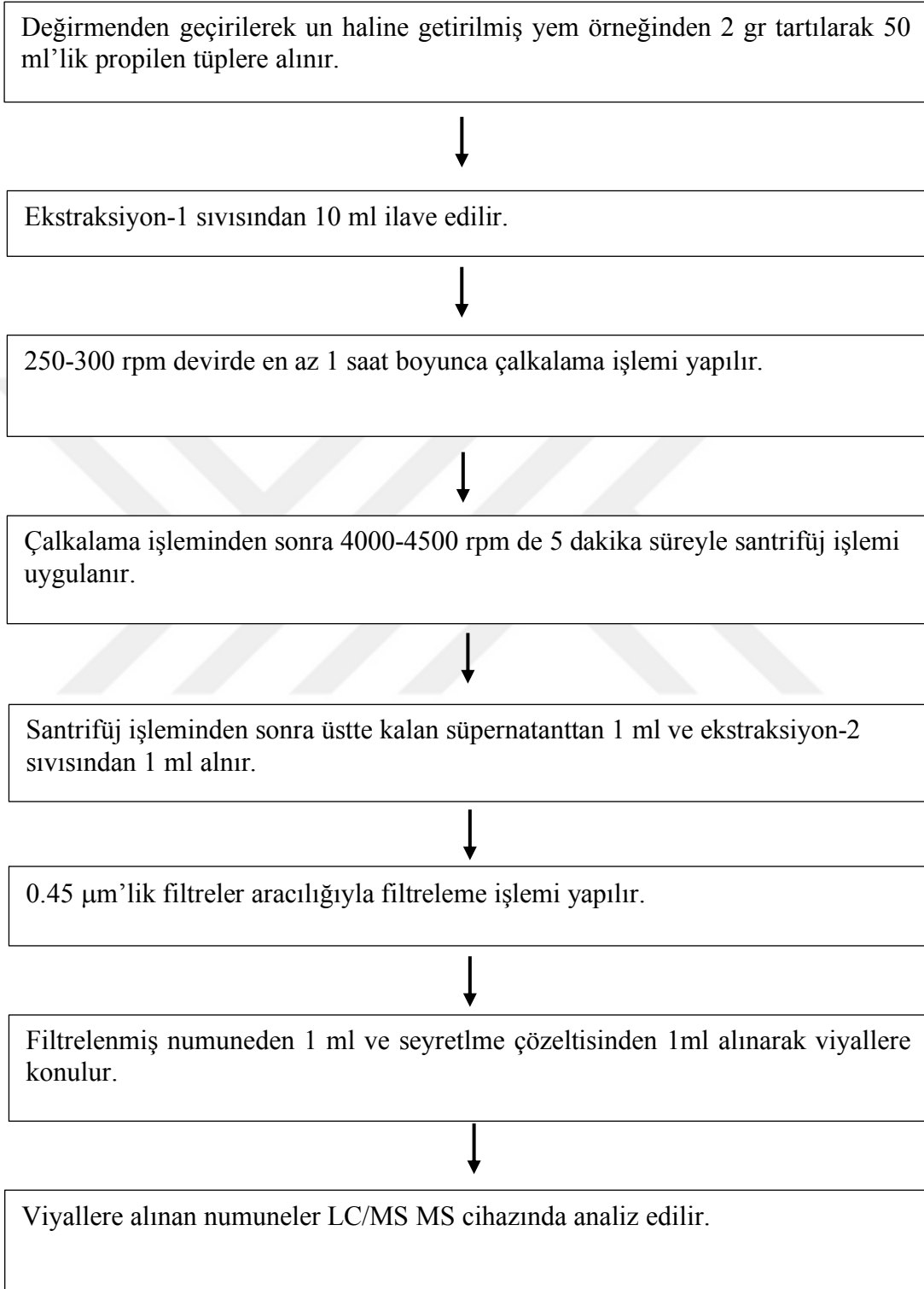
ayrılarak ammonizasyon işlemi için ayrı plastik kovalara alındı. Bu grup yemlere 10 gr/kg düzeyinde amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3 ; Toxifarm dry, Farmavet International, Türkiye) katılarak ammonizasyon uygulandı (Şekil 3.5). Ayrıca, süspansiyon olarak hazırlanmış kontaminasyon sıvısında için 1,25 gr/50mL (%2,5 konsantrasyon) olacak şekilde ammonizasyon uygulandı. NH_4HCO_3 hava ile teması esnasında gaz form oluşacağından, gaz kaçışını önleyerek kontamine edilmiş numunelerle daha fazla temas oluşturabilmek için plastik kovaların bağlantı yerlerine parafin bant sarıldı ve kapak bağlantıları selofan bant ile kapatıldı. Bu işlem 50 °C’de 24 saat süreyle uygulandı. Yine, kovalar her üç saatte bir çalkalanarak gaza dönüşen amonyum bikarbonatın yemlerle teması silo karıştırıcısı gibi taklit edildi.

Tablo 3.1. Yemlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu.

Mikotoksin	Yasal Limit (ppb- $\mu\text{g/kg}$) ²⁵⁴	Kontaminasyon (25 x Yasal Limit)	
		Kontrol	Kontamine*
AFB ₁	20	-	500
OTA	200	-	5000
ZEA	500	-	12500

*: Ammonizasyon işleminden önce hedeflenen mikotoksin miktarları.

Kontrol, kontamine ve ammonize gruplarına ait yemler 8 tekrar olacak şekilde 50 gr tartılarak analiz için cam şişelere alındı (Şekil 3.6). Benzer kontaminasyon ve ammonizasyon, her birinde 50 ml su içeren 3 adet falkon tüplerinde de uygulandı.



Şekil 3.1: Numunelerin LC/ MS-MS analizi için hazırlanış protokolü.

3.4. Mikotoksin Analizi

3.4.1. Yem numunelerinin analiz için hazırlanışı

Mikotoksin analizi için numune hazırlama ve analiz aşamaları Şekil 3.1’de özetlenmiştir. Multi mikotoksin analizi için yem numunelerinden 2 gr tartılarak 50 ml’lik propilen tüplere alındı. Propilen tüplere alınan 2 gr yem numunesinin üzerine 10 ml Ekstraksiyon-1 solüsyonu [%79 asetonitrile (HPLC grade), %20 distile su ve %1 formik asit (HPLC grade)] ilave edildi (Şekil 3.7). Örnekler 250-300 rpm hızda 1 saat boyunca çalkalandıktan sonra 4000-4500 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi (Şekil 3.8, Şekil 3.9).

Santrifüj sonrasında 1 ml süpernatant üzerine 1 ml ekstraksiyon-2 solüsyonu [%79 distile su, %20 asetonitrile (HPLC grade) ve %1 formik asit (HPLC grade)] eklenerek 0,45 µm filtreden süzülüp 15 ml’lik propilen tüplere aktarıldı.

Süzme işleminden sonra 15m’lik propilen tüplerdeki ekstraksiyon-2 sıvısı ile muamele görmüş numunelerden 1 ml alınarak viyallere konuldu ve her bir numune üzerine 1 ml seyreltme çözeltisi [(%50 asetonitril (HPLC grade), %49 distile su ve %1 formik asit (HPLC grade)] ilave edildi. Bu işlem hem mikotoksinlerin çözünmesini hem de 10 kat seyreltilmelerini sağlamak amacıyla uygulandı (Şekil 3.1).²⁵⁶

3.4.2. Numunelerin LC/MS MS analizi

Hazırlanan örnekler viyallere alındıktan sonra multi mikotoksin analizi için LC/MS MS cihazı kullanıldı (Agilent, LC/MS MS 6420) (Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14).

LC/MS MS’de multi mikotoksin analizi için kullanılan standart solüsyon verileri Tablo 3.2’de sunulmuştur. Verilere ilave olarak örnek sıcaklıkları 25 °C olarak tespit edilmiştir. LC/MS MS analizi için kullanılan cihazın LC koşulları Tablo 3.3’ de sunulmuştur. MS/MS için iyonizasyon parametreleri Tablo 3.4’de sunulmuştur.

Tablo 3.2: LC/ MS MS için kullanılan standartların listesi.²⁵⁷

Mikotoksin	TS (dakika)*	Konsantrasyon (µg/kg)
DON	3.998	33.1519
AFG2	4.673	0.2957
AFG1	4.745	0.3478
AFB2	5.020	0.3116
AFB1	5.101	0.3595
FB1	5.298	51.8928
FB2	6.361	18.8794
OTA	6.548	0.6627
ZON	6.748	4.6376

* TS: Tutulma Süresi

Tablo 3.3: LC cihaz koşulları.²⁵⁷

Kolon	Agilent Eclipse Plus C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm, p/n 959764-902																								
Akış Oranı	0.3 ml/dakika																								
Sıcaklık	35 °C																								
Enjeksiyon hacmi	2 µL																								
Mobil faz	A) 5mM Amonyum format, %0,1 formik asit (suda) B) Metanol (HPLC grade)																								
Kademeli yıkama işlemi	<table> <tr> <th>Süre (dakika)</th><th>%B</th></tr> <tr><td>0.0</td><td>10.0</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>10.0</td></tr> <tr><td>3.0</td><td>20.0</td></tr> <tr><td>7.0</td><td>24.0</td></tr> <tr><td>10.5</td><td>30.0</td></tr> <tr><td>13.5</td><td>60.0</td></tr> <tr><td>15.0</td><td>70.0</td></tr> <tr><td>18.0</td><td>75.0</td></tr> <tr><td>18.1</td><td>95.0</td></tr> <tr><td>21.9</td><td>95.0</td></tr> <tr><td>22.0</td><td>10.0</td></tr> </table>	Süre (dakika)	%B	0.0	10.0	2.0	10.0	3.0	20.0	7.0	24.0	10.5	30.0	13.5	60.0	15.0	70.0	18.0	75.0	18.1	95.0	21.9	95.0	22.0	10.0
Süre (dakika)	%B																								
0.0	10.0																								
2.0	10.0																								
3.0	20.0																								
7.0	24.0																								
10.5	30.0																								
13.5	60.0																								
15.0	70.0																								
18.0	75.0																								
18.1	95.0																								
21.9	95.0																								
22.0	10.0																								

Tablo 3.4: İyonlaştırıcı kaynağı parametreleri.²⁵⁷

Parametre	
Kuru gaz sıcaklığı	300 °C
Kuru gaz akış oranı	7 L/dakika
Püskürtücü basıncı	35 psi
Mahfaza gaz sıcaklığı	350 °C
Mahfaza gaz akış oranı	11 L/dakika

3.5. Veri Analizi

Veriler, SAS (Statistical Analysis System, Version 9.0, Cary, NC, 2002)'ta PROC. GLM prosedürü kullanılarak tek-yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutuldu.

Lineer model grup etkisini içerdi:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

Y: yanıt, μ : popülasyon ortalaması, G: grup (i: kontrol, kontamine ve ammonize) ve e: deneysel hata (i: grupta, j: numunede). Gruplar arası farklılık en küçük-kareler farkı (LSD) opsiyonu ile değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel farklılıklar $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı kabule edildi. Grup değerleri küçük kareler ortalaması $\pm$ standart hata ($LSM \pm SE$) şeklinde sunuldu.



Şekil 3.2. YTY ve TMR_{Si} kontaminasyon öncesi kurutma işlemi.



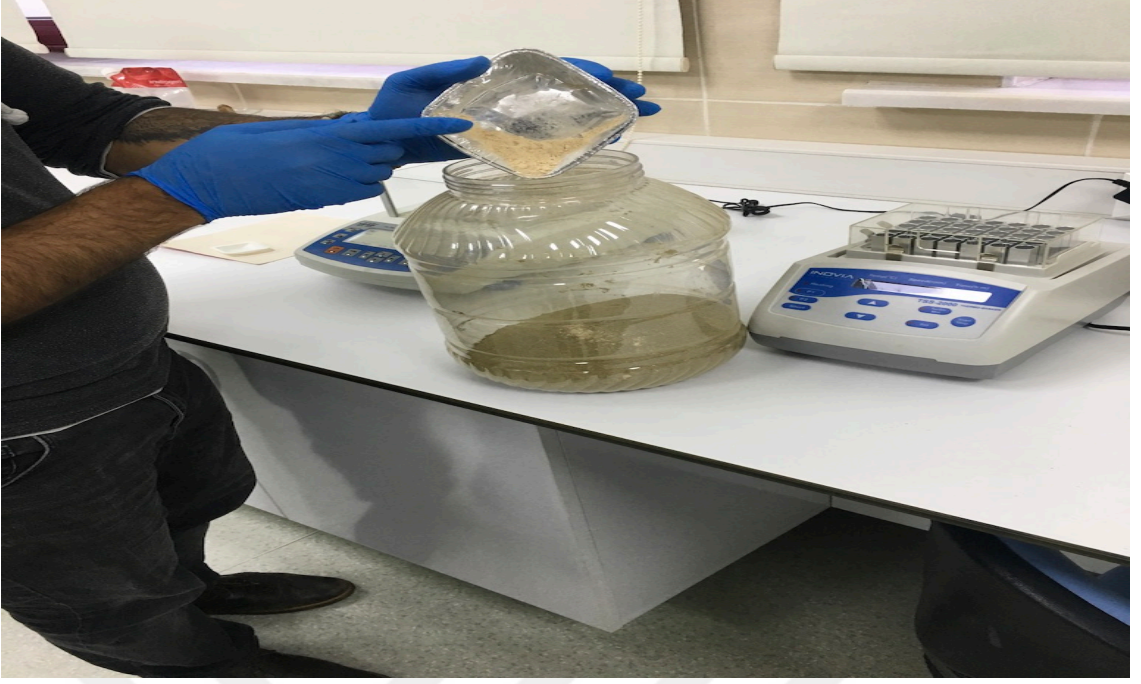
Şekil 3.3. Kurutma işleminden sonra yemlerin öğütülmesi.



Şekil 3.4. Saf halde temin edilen AFB₁, OTA ve ZEA.



Şekil 3.5. Mikotoksinlerin distile suda çözündürülmesi.



Şekil 3.6. AFB₁, OTA ve ZEA ile kontamine edilmiş yemlere NH₄HCO₃ ilavesi.



Şekil 3.7. Ammonizasyon işleminden sonra yem numunelerin paketlenmesi.



Şekil 3.8. 2 gr halinde tartılan yem numunelerine 10 ml Ekstraksiyon-1 sıvı ilavesi.



Şekil 3.9. Ekstraksiyon-1 sıvısı eklenen numunelerin çalkalanması.



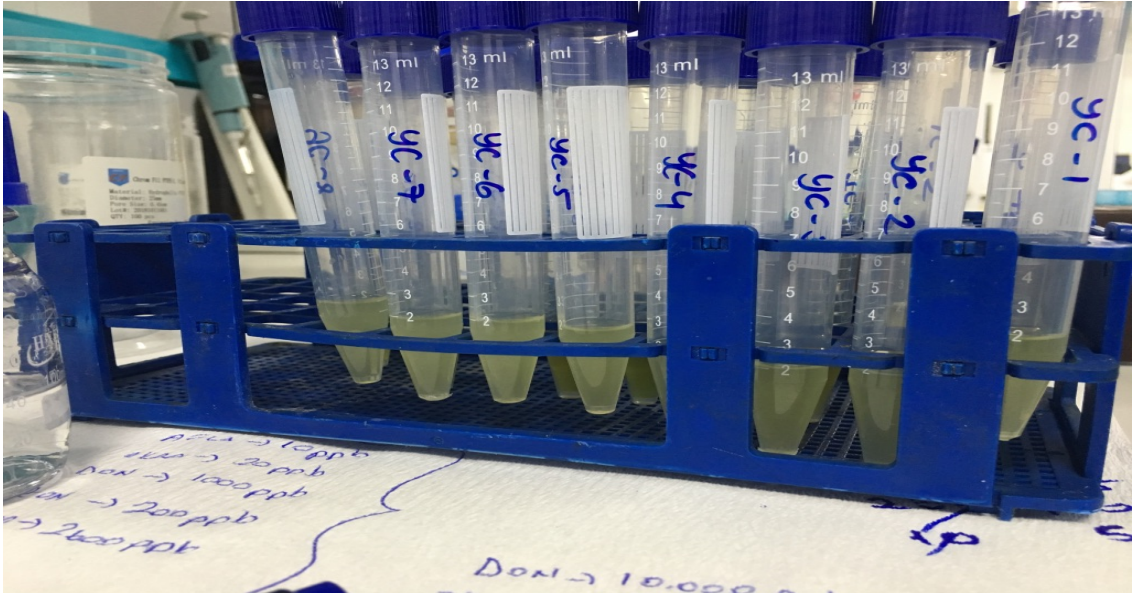
Şekil 3.10. Santrifüj işlemi.



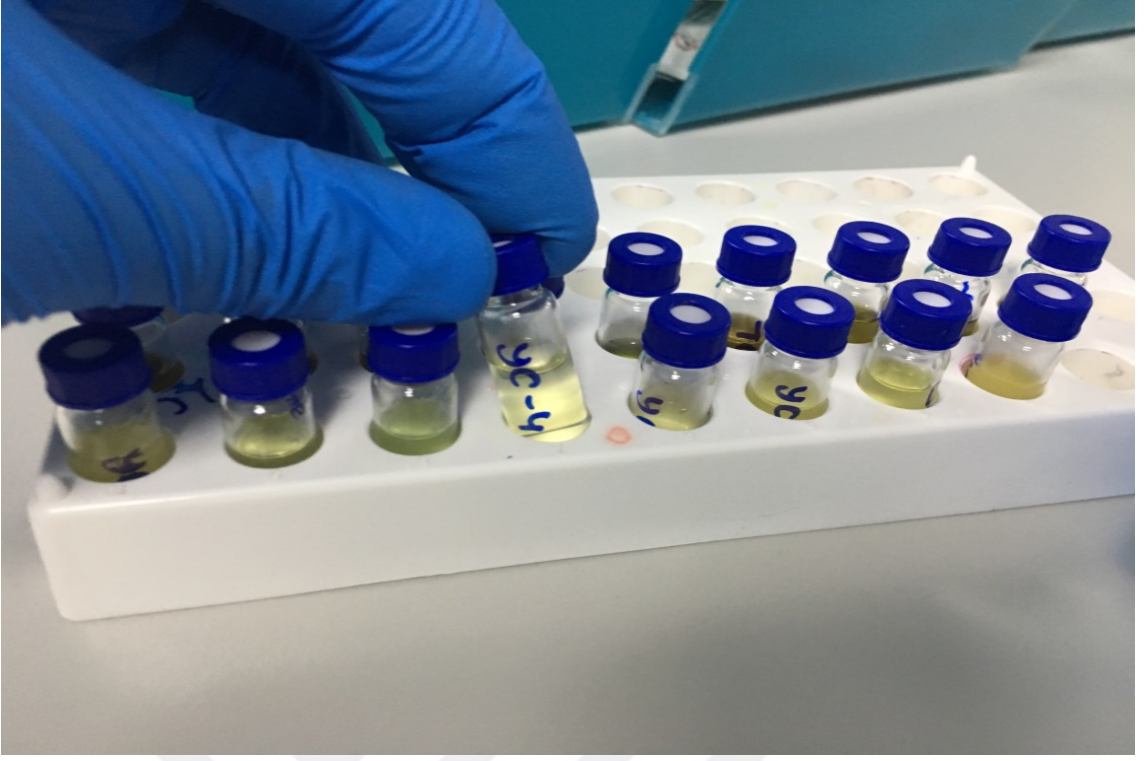
Şekil 3.11. Süpernatanttan 1 ml alınarak ekstraksiyon-2 sıvısı ilave edilmesi.



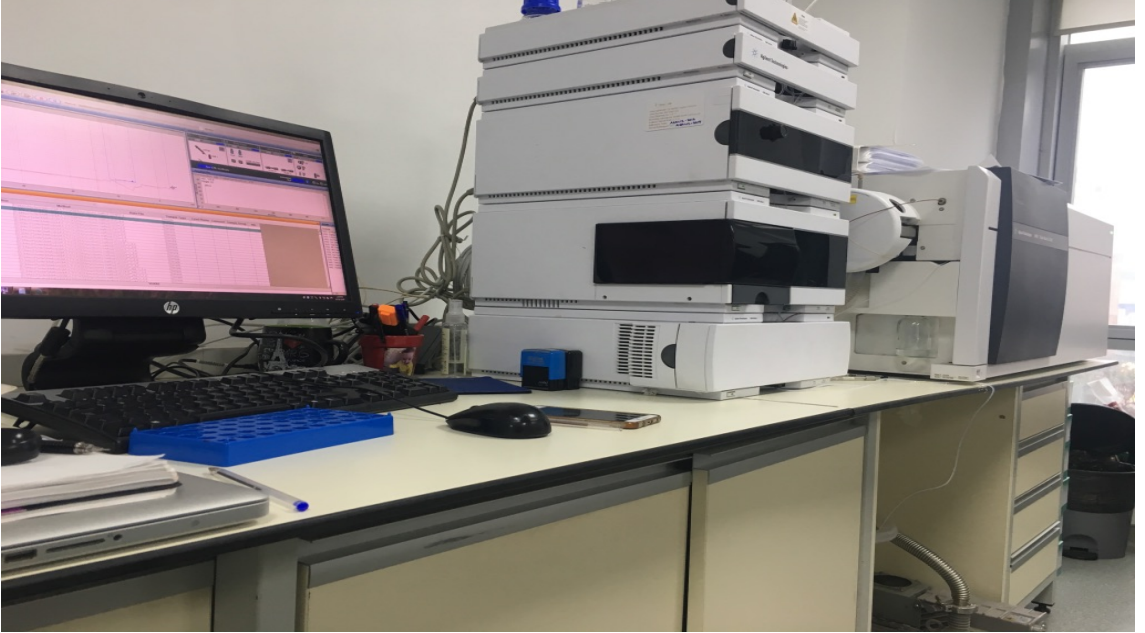
Şekil 3.12. Ekstraksiyon-2 sıvısı ilave edilen numunenin 0.45 mikronluk filtreden geçirilmesi.



Şekil 3.13. Seyreltme çözeltisi ile 1:1 oranında sulandırılması.



Şekil 3.14. Numunelerin LC/MS-MS analizi için viyalere konulması.



Şekil 3.15. Numunelerin LC/MS-MS cihazında analiz edilmesi.

4. BULGULAR

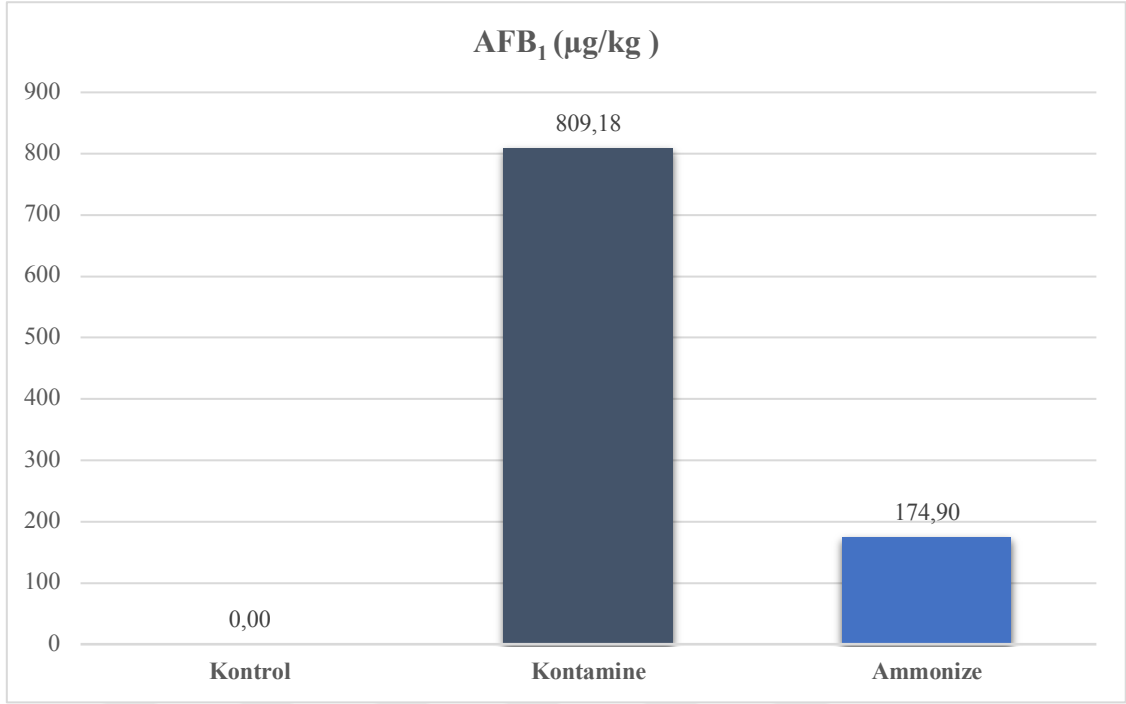
4.1. Kontaminasyon ve Ammonizasyonun Sudaki Başarısı

Kontamine edilmiş distile sudaki (KDS) AFB₁, OTA ve ZEA düzeyleri sırasıyla 809.18/500, 7002.45/5000 ve 5473.14/12500 µg/kg olarak ölçüldü (Tablo 4.1). Diğer bir ifade ile hedeflenen kontaminasyonun (25x) gerçekleşme oranı AFB₁, OTA ve ZEA için sırasıyla %162, %140 ve %44 olarak gerçekleşmiştir. Ammonizasyon sonucu distile sudaki AFB₁ (%-78, Şekil 4.1), OTA (%-44, Şekil 4.2) ve ZEA (%-31, Şekil 4.3) düzeylerinde belirgin düşüşler elde edilmiş, fakat ammonizasyon işlemi mikotoksin düzeylerini yasal limitlerin altına indirememiştir.

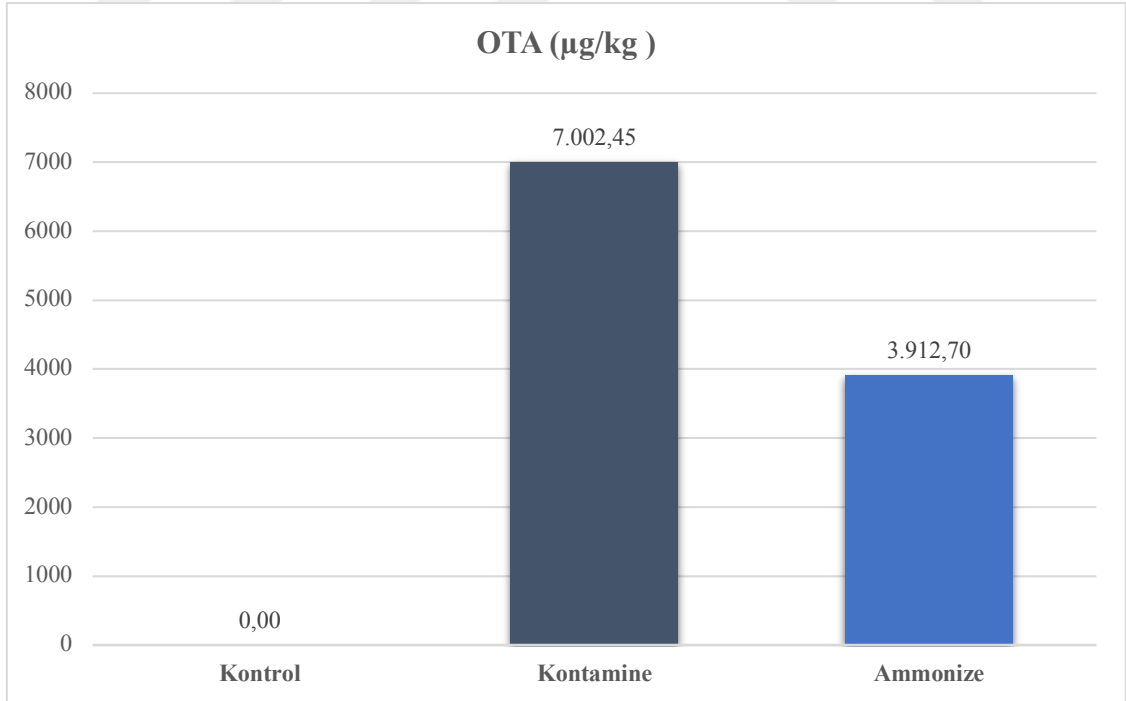
Tablo 4.1. Distile suyun kontaminasyonu ve ardından uygulanan ammonizasyonun mikotoksin düzeylerine etkisi.

Gruplar*				
Mikotoksin	Kontrol (µg/kg)	Kontamine (µg/kg)	Ammonize (µg/kg)	P>F
AFB ₁	0.00 ^c	809.18±49.25 ^a	174.90±13.89 ^b	0.0001
OTA	0.00 ^c	7002.45±433.66 ^a	3912.70±259.77 ^b	0.0001
ZEA	0.00 ^c	5473.14±335.90 ^a	3799.61±98.17 ^b	0.0001

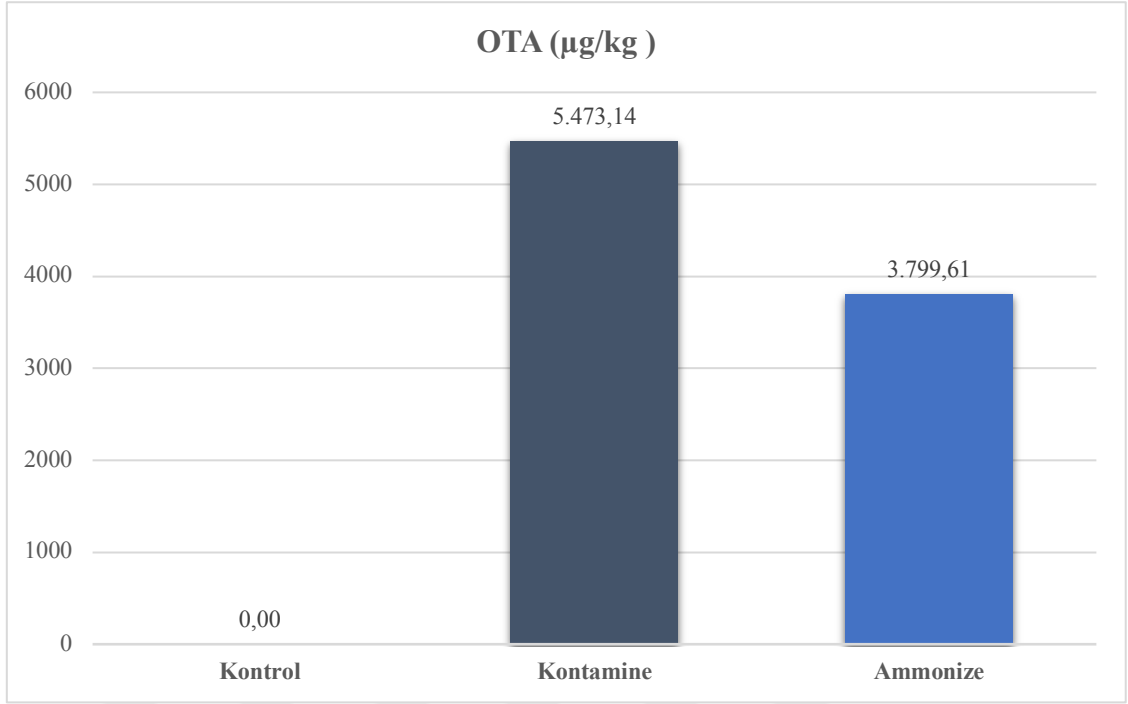
*: Aynı satırdaki gruplar arasındaki farklı üstel harfler istatistiksel farklılığı gösterir (P<0.001).



Şekil 4.1: AFB₁ ile kontamine edilen distile suya uygulanan ammonizasyonun AFB₁ düzeyine etkisi.



Şekil 4.2: OTA ile kontamine edilen distile suya uygulanan ammonizasyonun OTA düzeyine etkisi.



Şekil 4.3: ZEA ile kontamine edilen distile suya uygulanan ammonizasyonun ZEA düzeyine etkisi.

4.2. Analiz İçi ve Analizler Arası Varyasyon

Kontrol grubu yemleri dikkate alındığında AFB₁, OTA ve ZEA için analiz içi varyasyon sırasıyla %13,5, %39,0 ve %45,4, analizler arası varyasyonun sırasıyla %16,7, %63,8 ve %46,0 olduğu hesaplandı (standart sapma x 100 / ortalama).

4.3. Yumurta Tavuğu Yemi

Tablo 4.2 Hiçbir işleme tabi tutulmamış (kontrol), yasal limitlerinin 25 katı düzeyde mikotoksinlerle bulaştırılmış (kontamine) ve kontaminasyon sonrasında normal atmosferik basınç altında 50°C sıcaklıkta 10 gr/kg amonyum bikarbonat ile ammonizasyona tabi tutulan yumurta tavuk yemlerinin (YTY) mikotoksin düzeyleri Tablo 4.2’de gösterilmektedir. AFB₁, OTA ve ZEA düzeyleri yönünden gruplar arasında belirgin farklılıklar bulunmuştur (P<0,0001).

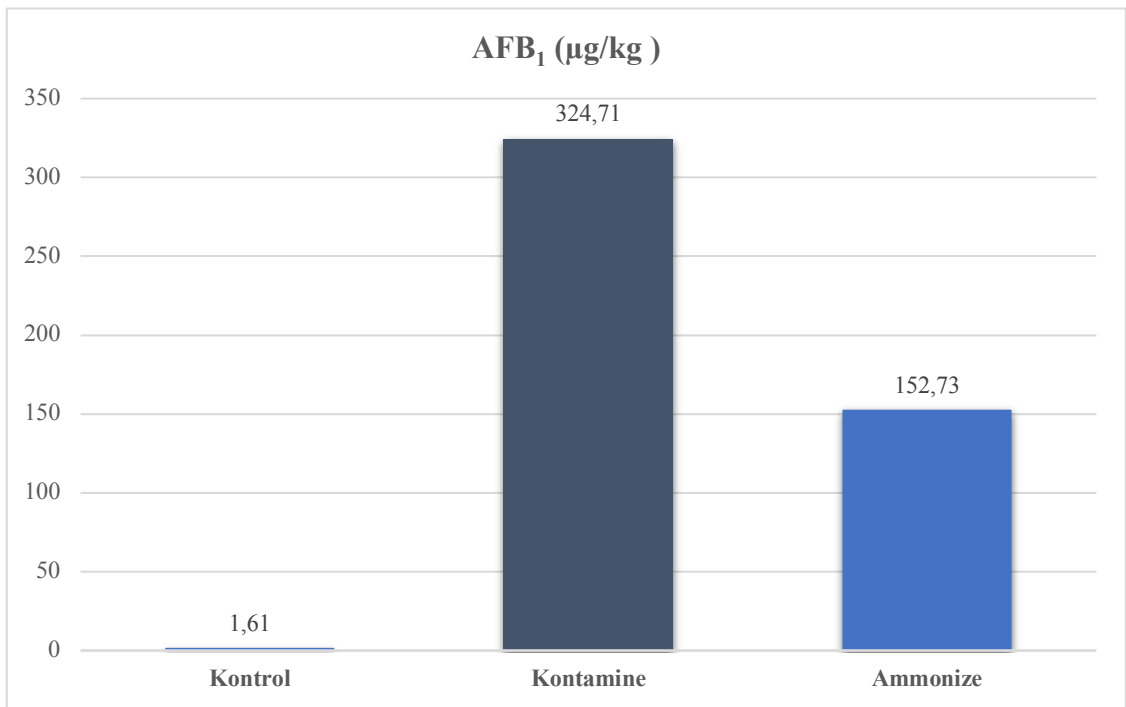
Tablo 4.2. Yumurta tavuğu yeminin mikotoksinlerle kontaminasyonu ve ardından uygulanan ammonizasyonun mikotoksin düzeylerine etkisi

Gruplar*				
Mikotoksin	Kontrol (µg/kg)	Kontamine (µg/kg)	Ammonize (µg/kg)	P>F
AFB ₁	1.61±0.05 ^c	324.71±2.89 ^a	152.73±1.36 ^b	0.0001
OTA	5.47±0.51 ^c	1831.61±51.28 ^a	1267.27±29.11 ^b	0.0001
ZEA	4.73±1.58 ^c	3045.20±94.68 ^a	2383.82±135.13 ^b	0.0001

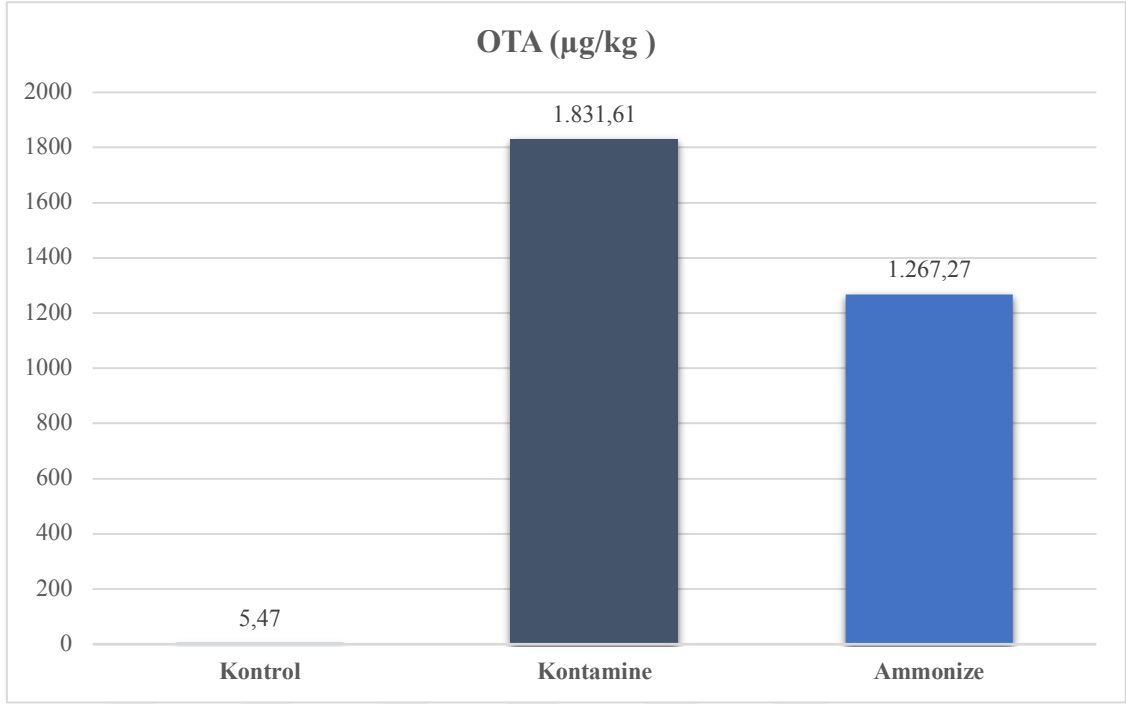
*: Aynı satırdaki gruplar arasındaki farklı üstel harfler istatistiksel farklılığı gösterir (P<0.05).

Kontrol grubundaki yumurta tavuğu yemi, uluslararası standartların belirlediği miktarın çok altında AFB₁, OTA ve ZEA düzeyine sahipti ve sırasıyla AFB₁, OTA ve ZEA içeriği 1.61/20, 5.47/200 ve 4.73/500 µg/kg bulundu (Tablo 4.2). Kontaminasyon sonucu AFB₁, OTA ve ZEA içerikleri hedefelen 25 kat’ın altında olup sırasıyla 325/500,

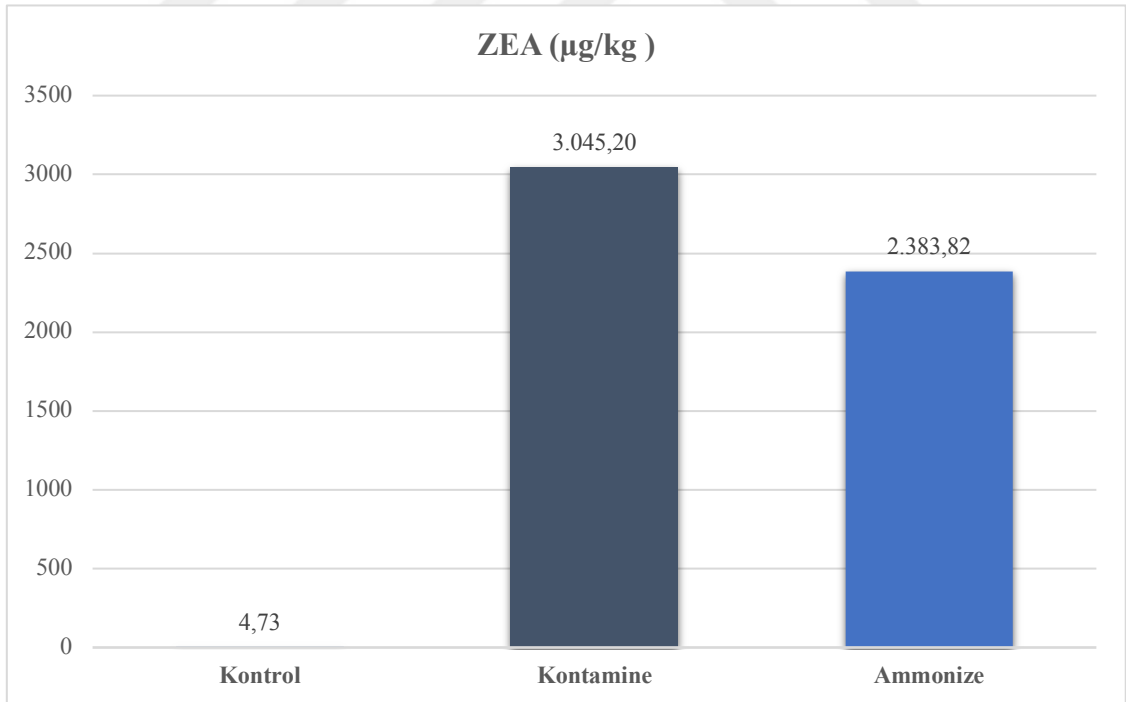
1832/5000 ve 3045/12500 $\mu\text{g/kg}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.2). Diğer bir ifade ile hedeflenen kontaminasyonun (25x) gerçekleşme oranı AFB₁, OTA ve ZEA için sırasıyla %65, %37 ve %24 olarak gerçekleşmiştir. Ammonizasyon sonucu AFB₁ (%-53, Şekil 4.4), OTA (%-31, Şekil 4.5) ve ZEA (%-22, Şekil 4.6) düzeylerinde belirgin düşüşler elde edilmiştir. Ancak, uygulanan ammonizasyon işlemi mikotoksin seviyelerini yasal limitlerin altına indiremede başarılı olmamıştır.



Şekil 4.4: AFB₁ ile kontamine edilen yumurtacı tavuk yemine uygulanan ammonizasyonun AFB₁ düzeyine etkisi.



Şekil 4.5: OTA ile kontamine edilen yumurtacı tavuk yemine uygulanan ammonizasyonun OTA düzeyine etkisi.



Şekil 4.6: ZEA ile kontamine edilen yumurtacı tavuk yemine uygulanan ammonizasyonun ZEA düzeyine etkisi.

4.4. Sütçü İnek Toplam Karma Yemi

Hiçbir işleme tabi tutulmamış (kontrol), yasal limitlerinin 25 katı düzeyde mikotoksinlerle bulaştırılmış (kontamine) ve kontaminasyon sonrasında normal atmosferik basınç altında 50 °C sıcaklıkta 10 gr/kg amonyum bikarbonat ile ammonizasyona tabi tutulan sütçü inek toplam karma yemlerinin (TMR_{Si}) mikotoksin düzeyleri Tablo 4.3.'de görülmektedir. Aflatoksin B₁, okratoksin A ve zearalenon düzeyleri gruplar arasında farklı bulunmuştur (P<0,0001).

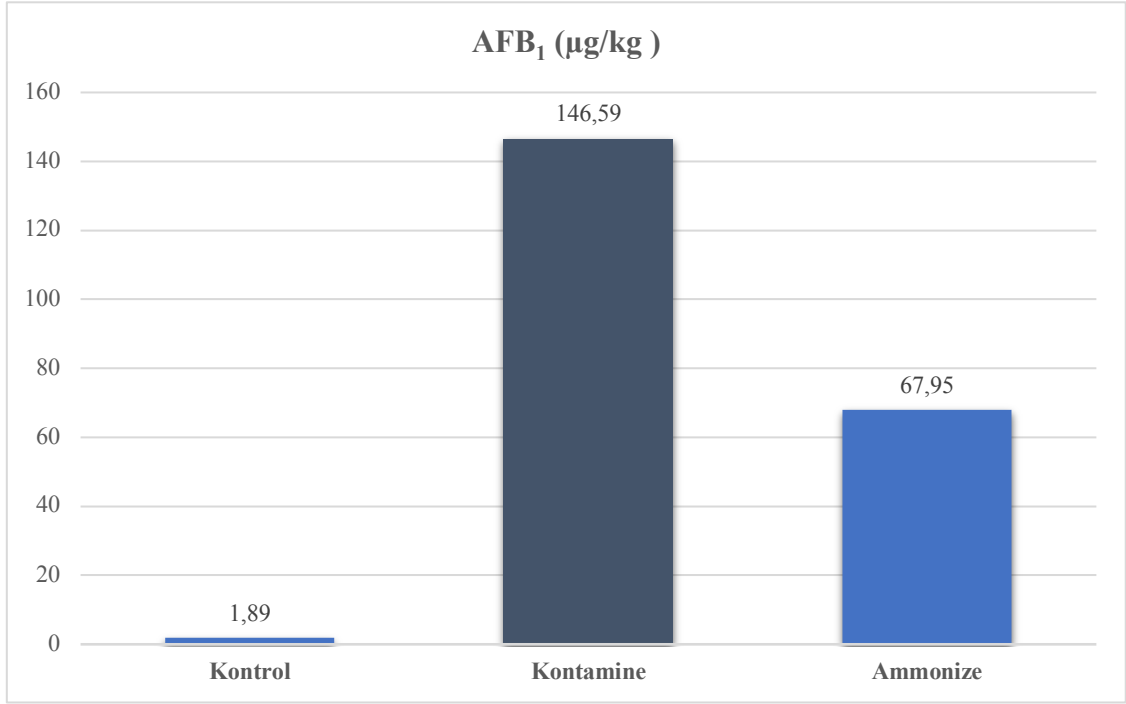
Tablo 4.3. Sütçü inek toplam karma yeminin mikotoksinlerle kontaminasyonu ve ardından uygulanan ammonizasyonun mikotoksin düzeylerine etkisi

Mikotoksin	Gruplar*			P>F
	Kontrol (µg/kg)	Kontamine (µg/kg)	Kontamine+Ammonize (µg/kg)	
AFB ₁	1.89±0.12 ^c	146.59±2.59 ^a	67.95±1,64 ^b	0.0001
OTA	12.28±2.24 ^c	877.65±20.36 ^a	608.04±18.05 ^b	0.0001
ZEA	2.44±1.10 ^c	2827.88±233.81 ^a	2192.87±147.09 ^b	0.0001

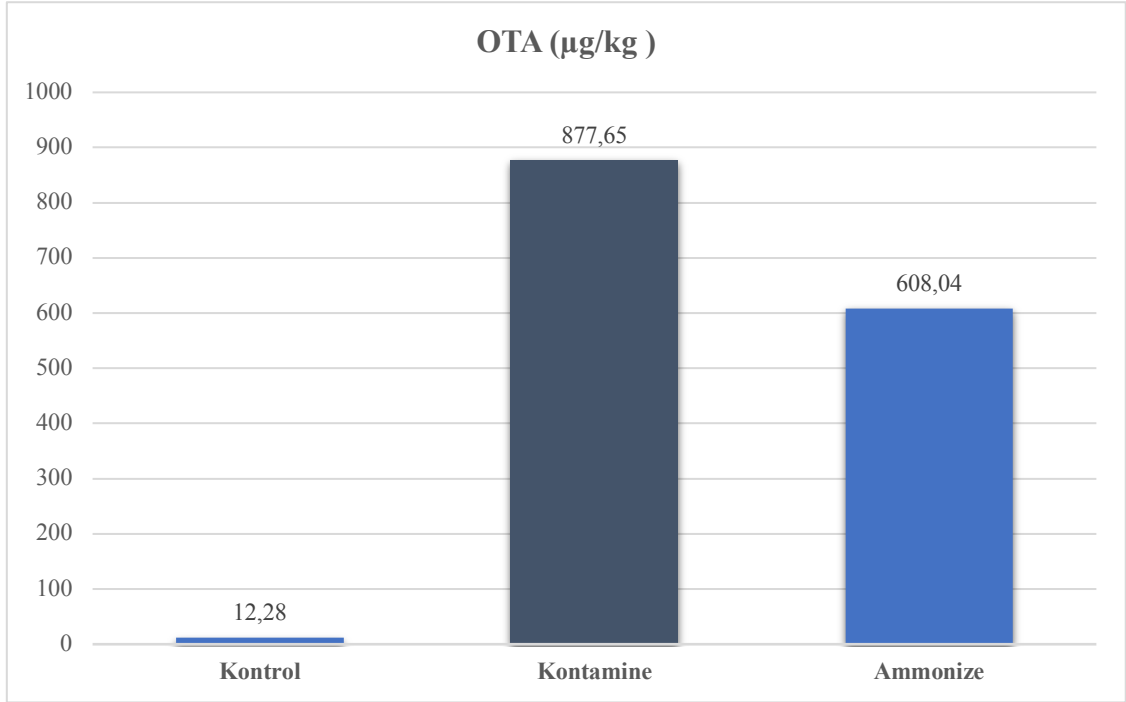
*: Aynı satırdaki gruplar arasındaki farklı üstel harfler istatistiksel farklılığı gösterir (P<0.05).

Kontrol grubundaki TMR_{Si}, uluslararası standartların belirlediği miktarın çok altında AFB₁, OTA ve ZEA düzeyine sahipti ve sırasıyla AFB₁, OTA ve ZEA içeriği 1.89/20, 12.28/200 ve 2.44/500 µg/kg bulundu (Tablo 4.3). Kontaminasyon sonucu AFB₁, OTA ve ZEA içerikleri hedefelen 25 kat'ın altında olup sırasıyla 147/500, 878/5000 ve 2828/12500 µg/kg olarak ölçüldü (Tablo 4.3). Diğer bir ifade ile hedeflenen kontaminasyonun (25x) gerçekleşme oranı AFB₁, OTA ve ZEA için sırasıyla %29, %18 ve %23 olarak gerçekleşmiştir. Ammonizasyon sonucu AFB₁ (%-54, Şekil 4.7), OTA (%-

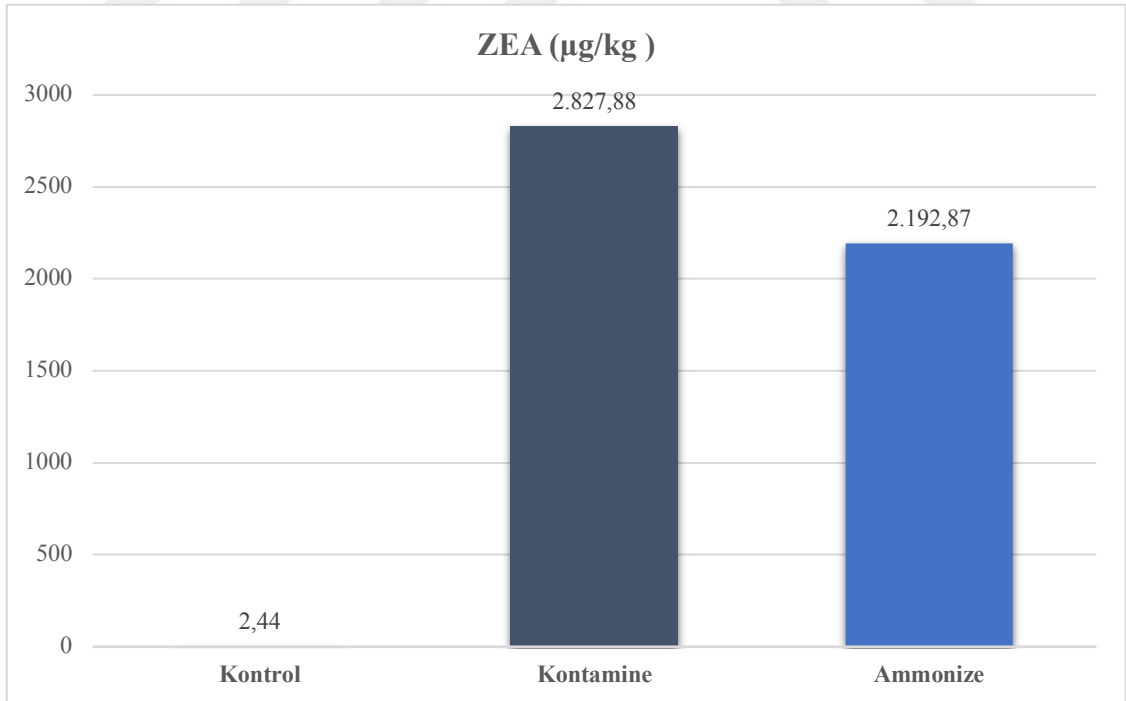
31, Şekil 4.8) ve ZEA (%-22, Şekil 4.9) düzeylerinde belirgin düşüşler elde edilmiştir. Ancak, ammonizasyon işlemi sonrasında mikotoksinlerle kontamine edilmiş TMR_{SI}'de var olan mikotoksin seviyelerini yasal limitlerin altına indirmede başarı elde edilememiştir.



Şekil 4.7: AFB₁ ile kontamine edilen süt sığırları toplam karma yemine uygulanan ammonizasyonun AFB₁ düzeyine etkisi.



Şekil 4.8: OTA ile kontamine edilen süt sığırları toplam karma yemine uygulanan ammonizasyonun OTA düzeyine etkisi.



Şekil 4.9: ZEA ile kontamine edilen süt sığırları toplam karma yemine uygulanan ammonizasyonun ZEA düzeyine etkisi.

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde yaygın olan ve birçok bilimsel çalışmanın odak noktasını oluşturan aflatoksinler, okratoksinler, deoksinivalenol ve zearalenonun hayvanlar üzerinde verim kaybı ve yemden yararlanmada kötüleşme gibi performans parametrelerinin yanı sıra sağlık halini de, teratojenik, hepatatoksik, nefrotoksik, immunotoksik, kanserojenik ve genotoksik etkiler oluşturarak olumsuz etkiler.^{80, 82, 83} Mikotoksinlerin bu etkilerinden kurtulmak için kontamine olmuş gıdaların işleme veya depolama aşamalarında fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere çeşitli detoksifikasyon/eliminasyon yöntemleri bulunmaktadır.

Mikotoksinlerin dekontaminasyonu veya eliminasyonu için uygulanan yöntemlerde amaç; mikotoksinleri bir bağlayıcı ile bağlama veya fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle mikotoksinlerin kimyasal yapılarında değişiklikler meydana getirerek onları daha az toksik olan bileşiklere ve/veya toksik olmayan başka bir moleküler yapıya dönüştürmeyi hedeflemektedir. Kimyasal yöntemlerle dekontaminasyon/eliminasyon mekanizması mikotoksinlerin yapısında bulunan lakton halkalarındaki epoksi terminal uçları veya furan halkalarındaki çift bağlar hedef alınarak sırasıyla hidroksilasyon, dekarboksilasyon ve oksidasyon işlemlerine maruz bırakmaya yöneliktir.

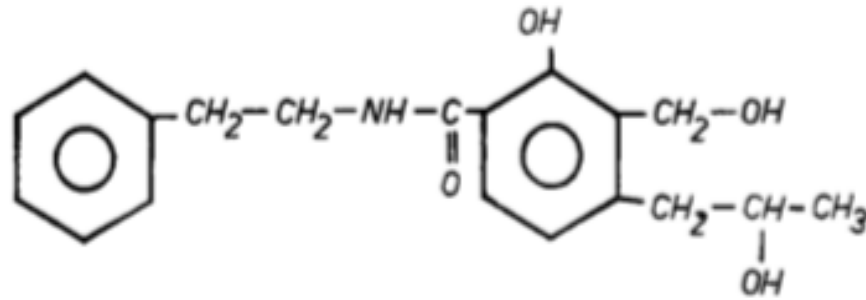
Bu yöntemlerden birisi olan ammonizasyon yönteminde temel amaç mikotoksinlerde var olan lakton halkalarındaki epoksi uçlarının hidroksilasyonla açılması ve bu aşamayı takiben dekarboksilasyonla CO₂ molekülünün uzaklaştırılması sonrasında toksik olmayan veya daha az toksik olan yeni moleküllerin oluşturulmasına dayanmaktadır.^{237, 238, 241} Bu çalışmada, kimyasal yapılarında lakton halkası içeren AFB₁, OTA ve ZEA ile deneysel olarak yüksek düzeyde kontamine edilmiş yem maddelerinde, NH₄HCO₃ ile uygulanan ammonizasyon yöntemi sonrasında kontaminasyon konsantrasyonlarının yasal limitlerin altına indirilmesi hedeflenmiştir.

AFB₁ ve AFB₂ siklopentan ile birleşmiş bir difuranokumarosiklopentanon yapısı içerisinde bir lakton halkası bulundururken, AFG₁ ve AFG₂ laktonla birleşmiş bir difuranokumarolaktondur.⁹⁴ AFB₁, AFG₁ furan halkasının C8,9 noktasında bir çift bağ içerirken, AFB₂ ve AFG₂'nin C8,9 noktasında çift bağ bulunmamaktadır (Şekil 2.2). AF'ler polar olmayan solüsyonlarda çözünmezken, su içerisinde hafif (10-20 µg/mL) hafif çözünebilir. Polar organik solüsyonlar (kloroform, metanol gibi) içerisinde özellikle dimetil sülfoksitte rahat bir şekilde çözünür.¹⁰² Oksijen varlığında UV ışığında, uç pH larda (<3 veya >10), okside edici ajanların varlığında kararsız yapıdadır.¹⁰³ AF'lerin detoksifikasyon/eliminasyon çalışmalarında oksidasyon ilkesine dayalı olan kimyasal yöntemlerden birisi olan ozonlamada AFB₁ ve AFG₁ düşük konsantrasyonlarda okside olabilirken, AFB₂ ve AFG₂ daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duymaktadır.²³⁵ Ayrıca, fiziksel yöntemlerden mikrodalga uygulamalarında da C8,9 noktasındaki çift bağlar uygulanacak dalga boylarında farklılıkların oluşmasına neden olabilmektedir.^{209,}
²¹⁰ Ammonizasyon işlemi sonrasında AFB₁'den AFD₁ ve dihidro-4-hidroksi-6-metoksifuro [2,3-b] benzofuran gibi iki yeni bileşik meydana gelir (Şekil 2.8).²³⁸ Ammonizasyon işleminde hedef, lakton halkalarında bulunan epoksi terminal uçları olduğu için dekontaminasyon/eliminasyon çalışmasında diğer fiziksel ve kimyasal yöntemlerde meydana gelen konsantrasyon farklılıklarının bu yöntemde ortaya çıkmayacağı düşünülmektedir.

OTA, isokumarin yapısında olan OTα'nın L-β-fenilalaninle peptit bağı ile bileşik oluşturduğu ve yapısında lakton halkası bulunduran bir mikotoksindir (Şekil 2.3). Polar organik solüsyonlarda (kloroform, metanol ve etanol) çözünme özelliğine sahiptir, OTA alkali ortamlarda lakton halkarında açılma gözlenmektedir fakat bu reaksiyon geri dönüşümsüzdür.¹²⁹ Chelkowski ve ark. (1981) yaptığı ammonizasyon çalışmasında OTA'da lakton halkasının yıkılmasında sonra C₁₉H₂₃NO₄ kimyasal yapısına sahip

bir yapının ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (Şekil 5.1).²⁵⁸ OTA lakton halkasında var olan epoksi terminal ucu ammonizasyon uygulamasıyla hidrolizi sonrasında meydana gelen metabolitin LD₅₀ düzeyi 200 µg/yumurta olarak belirlenmiştir.²⁵⁸ Dolayısıyla, ammonizasyon uygulaması ile OTA seviyelerinde azalma olacağı beklentisi doğrulanmaktadır.

ZEA ise resorsiklik asit lakton yapısında ve lakton halkasında bir epoksi terminal ucu bulundurmaktadır (Şekil 2.5). Önceki yıllarda amonyum solüsyonlarının gaz veya sıvı formları ile YB/YS ve AB/OS şartlarında, AFB₁ üzerinde yapılan ammonizasyon çalışmalarında²³⁷⁻²⁴⁵ ortaya konulan hidrolizasyon ve dekarboksilasyon reaksiyon basamakları hedef alınarak, AF'lerin yasal limitlerin altına indirilmesi hedeflenmiştir.



Şekil 5.1. Uygulanan ammonizasyon sonrasında OTA'dan elde edilen metabolitin tahmini kimyasal yapısı.²⁵⁸

Tablo 5.1'de literatürde farklı düzeyde farklı yemlerde farklı mikotoksinlere karşı uygulanan ammonizasyon çalışmalarından elde edilen etkinlik düzeyleri özetlenmiştir. Bu çalışmaların çoğunda AFB₁ hedef alınmış olup okratoksin²⁵⁸ ve zearalenonun^{232, 258} da ilgi konusu olduğu görülmektedir. Ancak, ammonizasyonla OTA seviyelerinde

hedeflenen yıkımlanma gözlenirken ZEA seviyelerinde belirgin bir yıkımlanma tespit edilememiştir.^{232, 258}

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda YB/YS prosedüründe 1,4-3,4 atmosferik basınç (Atm) ve 45-121 °C sıcaklıkları kullanılarak toplam AF miktarlarında yaklaşık olarak %52-99 oranında yıkımlanma gerçekleştirilmiştir (Tablo 5.1). Bu uygulamalarda, amonyum bileşiklerinin dekompozisyonu sonucunda meydana gelen NH_4^+ veya NH_3 'ün 30 dakika- 3 saat süreyle etki ederek lakton halkarındaki epoksi terminal uçlarını etkili bir şekilde açmasını sağlamakta ve yıkımlanan AF'lerin orijinal moleküllerine dönüşlerini engelleyerek yıkımlanma oranlarının sabit kalması sağlanmıştır. YB/YS prosedürüne karşılık uygulanan AB/OS uygulamalarında 1 Atm ve 15-50 °C sıcaklıklar kullanılmış ve mikotoksin seviyelerinde yaklaşık olarak <%50-%99 oranlarında yıkımlanma elde edilmiştir (Tablo 5.1) fakat bu uygulamalarda 24 saat- 10 hafta gibi geniş zaman aralıklarına ihtiyaç duyulmuştur.

Saha şartlarında konsantre yemlerde var olan mikotoksin kontaminasyonlarına yönelik tedbirler alınırken, kaba yemlerin mikotoksin kontaminasyonlarına katkılarının fazla olacağı da bir ihtimaldir. Bu yüzden çalışmada kaba yemleri de barındıran TMR_{si} kullanılmıştır. Ancak, saha şartlarında ammonizasyon metodunun günümüz şartlarında kaba yemlerde uygulanması zor gözükmemektedir.

LC-MS/MS ile yapılan analiz sonuçları, AFB_1 , OTA ve ZEA ile kontamine edilen KDS, TMR_{si} ve YTY'ye 24 saat süreyle uygulanan ammonizasyon sonrasında AFB_1 için sırasıyla %78, %54 ve %53; OTA için sırasıyla %44, %31 ve %31; ZEA için sırasıyla %31, %22 ve %22 düzeylerinde belirgin düşüşler elde edilmiştir (Şekil 5.2, Şekil 5.3 ve Şekil 5.4) ($P < 0.05$). Elde edilen bulgular; ammonizasyon mekanizmasının AFB_1 , OTA yanı sıra ZEA'nın kimyasal yapısındaki rezosirklik asit laktondaki epoksi terminal uçlarına aynı mekanizma ile etki edeceği beklentimizi doğrulamaktadır (Şekil 4.1- 4.9).

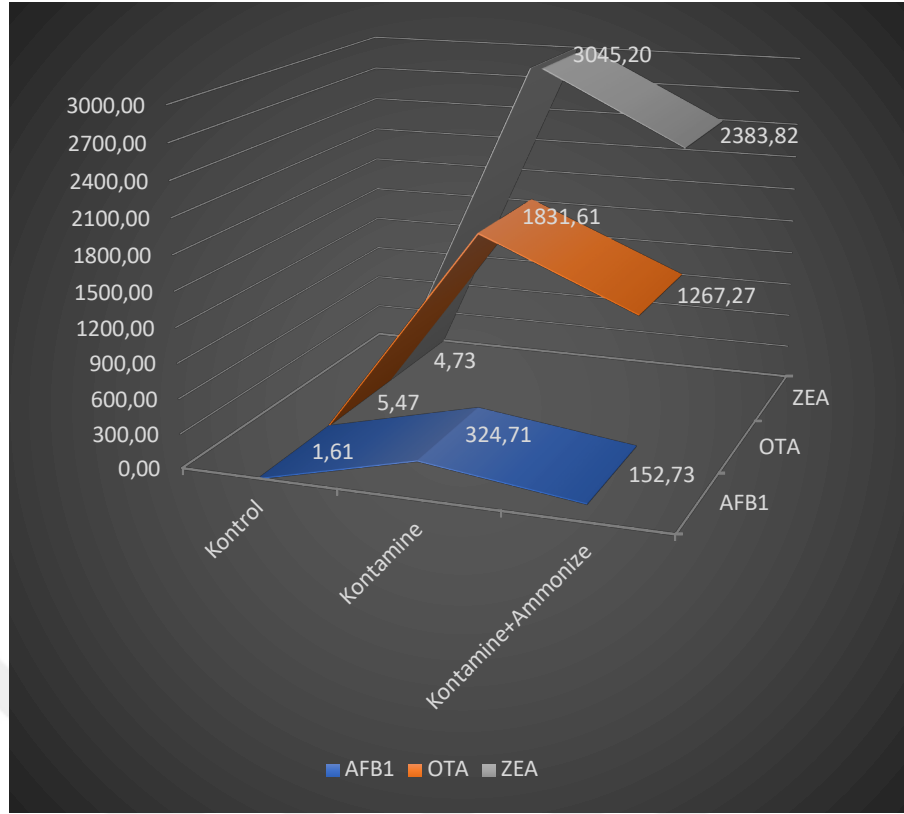
Amonyum bikarbonatın (NH_4HCO_3) 25 °C sudaki %1 çözeltisi yaklaşık olarak 7.8 pH' ya sahiptir.²⁵⁹ Ayrıca, Sutter ve Mazzotti (2017) yaptığı çalışmada NH_4HCO_3 hava ile temasının aksine $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-H}_2\text{O}$ ikili sisteminde NH_4^+ ve HCO_3^- aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir.²⁶⁰ Sıvı solüsyonun ammonizasyonu için ilave ettiğimiz 1.25 gr ağırlığındaki NH_4HCO_3 50 mL distile su içerisinde %2,5 konsantrasyona sahiptir. NH_4HCO_3 'ın iyonize olmasıyla ortaya çıkan HCO_3^- yaklaşık 0,02 M %1,92 konsantrasyona sahiptir. Bu durum mikotoksinlerin yıkımlanması için ammonizasyonun yanı sıra ekstra bir alkali ortam oluşmasına ve bu sebeple hidrolizasyon ile lakton halkalarındaki epoksi uçlarının açılmasına neden olmaktadır fakat bu etki diğer alkali bileşiklere göre oldukça düşüktür.¹⁰⁴ Gomma (1987) tarafından %5 sodyum bikarbonat gibi hafif alkali solüsyon ile yapılan bir çalışmada aflatoksinlerde %10 düzeylerinde yıkımlanma olduğu belirlenmiştir.²⁶¹ Bu bilgi doğrultusunda NH_4HCO_3 ile oluşturulan alkali ortam, NH_4HCO_3 sıvı ortamda NH_4^+ ve HCO_3^- iyonları lakton halkalarındaki epoksi terminal uçların hidrolizasyonla açılması sürecini hızlandırarak çalışmamızda hedeflenen yıkımlanma mekanizmasına az da olsa bir katkısının olduğu düşünülmektedir.

Amonyum bikarbonat 35-60 °C sıcaklıkta termik parçalanmayla $\text{NH}_3(\text{g})$, $\text{H}_2\text{O}(\text{g})$ ve $\text{CO}_2(\text{g})$ açığa çıkarmaktadır. Çalışmamızda TMR_{si} ve YTY kontaminasyon işleminden sonra 60 °C sıcaklıkta 3 gün süre ile tutularak nem içeriği %100 oranında uzaklaştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre %5' e kadar olan amonyum konsantrasyonlarında sıcaklık ve zamana bağlı olarak etkili bir aflatoksin yıkımlanması için %10-20 arasında bir nem içeriğine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.¹⁰⁴ Çalışmada kullanılan NH_4HCO_3 parçalanması ile açığa çıkan H_2O , çalışmada kullanılan mikotoksinlerin yasal limitlerin altına inmesinde gerekli olan etkiyi oluşturamadığı düşünülmektedir. Ayrıca, hem NH_4HCO_3 hava ile teması sonrası parçalanma ürünlerinden birisi olan hem de mikotoksinlerin yıkımlanmasındaki

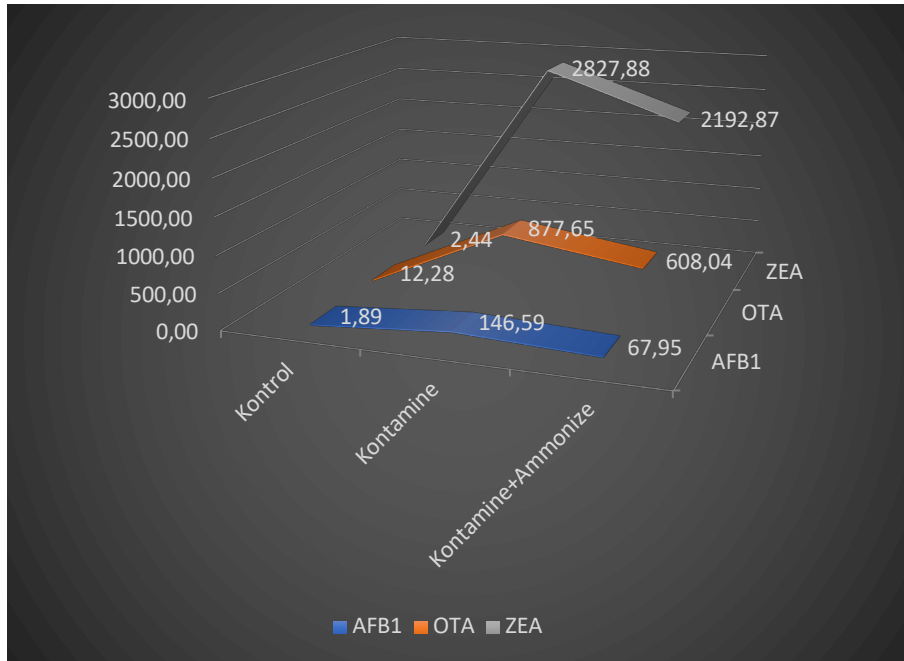
dekarboksilasyon basamağındaki CO₂ çıkışı ortamdaki CO₂ konsantrasyonunu kapalı ortamda artması, NH₄HCO₃ parçalanmasından ortaya çıkan H₂O ile birleşerek karbonik asit (H₂CO₃) oluşumunu tetikleyerek ortamı asitleştirebilir, bu durumda AFB₁'den hidrolizasyon aşamasından sonra oluşan aflatoksinin suda çözünebilir formu olan β-keto asit geri dönüşümlü olarak tekrar AFB₁'e dönüşebilir.²⁶² Bu durum mikotoksinlerin yasal limitlerin altına inmemesinde etkili olan ilave bir sebep olabilir.

Tablo 5.1: Önceki yıllarda yapılan ammonizasyon çalışmalarında elde edilen yıkımlanma oranları.

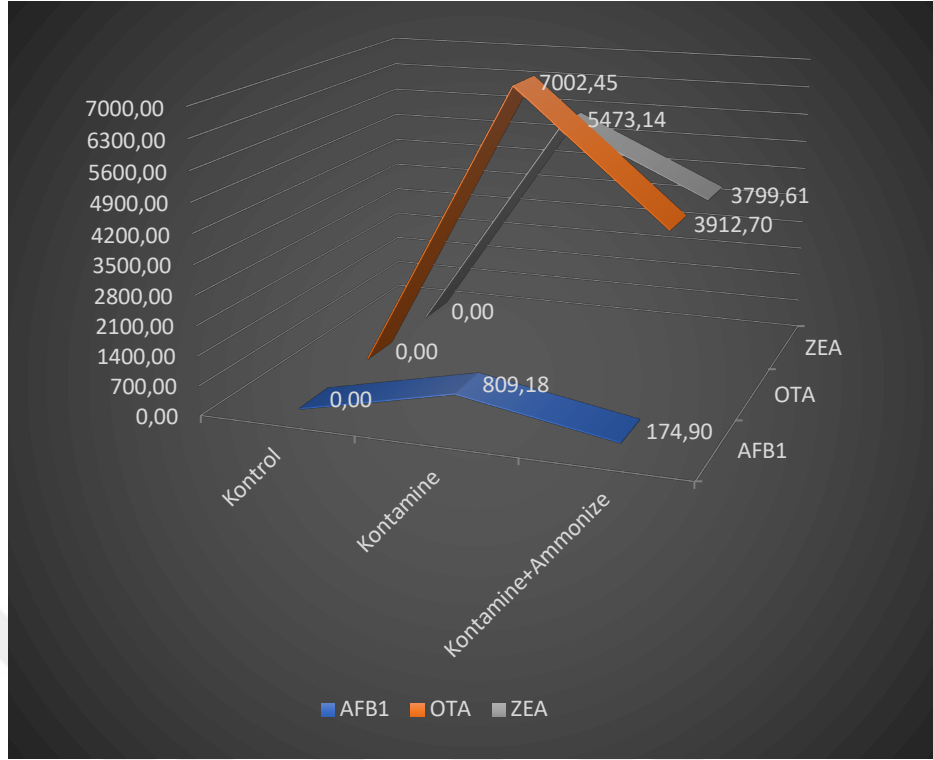
Ammonizasyon (%)	Yem	Mikotoksin	Sıcaklık (°C)	Basınç (Atm)	Süre	Yıkımlanma (%)	Referans
4	PTK	AFB ₁	100	2.72	30 dk	99	263
0.5-2.0	Mısır	AF	22	1	24 sa	60-99	264
0.5-1.5	Mısır	AFB ₁	22-25	1	13-15 g	99	265
1.5	Mısır	AFB ₁	32-43	1	13 g	91	239
0.5-3.0	Mısır	AFB ₁	25-60	1	2-20 g	97-99	253
0.5-2.0	Mısır	AFB ₁	25	1	18 g	99	266
1.5	Mısır	AFB ₁	49	1	12 g	99	267
4	PTK	AFB ₁	65-82	1.4-1.8	30 dk	93-99	268
2	Mısır	FB ₁	50	1	4 g	≤ 50	269
1-1.5	PTK	AFB ₁	18-23	1	21 g	88-98	242
3	Mısır	ZEA	50	1	16 sa	65-80	232
0.5-1.5	Mısır	AFB ₁	25	1	13 g	99	270
2	PTK	AFB ₁	43	1	15 g	99	271
1.5-2	Mısır	AFB ₁	40-121	1.1-3.7	60 dk	52-67	272
2	Mısır	AFB ₁	25	1	24 sa	88	273
2	Mısır	AFB ₁	20-45	1	2-10 hf	80-99	258
2	Mısır	ZEA	20-50	1	28-42 g	55-90	258
2	Mısır	OTA	45	1	10 g	90	258
2	PTK	AFB ₁	75-115	2.3-3.4	30 dk-3 sa	99.6	246
0.25-2	Mısır	AF	25	1	24 sa	40-93	245
2	Mısır	FB ₁	50	1	4 g	≤50	252
1,5	Mısır	AFB ₁	15-33	1	6 g	75	274



Şekil 5.2: YTY yemi ammonizasyon işleminin AFB₁, OTA, ZEA seviyelerinde meydana getirdiği değişim.



Şekil 5.3: TMR_{si} ammonizasyon işleminin AFB₁, OTA ve ZEA seviyelerinde meydana getirdiği değişim.



Şekil 5.4: KDS ammonizasyon işleminin AFB₁, OTA ve ZEA seviyelerinde meydana getirdiği değişim.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada hem YTY hem de TMR_{si} yaygın olarak rastlanan mikotoksinlerin yasal sınırlarının 25 katı düzeyinde kontaminasyon hedeflenmiştir, KDS'nin LS/MS-MS ile yapılan analizi sonucunda AFB₁, OTA ve ZEA düzeyleri sırasıyla 809.18/500, 7002.45/5000 ve 5473.14/12500 µg/kg olarak ölçüldü (Tablo 4.1). Diğer bir ifade ile hedeflenen kontaminasyonun gerçekleşme oranı AFB₁, OTA ve ZEA için sırasıyla %162, %140 ve %44 olarak belirlenmiştir.

Bir gün süre ile NH₄HCO₃ kullanılarak yapılan ammonizasyonla mikotoksinlerin detoksifikasyonu, AFB₁, OTA ve ZEA'nın kontaminasyon seviyelerinde belirgin düşümlere neden olmuştur. Deneysel mikotoksin kontaminasyon seviyeleri ammonizasyon sonrasında yasal limitlerin altına inmemiştir.

KDS, TMR_{si} ve YTY 24 saat süreyle uygulanan ammonizasyon sonrasında AFB₁ için sırasıyla %78, %54 ve %53; OTA için sırasıyla %44, %31 ve %31; ZEA için sırasıyla %31, %22 ve %22 düzeylerinde belirgin düşümler elde edilmiştir (P<0.05).

Bu çalışmada, ammonizasyon sonrasında mikotoksinlerde bir yıkımlanmanın olduğunu tespit etmiş olup, ammonizasyon sonrasında meydana gelen yeni moleküler yapılar tespit edilmemiştir. Önceki yıllarda yapılan çalışmalar, AFB₁ ve OTA için yeni moleküler yapılar belirleyebilmişken, ZEA için böyle bir durum söz konusu değildir. İlerleyen zamanda moleküler düzeyle yapılacak çalışmalarla bu moleküler yapılar belirlenebilir.

Yapılan çalışmada, ammonizasyon işleminin yem besin madde bileşimlerine nasıl bir etki yaptığına yönelik inceleme yapılmamıştır. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda besin madde içeriklerinde az da olsa farklılıklar gözlenmiştir fakat dekontaminasyon/eliminasyon için uygulanacak konsantrasyon farklılıklarının besin madde bileşimlerine nasıl etki ettiği gelecekteki çalışmalarda belirlenebilir.

Önceki yıllarda ammonizasyon uygulamalarının ZEA üzerine etkin olmadığına dair bilgiler bulunmaktadır. Bu çalışmada, ZEA'da anlamlı yıkımlanmalar elde edilmiştir. Elde edilen yıkımlanma ürünleri belirlenerek, bu yıkımlanma ürünlerinin toksik etkilerinin belirlenmesine gelecekteki çalışmalarda yer verilebilir.

Yapılan çalışmada, canlı hayvan üzerinde yedirme deneyleri yapılmamıştır. İlerleyen dönemde bu konuya paralel olarak yedirme çalışmalarıyla birlikte, ammonizasyon işlemi uygulanan ve uygulanmayan yemlerin canlı hayvan kan parametleri ve biyokimyasal değerleri üzerine olan etkileri belirlenebilir ve bu hayvanlardan elde edilen et, süt, yumurta gibi gıdalarda kalıntı çalışmalarına bakılabilir.

Yapılan çalışmada, deneysel olarak kontamine edilmiş yem maddelerindeki mikotoksin seviyeleri için aynı konsantrasyon düzeyindeki NH_4HCO_3 ile eliminasyonunda kayda değer azalmalar elde edilmiştir. İlerleyen zamanlarda yapılacak çalışmalarda, farklı mikotoksinler için farklı NH_4HCO_3 konsantrasyonları ve uygulama sürelerine yönelik belirlemeler yapılabilir.

Kimyasal dekontaminasyon/eliminasyon yöntemleri fiziksel yöntemlere kıyasla daha etkili olarak görülmektedir. NH_4HCO_3 kolay elde edilebilir olmasının yanı sıra uygulanmasında profesyonel bir beceri gerekmediği için saha şartlarında uygulanması kolay olmakla birlikte, yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre 24 saatlik uygulamanın mikotoksin seviyelerinde yasal limitlerin altına inmesini sağlamadığı için saha şartlarında uygulanabilirliği şu an için görülmemektedir. Kontaminasyon riski olan yemlerin hayvanlara yedirilmeden önce hayvanlar üzerinde oluşabilecek negatif etkileri en aza indirmek etmek için bağlayıcıların kullanılması uygun bir yöntem olarak görülmektedir.

Ammonizasyon alışmaları mikotoksinlerin kimyasal yapılarında var olan ortak noktalara etki ederek eliminasyon etkinliği gösterdiği için, çalışmalarda kullanılacak mikotoksinlerin kimyasal yapılarının detaylı bir şekilde irdelenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Moss MO. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Smith JE, Henderson RS (eds). *Mycotoxins and Animal Foods*. Florida, CRC Press, 1991:37-56.
2. Bennett JW. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia*, 1987, 100:3-5.
3. Blount WP. Turkey "X" disease. *Turkeys*, 1961, 9:52, 55-58, 61, 77.
4. Forgacs J. Mycotoxicoses-the neglected diseases. *Feedstuffs*, 1962, 34:124-134.
5. Ismaiel AA, Papenbrock J. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, 2015, 3:492-537.
6. Kaushal KS, Sinha SP. Mycotoxins. *Asean Food J*, 1993, 8:87-93.
7. Kacaniova M. Feeding soybean colonization by microscopic fungi. *Trakya Univ J Sci*, 2003, 4:165-168.
8. Seyedmousavi S, Bosco SMG, Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes RR, Jacobsen ID, Jensen HE, Martel A, Mignon B, Pasmans F, Pieckova E, Rodrigues AM, Singh K, Vicente VA, Wibbelt G, Wiederhold N, Guillot J. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Med Mycol*, 2018, 56:165-187.
9. Burnside CE. Fungous diseases of the honey bee. *US Department of Agriculture Technical Bulletin*, 1930:149.
10. Arne P, Thierry S, Wang D, Deviller M, Loc'h G, Desoutter A, Femenia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J. *Aspergillus fumigatus* in poultry. *Int J Microbiol*, 2011, 2011:746356.
11. Sharman MJ, Mansfield CS. Sinonasal aspergillosis in dogs: a review. *J Smal Anim Pract*, 2012, 53:434-444.

12. Putteney SB, Wang Y, Forsberg NE. Mycotic infections in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnostics, and prevention of hemorrhagic bowel syndrome. In: *Southwest Animal Nutrition Conference*. Tuscon AZ, University of Arizona, Department of Animal Science, 2003:49-63.
13. Jemmali M. Les moisissures et leurs toxines. *La Recherche*, 1979, 10:124-131.
14. Leibetseder J. Die bedeutung der mykotoxine für mensch und tier. *Ernähr Nut*, 1989, 13:739.
15. Tunail N. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. 2. Baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Sim Matbaası, 2000:1-50.
16. Legan JD. Cereals and cereal products. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW (eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Gaithersburg, MD, USA, Aspen Publishers Inc, 2000:759-783.
17. Miller JD. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *J Stored Prod Res*, 1995, 31:1-16.
18. D'Mello JPF, Macdonald AMC. Mycotoxins. *Anim Feed Sci Tech*, 1997, 69:155-166.
19. Magan N, Sachis V, Aldred D. The role of spoilage fungi in seed deterioration. In: Aurora DK (eds). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*, New York, Marcell Dekker, 2004:311-323.
20. Cotty PJ, Jaime-Garcia R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol*, 2007, 119:109-115.
21. Milani JM. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Vet Med*, 2013, 58:405-411.

22. Mostrom MS. Zearalenone. In: Gupta RC (eds). *Veterinary Toxicology*, 2nded. London, Elsevier, 2012:1266-1271.
23. Scott W. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv Food Res*, 1957, 7:83-127.
24. Pixton S. Moisture content-its significance and measurement in stored products. *J Stored Prod Res*, 1967, 3:35-47.
25. Gimeno A, Martins ML. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Humans and Animals. Miami, Special Nutrients Inc, 2006:11-15.
26. Magan N, Medina A, Aldred D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol*, 2011, 60:150-163.
27. Bullerman LB, Schroeder LL, Park KY. Formation and control of mycotoxins in food. *J Food Protect*, 1984, 47:637-646.
28. Magan N. Fungi in extreme environments. In: Kubicek CP, Druzhinina IS (eds). Environmental and Microbial Relationships, *The Mycota IV*, 2nd. Berlin, Springer-Verlag, 2007:85-103.
29. Diener UL, Davis ND. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 1966, 56:1390-1393.
30. Shih CN, Marth EH. Experimental production of aflatoxin on brick cheese. *J Milk Food Technol*, 1972, 35:585-587.
31. Northolt MD, van Egmond HP, Paulsch WE. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J Food Prot*, 1979, 42:485-490.

32. Mirocha CJ, Pathre SV, Christensen CM. Chemistry of *Fusarium* and *Stachybotrys* mycotoxins. In: Wyllie TD, Morehouse LG (eds) Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook, vol 2. 1977:365-420.
33. Zwierzchowski E, Przybylowicz M, Obremski K, Zielonka L, Skorska-Wyszynska E, Gajecka M, Polak M, Jakimiuk E, Jana B, Rybarczyk L, Gajecki M. Level of zeralenon in blood serum and lesions in ovarion follicles of sexually immature gilts in the course of zeralenone mycotoxicosis. *Pol J Vet Sci*, 2005, 8:209-218.
34. Liu J, Sun L, Zhang N, Zhang J, Guo J, Li C, Rajput SA, Qi D. Effects of nutrient in substrates of differen grains on aflatoksin B₁ production by *Asperggilus flavus*. *Biomed Res Int*, 2016, 20167232858-10 pages.
35. Maggon KK, Gupta SK, Venkitasubramanian TA. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol Rev*, 1977, 41:822-855.
36. Lee EGH, Townsley PM, Walden CC. Effect of bivalent metals on the production of aflatoxin in submerged cultures. *J Food Sci*, 1966, 31:432-436.
37. Mateles RI, Adye JC. Production of aflatoxins in submerged culture. *Appl Microbiol*, 1965, 13:208-211.
38. Davis ND, Diener UL, Agnihotri VP. Production of aflatoxins B₁ and G in chemically defined medium. *Mycopathol Mycol Appl*, 1967, 31:251-256.
39. Maggon KK, Gopal S, Venkitasubranian TA. Effect of trace metals on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Biochem Physiol Pflanz*, 1973, 164:523-530.
40. Tulpule PG. Afiatoxicosis. *Indian J Med Res*, 1969, 17:102-114.
41. Fanelli C, Fabbri AA. Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia*, 1989, 107:115-120.

42. Naik M, Modi V, Patel NC. Studies on aflatoxin synthesis in *Aspergillus flavus*. *Indian J Exp Biol*, 1970, 8:345-346.
43. Reddy TV, Viswanathan L, Venkitasubramanian TA. High aflatoxin production on a chemically defined medium. *Appl Microbiol*, 1971, 22:393-396.
44. Reddy TV, Viswanathan L, Venkitasubramanian TA. Factors affecting aflatoxin production on a synthetic medium. *Biochem J*, 1972, 128:61.
45. Leaich LL, Papa KE. Aflatoxins in mutants of *Aspergillus flavus*. *J Natl Cancer Inst*, 1974, 52:223-230.
46. Payne GA, Hagler Jr. WM. "Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media,". *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46:805-812.
47. Davis ND, Diener UL. "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources,". *J Appl Microbiol*, 1968, 16:158-159.
48. Mellon JE, Dowd MK, Cotty PJ. "Substrate utilization by *Aspergillus flavus* in inoculated whole corn kernels and isolated tissues," *J Agric Food Chem*, 2005, 53:2351-2357.
49. Bennett JW, Lee LS, Gaar GG. Effect of acetone on production of aflatoxin and versicolorin pigments by resting cell cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 1976, 58:9-12.
50. Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *Int J Food Microbiol*, 2009, 132:100-108.
51. Hesseltine CW. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. In Rodricks JV (eds). *Mycotoxins and other fungal related food problems*.

- Advances in Chemistry Series Vol. 149. Washington, DC, American Chemical Society, 1976:1-22
52. Panagiotou G, Granato Villas-Boas S, Christakopoulos P, Nielden J, Olsson L. Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *J Biotechnol*, 2005, 115:425-434.
53. Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *Int J Food Microbiol*, 2010, 143:218-225.
54. Giorni P, Battilani P, Petri A, Magan N. Effect of a_w and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *Int J Food Microbiol*, 2008, 122:109-113.
55. Niehaus WG Jr., Dilts RP. Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *J Bacteriol*, 1982, 151:243-250.
56. Wells JM, Uota M. Germination and growth of five fungi in low-oxygen and high-carbon dioxide atmospheres. *Phytopathology*, 1970, 60:50-53.
57. Zareddetto S. Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh filled pasta. *Food Microbiol*, 2005, 22:367-371.
58. Sanders TH, Davis ND, Diener UL. Effect of carbon dioxide, temperature and relative humidity on aflatoxin production in peanuts. *J Amer Oil Chem Soc*, 1968, 45:683-685.
59. Lander KE, Davis ND, Diener UL. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Phytopathology*, 1967, 57:1086-1090.

60. Paterson RRM, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res Int*, 2010, 43:1902-1914.
61. *World Mycotoxin Survey*. The Global Threat. January to September 2018:1-5.
62. Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc*, 2011, 15:129-144.
63. James B. Public awareness of aflatoxin and food quality control in Benin. *International Institute of Tropical Agriculture*. 2005.
64. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001, 167:101-134.
65. Swanson SP, Nicoletti J, Rood Jr. HD, Buck W, Cote LM. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *J Chromatogr*, 1987, 27:995-1001.
66. Helferich WG, Garrett WN, Hsieh DPH, Baldwin RL. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J Anim Sci*, 1986, 62:691-696.
67. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisins B1 and B2 and fusarin C. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1993, 56:445-462.
68. Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, Nyamongo J, Backer L, Dahiye AM, Misore A, Decot K, Rubin C. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environ Health Perspect*, 2005, 113:1763-1767.

69. Blunden G, Roch OG, Rogers DJ, Coker RD, Bradburn N. Mycotoxins in food. *Med Lab Sci*, 1991, 34:417-422.
70. Turner PC, Moore SE, Hall AJ, Prentice AM, Wild CP. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect*, 2003, 111:217-220.
71. Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y. Fumonisin occurrence in corn from high-and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:1626-1629.
72. Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman A, Voss KA, Wang E, Merrill AH. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. *J Nutr*, 2004, 134:711–716.
73. Gordon WA, Johanning E, Haddad L. Cognitive impairment associated with exposure to toxigenic fungi. In: Johanning E (eds). *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health effects, Assessment, Prevention and Control*. Eastern New York Occupational & Environmental Health Center, New York, 1999:94-98.
74. Gravesen S. Allergic and non-allergic manifestations related to indoor fungal exposure—management of cases. In: Samson RA, Flannigan B, Flannigan ME, Verhoeff P (eds). *Health Implications of Fungi in Indoor Air Environment*. Amsterdam, Elsevier, 1994:241-248.
75. Hodgson MJ, Morey PR, Leung WY, Morrow L, Miller JD, Jarvis BB, Robbins H, Halsey JF, Storey E. Building-associated pulmonary disease from exposure to

- Stachybotrys chartarum and Aspergillus versicolor. *J Occup Environ Med*, 1998, 40:241-249
76. Johanning E, Biagini RE, Hull D, Morey PR, Jarvis BB, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a waterdamaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health*, 1996, 68:207-218.
77. Koskinen O, Husman T, Meklin T, Nevalainen A. Adverse health effects in children associated with moisture and mold observations in houses. *Int J Environ Health R*, 1999, 9:143-156.
78. Purokivi MK, Hirvonen MR, Randell JT, Roponen M, Meklin T, Nevalainen A, Husman T, Tukiainen HO. Changes in pro-inflammatory cytokines in association with exposure to moisture-damaged building microbes. *Eur J Epidemiol*, 2001, 18:951-958.
79. Etzel RA. Reducing malnutrition: time to consider potential links between stunting and mycotoxin exposure? *Pediatrics*, 2014, 134:4-6.
80. Dierheimer G. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Rev Méd Vét*, 1998, 149:585-590.
81. Gabal MA, Azzam AH. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases in poultry. II. Effect on one day old layer chicks simultaneously vaccinated against Newcastle diseases infectious bronchitis and infectious bursal disease. *Av Patho*. 1998, 27:290-295
82. Smith EE, Kubena LF, Braithwaite RB, Harvey RB, Philips TD, Reine AH. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult Sci*, 1992, 71:1136-1144.

83. Bitay Z, Glavits R, Sellyey G. Feeding experiments on broiler chickens with ochratoxin A, patulin, T-2 and butenolol. *Magyar Allatorvosi Lapja*, 1979, 34:417-422.
84. Shane SH. Economic issues associated with aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD (eds). *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. San Diego USA, Academic Press, 1994:513-527.
85. Vasanthi S, Bhat RV. Mycotoxins in foods-occurrence, health and economic significance and food control measures. *Ind J Med Res*, 1998, 108:212-224.
86. Mannon J, Johnson E. *New Scientist* 1985, 105:12-16
87. Kabak B, Dobson AD, Var I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006, 46:593-619.
88. Wild CP, Gong YY. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 2010, 31:71-82.
89. Groopman JD, Kensler TW, Wild CP. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annu Rev Public Health*, 2008, 29:187-203.
90. Cardwell KF, Desjardins A, Henry SH, Munkvold G, Robens J. Mycotoxins: the cost of achieving food security and food quality. *American Phytopathological Society*. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Mycotoxins.aspx>. 25 Ekim 2018.
91. Wu F. Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. *Environ Sci Technol*, 2004, 38:4049-4055.
92. Dohnal V, Wu Q, Kuca K. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Arch Toxicol*, 2014, 88:1635-1644.

93. Heidtmann-Bemvenuti R, Mendes GL, Scaglioni PT, Badiale-Furlong E, Souza-Soares LA. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: a review. *Afr J Food Sci*, 2011, 5:861-869.
94. Gourama H, Bullerman L. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. *J Food Protect*, 1995, 58:1395-1404.
95. Bhatnagar D, Yu J, Ehrlich KC. Toxins of filamentous fungi. *Chem Immunol*, 2002, 81:167-206.
96. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab Rev*, 2009, 41:1-7.
97. Coppock RW, Christian RRG, Jacobes BJ. Aflatoxins. In: Gupta RC (eds). *Veterinary Toxicology*, 2nd ed. London, Academic Press, 2012:1181-1199.
98. Dutton MF. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiol Rev*, 1988, 52:274-295.
99. Applebaum RS, Marth EH. Biogenesis of the C₂₀ polyketide, aflatoxin. A review. *Mycopathologia*, 1981, 76:103-114.
100. Cleveland TE, Lax AR, Lee LS, Bhatnagar D. Appearance of enzyme activities catalysing conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B1 in late-growth-phase *Aspergillus parasiticus* cultures. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53:1711-1713.
101. Reiss J. Effects of mycotoxins on higher plants, algae, fungi and bacteria. In: Wyllie TD, Morehouse LG (eds). *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: An Encyclopaedic Handbook, Volume 3. Mycotoxicoses of Man and Plants: Mycotoxin Control and Regulatory Practices*. New York, Marcel Dekker Inc, 1978:119-143.

102. Cole RJ, Cox RH. *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York, Academic Press, 1981.
103. Castegnaro M, Hunt DC, Sansone EB, Schuller PL, Siriwardana MG, Telling GM, Van Egmond HP, Walker EA. Laboratory decontamination and destruction of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in laboratory wastes. *IARC Sci Publ*, 1980, 37:1-59.
104. Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD, Wei CI. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J Food Protect*, 1990, 53:489-501.
105. Agag BI. Mycotoxins in foods and feeds 1-aflatoxins. *Ass Univ Bull Environ Res*, 2004, 7:173-205.
106. Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N, Panneerselvan A. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. In: Guevara-Gonzales RG (eds). *Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology*. London, IntechOpen Ltd, 2011:221-254.
107. Cassel EK, Campbell B, Draper M, Epperson B. Aflatoxins: hazards in grain/aflatoxicosis and livestock. *Fact Sheets*, 2011:86.
108. Hsieh DP, Wong JJ. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD (eds). *The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Toronto, Academic Press, 1994:373-388.
109. Kumagai S. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicol in Vitro*, 1989, 14:321-327.
110. Cook WO, Richard JL, Osweiler GD, Trampel DW. Clinical and pathological changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. *Am J Vet Res*, 1986, 47:1817-1825.

111. Biehl ML, Buck WB. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *J Food Nutr*, 1987, 50:1058-1073.
112. Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Oldham JH. Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1991, 30:403-439.
113. Dvorackova I. *Aflatoxins and Human Health*. Florida, CRC Press, 1990:135-150.
114. McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: and update. *Pharmacol Ther*, 1995, 65:163-192.
115. Wild CP, Gong YY. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 2012, 31:71-82.
116. Fernandez A, Hernandez M, Verde MT, Sanz M. Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Can J Vet Res*, 2000, 64:53-58.
117. Pier AC, Heddleston KL. The effect of aflatoxin on immunity in turkeys. I. Impairment of actively acquired resistance to bacterial challenge. *Avian Dis*, 1970, 14:797-809.
118. Sur E, Celik I. Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of fabricius and blood lymphocytes acid phosphatase of the chicken. *Br Poult Sci*, 2003, 44:558-566.
119. Ortatatli M, Ciftci MK, Tuzcu M, Kaya A. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. *Res Vet Sci*, 2002, 72:29-36.
120. Howarth Jr B, Wyatt RD. Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability, and progeny performance of broiler breeder hens. *Appl Environ Microbiol*, 1976, 31:680-684.

121. Nibbelink SK. Aflatoxicosis in food animals: a clinical review. *Iowa State Univ Vet*, 1986, 48:28-31.
122. Diekman DA, Green ML. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci*, 1992, 70:1615-1627.
123. Dvorak R, Jagos J, Bouda J, Piskac A, Zapletal O. Changes in the clinic-biochemical indices in the liquor and urine in cases of experimental aflatoxicosis in dairy cows. *Vet Med (Prague)*, 1977, 22:161-169.
124. Guthrie LD. Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *Proc Annu Meet US Anim Health Assoc*, 1979, 83:202-204.
125. Charoenpornsook K, Kavisarasai P. Mycotoxins in animal feedstuff of Thailand. *KMILT Sci Tech J*, 2006, 6:25-28.
126. Frisvad TC, Thrane U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (eds). *Introduction to Food and Airborne Fungi*, 6th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002:338.
127. Pohland AE, Schuller PL, Steyn PS, Van Egmond HP. Physicochemical data for selected mycotoxins. *Pure Appl Chem*, 1982, 54:2219-2284.
128. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leskowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins (Basel)*, 2016, 8:191.
129. Müller HM. A survey of methods of decontaminating mycotoxins. Part II chemical methods and reactions with components of feedstuffs. *Übersicht Tierernach*, 1983, 11:7-37.
130. Gupta RC. *Ochratoxin and citrinin*. In: Gupta RC (eds). *Veterinary Toxicology*, London Academic Press, 2012:1220-1226.

131. World Health Organization. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. Report of an Expert Committee. Environmental Health Criteria No:105, New York, WHO, 1990.
132. Roth A, Chakor K, Creppy EE, Kane A, Rösenthaller R, Dirheimer G. Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*, 1988, 48:293-308.
133. Kumagai S, Aibara K. Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1982, 64:94-102.
134. Kumagai S. Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Chem Toxicol*, 1988, 26:753-758.
135. Suzuki S, Satoh T, Yamazaki M. The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Jpn J Pharmacol*, 1977, 27:735-744.
136. Galtier P, Camguilhem R, Bodin G. Evidence for in vitro and in vivo interaction between ochratoxin A and three acidic drugs. *Food Cosmet Toxicol*, 1980, 18:493-496.
137. Hult K, Fuchs R. Analysis and dynamics of ochratoxin A in biological systems. In: Steyn PS, Vleggaar R (eds). *Mycotoxins and Phycotoxins*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher BV, 1986:365-376.
138. Kuiper-Goodman T, Scott PM. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed Environ Sci*, 1989, 2:179-248.
139. Hult K, Hökby E, Hägglund U, Gatenbeck S, Rutqvist L, Sellyey G. Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 38:772-776.

140. Breitholtz-Emanuelson A, Palminger-Hallen I, Wohlin PO, Oskarsson A, Hult K, Olsen M. Transfer of ochratoxin A from lactating rats to their offspring: A short-term study. *Nat Toxins*, 1993a, 1:347-352.
141. Wu Q, Dohnal V, Huang L, Kuca K, Wang X, Chen G, Yuan Z. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Curr Drug Metab*, 2011, 12:1-10.
142. Galtier P. Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology- ochratoxin A. *A Vet Sci Commun*, 1978, 1:349-358.
143. Pettersson H, Kiessling KH, Ciszuk P. Degradation of ochratoxin A in rumen. In: *Proceedings of the Vth International IUPAC Symposium Mycotoxins and Phycotoxins*. Vienna. Austrian Chemical Society, 1982:313-316.
144. Hult K, Teiling A, Gatenbeck S. Degredation of ochratoxin A by a ruminant. *App Environ Microbiol*, 1976, 32:443-444.
145. Kiessling KH, Pettersson H, Sandholm K, Olsen M. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *App Environ Microbiol*, 1984, 47:1070-1073.
146. Müller G, Kilestein P, Rosner H, Berndt A, Heller M, Köhler H. Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reaction in weaners. *Mycoses*, 1999, 42:495-505.
147. Al-Anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *J Vet Pharmacol Ther*, 2006, 29:79-90.
148. Dwivedi P, Burns RB. Pathology of ochratoxicosis A in young broiler chicks. *Res Vet Sci*, 1984a, 36:92-103.
149. Rupic V, Liker B, Muzic S, Bogdanic IC, Balzer I. The effects of ochratoxin A in feed on the blood content of lipids and proteins in chickens. *Arh Hig Rada Toksikol*, 1978, 29:139-145.

150. Barnikol H, Thalmann A. Klinische Beobachtungen beim Schwein in Zusammenhang mit den Mykotoxinen Ochratoxin A und Zearalenon. *Tierärztl Umsch*, 1988, 43:74-82.
151. Munro IC, Scott PM, Moodie CA, Willes RF. Ochratoxin A-occurrence and toxicity. *J Am Vet Med Assoc*, 1973, 163:1269-1278.
152. Creppy EE, Lugnie AAJ, Fasolo F, Heller K, Rösenthaller R, Dirheimer G. In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. *Chem Biol Interactions*, 1979a, 24:257-262.
153. Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxins. *J Anim Sci*, 1992, 70:3968-3988.
154. Huff WE, Wyatt RD, Hamilton PB. Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in broiler chickens. *Appl Microbiol*, 1975, 30:48-51.
155. Maxie MG, Newman SJ. Urinary system. In: Macie MG (eds). *Pathology of Domestic Animals*, 5thed. Vol:2, Philadelphia, Elsevier, 2007:425-522.
156. World Health Organization. Environmental Health Criteria for Fumonisin B1, No:129, New York, WHO, 2000.
157. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AH. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implication for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem*, 1991, 266:14486-14490.
158. Smith GW, Constable PD, Eppley RM, Tumbleson ME, Gumprecht LA, Haschek-Hock WM. Purified fumonisin B1 decreases cardiovascular function but does not alter pulmonary permeability in swine. *Toxicol Sci*, 2000, 56:240-249.
159. Constable PD, Smith GW, Rottinghaus GE, Haschek WM. Ingestion of fumonisin B1-containing culture material decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 162:151-160.

160. Osweiler GD, Ross PF, Wilson TM, Nelson TM, Witte ST, Carson TL, Rice LG, Nelson HA. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screening. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4:53-59.
161. Smith GW, Constable PD, Foreman JH, Eppley RM, Waggoner AL, Tumbleson ME, Haschek WM. Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B₁ in horses. *AJVR*, 2002, 63:538-545.
162. Foreman JH, Constable PD, Waggoner A, Levy M, Eppley RM, Smith GW, Tumbleson ME, Haschek WM. Neurological abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horses administered fumonisin B₁ intravenously. *J Vet Int Med*, 2004, 18:223-230.
163. Bucci TJ, Hansen DK, LaBorde JB. Leukoencephalomalacia and haemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. *Nat Toxins*, 1996, 4:51-52.
164. Kwon OS, Schmued LC, Slikker Jr. W. Fumonisin B₁ in developing rats alters brain sphinganine levels and myelination. *Neurotoxicology*, 1997b, 18:571-579.
165. Marijanovic DR, Holt P, Norred WP, Bacon CW, Voss KA, Stancel PC, Ragland WL. Immunosuppressive effect of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. *Poult Sci*, 1991, 70:1895-1901.
166. Javed T, Richard JL, Bennet GA, Dombrink-Kurtzman MA, Bunte RM, Koelkebeck KW, Cote LM, Leeper RW, Buck WB. Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B₁ or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos. *Mycopathologia*, 1993, 123:185-193.
167. Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1987, 7:253-306.

168. Ryu D, Hanna MA, Eskridge KM, Bullerman LB. Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:1746-1748.
169. Daiely RE, Reese RE, Brouwer EA. Metabolism of [¹⁴C] zearalenone in laying hens. *J Agric Food Chem*, 1980, 28:286-291.
170. Ueno Y, Ayaki S, Sayo N, Ito T. Fate and mode of action of zearalenone. *Ann Nutr Aliment*, 1977, 31:935-948.
171. Biehl ML, Prelusky DB, Koritz GD, Hartin KE, Buck WB, Trenholm HL. (1993). Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, 121:152-159.
172. Hagler WM, Danko G, Horvath L, Palyusik M, Microcha CJ. Transmission of zearalenone and its metabolite into ruminant milk. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 1980, 28:209-216.
173. Ueno Y, Tashiro F, Kobayashi T. Species differences in zearalenone-reductase activity. *Food Chem Toxicol*, 1983, 21:167-173.
174. Malekinejad H, Maas-Bakker R, Fink-Gremmels J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J*, 2006, 172:96-102.
175. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Mordecai D. Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series fungal resorcycli acid lactones. *Endocrinology*, 1979, 105:33-40.
176. Iheshiulor OOM, Esonu BO, Chuwaka OK, Omede AA, Okoli IC, Ogbuewu IP. Effects of mycotoxis in animal nutrition: a review. *Asian J Anim Sci*, 2011, 5:19-33.
177. Jones FT, Genter MB, Hagler WM, Hansen JA, Mowrey BA. Understanding and coping with effects of mycotoxins in livestock feed and forage. North Carolina Cooperative Extension Service, North Carolina, 1994:1-14.

178. Weaver GA, Kurtz HJ, Behrens JC, Robison TS, Seguin BE, Bates FY, Mirocha CJ. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *Am J Vet Res*, 1986a, 47:1395-1397.
179. Coppock RW, Mostrom MS, Sparling CG, Jacobsen B, Ross SC. Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Vet Hum Toxicol*, 1990, 32:246-248.
180. Milano GD, Odriozola E, Lopez TA. Lack of effect of a diet containing zearalenone on spermatogenesis in rams. *Vet Rec*, 1991, 129:33-35.
181. Wolf CE, Bullerman LB. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment. *J Food Prot*, 1998, 61:365-367.
182. Ueno Y. Tricothecenes in food. In: Krough P (eds). *Mycotoxin in Food*. London, Academic Press, 1987:136.
183. Miller JD. Aspects of the ecology of Fusarium toxins in cereals. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 504:19-27.
184. Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of trichotecenes mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam*, 2005, 22:369-378.
185. Prelusky DB, Yeun JM, Thompson BK, Trenholm HL. Effect of deoxynivalenol on neurotransmitters in discrete regions of swine brain. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1992, 22:36-60.
186. Whitlow LW, Nebel RL, Hagler Jr WM. The association of deoxynivalenol in grain with milk production loss in dairy cows. In: Llewellyn GC, Dashek WV, O'Rear CE (eds). *Biodeterioration Research 4*. New York, Plenum Press, 1994:131-139.

187. Zhao Y, Zhu X, Wu H, Zhuang D, Yu G, Li X, Li F, Yu A. Evaluation of fetal skeletal malformation in deoxynivalenol-treated mice using microarray analysis. *Arc Environ Contam Toxicol*, 2012, 63:445-452.
188. Charmley E, Trenholm HL, Thompson BK, Vudathala D, Nicholson JWG, Prelusky DB, Charmley LL. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production and its composition. *J Dairy Sci*, 1993, 76:3580-3587.
189. Kubena LF, Swanson SP, Harvey RB, Fletcher OJ, Rowe LD, Philips TD. Effects of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat to growing chicks. *Poult Sci*, 1985, 64:1649-1655.
190. Lin L, Zhang J, Wang P, Wanh Y, Chen J. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *J Chromotogr*, 1998, 815:3-20.
191. Betina V. Thin-layer chromatography of mycotoxins. *J Chromatogr*, 1985, 334:35-37.
192. Aiko V, Mehta A. Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. *J Biosci*, 2015, 40:943-954.
193. Nguyen MT, Tozlovanu M, Tran TL, Pfohl-Leszkowicz A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of central region of Vietnam. *Food Chem*, 2007, 105:42-47.
194. Chauhan R, Singh J, Sachdev T, Basu T, Malhotra BD. Recent advances in mycotoxin detection. *Biosens and Bioelectr*, 2016, 81:532-545.
195. Bozoğlu F. Different mycotoxin inactivation applications and their inactivation mechanisms. *Proc Nat Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 2009, 117:27-35.

196. Basappa SC, Shantha T. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds - a critical appraisal. *J Food Sci Tech Mys*, 1996, 33: 95-107.
197. Park DL. Perspective on mycotoxin decontamination procedures. *Food Addit and Contamin*, 1993, 10:49-60.
198. Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *Int Food Microbiol*, 2007, 119:140-146.
199. Grenier B, Loureiro-Bracarense APL, Leslie JF, Oswald IP. Physical and chemical methods for mycotoxin decontamination in maize. In: Leslie JF, Logrieco F (eds). *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, 1st ed. John Wiley & Sons Inc, 2014:116-129.
200. Levi C. Mycotoxins in coffee. *J AOAC Int*, 1980, 63:1282-1285.
201. Cicgler A, Vesonder RF. Microbial food and feed toxicants: fungal toxins. In: Rechcigl Jr. M (eds). *Handbook of food borne disease of biological origin*. Boca Raton, CRC Press, 1983:57-166.
202. Fischbach H, Campbell AD. Note on detoxification of aflatoxins. *J Assoc Off Anal Chem*, 1965, 48:28.
203. Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE, Marth EM. Physical, chemical and biological degradation mycotoxins in foods and agricultural commodities. *J Food Prot*, 1982, 45:964-971.
204. Coomes TL, Crowther PC, Feuill AJ, Francis BJ. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxins. *Nature*, 1966, 209:408-409.
205. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem*, 1997, 59:57-67.

206. Varga J, Koscube S, Peteri Z, Vagvölgyi C, Toth B. Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicosis in human and animals. *Toxins*, 2002, 2:1718-1750.
207. Boudra H, Le Bars P, Le Bars J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:1156-1158.
208. Urbano GR, de Freitas Leitao MF, Vicentini MC, Taniwaki MH. Preliminary studies on the destruction of ochratoxin A in coffee during roasting. *Food Sci Technol Int*, 2004, 10:45-49.
209. Diao E, Li X, Zhang Z, Ma W, Ji N, Dong H. Ultraviolet irradiation detoxification of aflatoxins: a review. *Trends Food Sci Technol*, 2015, 42:64-69.
210. Atalla MM, Hassanein NM, El-Beih AA, Youssef YA. Effects of fluorescent and UV light on mycotoxin production under different relative humidities in wheat grains. *Int J Agric Biol*, 2004, 6:106-1012.
211. Aziz NH, Moussa LAA, Far FME. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. *J Food Safety*, 2004, 24:109-127.
212. Deberghes P, Betbeder AM, Boisar F, Blance R, Delaby JF, Krivobok S, Steiman R, Seigle-Murandi F, Creppy EE. Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Res*, 1995, 11:37-47.
213. Refai MK, Aziz NH, El-Far F, Hassan AA. Detection of ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by γ -radiation. *Appl Radiat Isot*, 1996, 47:617-621.
214. Jans D, Pedrosa K, Schatzmayr D, Bertin G, Grenier B. Mycotoxin reduction in animal diets. In: Leslie FJ, Logrieco AF (eds). *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. John Wiley & Sons Inc, 2014:101-115.

215. Zhu Y, Hassan YI, Watts C, Zhou T. Innovative technologies for the migration of mycotoxins in animal feed and ingredients- a review of recent patents. *Anim Feed Sci and Tech*, 2016, 216:19-29.
216. Dakovića A, Tomašević M, Rottinghausb GE, Matijaševića S, Sekulića Z. Fumonisin B1 adsorption to octadecyldimethylbenzyl ammonium-modified clinoptilolite-rich zeolitic tuff. *Microporous Mesoporous Mater*, 2007, 105:285-290.
217. Yiannikouris A, Kwiatkowski S, Kudupoj MB, Matney C (US Patent Publications) Synthetic mycotoxin adsorbents and methods making and utilizing the same, RE452274, 2014.
218. Howes AD, Newman KE (US Patent Publications). Composition and methods for removal of mycotoxins from animal feed, 6045834 A, 1999.
219. Tranquil E, Kanarskaya ZA, Tikhomirov DF, Kanarsky AV (US Patent Publication). Composition and methods for decontamination of animal feed containing mycotoxins typical for both northern and southern climates. 8496984 B2, 2013.
220. Schoeters E, Li Z, Van Dyck SMO, Lao Y (US Patent Publication). Mycotoxin binder, 8507019 B2, 2013.
221. Swenson DH. Metabolic activation and detoxification of aflatoxin. *Rev Biochem Toxicol*, 1981, 3:155-192.
222. Stoloff L, Trager WT. Recommended decontamination procedures for aflatoxin. *J Assoc Off Anal Chem*, 1965, 48:681-682.
223. Trager WT, Stoloff L. Possible reactions for aflatoxin detoxification. *J Agric Food Chem*, 1967, 15:679-681.

224. Natarajan KR, Rhee KC, Cater CM, Mattil KF. Destruction of aflatoxin in peanut protein isolates by sodium hypochlorite. *J Am Oil Chem Soc*, 1975, 52:160-163.
225. Rhee KC, Natarajan KR, Cater CM, Mattil KF. Processing edible peanut protein concentrates and isolates to inactivate aflatoxins. *J Am Oil Chem Soc*, 1976, 42:467-471.
226. Wang Y, Wang L, Liu F, Wang Q, Selvaraj JN, Xing F, Zhao Y, Liu Y. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins (Basel)*, 2016, 8:83.
227. Kumar S, Chaubey KA, Maurya DK, Gautam S, Sharma A. In vitro analysis of efficacy of chlorination in detoxifyin ochratoxin A from freshly shelled sweet corn kernels spiked with toxigenic *Aspergillus ochraceus* strain. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2014, 3:570-582.
228. Sreenivasamurthy V, Parpia HAB, Srikanta S, Murti AS. Detoxification of aflatoxin in peanut meal by hydrogen peroxide. *J Assoc Off Anal Chem*, 1967, 50:350-354.
229. Van Dorp DA, van der Zijden ASM, Beerthius RK, Sparreboom S, Ord WO, de Jong K, Keuningn R. Dihydroaflatoxin B, a metabolite *Aspergillus flavus*. Remarks on the structure of Aflatoxin B. *Rec Trav Chim*, 1963, 82:587-592.
230. Fouler SG, Trivedi AB, Kitabatake N. Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. *J Assoc Off Anal Chem Int*, 1994, 77:631-637.
231. Jalili M, Jinap S. Reduction of mycotoxins in white pepper. *Food Addit Contam Part A*, 2012, 29:1947-1958.
232. Bennet GA, Shotwell OL, Hesseltine CW. Destruction of zearalenone in contaminated corn. *JAOCs*, 1980:245-247.

233. Abd Alla ES. Zearalenone: toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. *Nahrung*, 1997, 41:362-365.
234. El-Desouky TA, Sharoba AMA, El-Desouky AI, El-Mansy HA, Naguib K. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B1 and *Aspergillus flavus* fungal. *J Environment Analytic Toxicol*, 2012, 2:1000128.
235. McKenzie KS, Sarr AB, Mayura K, Bailey RH, Miller DR, Rogers TD, Norred WP, Voss KA, Plattner RD, Kubena LF, Phillips TD. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem Toxicol*, 1997, 35:807-820.
236. Dwarakanath CT, Rayner ET, Mann GE, Doller FG. Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonisation. *J Am Oil Chem Soc*, 1968, 45:93-95.
237. Grove MD, Plattner RD, Peterson RE. Detection of Aflatoxin D1 in Ammoniated corn by mass spectrometry-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48:887-889.
238. Lee LS, Stanley JB, Cucullu AF, Pons WA, Goldblatt LA. Ammoniation of aflatoxin B1: isolation and identification of the major reaction product. *J Assoc Off Anal Chem*, 1974, 57:626-631.
239. Brekke OL, Peplinski AJ, Nofsinger GW, Conway HF, Stringfellow AC, Montgomery RR, Silman RW, Sohns VE, Bagley EB. Aflatoxin inactivation in corn by ammonia gas: a field trial. *Asae*, 1979, 22:425-432.
240. Conkerlon EJ, Chapital DC, Lee LS, Ory RL. Effect of ammoniation on the physico-chemical properties of peanut and cottonseed meals. *J Food Sci*, 1980, 45:564-569.

241. Cucullu AF, Lee LS, Pons WA, Stanley JB. Ammoniation of aflatoxin B1: isolation and characterization of a product with a molecular weight 206. *J Agric Food Chem*, 1976, 24:408-410.
242. Price RL, Lough OG, Brown WH. Ammoniation of whole cottonseed at atmospheric pressure and ambient temperature to reduce aflatoxin M1 in milk. *J Food Protect*, 1982, 45:341-344.
243. Burgos-Hernandez A, Price RL, Jorgensen-Kornman K, Lopez-García R, Njapau H, Park DL. Decontamination of aflatoxin B1-contaminated corn by ammonium persulphate during fermentation. *J Sci Food Agr*, 2002, 82:546-552.
244. Allameh A, Safamehr A, Ahmad Mirhadi SA, Shivazad M, Razzaghi-Abyaneh M, Afshar-Naderi A. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. *Anim Feed Sci Tech*, 2005, 122:289-301.
245. Nyandieka HS, Maina JO, Nyamwange C. Destruction of aflatoxins in contaminated maize samples using ammoniation procedures. *East Cent Afr J Pharm Sci*, 2009, 12:47-51.
246. Lee LS, Cucullu AF. Conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin D1 in ammoniated peanut and cottonseed meals. *J Agric Food Chem*, 1978, 26:881-884.
247. Brekke OL, Stringfellow AC, Peplinski AJ. Aflatoxin inactivation in corn by ammonia gas: Laboratory trials. *J Agric Food Chem*, 1978, 26:1383-1389.
248. Park DL, Lee LS, Price RL, Pohland AE. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *J Assoc Off Anal Chem*, 1988, 71:685-703.
249. Lopez-Garcia R, Park DL, Philips TD. Integrated mycotoxin management systems. *Food Nutr Agricul*, 1999, 23:38-48.

250. Piva GFP, Galvano FRD, Pietri AAP, Piva ARD. Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutr Res*, 1995, 15:767-776.
251. Haworth SR, Lawlor TE, Zeiger E, Park DL. Mutagenic potential of ammonia-related aflatoxin reaction products in a model system. *J Am Oil Soc*, 1989, 66:102-104.
252. Chourasia HK. Efficacy of ammonia in detoxification of fumonisin contaminated corn. *Indi J Experim Biol*, 2001, 39:493-495.
253. Brekke OL, Peplinski AJ, Lancater EB. Aflatoxn inactivation in corn by aqua ammoni. *Trans Am Agric Eng*, 1977, 20:1160-1168.
254. Black LT, Spencer GF, Brekke OL. Reaction of lipids in corn with ammonia. *J Am Oil Chem Soc*, 1978, 55:526-529.
255. Empfehlung der Kommission, betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisien zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen. Amtsblatt der Europäischen Union, 2006/576/EG, vom 17. August 2006.
256. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/ tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20:2649-2659.
257. Jin Y, Yu W, Songxue W, Qilei G, Meiling L, Cuiling W, Yuhong C. Simultaneous determination of 16 mycotoxins in cereals using an Agilent Triple Quadupole LC/MS system and e-method. *Agilent Technologies, Inc*, USA, 2017
258. Chelkowski J, Golinski P, Godlewska B, Radomska W, Szebiotko K, Wiewirowska M. Mycotoxins in cereal grain. Part IV. Inactivation of ochratoxin A and other mycotoxins during ammoniation. *Nahrung*, 1981, 25:631-637.

259. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. *The Merch Index*, 12th ed., Merck 1996:Entry#523.
260. Sutter D, Mazzotti M. Solubility and growth kinetics of ammonium bicarbonate in aqueous solution. *Cryst Growth Des*, 2017, 6:3048-3054.
261. Gomma EG. Effect of alkalies on aflatoxins in solutions and in biscuits and cakes. *ASEJ*, 1987, 8:23-37.
262. Tabata S, Kamimura H, Ibe A, Hashimoto H, Tamura Y. Degradation of aflatoxins by food additives. *J Food Protect*, 1994, 57:42-47.
263. Lee LS, Koltun SP, Stanley JB. Ammoniation of aflatoxin B₁ in a pressure chamber used to decontaminate toxin-containing cottonseed meal. *JAOCS*, 1984, 61:1607-1608.
264. Moerck KE, McElfresh P, Wohlman A, Hilton BW. Aflatoxin destruction in corn using sodium bisulfite, sodium hydroxide and aqueous ammonia. *J Food Protect*, 1980, 43:571-574.
265. Norred W. Ammonia treatment to destroy aflatoxins in corn. *J Food Protect*, 1982, 45:972-976.
266. Jensen AH, Brekke OL, Frank GR, Peplinski AJ. Acceptance and utilization by swine of aflatoxin-contaminated corn treated with aqueous or gaseous ammonia. *J Anim Sci*, 1977, 45:8-12.
267. Brekke OL, Sinnhuber RO, Peplinski AJ, Wales JH, Putnam GB, Lee DJ, Ciegler A. Aflatoxin in corn: ammonia inactivation and bioassay with rainbow trout. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 34:37.
268. Koltun S. Aflatoxin inactivation of undelinted cottonseed by ammoniation. *JAOCS*, 1986, 63:533-534.

269. Norred WP, Voss KA, Bacon CW, Riley RT. Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. *Fd Chem Toxic*, 1991, 29:815-819.
270. Bagley EB. Decontamination of corn containing aflatoxin by treatment with ammonia. *J Am Oil Chem Soc*, 1979, 56:808-811.
271. Jorgensen KV, Price RL. Atmospheric pressure-ambient temperature reduction of aflatoxin B₁ in ammoniated cottonseed. *J Agric Food Chem*, 1981, 29:555-558.
272. Weng CY, Park DL, Martinez AJ. Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. *Food Addit Contam*, 1994, 11:649-658.
273. Gomaa MNE, Ayesh AM, MMA Galil, Khayria N. Effect of high pressure ammoniation procedure on the detoxification of aflatoxins. *Mycotoxin Res*, 1997, 13:23-34.
274. Southern LL, Clawson AJ. Ammoniation of corn contaminated with aflatoxin and its effects on growing rats. *J Anim Sci*, 1980, 50:459-466.

EKLER

Ek-1 : Özgeçmiş

Ek-2 : Birim Etik Kurul Kararı



EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Veysel DOĞAN Doğum tarihi: 17.02.1986 Doğum yeri: Erzurum/Tortum Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0541 971 24 80 Faks: E-mail: d_veysel@yahoo.com
Eğitim
Lise: Şükrüpaşa Lisesi (2000-2003) Lisans: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2004-2010) Yüksek lisans: Doktora: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıklar Anabilim Dalı (2011-2019)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: İyi derecede
Almanca: Orta
Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
.....
İlgi Alanları ve Hobiler
Kitap okuma, bağlama çalma, bisikletle doğa gezileri ve turlar, doğa gezileri ve kuş gözlemi

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
Birim Etik Kurul Kararı



Karar Sayısı: 2018 / 38	Karar Tarihi: 13 / 02 / 2018
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme Ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Armağan HAYIRLI ve Dokt.Öğr.Veyssel DOĞAN tarafından sunulan (YAYGIN MİKOTOKSİNLERİN AMMONİZASYONLA ELİMİNASYONU) adlı bilimsel teze ait başvuru formu etik alt kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir. Sunulan bilimsel tez çalışmasının Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkesine UYGUN olduğuna karar verilmiştir	
Prof. Dr. Dursunali ÇINAR	Başkan
Prof.Dr.Bülent POLAT	Üye
Prof.Dr.Ekrem LAÇIN	Üye
Prof.Dr.Zafer OKUMUŞ	Üye
Prof.Dr.Ziya Gökalp CEYLAN	Üye