T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ

KOORDİNASYON BİRİMİ

KIRMIZIBİBERDE AFLATOKSİN OLUŞUMUNA NEDEN OLAN *ASPERGILLUS PARASITICUS* TÜRÜNÜN REAL-TIME PCR TEKNİĞİ İLE KANTİTATİF OLARAK TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZ PROJESİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Doç.Dr. Zülal KESMEN

Gıda Mühendisliği Bölümü

Araştırmacı

Yük. Lis.Öğr. Ayten Güllüce

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBT-07-89 kodlu proje ile desteklenmiştir.

08/2012

KAYSERİ

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR KOORDİNASYON BİRİMİ

19.11.2012

Yürütücüsü olduğum FBT-07-89 no'lu "Kırmızıbiberde Aflatoksin Oluşumuna Neden Olan Aspergillus Parasiticus Türünün Real-Time PCR Tekniği İle Kantitatif Olarak Tayini" isimli yüksek lisans tez projesinde görevli yüksek lisans öğrencisi Ayten Güllüce proje desteklendikten sonra Cumhuriyet Üniversitesi Timur Karabal Meslek Yüksek Okuluna öğretim görevlisi olarak atandığından projenin laboratuar çalışmalarını yürütememiştir. Bu nedenle proje çalışmaları tarafımdan tamamlanarak sonuç raporu hazırlandığından raporda onay sayfası bulunmamaktadır. Bilgilerinize arz ederim.

Doç.Dr. Zülal KESMEN

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

ÖZET **4**

ABSTRACT **5**

1. GİRİŞ **5**

2. GENEL BİLGİLER **8**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **12**

3.1. Projede Kullanılan Standart Küf Suşları 12
3.2. İnokulum Hazırlama 12
3.3. Küf Türlerinden ve Kırmızıbiber Örneklerin DNA Ekstraksiyonu 13
3.4. Aflatoksikojenik *A.parasiticus*'un Türe Spesifik Real Time PCR Metodu ile Analizi 13
3.5. Aflatoksin Miktarının Belirlenmesi 14
3.6. Aflatoksin Üreten Gen Bölgelerinin Real-Time PCR Yöntemi ileTespiti 14

4. BULGULAR **16**

5. SONUÇ VE TARTIŞMA **24**

6. KAYNAKLAR **26**

ÖZET

KIRMIZIBİBERDE AFLATOKSİN OLUŞUMUNA NEDEN OLAN *ASPERGILLUS PARASITICUS* TÜRÜNÜN REAL-TIME PCR TEKNİĞİ İLE KANTİTATİF OLARAK TAYİNİ

Bu çalışmada *A. parasiticus* türü aflatoksijenik küflerin spesifik olarak tespitini sağlayacak, real-time PCR'a dayanan, spesifik, hassas, güvenilir bir metot geliştirilmesi ve aflatoksin biyosentezinden sorumlu yapısal genler; *nor-1* (norsolorinic acid reductase), *ver-1* (Versicolorin A dehydrogenase), ve *omt-A* (Sterigmatocystin O-methyltransferase) ile aflatoksin sentezini düzenleyici *aflR* geni analiz edilerek üretilen aflatoksin miktarları ile bu genler arasındaki korelasyonların belirlemesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla *A. parasiticus* ile inokule edilen kırmızıbiber örnekleri inokulasyonun 3., 6., 9., 15, 25. ve 30. günlerinde bir taraftan HPLC sistemi ile üretilen aflatoksin miktarı yönünden analiz edilirken, diğer taraftan da real-time PCR sistemi ile aflatoksijenik gen bölgeleri ile üretilen toksin miktarı arasındaki korelasyonlar tespit edilmiştir.

Kırmızıbiber örneklerine 10^6 spor/g seviyesinde *A. parasiticus* inokule edildikten sonra inokulasyonun 3. gününde 1.1×10^7 kob/g olarak tespit edilen küf sayısının 25. güne kadar artarak 8.9×10^8 kob/g seviyesine ulaştığı, 30. günde ise tekrar 6.7×10^8 kob/g seviyesine düştüğü gözlenmiştir. Diğer taraftan en yüksek aflatoksin miktarı inokulasyonun 3. gününde tespit edilirken (182.80 ppb) en düşük aflatoksin miktarı 15. günde (113.69 ppb) tespit edilmiştir. 15. günden sonra aflatoksin miktarının tekrar artarak 132.01 ppb seviyesine ulaştığı gözlenmiştir.

Aflatoksin biyosentezinden sorumlu 4 genlerin *(nor-1, ver-1, omt-A ve AFLR)* toksin üreten suşların belirlenmesi bakımından olumlu sonuçlar verdiği ve aflatoksin üretimi ile bu gen bölgeleri arasında bir korelasyonun bulunduğu dolaysıyla aflatoksin üretiminin belirlenmesinde bu genlerin kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, *A. parasiticus*, real-time PCR, aflatoksin biyosentez genleri

ABSTRACT

QUANTITIVE DETECTION OF AFLATOXIN PRODUCING ASPERGILLUS PARASITICUS IN RED PEPPERS BY REAL-TIME PCR

The aim of this study was develop a real time PCR-based sensitive, specific and reliable method which will provide the specifically detection of aflatoxigenic *A. parasiticus* and to determine the correlations between the amount of aflatoxin produced by aflatoxigenic species and presence regulative *AFLR* gene and *nor-1, ver-1* and *omt-A* structural genes in biosyntesis of aflatoxigenic species.

For this purpose, on the one hand aflatoxin amount of red pepper samples, contaminated with aflatoxigenic *A. parasiticus* strain was determined by HPLC, on the other hand three structural genes (*nor-1, ver-1* and *omt-A*) and a regulatory *AflR* gene were quantified by real-time PCR at certain time intervals (at 3. 6. 9. 15. 25. and 30. days). So the correlations between real-time PCR results and amount of produced toxins were determined.

The mould counts of red pepper samples, inoculated with *A. parasiticus* was determined as $1.1x10^7$ cfu/g at the 3th day of inoculation. The counts increased to $8.9x10^8$ cfu/g until 25th day of inoculation and then decreased to $6.7x10^8$ cfu/g at the 30th day of inoculation. On the other hand, the highest aflatoxin amount (182.80 ppb) was determined at the 3rd day of inoculation while the lowest amount (113.69ppb) was obtained at the 15th day. After 15th day of inoculation aflatoxin amount increased again by the level of 132.01 ppb.

In conclusion, a correlation was determined between the 4 genes (*nor-1, ver-1, omt-A* and *AFLR*) responsible for aflatoxin biosyntesis and aflatoxin production, and the genes were useful for determination of aflatoxigenic strains in food samples.

Keywords: Aflatoxin, *A. parasiticus*, real-time PCR, aflatoxin producing genes

1. GİRİŞ

Türkiye önemli kırmızı biber üreticisi ülkeler arasında yer almakta olup, kırmızı biber verimi dünya ortalamasının üzerindedir. Kırmızıbiber iç pazar için gerekli olduğu kadar, dış ülkelere yapılan ihracat potansiyeli açısından da ekonomik öneme sahiptir. Ancak yetersiz ve uygun olmayan hasat, kurutma ve depolama yöntemleri ve koşulları nedeniyle, kırmızıbiberde özellikle küfler faaliyet göstermekte ve sonuçta aflatoksin adı verilen ve insan sağlığı için zararlı toksik maddelerin oluşumuna neden olabilmektedir. Bu durum insan sağlığı için bir risk oluşturmasının yanında, bu ürünlerin tüketimden kaldırılması ve ihraç ürünlerinin alıcılar tarafından geri gönderilmesi nedeniyle oluşan ekonomik kayıplara da yol açabilmektedir.

Gıdalarda küfler gelişip belirli bir sayıya ulaştıktan sonra sekonder metabolizma ürünleri olarak toksin üretirler. Yani diğer bir deyişle herhangi bir gıda da küf gelişmesi başladığı anda toksin üretimi başlamaz. Toksin üretimi küf gelişmesi gözlendikten belirli bir süre sonra gerçekleşir. Bu nedenle gıdalarda aflatoksin oluşumunun izlenmesinde aflatoksikojenik floranın yoğunluğunun belirlenmesi, aflatoksin oluşma riskinin ve boyutunun tespit edilmesi ve kontrol altına alınması bakımından önem taşımaktadır. Aflatoksin üreten *Aspergillus* türlerinin klasik metotlarla tespiti bu küflerin kültüre alınması ve morfolojik düzeyde taksonomik olarak ayrılmasına dayanmaktadır. Bu metodlar zaman alıcı, pahalı, yoğun laboratuvar çalışması ve mikolojik uzmanlık gerektirmektedir. Alternatif olarak geliştirilen immunolojik ve impedimetrik metotlar ise yeterince spesifik değildir, yakın türlerin ayırımında yetersiz kalmaktadır.

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin bu alanda kullanılamaya başlanması ile birlikte in vitro şartlarda hedef DNA dizilerinin amplifikasyonuna dayanan yeni yöntemler geliştirilmiştir. PCR tekniği oldukça hızlı, hassas ve çok yönlü bir metot olmasının yanında, deteksiyon öncesinde organizmaların kültüre alınmasına ihtiyaç duyulmaması ve hedef DNA dizileri komplex bir karışım içinde olsa bile radyoaktif probe kullanamaya gerek duyulmadan teşhisinin mümkün olması nedeniyle klasik yöntemlerden daha avantajlıdır. Ancak klasik PCR tekniği ile yapılan aflotoksin biyosentetik genlerinin karakterizasyonu olası aflatoksikojenik fungusların belirlenmesi içindir. Bu klasik PCR sistemi sadece aflatoksikojenik bir fungusun var olup olmadığını gösteren kalitatif sonuçlar verir. Bu yüzden son yıllarda kantitasyona imkan sağlayan real-time PCR tekniğine dayanan yeni yöntemler geliştirilmiştir. Böylece fungal

konidiaların veya patojenik fungusların sporlarının güvenilir ve hızlı bir kantifikasyon metodu ile belirlenmesi mümkün olmuştur.

Sonuç olarak; ülkemiz iç pazarı için gerekli olduğu kadar, dış ticaret potansiyeli açısından da ekonomik bir öneme sahip olan kırmızıbiberde aflatoksin oluşma riskinin olması, kırmızıbiber ihraç ettiğimiz ülkelerin bu konuda çok hassas davranmaları, ülkemiz ihracatının engellenmemesi, ülkemiz orijinli ürünlerin itibarının zedelenmemesi ve tüketici sağlığının korunması amacıyla ülkemizde üretilen, yurt içine dağıtılan ve yurt dışına ihraç edilen kırmızıbiberin aflatoksin yönünden sürekli izlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Kırmızıbiberdeki aflatoksin riskinin ve boyutlarının belirlenmesinde aflatoksin oluşumuna neden olan etkenlerin saptanması ve önlenmesi birinci derece önemli görülmektedir. Sunulan projede de aflatoksin üreten *Aspergillus* türlerinden en yaygın olarak bulunan türlerden biri olan A*spergillus parasiticus*'un toksikojenik suşlarının kantitatif olarak tespitini sağlayacak, spesifik, hassas, güvenilir bir metot geliştirilmesi ve kırmızıbiberde gelişen bu suşların sayısı ile bu suşlar tarafından üretilen aflatoksin miktarı arasındaki korelasyonun belirlemesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Kırmızı biber, dünyada ve ülkemizde büyük ölçüde üretilmekte olan ve gerek taze gerekse kurutulmuş olarak geniş kullanım alanı bulan bir üründür. Askorbik asit ve karoten içeriği yönünden zengin olan kırmızı biberlerin tüketimde kullanılması; baharat, yem maddesi ve antibiyotik hammaddesi şeklindedir (Tunçer ve ark., 1989). Kırmızı biber gıda sanayinde baharat, oleorezin veya ekstrakt, başta et ürünleri ve çorbalar olmak üzere, fırın ürünleri, baharat karışımları, çeşni ürünleri, sos, şekerleme, alkolsüz içecek, sebze, dondurma, çiklet ve turşularda kullanılmaktadır (Akgül, 1993). Kırmızı biber üretim aşamasında yoğun işgücü talep ederek il ve ülke istihdamına katkı sağlamasının yanı sıra kırmızı biber işleyen tarıma dayalı sanayi işletmelerinde hammadde olarak kullanılması ile de ülke ekonomisine önemli katkı sağlamaktadır. Gıda sanayi içerisinde yer alan kırmızıbiber işleyen tarıma dayalı sanayi işletmeleri işledikleri pul ve toz biberlerin bir kısmını ihraç etmek suretiyle ülkenin gelirlerinin artmasına katkıda bulunmaktadır (Çakan,1996).

Ülkemizde kırmızıbiberlerle ilgili ilk ciddi sorunlar; son on yıldır ihraç edilen ürünlerin Avrupa ülkelerinden iade edilmesi ile dikkati çekmiştir. Mikotoksinler ve dolayısıyla aflatoksinler bitki gelişme döneminde meydana gelebildiği gibi, hasatta, açıkta kurutma sırasında ve depolama döneminde meydana gelebilmektedir. *Aspergillus* gelişimi ve aflatoksin oluşumlarına nem, sıcaklık, üründeki mekaniki zedelenmeler, kuruma hızı, kızışma, depo atmosferi, CO2 ve O2 miktarı, ürünün doğal yapısı, mineraller, kimyasal uygulamalar, böcekler ve diğer fungusların faaliyeti gibi bir çok faktör etki etmektedir (Banwrt, 1989).

Mikotoksinler içerisinde önem yönünden ilk sırayı alaln aflatoksin, genellikle Aspergllus flavus, Aspergillus parasiticus ve Aspergillus nomius türlerine ait küfler tarafından meydana getirilen ve bisfurana kumarin yapısında olan bir grup küf metabolitinin genel ismidir (Anonim, 1985). Bunlardan en toksik olanı B_1'dir. Aflatoksin oluşturan küflere genelde 24-30°C sıcaklıkta, su aktivitesi (a_w) değeri 0.78-0.82 ve nem miktarı %9-14 veya daha yüksek olan hemen her çeşit gıda maddesinde rastlanmaktadır (Banwart, 1989; Kaya, 1995). Birçok araştırıcı (Bilgrami and Sinha 1986; Ünlütürk ve Turantaş, 1998) kırmızı biberin aflatoksin oluşumu yönünden oldukça riskli bir baharat çeşidi olduğunu bildirmiştir.

Aflatoksin üreten *Aspergillus* türlerinin klasik metotlarla tespiti bu küflerin kültüre alınması ve morfolojik düzeyde taksonomik olarak ayrılmasına dayanmaktadır. Bu metodlar zaman alıcı, pahalı, yoğun laboratuar çalışması ve mikolojik uzmanlık gerektirir ve aflatoksikojenik küflerin tespitinde yanlış pozitif sonuçların elde edilmesi mümkündür. Alternatif olarak

geliştirilen immunolojik ve impedimetrik metotlar ise yeterince spesifik değildir, yakın türlerin ayırımında yetersiz kalmaktadır (Seitz et al., 1977; De Ruiter et al., 1993; Gourama and Bullerman, 1995). Bu yüzden daha hızlı, uygulanması kolay, spesifitesi yüksek mevcut metodlara alternatif yeni metotların geliştirilmesi zorunludur.

Aspergillus flavus 6-8 ^{o}C'den 44-45 ^{o}C'ye kadar geniş bir sıcaklık aralığında gelişmesine karşılık daha dar bir sıcaklık aralığında aflatoksin (11-37 ^{o}C) oluşturabilmektedir. Özellikle tarlada gelişmekte olan üründe oluşan mekanik hasarların *Aspergillus flavus* gelişmesine ve bunun sonucu olarak aflatoksin oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. Depoda kızışma meydana geldiğinde üründe aflatoksin miktarı çok fazla yükselmektedir. Depo havasında CO2'nin %60'a yükseltilmesi aflatoksin oluşumunu durdurmaktadır. Başta; kuraklık stresi olmak üzere, bitki stresi üründe aflatoksin oluşumunu çok fazla arttırmaktadır. Benzer şekilde böcek zararları ve onların neden olduğu bulaşılar, bitkiye zarar veren diğer fungal hastalıklar, bitkiyi zayıf düşürerek üründe aflatoksin oluşumuna neden olmaktadır. Bitkilerin *Aspergillus flavus* bulaşısına karşı dirençlerinin farklılığı, üründe oluşabilecek aflatoksin düzeyini etkileyebilmektedir (Hesseltine, 1976).

A.falvus bütün dünyada yaygın olarak bulunur. *A.parasiticus* ise daha fazla tropik ve subtropik iklim zonlarında görülür. Her ikisine de topraklarda sıklıkla rastlanır. Havada, canlı veya ölü hayvanlar ve bitkiler üzerinde de bulunurlar. Küflerin aflatoksin üretimleri; genetik potansiyel, çevre koşulları (su aktivitesi, sıcaklık, substart, pH, redoks potansiyeli) ve fungusla substartın bulaşması gibi faktörlere bağlıdır. Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*'un bazı suşları, *Aspergillus parasiticus*'un ise hemen hemen bütün suşları tarafından üretilmektedir (Banwart, 1989).

Aflatoksin üreten *Aspergillus* türlerinin klasik metotlarla tespiti bu küflerin kültüre alınması ve morfolojik düzeyde taksonomik olarak ayrılmasına dayanmaktadır. Bu metodlar zaman alıcı, pahalı, yoğun laboratuvar çalışması ve mikolojik uzmanlık gerektirir ve aflatoksikojenik küflerin tespitinde yanlış pozitif sonuçların elde edilmesi mümkündür. Alternatif olarak geliştirilen immunolojik ve impedimetrik metotlar ise yeterince spesifik değildir, yakın türlerin ayırımında yetersiz kalmaktadır (Seitz et al., 1977; De Ruiter et al., 1993; Gourama and Bullerman, 1995). Bu yüzden daha hızlı, uygulanması kolay, spesifitesi yüksek mevcut metodlara alternatif yeni metotların geliştirilmesi zorunludur.

Bugün *A.flavus* ve *A.parasiticus* türlerinin kromozomlarında yer alan ve aflatoksin sentezini regüle eden genlere ait dizi bilgileri mevcuttur. PCR tekniği ile türe spesifik bölgeler

amplifiye edilerek aflatoksikojenik *Aspergillus* türlerinin tanımlanması amacıyla birçok araştırmalar yapılmıştır. Örneğin Criseo et al. (2001), aflatoksikojenik olan ve olmayan *A.flavus* türlerini belirlemek için aflatoksin biyosentetik pathway'in dört geni *aflR, nor-1, ver-1* ve *omt-A'* ya spesifik primerler kullanarak quaduplex bir PCR yöntemi geliştirilmiş ve aflatoksin üreten tüm suşlarda bu genlerin mevcut olduğunu göstermiştir. Scherm et al. (2005) ise *A.flavus* ve *A.parasiticus*'un aflatoksin üreten ve üretmeyen izolatlarını belirlemek için RT-PCR ile aflatoksin B1 biyosentetik pathway'nin 9 yapısal ve 2 regülatör genini analiz etmişlerdir. Analiz edilen üç genin *aflD, aflO* ve *aflP*'nin ekspresyon profilinin bir suşun aflatoksin üretip üretmemesiyle yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aflatoksin üretimi zinc binuclear cluster DNA-binding proteinini kodlayan *afl-R* geninin aktivitesine bağlıdır. Yapılan bir araştırmada A.oryzae ve A.sojae'nin bu geni amplifiye etmediği dolaysıyla bu geninin bu türlerde bulunmadığı veya baz dizisinin çok farklı olduğu bildirilmiştir (Lee et al., 2006).

Kalsik PCR ile yapılan çalışmalar aflatoksikojenik *Aspergillus* türleri hakkında kalitatif sonuçlar vermektedir. Oysa bir gıda ürünündeki aflatoksin oluşma riskinini belirlenmesi ve önlem alınması için kantitatif sonuçlar gereklidir. Bu amaçla yapılan son birkaç çalışmada aflatoksikojenik türler real-time PCR ile belirlenmeye çalışılmıştır. Örneğin; Mayer et al. (2003) *nor-1* geninin kopya saysını real-time PCR TaqMan probe yöntemi ile tespit ederek, gıdalarda *A.flavus'*un koloni oluşturan birimi arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif olarak sonuç verebilen real-time PCR yöntemi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Araştırmacılar real-time PCR tekniğinin kantitasyona imkan sağlamsının yanında, geniş bir dinamik aralığa sahip olması, düşük kontaminasyon riski taşıması ve daha spesifik bir deteksiyona imkan sağlaması nedeniyle klasik PCR'a kıyasla oldukça avantajlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (Mackay et al., 2002). Pek çok real-time PCR tekniği mevcut olmakla birlikte her döngüde üretilen amplikon miktarına paralel olarak oluşan sinyalin şiddeti de arttığı için TaqMan probe yöntemi tür tayini amacıyla yapılan çalışmalarda daha fazla tercih edilmektedir. TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli problar kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein=6-FAM), 3'ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob tek sarmal haline getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan kısma bağlanır.

Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3’ uctaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde sentezin devam edebilmesi için taq DNA polimeraz enzimi 5’→3’ nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5’ ucundan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur (Kubista et al., 2006).

Sonuç olarak gıda güvenliğinin sağlanması ve ekonomik kayıpların önlenmesi için risk oluşturan etkenlerin tespiti ve izlenmesi hassas ve hızlı sonuçlar veren yöntemlerle gerekmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygınlaşan real-time PCR sistemleri, hız ve kaliteye önem veren moleküler genetik laboratuvarlarının pek çok sorununa çözüm olmaktadır. Gıdalarda aflatoksikojenik suşların kantitatif olarak tespiti için de real-time PCR tekniğinin de uygun bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak gıda güvenliğinin sağlanması ve ekonomik kayıpların önlenmesi için risk oluşturan etkenlerin tespiti ve izlenmesi hassas ve hızlı sonuçlar veren yöntemlerle gerekmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygınlaşan real-time PCR sistemleri, hız ve kaliteye önem veren moleküler genetik laboratuvarlarının pek çok sorununa çözüm olmaktadır. Sonuç olarak literatürde aflatoksin biyosentezinden sorumlu genlerin belirlenmesi amacıyla yapılmış bazı çalışmalar mevcut olmakla birlikte kırmızı biberlerden izole edilen aflatoksikojenik küflerin tanımlanarak bu küflerde toksin üretiminden sorumlu genlerin üretilen aflatoksinler ile birlikte incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolaysıyla sunulan projenin; bir taraftan literatürdeki bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlayacağı diğer taraftan da son yıllarda kabul edilen limitlerin üzerinde aflatoksin içerdiği için iç ve dış ticarette sorunların yaşandığı ülkemizin önemli bir ihraç ürünü olan kırmızı biberde, aflatoksin biyosentez mekanizmasını aydınlatarak önlenmesine yönelik uygulanabilir sonuçlar ortaya koyacağı düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Projede Kullanılan Standart Küf Suşları

A.parasiticus türüne ve aflatoksin üreten gen bölgelerine spesifik primerlerin spesifite testinde kullanılan standart suşlar, United States of Agriculture (ARS) Kültür Kolleksiyonundan (NRRL) temin edilmiştir (Tablo 3.1). Fungal suşlar, Potato Dextrose Agar (PDA)'da 28±1°C'de 3-4 gün süreyle kültüre edilmiş ve kullanılıncaya kadar %15 gliserol içinde 80°C'de spor süspansiyonu olarak muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. Projede kullanılan standart küf suşları

Tür	**NRRL No**	**Tür**	**NRRL No**
A. parasiticus	NRRL 29538	*A. flavus*	NRRL 29487
A. parasiticus	NRRL 29571	*A. flavus*	NRRL 29506
A. parasiticus	NRRL 29573	*A. flavus*	NRRL 29507
A. parasiticus	NRRL 29575	*A. flavus*	NRRL 29512
A. parasiticus	NRRL 29581	*A. flavus*	NRRL 29518
A. parasiticus	DSM 5771	*A. flavus*	NRRL 5565
A. parasiticus	NRRL 29590	*A. flavus*	NRRL 4823
A. parasiticus	NRRL 29603	*A. flavus*	NRRL 4822
A. parasiticus	NRRL 6433	*A. flavus*	NRRL 3518
A. parasiticus	NRRL 29570	*A. flavus*	NRRL 3357
A. flavus	NRRL 4818	*A. flavus*	NRRL 626
A. flavus	NRRL 20521	*A. flavus*	NRRL 482
A. flavus	NRRL 29473	*A. flavus*	NRRL 465
A. flavus	NRRL 29474	*A. flavus*	DSM 818
A. flavus	NRRL 29519	*A. flavus*	NRRL 453

3.2. İnokulum Hazırlama

PDA besiyerinden toplanan *A.parasiticus* suşlarına ait sporların 10^6 spor/ml'lik dilüsyonu hazırlanarak bu spor suspensiyonu kırmızıbiber örneklerini inokule etmede kullanılmıştır. Disk şeklindeki fitre kağıtları steril bir petri plaklar içerisine yerleştirilerek spor solusyonu ile ıslatılmıştır. Steril edilmiş kırmızıbiber örnekleri bu disk yüzeyi üzerine yayılarak petri kutusunun kapağı kapatılmış ve 25^{o}C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyonun 3.,

6., 9., 15., 25. ve 30. günlerinde kontrol ve inokule kırmızıbiber örneklerinde aflatoksin tayini ve real time PCR ile *A. parasiticus* ve aflatoksin üreten biyosentez genleri analiz edilmiştir.

3.3. Küf Türlerinden ve Kırmızıbiber Örneklerin DNA Ekstraksiyonu

Her bir küf türünden yaklaşık 200 mg miselyum total genomik DNA ekstraksiyonunda kullanılmıştır. DNA ektraksiyonu fungal DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak gerçekletilmiştir. Kırmızıbiber örneklerinden DNA ekstraksiyonunda CTAB protokolu kullanılmıştır. *A.parasiticus* ile kontamine edilen kırmızıbiber örnekleri ve kontrol grubu örnekler %0.4'lük hipoklorit solusyonuna daldırılarak 2 dak. bekletilmiş ve daha sonra steril su ile 1 dak. yıkanmıştır. Kırmızıbiber örnekleri sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra DNA ektarksiyonu için 300 mg örnek tartılmış ve 750 µl ektraksiyon buffer (%4 CTAB, 100mM Tris-HCl, 1.4 MNaCl, 20mM EDTA ve %1 PVP) ve % 0.4 ß-merkaptoetanol içerisinde 65 ^{o}C'de 20 dak. inkübe edildikten sonra 600 µl kloroform:izoamilalkol (24:1 v/v) ilave edilerek faz ayrımı için 14.000 g'de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Üstteki sulu faza isopropanol ilave edilip -20^{o}C'de 2 saat inkübe ediledikten sonra 14.000 g'de 5 dak. santrifüj edilecektir. %70'lik etanol ile yıkanan pellet 50 µl TE buffer (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) ile resuspense edilmiştir.

3.4. Aflatoksikojenik A.parasiticus'un Türe Spesifik Real Time PCR Metodu ile Analizi

A.parasiticus'a spesifik oligonükeotid primerler kullanılarak hedef bölge amplifiye edildikçe oluşan floresans ışıma real-time PCR cihazı ile izlenmiş kırmızıbiber numunelerinden izole edilen küflerin *A. flavus* türene ait olup olmadığı spesifik primerler (PAR1 ve PAR2) (Tablo 3.2) kullanılarak spesifik real-time PCR syber Green yöntemi ile belirlenmiştir. PCR reaksiyonu, toplam 50 µl hacim içerisinde 25 µl PCR master mix, 200 pmol PAR1 ve PAR2 primerler ve yaklaşık 100 ng DNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Termal döngü şartları optimize edilerek 95 ºC'de 10 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94 ºC'de 1 dakika denatürasyon, 58 ºC'de 1 dakika yapışma ve 72 ºC'de 2 dakika uzama aşaması olmak toplam üzere toplam 30 döngü uygulanmıştır. Real-time PCR sonuçları melting kurve analizi ile doğrulanmıştır. PCR ürünleri %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

Sensitivite testi için PDA besiyerinden toplanan *A.parasiticus* suşlarına ait sporların sayımı yapıldıktan sonra 10^6, 10^5,10^4,10^3,10^2 ve 10^1 spor/ml'lik dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir

dilüsyondan DNA izole edildikten *A. parasiticus* türüne spesifik primerler kullanılarak real-time PCR tekniği ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.2. *A. flavus* Türüne Ait Küflerin Real-Time PCR ile İdentifikasyonu için kullanılan primerler

Primer Kodu	Baz dizisi	Ürün Boyutu
PAR1	5'- GTCATGGCCGCCGGGGGCGTC -3’	488 baz çifti
PAR2	5'- CCTGGAAAAAATGGTTGTTTTGCG -3'	

3.5. Aflatoksin Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve inokule kırmızıbiber örneklerinde aflatoksin tayininde TS EN 14123 “Gıda maddeleri - Yer fıstığı, antep fıstığı, incir ve kırmızı toz biberde aflatoksin B1 ile aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 toplamlarının tayini - Artkolon türevlendirmeli ve immunoaffinite ile kolondan geri almalı yüksek performanslı sıvı kromotografisi yöntemi” ve AOAC Official Method 999.07 “Aflatoxin B1 and Total Aflatoxins in Peanut Butter,Pistachio Paste, Fig P” kullanılmıştır. Bu amaçla mobil faz olarak kullanılan su+asetonitril +metanol (6+6+3) karışımının her litresine, 120 mg potasyum bromür ve 350 µL nitrik asit eklenmiştir. Cihazın çalışma koşulları, akış hızı 1.0 mL/dak, eksitasyon dalga boyu 360 nm, emisyon dalga boyu 430 nm, enjeksiyon hacmi 100 µL ve Kobra Cell akım kaynağı 100 µA olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.6. Aflatoksin Üreten Gen Bölgelerinin Real-Time PCR Yöntemi ileTespiti

Aflatoksin biyosentezinden sorumlu genlerin (*nor-1, ver-1, omt-A ve AFLR*) amplifikasyonunu sağlamak üzere Tablo 3.3’de verilen spesifik primerler kullanılmıştır. Böylece standart suşların ve kırmızıbiber numunelerine ait izolatların söz konusu gen bölgelerini bulundurup bulundurmadıkları tespit edilmiştir. Standart suşlarda ve izolatlarda aflatoksin üreten gen bölgelerinin tayini, real-time PCR Sybr Green yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu, her bir toksin geni için, toplam 50 µl hacim içerisinde 25 µl PCR master mix, 200 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 3.4) ve yaklaşık 100 ng DNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. Aflatoksin üreten gen bölgelerinin tespiti için kullanılan primerler

Primer Kodu	Gen Bölgesi	Baz dizisi
Nor1-F	norsolorinic acid reductase	5'-ACGGATCACTTAGCCAGCAC-3'
Nor1-R		5'-CTACCAGGGGAGTTGAGATCC-3'
VER-496	Versicolorin A dehydrogenase	5'-ATGTCGGATAATCACCGTTTAGATGGC-3'
VER-1391		5'-CGAAAAGCGCCACCATCCACCCCAATG-3'
OMT-208	Sterigmatocystin O-methyltransferase	5'-GGCCCGGTTCCTTGGCTCCTAAGC-3'
OMT-1232		5'-GCCCCAGTGAGACCCTTCCTCG-3'
AFLR-forward	Aflatoksin biyosentezini düzenleyici gen	5'-AATACATGGTCTCCAAGCGG-3'
AFLR-reverse		5'-GAAGACAGGGTGCTTTGCTC-3'

4. BULGULAR

4.1. *A.parasiticus* Türüne Spesifik Primerlerin Spesifite ve Sensitivite Testi Sonuçları

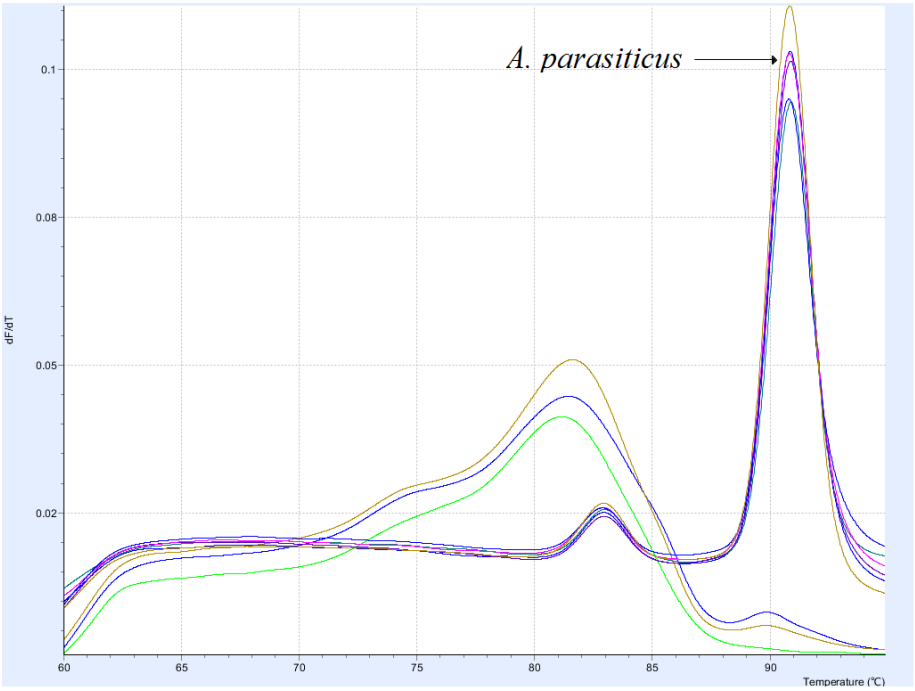
A.parasiticus türüne spesifik primerlerin spesifite testinde kullanılan standart suşlara ait ct değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Araştırmada kullanılan *A.parasiticus* türüne spesfik PAR1 ve PAR2 primerlerinin yalnızca *A.parasiticus* türleri ile spesifik reaksiyon verdiği *A.parasiticus* türüne ait standart suşlarla reaksiyon vermediği tespit edilmiştir. Primerlerin spesifitesi melting kurve analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.1). Melting kurve analizinde *A.parasiticus* türlerinin 91.5±0.1^{o}C'de türe spesifik pik verdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. *A.flavus* türüne spesifik primerlerin standart suşlar için spesifite testi sonuçları.

Tür	Standart No	Ct değeri (100 ng DNA için)
A. parasiticus	NRRL 29538	15.45
A. parasiticus	NRRL 29571	16.74
A. parasiticus	NRRL 29573	17.51
A. parasiticus	NRRL 29575	16.02
A. parasiticus	NRRL 29581	15.89
A. parasiticus	DSM 5771	18.01
A. parasiticus	NRRL 29590	15.52
A. parasiticus	NRRL 29603	17.42
A. parasiticus	NRRL 6433	16.54
A. parasiticus	NRRL 29570	17.63
A. flavus	NRRL 29473	>30
A. flavus	NRRL 29474	>30
A. flavus	NRRL 29519	>30
A. flavus	NRRL 29487	>30
A. flavus	NRRL 29506	>30
A. flavus	NRRL 29507	>30
A. flavus	NRRL 29512	>30
A. flavus	NRRL 29518	>30
A. flavus	NRRL 5565	>30
A. flavus	NRRL 4823	>30
A. flavus	NRRL 4822	>30
A. flavus	NRRL 3518	>30

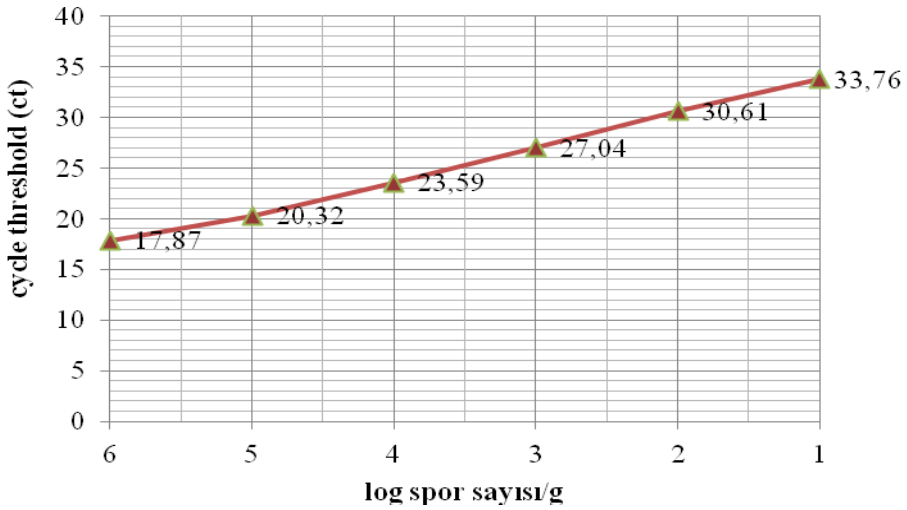
A. flavus	NRRL 3357	>30
A. flavus	NRRL 626	>30
A. flavus	NRRL 482	>30
A. flavus	NRRL 453	>30
A. flavus	NRRL 4818	>30
A. flavus	NRRL 20521	>30

>30: sinyal alınmadı ve ct değeri tespit edilmedi.



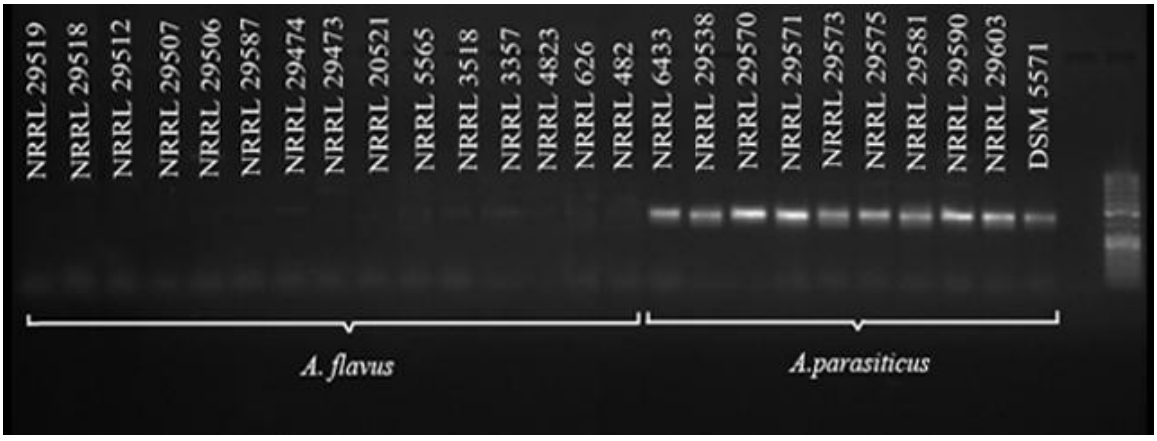
Şekil 4.1. Standart suşların PAR1 ve PAR2 primeleri kullanılarak elde edilen melting kurve analiz sonuçları.

A. parasiticus türüne spesifik primerlerin (PAR1 ve PAR2) sensitivite testi için 5771 No'lu DSM suşu kullanılmıştır. PDA besiyerinden toplanan *A.parasiticus* suşlarına ait sporların sayımı yapıldıktan sonra 10^6, 10^5,10^4,10^3,10^2 ve 10^1 spor/ml'lik dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan DNA izole edildikten *A. parasiticus* türüne spesifik primerlerin sensitivite sonuçları Şekil 4.2.'de verilmiştir.

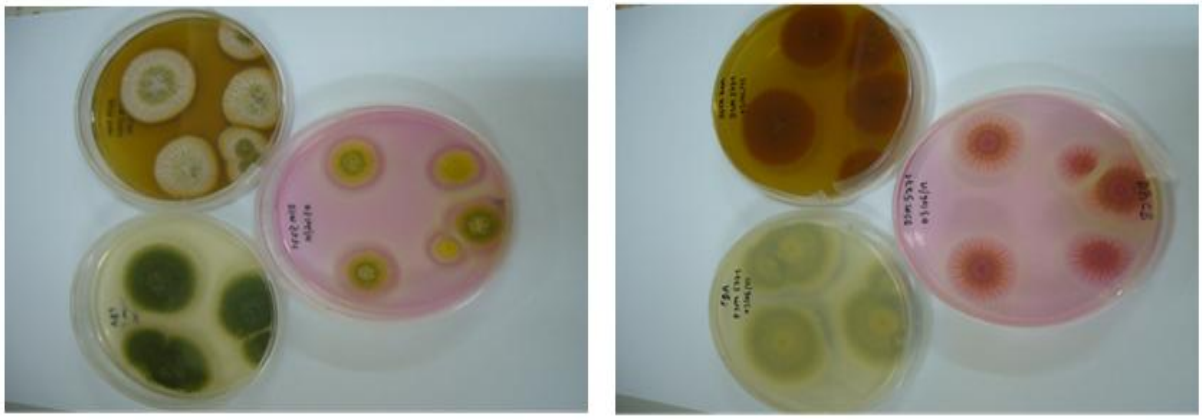


Şekil 4.2. *A. parasiticus* (DSM 5771)'un farklı spor konsantrasyonlarına karşılık PAR1 ve PAR2 spesifik primerleri ile belirlenen ct değerleri için çizilen standart eğri

Standart *A. parasiticus* ve *A.flavus* suşlarının PAR1 ve PAR2 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. *A. parasiticus* türüne spesifik primerlerin yalnızca *A. parasiticus* suşları ile türe spesifik PCR ürünü verdiği *A.flavus* ile reaksiyon vermediği tespit gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *A.parasiticus* türüne spesifik primerler (PAR1 ve PAR2) kullanılarak elde edilen PCR ürünlerine ait jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.4. *A.parasiticus* türlerinin farklı besiyerlerindeki görünümü.

4.2. *A. parasiticus* Standart Suşlarında Aflatoksin Üreten Gen Bölgelerinin Real-Time PCR ile Tespiti

Bu çalışmada 10 adet *A. parasiticus* standart suşunda aflatoksin biyosentezinde görev alan 3 adet yapısal gen *nor-1* (norsolorinic acid reductase), *ver-1* (Versicolorin A dehydrogenase) ve *omt-A* (Sterigmatocystin O-methyltransferase) ve 1 adet düzenleyici *AflR* geni olmak üzere toplam 4 gen bölgesinin varlığı real-time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Diğer taraftan küf izolatları tarafından üretilen aflatoksin kantitatif olarak HPLC yöntemi ile belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Standart suşlarda aflatoksin üreten gen bölgeleri ve aflatoksin üretimi

Tür	Standart Suş No	Toksin genleri				Aflatoksin Üretimi (ng/0.1cm^2)				
		nor-1	***ver-1***	***omt-A***	***AFLR***	**B_1**	**B_2**	**G_1**	**G_2**	**Toplam**
A.parasiticus	NRRL 6433	15.43	16.25	17.15	17.462	7.59	-	-	-	7.97
A.parasiticus	NRRL 29538	28.60	29.27	28.18	31.173	-	-	-	-	-
A.parasiticus	NRRL 29603	30.82	28.77	26.65	31.615	-	-	-	-	-
A.parasiticus	NRRL29590	18.39	17.72	17.71	17.086	156.25	11.00	251.1	10.29	428.70
A.parasiticus	NRRL 29570	16.633	17.37	19.39	17.65	16.54	0.2	4.67	0.05	21.46
A.parasiticus	NRRL29575	18.82	15.67	17.79	17.39	14.44	0.13	9.87	0.14	24.58
A.parasiticus	NRRL29573	17.37	18.18	18.31	16.31	AE	AE	AE	AE	AE
A.parasiticus	NRRL29581	16.92	16.30	17.12	16.90	7.069	0.044	0.185	-	7.30
A.parasiticus	NRRL29571	17.50	18.39	18.68	17.22	138.50	2.97	140.4	3.051	284.97
A.parasiticus	DSM 5771	16.75	16.12	16.52	14.98	34.10	6.15	51.31	1.1	87.05

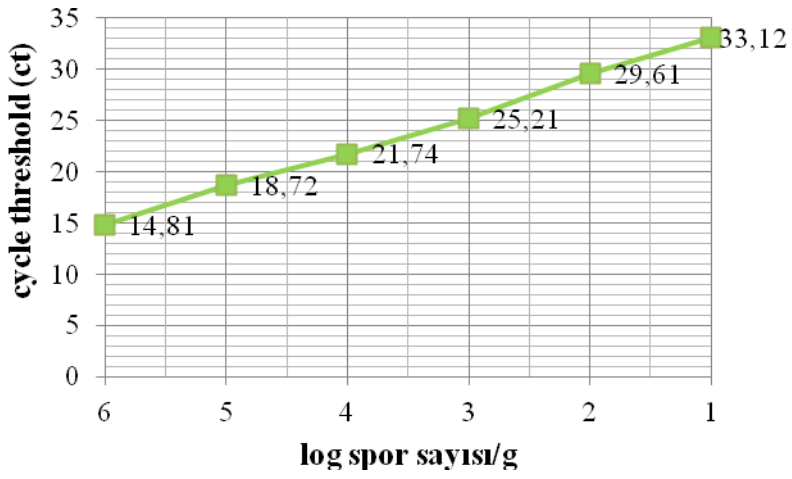
-: Deteksiyon limitinin altında
AE: Analiz edilmedi.

Standart küf izolatlarına ait HPLC sonuçları incelendiğinde, 10 standart suştan 7 tanesinin aflatoksin ürettiği tespit edilmiştir. Toksikojenik suşların ürettikleri aflatoksin B1'in toplam

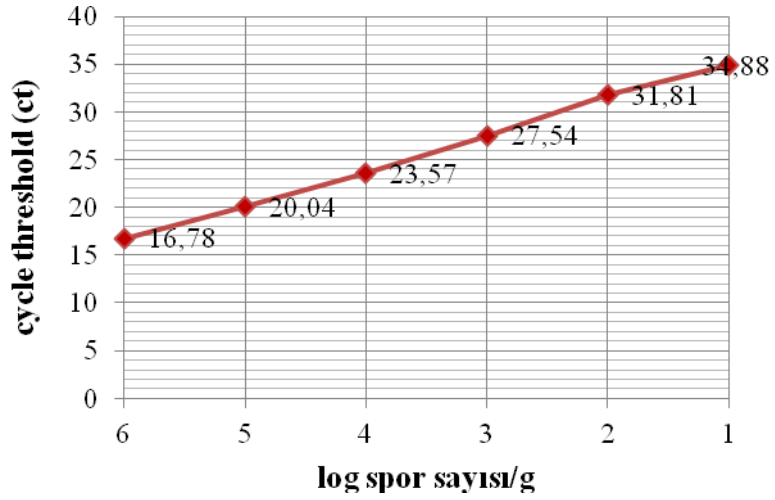
üretilen toksin içerisindeki oranı %36.44-99.84 arasında değişirken, aflatoksin B2'nin oranının %0.60- 7.06 arasında değiştiği, G1'nin %2.53-58.94 ve yine G2'nin oranının %0.23-2.40 tespit edilmiştir. Bunların dışında 2 standart suşun da aflatoksin üretmediği belirlenmiştir. Standart suşlara ait aflatoksin biyosentez genlerinin real-time PCR sonuçları incelendiğinde, toksikojenik suşların 14.98-19.39 arasında değişen ct değerleri aldığı gözlenmiştir. Toksikojenik olmayan suşlarda (NRRL 29603 ve NRRL 29538) ise ct değerlerinin 26.65-31.62 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

4.3. *A. parasiticus* İzolatlarında Aflatoksin Biyosentez Genlerinin Real-Time PCR ile Tespiti

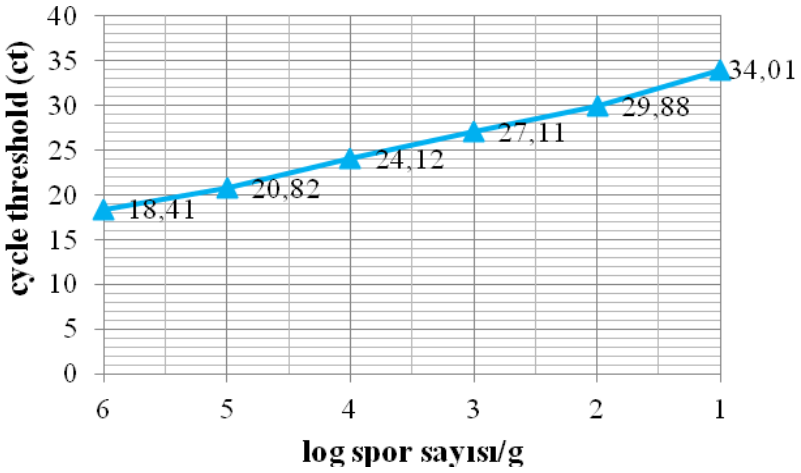
Aflatoksin biyosentezinden sorumlu gen bölgelerinin kantitatif analizi için söz konusu genlerin (*nor-1, ver-1, omt-A ve AFLR*), amplifikasyonunu sağlayan spesifik primerler kullanılmıştır. (Tablo 4.4). PDA besiyerinden toplanan *A.parasiticus* suşlarına ait sporların sayımı yapıldıktan sonra 10^6, 10^5,10^4,10^3,10^2 ve 10^1 spor/ml'lik dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan DNA izole edildikten aflatoksin gen bölgelerine spesifik primerlerin sensitivite sonuçları Şekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.



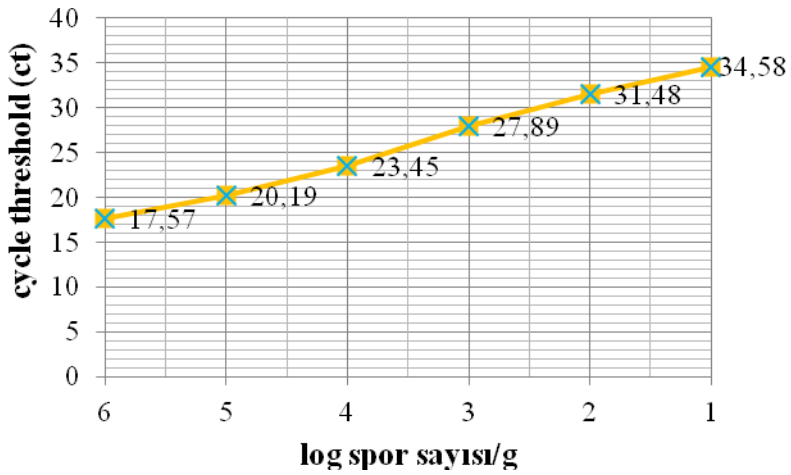
Şekil 4.5. *A. parasiticus* (DSM 5771)'un farklı spor konsantrasyonlarına karşılık *nor-1*genine spesifik primerleri ile belirlenen ct değerleri için çizilen standart eğri



Şekil 4.6. *A. parasiticus* (DSM 5771)'un farklı spor konsantrasyonlarına karşılık *ver-1* genine spesifik primerleri ile belirlenen ct değerleri için çizilen standart eğri



Şekil 4.7. *A. parasiticus* (DSM 5771)'un farklı spor konsantrasyonlarına karşılık *AFLR* genine spesifik primerleri ile belirlenen ct değerleri için çizilen standart eğri



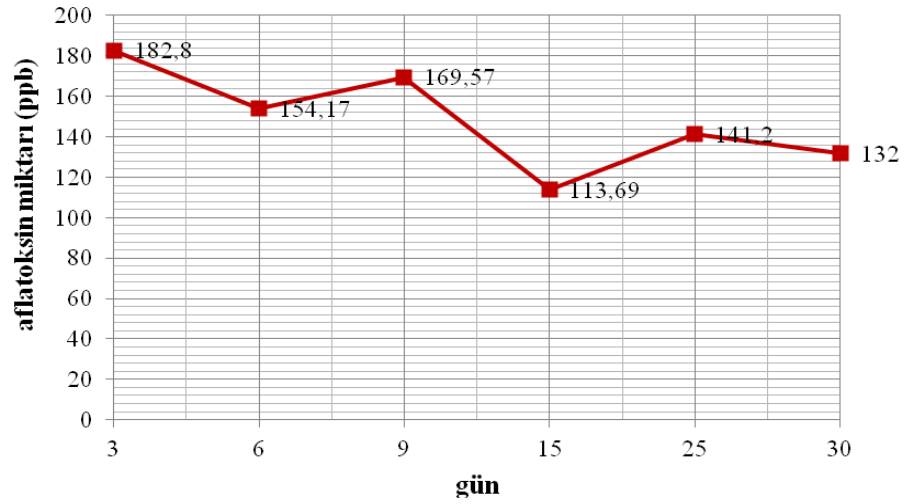
Şekil 4.8. *A. parasiticus* (DSM 5771)'un farklı spor konsantrasyonlarına karşılık *nor-1*genine spesifik primerleri ile belirlenen ct değerleri için çizilen standart eğri

Kırmızı biber örneklerine *A. parasiticus* 10^6 spor/g seviyesine inokulasyon yapıldıktan sonra 3., 6., 9., 15., 25. ve 30. günlerde kırmızı biber örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak toksin genleri real-time PCR tekniği ile analiz edilmiştir. Ayrıca aynı örneklerde HPLC yöntemi ile aflatoksin tayini yapılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Tablo 4.3'de verilmiştir.

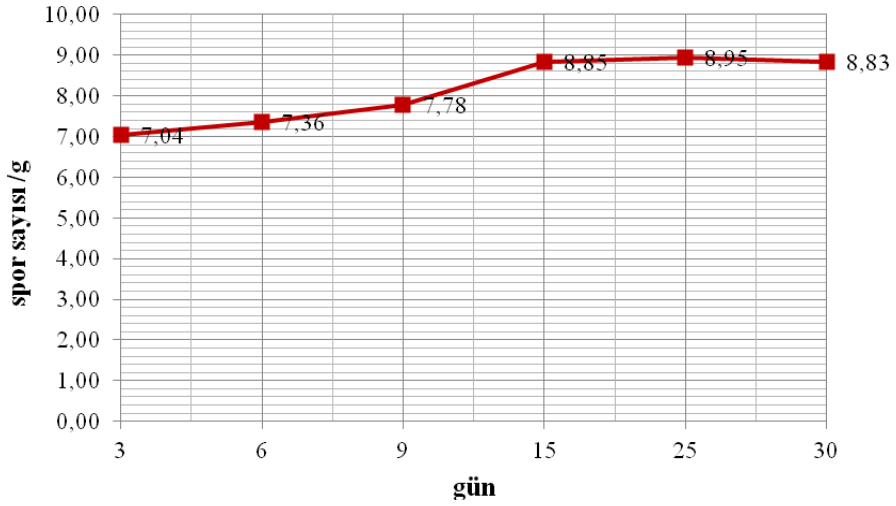
Tablo 4.3. *A.parasiticus* ile inokule edilen kırmızı biber örneklerinde aflatoksin üretiminden sorumlu gen bölgelerine ait real-time PCR sonuçları üretilen aflatoksin miktarı.

Gün	Küf sayısı (Spor sayısı/g)	Toplam Aflatoksin miktarı (ppb)	Tespit edilen ct değeri			
			nor-1	*ver-1*	*omt-A*	*AFLR*
3	1.1 x 10^7	182.80	18.18	18.13	19.18	19.14
6	2.3x10^7	154.17	18.54	18.63	19.50	19.45
9	6x10^7	169.57	18.05	18.03	19.78	20.38
15	7x10^8	113.69	-	20.74	20.89	22.43
25	8.9x10^8	141.20	20.74	20.14	20.143	22.13

>30: sinyal alınmadı ve ct değeri tespit edilmedi.



Şekil 4.9. *A. parasiticus* (DSM 5771) ile inokule edilen kırmızı biber örneklerinde inokulasyonun 3.,6.,9.,15.,25. ve 30. günlerinde tespit edilen aflatoksin miktarı.



Şekil 4.10. *A. parasiticus* (DSM 5771) ile inokule edilen kırmızı biber örneklerinde inokulasyonun 3.,6.,9.,15.,25. ve 30. günlerinde tespit edilen küf sporu sayısı.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu proje ile aflatoksijenik küf türü olan *A. parasiticus*'un aflatoksin üretme mekanizmaları aflatoksin sorunu ile en çok anılan gıda maddelerinden biri olan kırmızıbiber modelinde moleküler boyutta belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla *A. parasiticus* ile inokule edilen kırmızıbiber örnekleri inokulasyonun 3., 6., 9., 15, 25. ve 30. günlerinde bir taraftan HPLC sistemi ile üretilen aflatoksin miktarı yönünden analiz edilirken diğer taraftan da real-time PCR sistemi ile aflatoksijenik gen bölgeleri ile üretilen toksin miktarı arasındaki korelasyonlar tespit edilmiştir.

Tamamlanan proje kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Araştırmada *A.parasiticus* türüne spesifik primerler (PAR1 ve PAR2) kullanılarak real-time PCR tekniği ile *A. parasiticus* türüne ait küflerin spesifik olarak belirleneceği gözlenmiştir. Bu primer seti kullanılarak *A. parasiticus* türüne ait küfler 1 log spor sayısı/g seviyesine kadar tespit edilebilmiştir.

2. *A.parasiticus* türüne ait 10 standart suştan 7 tanesinin aflatoksin ürettiği tespit edilmiştir. Toksikojenik suşların ürettikleri aflatoksin B1'in toplam üretilen toksin içerisindeki oranı %36.44-99.84 arasında değişirken, aflatoksin B2'nin oranının %0.60- 7.06 arasında değiştiği, G1'nin %2.53-58.94 ve yine G2'nin oranının %0.23-2.40 tespit edilmiştir.

3. Standart suşlara ait aflatoksin biyosentezinden sorumlu gen bölgelerinin kantitatif analizi sonuçları incelendiğinde; her bir gen bölgesinin 1 log spor sayısı/g seviyesine kadar tespit edilebildiği ve *nor-1, ver-1, omt-A ve AFLR* genlerinin 1 log spor sayısı/g seviyesi için sırasıyla; 33.12- 34.88 arasında değişen ct değerleri verdiği tespit edilmiştir.

4. Kırmızıbiber örneklerine 10^6 spor/g seviyesinde *A. parasiticus* inokule edildikten sonra inokulasyonun 3. gününde 1.1×10^7 olarak tespit edilen küf sayısının 25. güne kadar artarak 8.9×10^8 seviyesine ulaştığı 30. günde ise tekrar 6.7×10^8 seviyesine

düştüğü gözlenmiştir. Diğer taraftan en yüksek aflatoksin miktarı inokulasyonun 3. gününde tespit edilirken (182.80 ppb) en düşük aflatoksin miktarı 15. günde (113.69) tespit edilmiştir. 15. günden sonra aflatoksin miktarının tekrar artarak 132.01 ppb seviyesine ulaştığı gözlenmiştir. Dolaysıyla *A. parasiticus* inokule edilen kırmızı biber örneklerinde bir taraftan aflatoksin oluşurken diğer taraftan da parçalandığı olduğu anlaşılmaktadır.

5. Aflatoksin biyosentezinden sorumlu 4 gen bölgesinin *(nor-1, ver-1, omt-A ve AFLR)* toksinin üreten suşların belirlenmesi bakımından paralel sonuçlar verdiği tespit ve aflatoksin üretimi ile bu gen bölgeleri arasında bir korelasyonun bulunduğu dolaysıyla aflatoksin üretiminin belirlenmesinde bu genlerin kullanılabileceği belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

Akgül, A., 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Dergisi Yayınları, No15, Ankara.Akpınar, Ş. 2006. Gıdalar yemler ve mikotoksinler http://www.ordutarim.gov.tr /subeleler/kontrol/aflatoksin /toksinler.htm Anonim. 1985. Türk Standartları Enstitüsü. Aflatoksin Tayin Metotları-Yağlı Kuru Meyvelerde. TS 4672, Ankara 1985.

Atoui, A., Mathieu, F., Lebrihi. A. 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. Int J Food Microbiol. 115(3):313-8.

Banwart GJ. 1989. Basic Food Microbiology. Second Edition, Published by Van Nostrand Reinhold, New York, 299-320.

Bilgrami KS, Sinha KK.1986. Aflatoxin in India: I : Aflatoxin in Maize, MS, Zuber, EB, Lillehoj and BL Renfro (Eds) Sponsored by CIMMYT, UNDP and USAID, A proceeding the workshop. Mexico 349-358.

Criseo G, Bagnara A, Bisignano G. 2001. Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of Aspergillus flavus group. Lett Appl Microbiol. Oct;33(4):291-5.

De Ruiter, G.A., Notermanns, S.H.W., Rombouts, F.M., 1993. New methods in food mycology. Trends Food Sci. Technol. 4.

Gourama, H., Bullermann, L.B., 1995. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. J. Food Protect. 58, 1389–1394. 91– 97.

Hesseltine, C. W. 1976. Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods and Feeds. In Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Ed. J. V. Rodrics, Washington. D. C., 411p

Doyle, J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytoch. Bull. 19; 11–15.

Karapınar, M. ve Tuncel,G. 1986. Perakende satılan toz baharatların mikrobiyolojik kaliteleri. E.Ü.Müh.Fak. Der. Seri: B Gıda Mühendisligi, 4:1:27-36.

Kaya S. 1995. Veteriner Klinik Toksikoloji. Medisan Yayınevi, Ankara, pp: 296-299.

Kıvanç,M. ve Sert, S. 1989. Erzurum'da perakende satıs magazalarındaki bazı ögütülmüs baharatların mikrobiyel kalitesi. Doga TU.Tarım Ormancılık. 13:2:316-325.

Kneifel,W. ve Berger, E.1994. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. J.of Food Protection. 57:10:893-901.

Kubista,M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jona´k J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback R.,Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric N. 2006.The real-time polymerase chain reaction Review. Molecular Aspects of Medicine 27;95–125.

Lee, C.Z., Liou, G.Y., Yuan, G.F. 2006. Comparison of the aflR gene sequences of strains in Aspergillus section Flavi. Microbiology, 152, 161–170.

Majerus P, Woller R: Gewürze schimmelpllzbefall and gerhalt an aflatoxin, ochratoxin A und sterigmatocystin. Fleischwirtschaft, 65(9), 1155-1158, 1985.

Mayer, Z., Bagnara, A., Färber, P., Geisen, R. 2003. Quantification of the copy number of *nor*-1, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. Int J Food Microbiol., 82(2);143-51.

Paksoy, M., Uslu, Ö. S. 2006. Türkiye'de Kırmızı Biberin Pazarlanması ve Sorunları. http://www.kahramanmarastarim.gov.tr/makaleler/makale1.htm

Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello A., Migheli, Q.2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes *aflD, aflO***,** and *aflP* by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus.* Int J Food Microbiol., 98 (2); 201-210.

Scott PM, Kennedy BPC: Analysis and survey of ground black, white and capsicum peppers for aflatoxins. Journal of the AOAC, 56 (6); 1452-1457.

Seitz, L.M., Mohr, H.E., Burroughs, R., Sauer, D.B., 1977. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. Cereal Chem. 54, 1207– 1217.

Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R., Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. 1996. Appl Environ Microbiol. September; 62(9): 3270–3273.

Taydas ,E.E. ve Askın,O. 1995. Kırmızı biberlerde aflatoksin olusumu. Gıda.20:1:3-8.

Yıldırım,T.,Tanrıseven,A.ve Özkaya, S. 1997. Bursa ve Sakarya kırmızı biberlerinde aflatoksin çalısması. Gıda Teknolojisi.2:6:60-64.