

## Kuru incirde fumonisin varlığının belirlenmesi

**Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER<sup>\*</sup>, Dilek HEPERKAN**

*İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul*

### Özet

*Besleyici ve sağlıklı bir gıda olan kuru incir dünyada yaygın olarak üretilen meyvelerdendir. Fumonisinler, mısırdaki yaygın olarak bulunmakta olup *Fusarium verticilloides* ve *F. proliferatum* tarafından üretilmektedir. Bu çalışmada Ege Bölgesi'nden 2003 ve 2004 yıllarında 7 farklı yöreden kurutma aşamasından temin edilen kuru incir örneklerinde fumonisin varlığı ELISA yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. ELISA yöntemiyle toplam fumonisin tayini ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon kolonuyla temizleme işlemlerinden sonra gerçekleştirilmiştir. İncir örneklerinin %81.8'inde 0.1 ppm'in üstünde fumonisin varlığı belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci yılında örneklerde birinci yıla göre daha yüksek oranda fumonisin kontaminasyonu belirlenmiştir. Buna karşılık birinci yılda daha yüksek fumonisin düzeyleri belirlenmiştir. Her iki yılda da örneklerde fumonisin kontaminasyonu en fazla 1.0-5.0 ppm arasındadır. Kurutma aşamasından temin edilen kuru incirlerde ELISA yöntemiyle belirlenen toplam fumonisin değerleri HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. ELISA yöntemi ile HPLC yöntemine göre kuru incirde çok daha yüksek fumonisin değerleri elde edilmiştir. Örneklerin tamamında iki yöntemle elde edilen bulgular karşılaştırıldığında regresyon katsayısı 0.869 olarak hesaplanmıştır. HPLC yöntemiyle 1 ppm değerinin altındaki  $FB_1$  değerleri dikkate alındığında iki yöntem arasında ilişki belirlenmemiştir. 1 ppm'in üzerindeki değerler için iki yöntem arasında korelasyon belirlenmesine rağmen ELISA yöntemiyle elde edilen fumonisin miktarları HPLC yöntemine göre çok yüksektir. ELISA yöntemiyle 115 örneğin 11 adedinde yanlış pozitif sonuç belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre kuru incirde fumonisin tayini için ELISA tarama amaçlı olarak kullanılabilir bir yöntem olup sonuçların HPLC gibi başka bir yöntemle doğrulanması gerektiği düşünülmektedir.*

**Anahtar Kelimeler:** Kuru incir, fumonisin, ELISA.

<sup>\*</sup>Yazışmaların yapılacağı yazar: Funda KARBANCIOĞLU GÜLER. karbanci@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 73 19.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Programı'nda tamamlanmış olan "İncirde okratoksin A ve fumonisin oluşumunun incelenmesi" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 05.06.2008 tarihinde dergiye ulaşmış, 16.07.2008 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.11.2010 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Determination of occurrence of fumonisin in dried figs

### Extended abstract

Dried fig, very nutritional and a healthy food, is one of the most widely produced fruits in the world. Dried figs can be consumed directly, or as fig paste in production of different desserts and candies. It is an important agricultural product following raisin and dried apricot among Turkish dried fruit exports. Turkey is ranked first in dried fig exporting countries with approximately 52600 tons of dried figs in 2005, equivalent to 52% of world's dried fig exports. Dried figs are produced mainly in the Aegean Region in the western part of Turkey. Environmental conditions in the Aegean Region during ripening, harvesting and drying of figs seem favorable for mycotoxin production in infected fruits. Harvesting and sun-drying processes and water activity value of fig fruits during drying are also effective on mycotoxin formation.

Fumonisin are produced by *Fusarium verticilloides* and *Fusarium proliferatum*, fungi that commonly contaminate maize. Fumonisin induce several diseases in animals such as Equine leukoencephalomalacia in horses, Porcine pulmonary oedema. A relationship between consumption of fumonisin containing maize and incidence of esophageal cancer by humans in certain areas of the world has been determined. With regard to the animal studies and epidemiological studies on humans, fumonisins have been classified as a possible human carcinogen (Group 2B) by IARC. Thin-layer chromatography (TLC) and liquid chromatographic (LC), mass spectroscopic (MS), gas chromatographic and immunochemical methods have been used for fumonisin analysis in foods.

In this study, the total fumonisin incidence and levels were determined in the Turkish dried figs, collected from the drying stage in seven different districts located in the Aegean Region in 2003 and 2004. Occurrence of total fumonisin (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>) in dried figs was investigated by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) after extraction with methanol: water and clean up with solid phase extraction cartridge.

The results of the two years indicate that fumonisin presence is a potential risk in dried figs. Fumonisin were detected in 94 samples of the 115 naturally dried figs collected from orchards before any treatment. The total fumonisins in dried figs contamina-

tion were determined as 78.9% and 86.4 % in 2003 and 2004 samples, respectively. Although the lower contamination incidences were observed in 2003 than in 2004, higher total fumonisin content was determined in the first year of the study. The highest incidences of fumonisin positive samples were obtained within the range 1.0-5.0 ppm for each year. 19.7% and 11.4% of the dried fig samples had fumonisin level exceeding 20 ppm in 2003 and 2004, respectively.

ELISA and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods for the determination of fumonisins in dried figs were compared. Only occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> in dried figs was determined by HPLC. Among the fumonisin derivatives, FB<sub>1</sub> is the most common one and constitutes about 70-80% of the total fumonisin content of *F. verticilloides* cultures and naturally contaminated foods. Fumonisin B<sub>2</sub> accounts for 15-25% of the total fumonisin while fumonisin B<sub>3</sub> accounts for % 3-8.

Correlation between ELISA and HPLC methods was observed for all samples. However, no correlation between methods was recorded for samples below 1 ppm Fumonisin B<sub>1</sub> level (obtained by HPLC). Regression coefficient was calculated as 0.820 for samples that contains above 1 ppm fumonisin B<sub>1</sub>. Although there was a correlation between methods for samples above 1 µg/gr, fumonisin levels obtained by ELISA were much higher than HPLC. False positive results were obtained by ELISA in 11 of 115 dried fig samples. Overestimation of the fumonisin content and false positive results in ELISA assays have been also reported previously. Although solid phase extraction cartridge was used for cleaning in the ELISA assay, higher fumonisin levels than HPLC were observed in dried fig samples because of the solvent effect of methanol. Hence, it was reported that solvent and matrix effect could be decreased by diluting the extract with phosphate buffer or distilled water.

It is considered that ELISA assay can be used as a screening method to determine the occurrence of fumonisin in dried figs after diluting the extracts. The mycotoxin concentrations in positive samples should be confirmed by a chromatographic methods such as HPLC to eliminate the false positive and false negative results.

**Keywords:** Dried figs, fumonisin, ELISA.

## Giriş

İncir, Moracea familyasından olup en tanınmış bildiğimiz sofralık incir *Ficus carica L.*'dir. Sofralık incir, taze, kurutulmuş, ezme veya konserve olarak tüketilmektedir. Konserve incir daha çok şekerleme veya reçel yapımında kullanılmaktadır (Desai ve Katecha, 1995). Düşük kaliteli incirlerden ise pekmez ve etil alkol üretilmektedir. Etil alkol üretiminde yan ürün olan incir çekirdekleri, boya, kozmetik ve ilaç sanayinde, incir küspesi de hayvan yemi üretiminde değerlendirilmektedir (Tuğ, 2002; Özden, 2005).

Ülkemizde yetiştirilen incir çeşitlerinden en önemlisi ve kurutmaya en uygun incir çeşidi Küçük ve Büyük Menderes havzalarında yetişen büyük ebatlı, açık sarı renkte ince kabuklu, beyaz etli, şekerce zengin, düşük asit içeriğine sahip Sarılop (Smyrna) inciridir (Tous ve Ferguson, 1996; Aksoy vd., 2003;).

Kuru incir, kuru üzüm ve kayısıdan sonra Türk kuru meyve ihracatında önemli bir tarımsal üründür. Dünyada kuru incir üretimi az sayıdaki ülkede ve sınırlı miktarda olup, dünya taze incir üretiminin % 27'si, kuru incir ihracatının ise %51.6'sı ülkemiz tarafından gerçekleştirilmektedir.

İhraç ettiğimiz ürünler içerisinde önemli yer tutan kuru incirde geçmiş yıllarda, limitlerin üzerinde aflatoksin belirlenmiş ve bu ürünler Türkiye'ye iade edilmiştir. Olgunlaşma, hasat ve kurutma aşamalarında Ege Bölgesi'ndeki sıcaklık iklim koşulları ve meyvenin su aktivitesi, ürünü küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu için elverişli hale getirmektedir. İncirlerin küf florası üzerine yapılan çalışmalarda hakim florayı *A. niger*, *A. flavus*-*A. parasiticus* ve *Fusarium* küflerinin oluşturduğu, ancak incirin temin edildiği aşamaya göre de farklılık gösterebileceği belirtilmiştir (Heperkan, 2006). Bu küflerin toksijenik suşlarının varlığı üründe mikotoksin riskini ortaya çıkarmaktadır.

Fumonisinler, *Fusarium* spp. tarafından üretilen dünya genelinde çoğunlukla mısır ve mısır ürünlerinde bulunan doğal kontaminantlardan-

dır. Çoğunlukla *F. verticilloides* ve *F. proliferatum* tarafından üretilmektedir (Jackson ve Jablonski 2004; Scaff ve Scussel, 2004). *F. verticilloides* ve *F. proliferatum* 4-37°C arasında gelişmektedir. *F. verticilloides* için optimum gelişme ve çimlenme 0.994 su aktivitesinde gerçekleşmektedir (Marin vd., 2004; Sweeney ve Dobson, 1998). Mısırdaki fumonisin oluşumu 10-37°C'de gerçekleşmektedir, 7°C'de fumonisin varlığı tespit edilmemiştir. *F. verticilloides* suşları optimum 20-30°C'de fumonisin üretirken, *F. proliferatum* için bu değer 15°C'dir (aw~1) (Marin vd., 2004).

Tarım ürünlerinin *Fusarium* spp. ve fumonisinlerle kontaminasyon düzeyini etkileyen faktörler arasında tohum çeşidi, iklim ve tarımsal uygulamalar, bitki stresi, toprağın nem içeriği, gündüzlerin uzun olduğu mevsimlerde maksimum sıcaklık dereceleri, toprağın besin içeriği ve yarışmacı mikoflora bulunmaktadır. Yüksek sıcaklık ve neme sahip bölgelerde gıdalardaki fumonisin düzeylerinin diğer bölgelere göre artış gösterdiği belirtilmektedir (Jackson ve Jablonski, 2004; Soriano ve Dragacci, 2004).

Fumonisinlerin farelerde karaciğer kanserini teşvik edici etkilere sahip olduğu, atlarda beyin hücrelerinde ölüm ve lezyonlara, domuzlarda akciğer ödem sendromu, kalp-damar rahatsızlıkları gibi hayvan hastalıklarına neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çeşitli hayvan türlerine karşı nefrotoksik, hepatotoksik ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkiler gösterdiği saptanmıştır. Fumonisinle bulaşık mısır tüketimi ile yemek borusu kanserinin görülme oranı arasında Güney Afrika ve Çin'de ilişki olduğu saptanmıştır (Nelson vd., 1992; Castellá vd., 1999; EHC, 2000; Scaff ve Saussel, 2004).

Fumonisinler, insanlarla ilgili yeterli veri olmamasına rağmen deney hayvanlarından elde edilen kanserojen etki bulgularına göre Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından 2B sınıfı kanserojen olarak değerlendirilmiştir (IARC, 1993).

Gıdalarda fumonisin varlığının belirlenmesinde ince tabaka kromatografisi (TLC), sıvı kromato-

grafisi (LC), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), LC-MS ve immunokimyasal metotlar kullanılmaktadır.

Immunokimyasal yöntemlerden olan ELISA yöntemi hızlı mikotoksin analizlerinde ve tarama çalışmaları için faydalı bir araçtır. Yüksek matriks bağımlılığı ve muhtemel yüksek sonuçlara rağmen ELISA yöntemi, kullanımı kolay ve aynı anda çok sayıda örneğe uygulanabilir bir yöntemdir.

Bu çalışmada Ege Bölgesi'nde farklı yörelerden kurutma aşamasında temin edilen kuru incir örneklerinde fumonisin varlığının ELISA yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve yöntem

### Kuru incir örnekleri

Çalışmada kullanılan 2003 ve 2004 yıllarına ait toplam 115 adet kuru incir örneği Avrupa Birliği'nin 2002/26/EC nolu direktifine uygun olarak Ege Bölgesi'nde 7 farklı yöreden (Erbeyli, Germencik, İncirliova, Söke, Selçuk, Ortaklar, Torbalı) kurutma aşamasında temin edilmiştir (Tablo 1). Örnekler laboratuvara kağıt torbalar da taşınmıştır. Örnekler analize alınıncaya kadar plastik torba içinde ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. Örneklerin bölgelere göre dağılımı

| Bölge      | Örnek Sayısı |      |
|------------|--------------|------|
|            | 2003         | 2004 |
| Erbeyli    | 9            | 6    |
| Germencik  | 21           | 12   |
| İncirliova | 9            | 4    |
| Ortaklar   | 9            | 9    |
| Selçuk     | 13           | 6    |
| Söke       | 7            | 4    |
| Torbalı    | 3            | 3    |
| Toplam     | 71           | 44   |

### Örneklerin hazırlanması

Fumonisin analizini gerçekleştirmek amacıyla incir örnekleri su ile birlikte homojenize edilmiştir. Bu amaçla örnekler kıyma makinesinden geçirilmiştir. Daha sonra yaklaşık 250 g incir ezmesi, 5 kısım meyve ve 4 kısım musluk suyu

(w/w) olacak şekilde Stomacher cihazında 5 dak. karıştırılarak homojenizasyon sağlanmıştır.

### Katı faz ekstraksiyon kolonla saflaştırma ile fumonisin ekstraksiyonu

Kuru incirde fumonisin B<sub>1</sub> analizi mısır için geliştirilmiş olan Romer Labs. (Anonymous, 2004a) ve AOAC 995.15; TS EN 13585 metotlarının uyarlanması ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada analitik ve/veya HPLC saflığında kimyasal maddeler kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyon kolonları Romer Labs firmasından temin edilmiştir. 45 g ± 0.2 g örnek 100 ml metanol:su (3:1; v/v) ilavesiyle Waring Blender da 5 dak. süreyle ekstrakte edilmiştir. Karışım Whatman No:4 filtre kağıdı kullanılarak filtre edildikten sonra pH'ı 0,1M NaOH ile 6-9'a ayarlanmıştır. 10 ml filtrat alınarak 10ml metanol:su karışımıyla seyreltilmiştir. Katı faz ekstraksiyon kolonu önce 5 ml metanol ve arkasından 5 ml metanol:su karışımı geçirilerek koşullandırılmıştır. Koşullandırılan kolondan seyreltilmiş ekstrakt ≤2 ml/sn hızında geçirilmiştir. Kolon safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla 8 ml metanol-su ve 3 ml metanolle yıkanmıştır. Fumonisin, 10ml metanol:asetik asit (99:1; v/v) ile kolondan alınmıştır. Elde edilen ekstrakt HPLC ve ELISA analizlerinde kullanılmak üzere ikiye bölünerek azot altında yaklaşık 60°C'de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kalıntı 200 µl metanol karışımında çözülerek türevlendirme sonrası HPLC, 1 ml metanol-su ile çözülerek ELISA yöntemi ile analizlenmiştir.

### ELISA yöntemi

Romer Lab. AgraQuant®1-5 Fumonisin direkt yarışmalı ELISA test kiti kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir (Anonymous, 2004b). ELISA yöntemiyle analizler dağıtıcı firmanın önerisiyle katı faz ekstraksiyon kolonuyla saflaştırılmış örneklerin metanol:su (3:1) ile çözülmesiyle elde edilen ekstraktlarda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan ELISA kiti tahıllar için geliştirilmiştir. Kit içeriği 96 adet antipodi kaplı küvet, 96 adet mavi etiketli dilüsyon küveti, fumonisin standartları ( 0; 0.25; 0.5; 1.0; 2.5 ve 5.0 µg/g), yeşil kapaklı şişede fumonisin konjugatı, mavi kapaklı şişede substrat solüsyonu ve

kırmızı kapaklı şişede durdurma solusyonu içermektedir.

Her örnek ve standart için iki adet dilüsyon ve antibodi kaplı küvet kullanılmıştır. 200'er µl konjugattan dilüsyon küvetine sekiz kanallı pipet ile aktarılmıştır. 100'er µl standart ve örnek reaktiflerinden ilave edilerek pipetle üç kez çekilip bırakılarak karıştırılmıştır. Karışımlardan 100'er µl alınarak antibodi kaplı küvetlere aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dak. inkübasyon sonrası küvet içerikleri boşaltılmış ve enjektör yardımıyla saf su ile 5 kez yıkanarak kağıt havlu ile kurutulmuştur. Tüm küvetlere 100'er µl substrat solüsyonu ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 5 dak. inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonrası durdurma reaktifinden eklenerek ELISA okuyucuda 450nm'de sonuçlar RIDAWIN programı kullanılarak örneklerdeki toplam fumonisin (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>) miktarı µg/g olarak belirlenmiştir.

#### Fumonisin B<sub>1</sub> analizi HPLC koşulları

HPLC ile fumonisin analizi OPA reaktifi ile türevlendirmeye gerçekleştirilmiştir. Metanolde çözülmüş kalıntıdan 25 µl alınarak 225 µl OPA reaktifi ilave edilerek vorteksde karıştırılmış ve 1-2 dak. içinde HPLC'ye enjekte edilmiştir.

HPLC ile fumonisin analizi dörtlü çözgen dağıtım sistemi, 20 µl'lik döngü içeren Rheodyne enjeksiyon sistemi, floresans dedektör (λ<sub>ex</sub>: 335 nm; λ<sub>em</sub>: 440nm), degasser ünitesi içeren Agilent 1100 HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler Chemstation 3D yazılım programı yardımıyla değerlendirilmiştir. Fumonisin ayrımı, oda sıcaklığında ODS-Hypersil C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm partikül çaplı) ters faz kolonda 1 ml/dak. akış hızında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak o-fosforik asitle pH'ı 3.35'e ayarlanmış metanol:0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (77:23; v/v) çözgen sistemi kullanılmıştır.

#### Deneysel çalışma sonuçları

Kurutma aşamasından temin edilen kuru incirlerde % 81.8'inde ELISA yöntemiyle 0.1 ppm'in üzerinde toplam fumonisin varlığı belirlenmiştir. Toplam fumonisinin kuru incirlerde yıllara göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Kuru incirlerde FB<sub>1</sub>'in yıllara göre dağılımı

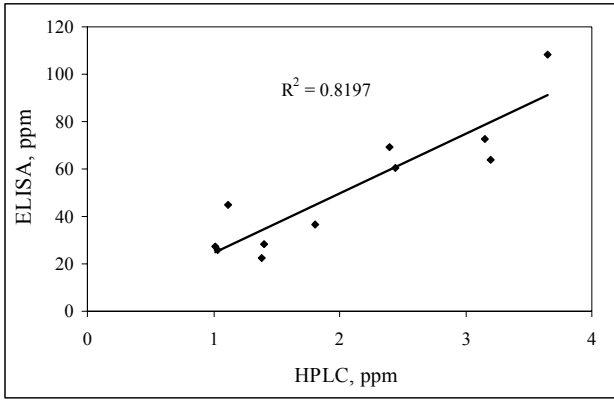
| Toplam Fumonisin miktarı (ppm) | 2003         |           | 2004         |           |
|--------------------------------|--------------|-----------|--------------|-----------|
|                                | Örnek sayısı | Oranı (%) | Örnek sayısı | Oranı (%) |
| <0.1                           | 15           | 21.1      | 6            | 13.6      |
| 0.1-1.0                        | 3            | 4.2       | 5            | 11.4      |
| 1.0-5.0                        | 16           | 22.5      | 15           | 34.1      |
| 5.0-10.0                       | 15           | 21.1      | 8            | 18.2      |
| 10.0-20.0                      | 8            | 11.3      | 5            | 11.4      |
| >20                            | 14           | 19.7      | 5            | 11.4      |

İncir örneklerinde birinci yılda fumonisin kontaminasyonu ikinci yıla oranla daha düşük olmasına rağmen birinci yılda daha yüksek toplam fumonisin düzeyleri belirlenmiştir. Birinci yılda örneklerin %19.7'si, ikinci yılda ise %11.4'ü 20 ppm'in üzerinde fumonisin içermektedir. Her iki yılda da örneklerde fumonisin kontaminasyonu en fazla 1.0-5.0 ppm arasında bulunmuştur.

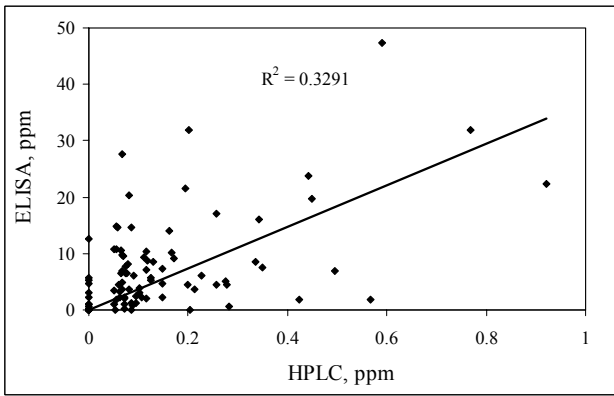
Fumonisinlere, çoğunlukla mısır ve mısır ürünlerinde rastlanmaktadır. Mısır örneklerinde belirlenen en yüksek düzey 154.9 ppm'dir. (Rheeder vd., 1992; Chu ve Li, 1994). Mısır ürünleri dışında tahıllarda değişik düzey ve sıklıkta fumonisin varlığı belirlenmiştir (SCF, 2003). Ayrıca kuşkonmaz (Liu vd., 2005), tıbbi bitkiler (Omurtag vd.,2005), siyah çay (Martins vd., 2001) ve baharat soslarında (SCOOP, 2003) fumonisin varlığı saptanmıştır. Literatür araştırmasında incirde fumonisin varlığı ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır.

Çalışmada ELISA yöntemi ile elde edilen bulgular HPLC yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Kuru incirlerde fumonisin varlığının belirlenmesinde iki yöntem arasındaki ilişki tüm değerlere göre Şekil 1'de, HPLC'de 1 ppm'in altındaki ve üstündeki örneklerdeki değerlere göre Şekil 2 ve 3'te verilmiştir.

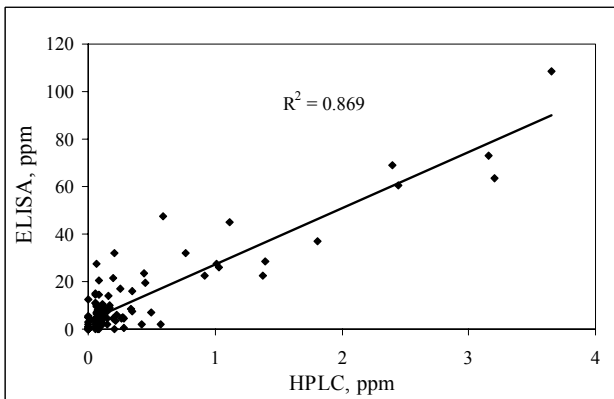
HPLC yönteminde sadece FB<sub>1</sub> miktarı belirlenmiştir. Esasında kontamine gıdalardaki toplam fumonisin içeriğinin %70-80'ini FB<sub>1</sub> oluşturmaktadır (Ross vd., 1992; Rheeder vd., 2002). Toplam fumonisin miktarının % 15-25'ini fumonisin B<sub>2</sub> ve % 3-8'ini fumonisin B<sub>3</sub> oluşturmaktadır (Jackson ve Jablonski, 2004).



Şekil 1. Kuru incirlerde fumonisin varlığının belirlenmesinde HPLC ve ELISA yönteminin karşılaştırılması (tüm değerler için)



Şekil 2. Kuru incirlerde fumonisin varlığının belirlenmesinde HPLC ve ELISA yönteminin karşılaştırılması (<1 ppm)



Şekil 3. Kuru incirlerde fumonisin varlığının belirlenmesinde HPLC ve ELISA yönteminin karşılaştırılması (>1 ppm)

Şekil 1-3'ten de görüldüğü gibi ELISA yöntemi ile HPLC yöntemine göre kuru incirde çok daha yüksek fumonisin değerleri elde edilmiştir.

ELISA ve HPLC metotları tüm değerler kullanılarak karşılaştırıldığında regresyon katsayısı 0.869 olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte HPLC yöntemiyle 1 ppm değerinin altındaki FB<sub>1</sub> değerleri dikkate alındığında ise iki yöntem arasında ilişki belirlenmemiştir. Regresyon katsayısı 1 ppm'in üstündeki değerler için ise 0.820 olarak bulunmuştur. HPLC ve ELISA yöntemleri arasında 1ppm'in üstündeki değerlerde korelasyon bulunmasına rağmen ELISA ile elde edilen sonuçlar HPLC yönteminden çok yüksektir ve bu fark bazı örneklerde 400 kata kadar çıkmaktadır. İki yöntemde de en yüksek fumonisin miktarı aynı örnekte saptanmıştır.

ELISA yöntemiyle fumonisin varlığının belirlenmediği 3 örnekte HPLC yöntemiyle FB<sub>1</sub> tespit edilmiştir. ELISA yöntemiyle fumonisin varlığının belirlendiği 11 örnekte ise HPLC ile toksin saptanmamıştır.

Pestka ve diğerleri (1994) mısır ve buğday bazlı gıdalardan oluşan 71 adet örnekte fumonisin varlığını ELISA ile belirlemiştir. Fumonisin tespit edilen 11 örnek ve 9 negatif örnek HPLC ile de analizlenmiştir. Çalışma sonrasında yöntemler arasında korelasyon 0.512 bulunmuştur. ELISA ile elde edilen sonuçlar HPLC ve GC-MS ile elde edilen sonuçlardan yüksek bulunmuştur. Örneğin ELISA ile 13.1 ppm FB<sub>1</sub> bulunan örnekte toksin miktarı HPLC ile 0.40 ppm olarak tespit edilmiştir. ELISA'da toksin belirlenmeyen bazı örneklerde ise HPLC yönteminde toksin varlığı tespit edilmiştir.

ELISA ile analizde HPLC ile elde edilenden ortalama 30 kat daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun örnek hazırlamadaki farklılıklardan kaynaklanabileceği veya gıda matrisinin fumonisinlerin antipodiye bağlanmasını engellemesi nedeniyle sonuçların daha yüksek çıkabileceği bildirilmiştir. Üçüncü bir alternatif olarak da fumonisin üreticisi *F. verticilloides* veya diğer *Fusarium* türlerinin oluşturduğu diğer fumonisin türevlerinin çapraz reaktivite göstererek daha yüksek toksin miktarının tespit edilmesine neden olabileceği ifade edilmiştir (Pestka vd., 1994).

ELISA yönteminde HPLC sonuçlarına göre çok daha yüksek değerlerin ve yanlış pozitif sonuç-

ların elde edildiği ve sonuçların HPLC ile doğrulanması gerektiği literatürde belirtilmiştir. Çalışmada ELISA yöntemi firmanın önerisi doğrultusunda katı faz ekstraksiyon kolonuyla temizlenmiş ekstraktın metanol:su ile çözülmesi sonrası uygulanmıştır. Katı faz ekstraksiyon kolonuyla temizlenmiş ekstrakt kullanılmasına rağmen bu kadar yüksek değerler elde edilmesine solvent etkisinin neden olduğu düşünülmektedir. Nitekim literatürde ELISA ile analizde saf su veya fosfat tamponu ile seyreltme sonucu solvent etkisinin azaldığı ifade edilmektedir.

## Sonuçlar

Kurutma aşamasından temin edilen kuru incirlerin birinci yılda %78.9'unda ikinci yıl ise %86.4'ünde ELISA yöntemiyle 0.1 ppm'in üzerinde toplam fumonisin varlığı belirlenmiştir.

Çalışmada ELISA yöntemiyle HPLC yöntemi karşılaştırılmış olup, ELISA yönteminde HPLC sonuçlarına göre çok daha yüksek fumonisin düzeyleri elde edilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre kuru incirde hızlı bir yöntem olan ELISA yönteminin ekstraktların seyreltilmesinden sonra tarama amaçlı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Yanlış pozitif sonuçların bulunma olasılığı dikkate alınarak sonuçların HPLC gibi bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir.

## Kaynaklar

Aksoy, U., Sabır, E., Eltem, R., Kıraç, S., Sarıgül, N., Meyvacı, B., Ateş, M. ve Çakır, M., (2003). Kuru incirlerde Okratoksin A'nın potansiyel kontaminasyon riskinin araştırılması, *Bildiriler Kitabı*, Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 41-46, İstanbul.

Anonymous, (2004a). *Rapid quantitation of fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in cereals by HPLC-FLD*, Romer Labs, Inc, USA.

Anonymous, (2004b). *AgraQuant total fumonisin assay*, Romer Labs, Singapore Pte Ltd., Singapur.

AOAC 995.15, (2000) Natural poisons: Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn, *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.

Castellá, G., Bragulat, M.R. ve Cabañes, F.J., (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based and

cereals from Spain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4707-4710.

Chu, F.S. ve Li, G.Y., (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 847-852.

Desai, U.T. ve Kotecha, P.M., (1995). Fig, in Salunke, D.K. ve Kadam, S.S., eds, *Handbook of fruit science and technology*, Marcel Dekker Inc., 407-408, NY.

EHC, (2000). Environmental Health Criteria 219: Fumonisin B<sub>1</sub>, International Programme on Chemical Safety (IPCS; UNEP, ILO and WHO), Marasas, W.H.O., Miller, J.D., Riley, R.T. ve Visconti, A., eds, WHO, 150, Geneva.

Hepkan, D., (2006). The importance of mycotoxins and a brief history of mycotoxin studies in Turkey, *ARI Bulletin of Istanbul Technical University*, Special issue "Mycotoxins: Hidden hazards in food", **54**, 18-27.

IARC, (1993). *Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans, **56**, Lyon, France.

Jackson, L. ve Jablonski, J., (2004). *Fumonisin*, in Magan, N. ve Olsen, M., eds, *Mycotoxins in Food Detection and Control*, 367-405, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.

Liu, C., Liu, F., Xu, W., Kofoet, A., Humpf, H. ve Jiang, S., (2005). Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in asparagus from Shandong province, P.R. China, *Food Additives and Contaminants*, **22**, 673-676.

Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J. ve Sanchis, V., (2004). Fumonisin producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology, *Journal of Food Protection*, **67**, 1792-1805.

Martins, M.L., Martins, H.M. ve Bernardo, F., (2001). Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in black tea and medicinal plants, *Journal of Food Protection*, **64**, 701-705.

Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. ve Desjardins, A.E., (1992). Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 984-989.

Omurtag, G.Z., Yazıcıoğlu, D., Beyoğlu, D., Tozan A. ve Atak, G., (2005). Besinlerde fumonisinler ve trikotesenler, *Bildiriler Kitabı-Türkiye'de*

- Mikotoksin Çalışmaları*, 2. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 73-79, İstanbul.
- Özden, Ç., (2005). *Kuru incir*, T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi, Ankara.
- Pestka, J.J., Azcona-Olivera, J.I., Plattner, R.D., Minervini, F., Doko, M.B. ve Visconti, A., (1994). Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC, *Journal of Food Protection*, **57**, 169-172.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shepard, G.S. ve Van Schalkwyk, D.J., (1992). Fusarium moniliforme and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkeim, *Phytopathology*, **83**, 353-357.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O. ve Wismer, H.F., (2002). Production of fumonisin analogs by Fusarium species, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2101-2105.
- Ross, P.F., Rice, L.G., Osweiler, G.D., Nelson, P.E., Richard, J.L. ve Wilson, T.M., (1992). A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by Fusarium isolates, *Mycopathologia*, **117**, 109-114.
- Scaff, R.M.C. ve Scussel, V.M., (2004). Fumonisin B1 and B2 in corn-based products commercialized in the State of Santa Catarina-Southern Brazil, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **47**, 911-919.
- SCF, (2003). *Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>*, Expressed on 4 April 2003, SCF/CS/CNTM/MYC/28 FINAL.
- SCOOP, 2003, SCOOP Task 3.2.10, Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. <http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>.
- Soriano, J.M. ve Dragacci, S., (2004). Occurrence of fumonisins in foods, *Food Research International*, **37**, 985-1000.
- Sweeney, M.J. ve Dobson, A.D.W., (1998). Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species, *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 141-158.
- Tous, J. ve Ferguson, L., (1996). *Mediterranean fruits* in Janick, J., eds, *Progress in new crops*, ASHS press, 416-430, Arlington, VA.
- TS EN 13585, (2002). Gıdalar-mısırdaki fumonisin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> tayini-katı faz özütlemeli HPLC yöntemi, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara.
- Tuğ, Y., (2002). *Kuru incir raporu*, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Araştırma Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı, Ankara.