

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**AFLATOKSİN B<sub>1</sub>'İN BİYOLOJİK PARÇALANMASINDA  
MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİNE TUTUKLANMIŞ  
*MORCHELLA ESCULENTA* KULLANIMININ  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AİDAİ DUISHEMAMBET KYZY**

**DENİZLİ, OCAK - 2021**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI



AFLATOKSİN B<sub>1</sub>'İN BİYOLOJİK PARÇALANMASINDA  
MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİNE TUTUKLANMIŞ  
*MORCHELLA ESCULENTA* KULLANIMININ  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AİDAİ DUISHEMAMBET KYZY

DENİZLİ, OCAK - 2021

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri tarafından 2018FEBE012 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**AIDAİ DUISHEMAMBET KYZY**

# ÖZET

**AFLATOKSİN B<sub>1</sub>'İN BİYOLOJİK PARÇALANMASINDA MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİNE TUTUKLANMIŞ *MORCHELLA ESCULENTA* KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**AİDAİ DÜŞHEMAMBET KYZY**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. ÜMİT DİVRİKLİ)**

**DENİZLİ, OCAK - 2021**

Küf mantarları hem bitkisel hem de hayvansal kökenli ürünleri pek çok aşamada; nakliyatta depolamada, üretim veya tarlada etkilerler. Mikotoksinler insan vücuduna tüketilen gıda ürünlerinden, yani küf mantarla bulaşmış besinle beslenen hayvan eti veya sütünden geçebilir. Hayvan ve kümes hayvanlarının ölüm veya hastalığına yol açan da mikotoksin bulaşmış yem besinleridir. Bu mikotoksinler, mikroskopik küf mantarları tarafından üretilen düşük moleküler ağırlıklı sekonder metabolitlerdir. Ayrıca, mikotoksinler grubunun en tehlikeli ve kanserojen temsilcisi olan aflatoksin günümüzde önemli bir sorunların biridir.

Bu çalışmada; farklı konsantrasyonlarda aflatoksin B<sub>1</sub>'in beyaz çürükçül fungus olan *Morchella esculenta* yardımıyla biyolojik giderimi araştırılmıştır. Biyolojik yıkım önce *Morchella esculenta*'nın serbest formu ile daha sonra ise farklı fonksiyonel gruplarla türevlendirilerek sentezlenen manyetik nanopatiküller üzerine tutuklanması sağlanıp, biyolojik iyileştirme oranları belirlenmiştir. Biyolojik giderim sırasında fungal lakkaz ve mangan peroksidaz enzim aktiviteleri izlenerek, yıkımdaki rolleri belirlenmiştir. Biyolojik yıkımı takip etmek için kromatografik (HPLC) analiz ve FT-IR analizleri, tutuklama işlemlerin gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü alınmıştır. Degradasyon çalışmaları 10 gün boyunca gerçekleştirildi ve 3 µg / mL AFB<sub>1</sub> yıkım yüzdeleri serbest hücreler ile %54.97, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(M) ile %85.85, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T) ile %95.07, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> ile %84.48, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD ile %96.52 bulunmuştur. Bulgular, potansiyel aflatoksin B<sub>1</sub> detoksifikasyonunu ümit vericidir .

**ANAHTAR KELİMELEER:** Aflatoksin B<sub>1</sub>, *Morchella esculenta*, Biyolojik Giderim

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE USE OF IMMOBILIZED TO MAGNETIC NANOPARTICLE OF *MORCHELLA ESCULENTA* IN THE BIOLOGICAL DECAY OF AFLATOXIN B<sub>1</sub>

MSC THESIS  
AIDAİ DUISHEMAMBET KYZY  
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ÜMİT DİVRİKLİ)

DENİZLİ, JANUARY 2021

Mold fungi affect products of both plant and animal origin at any stages like transport nor storage, even at production period. Mycotoxins can be infected through animal meat or milk fed with mold-borne food products consumed by human. These contaminated feed one of the causes of death or disease of animals and poultry. Mycotoxins are low molecular weight secondary metabolites produced by microscopic mold fungi. In addition, aflatoxin, which is the most dangerous and carcinogenic representative of the mycotoxins group, is one of the major problems of today.

In this study; the biological degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by white rot fungus, *Morchella esculenta* was studied. Three different concentrations of aflatoxin B<sub>1</sub> were studied. Biological degradation was detected by free form of *Morchella esculenta* and then by immobilized onto magnetic nanoparticules derivatized with different functional groups. During biological removal, fungal laccase and manganese peroxidase enzyme activities were monitored and determined roles in destruction were. Chromatographic (HPLC) analysis and FT-IR analysis were used to monitor the biodegradation and scanning electron microscopy (SEM) image was taken to observe whether the arrest processes were performed. The degradation studies were carried out during 10 days and the degradation percentages were found to be %54.97 of free cell study, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(M) %85.85, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T) %95.07, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> %84.48, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD %96.52 for 3 µg/mL AFB<sub>1</sub> degradation. Findings gives reliance in potential aflatoxin B<sub>1</sub> detoxification.

**KEYWORDS:** Aflatoxin B<sub>1</sub>, *Morchella esculenta*, Biological Removal

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. AFLATOKSİNLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 Aflatoksinlerin kimyasal yapısı .....	3
2.2 Kimyasal ve fiziksel özellikleri .....	4
2.3 Aflatoksinlerin oluşumu için koşullar .....	6
2.4 Aflatoksinlerin toksitesi ve sağlığa etkileri .....	6
2.4.1 İnsan ve hayvan sağlığına etkisi .....	8
2.4.1.1 Aflatoksikoz .....	8
2.4.1.2 Akut toksisite .....	8
2.4.1.3 Kronik toksisite .....	8
2.4.1.4 Aflatoksinin karaciğer içerisindeki metabolizması .....	9
2.5 Aflatoksin Dekontaminasyon/ Detoksifikasyon Yöntemleri.....	11
2.5.1 Kimyasal yöntemler .....	11
2.5.1.1 Amonyaklama .....	11
2.5.1.2 Sodyum Bisüfit ile detoksifikasyon .....	13
2.5.1.3 Nötral elektrolizlenmiş okside su ile .....	14
2.5.2 Fiziksel Yöntemler .....	14
2.5.2.1 Ekstrüzyon pişirme .....	14
2.5.2.2 Magnetik karbon .....	15
2.5.2.3 Başka absorbanların uygulanması .....	15
2.5.3 Biyolojik yöntemler .....	16
2.5.3.1 Probiyotikler ve laktik asit bakterilerini kullanılarak .....	16
2.5.3.2 Aktinomisetler .....	16
2.5.3.3 Mantar biyomoleküllerini kullanarak detoksifikasyon .....	17
2.5.3.4 Bitkilerin biyoaktif maddelerini kullanarak detoksifikasyon ..	17
<b>3. BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL MANTARLAR</b> .....	<b>18</b>
<b>4. NANOTEKNOLOJİ</b> .....	<b>19</b>
4.1 Nanopartiküller .....	20
4.2 Manyetik nanopartiküller (MNP) .....	21
4.2.1 Demir Oksit Nanopartiküller .....	21
4.3 Manyetik nanopartiküllerin sentezi .....	23
4.3.1 Mikroemülsiyon .....	23
4.3.2 Hidrotermal sentez .....	24
4.3.3 Termal parçalanma .....	24
4.3.4 Ortak çöktürme .....	25
4.4 Manyetik Nanopartikülün Yüzey Modifikasyonu .....	25
4.5 Manyetik Nanopartiküllerin Kullanım Alanları .....	26
28	
4.6 Karakterizasyon Yöntemleri .....	28

4.6.1	Infrared spektroskopisi (IR).....	28
4.6.2	Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) .....	28
<b>5.</b>	<b>MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>30</b>
5.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Stok Çözeltiler.....	30
5.2	Hücre Ortamının Hazırlanması .....	30
5.3	Hücre süspansiyonunun hazırlanması .....	31
5.4	Hücre İmmobilizasyonu .....	31
5.4.1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerin sentezi ve hücrelerin immobilizasyonu	31
5.4.1.1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanopartikülün (MNPs) sentezi .....	31
5.4.1.2	MNP'i SiO <sub>2</sub> ile kaplanması.....	31
5.4.1.2.1	<b>MNP@SiO<sub>2</sub>'nin fonksiyonlendirilmesi .....</b>	<b>32</b>
5.4.2	Hücre tutuklama işlemi .....	32
5.5	Aflatoksin Standardının Numunelere Aşılması ve degradasyonu ..	32
5.6	Sentezlenen Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları .....	33
5.6.1	FT-IR Analizleri ve Spektrum Taraması .....	33
5.6.2	SEM Analizleri .....	33
5.7	Enzim Aktivite Tayinleri .....	33
5.8	Degradasyon Çalışmalarından Sonra AFB <sub>1</sub> 'in analizi .....	33
<b>6.</b>	<b>SONUÇ VE TARTIŞMA.....</b>	<b>34</b>
6.1	Sentezlenen Manyetik Partiküllerin Karakterizasyonu .....	34
6.2	SEM analizi .....	34
6.3	HPLC-FLD Çalışma Şartlarının Optimizasyonu .....	39
6.3.1	Yöntem Geçerlilik Testleri .....	40
6.4	AFB <sub>1</sub> 'in biyolojik yıkımı.....	41
6.4.1	Serbest Hücrelerle AFB <sub>1</sub> yıkımı .....	42
6.4.2	MNP taşıyıcılarına tutuklanmış fungal hücreleri ile AFB <sub>1</sub> yıkımı	44
<b>7.</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>.EKLER.....</b>	<b>65</b>
	EK A: SPEKTRUMLAR .....	65
<b>10.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>72</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: En çok bilinen aflatoksinlerin kimyasal yapıları .....	4
Şekil 2.2: Aflatoksinin karaciğer içerisindeki metabolizması.....	10
Şekil 2.3: AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Guanin kompleksin yapısı.....	11
Şekil 2.4: Aflatoksinin amonyaklanması (Cucullu, Lee ve diğ. 1976) .....	13
Şekil 4.1: Mikroemülsiyon ile sentezin şematik gösterimi .....	23
Şekil 4.2: Ortak çöktürme sentezi .....	25
Şekil 4.3: Demir oksit nano materyallerin uygulamaları, sınırlamaları ve çalışmaları .....	28
Şekil 4.4: SEM' in şematik yapısı.....	29
Şekil 6.1: Sentezlenen MNP partikülün SEM görüntüsü.....	35
Şekil 6.2: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (M) bileşiğın SEM görüntüsü .....	36
Şekil 6.3: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (T) bileşiğın SEM görüntüsü .....	37
Şekil 6.4: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> bileşiğın SEM görüntüsü .....	38
Şekil 6.5: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @BCD bileşiğın SEM görüntüsü.....	39
Şekil 6.6: 5 ng/mL aflatoksin B <sub>1</sub> standardın MeOH:Su (55: 45, v/v) hareketli faz oranında elde edilen HPLC-FLD kromatogramı.....	40
Şekil 6.7: Serbest hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri.....	42
Şekil 6.8: Serbest hücrelerle 3 ppb AFB <sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı .....	43
Şekil 6.9: Tahmini AFB <sub>1</sub> oksidasyonu mekanizması (Wang, Hirai ve diğ. 2011).....	44
Şekil 6.10: Fungal hücrelerin Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (M) destek materyaline tutuklanmış SEM görüntüsü.....	45
Şekil 6.11: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (M)'e tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri .....	46
Şekil 6.12: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (M)' tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB <sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı .....	46
Şekil 6.13: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (T)'e tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB <sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı .....	47
Şekil 6.14: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (T)'e tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri .....	47
Şekil 6.15: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (T)'ye tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB <sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı .....	48
Şekil 6.16: Fungal hücrelerin Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> destek materyaline tutuklanmış SEM görüntüsü.....	49
Şekil 6.17: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> üzerine tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri .....	49
Şekil 6.18: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> üzerine tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB <sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı .....	50
Şekil 6.19: Fungal hücrelerin Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @BCD destek materyaline tutuklanmış SEM görüntüsü.....	51
Şekil 6.20: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @BCD üzerine tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri .....	52
Şekil 6.21: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @BCD üzerine tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB <sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı .....	52
Şekil 6.22: AFB <sub>1</sub> 'in serbest ve farklı destek materyallere tutuklanmış fungal hücreleri ile yıkımı .....	53

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 2.1: Aflatoksin fiziksel özellikleri .....	5
Tablo 2.2: Aflatoksinlerin spektral özellikleri .....	6
Tablo 3.1: Manyetit ve Maghemit'in farklılık ve benzerlikleri. ....	22
Tablo 5.1: Hücre ortamı .....	30
Tablo 6.1: AFB <sub>1</sub> 'in HPLC analizinde geri kazanım çalışma sonucu.....	41
Tablo 6.2: Yöntemin analitik verileri.....	41

## SEMBOL LİSTESİ

<b>°C</b>	:	Derece (Celsius)
<b><math>\alpha</math></b>	:	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	:	Beta
<b><math>\gamma</math></b>	:	Gamma
<b><math>\epsilon</math></b>	:	Epsilon (elektriksel geçirgenlik)
<b>m<math>\mu</math></b>	:	milimikron ( $10^{-9}$ metre)
<b><math>\lambda_{max}</math></b>	:	Dalga boyu
<b><math>\Omega</math></b>	:	Ohm
<b>AFB<sub>1</sub></b>	:	Aflatoksin B <sub>1</sub>
<b>SEM</b>	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>HPLC</b>	:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>MnP</b>	:	Mangan peroksidaz
<b>Lac</b>	:	Lakkaz
<b>LiP</b>	:	Lignin peroksidaz
<b>PAH</b>	:	Polisiklik aromatik hidrokarbon
<b>MNP</b>	:	Manyetik nanopartikül
<b>TEOS</b>	:	Tri etoksi orto silikat
<b>APTES</b>	:	3-Aminopropil trietoksisilan
<b>BCD</b>	:	Siklodekstrin
<b>IR</b>	:	Kırmızı Ötesi

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, desteklerini gördüğüm kimya bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Ayrıca finansal olarak 2018FEBE012 numara ile çalışmamı desteklediği için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve yüksek lisans öğrenimim esnasında yardımlarını gördüğüm Fen Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve her konuda beni destekleyen, bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

İnsan ve hayvan sağlığı, büyük ölçüde, farklı mikroflora (bakteriler, aktinomisetler, mantarlar, vb.) ile etkilenmiş, genelde kontaminasyon dereceleri ile belirlenen, gıda ve yemlerin sağlık kalitesine bağlıdır. Bu mikroflora gelişimi, elverişli koşullar altında miktarı bir gram ürün için yüz binden milyona kadar ulaşabilir (Avreneva ve diğ. 1987). Mikromisetlerle kontamine olmuş hububatlar büyük tehlikedir, çünkü funguslar sekonder metabolitler oluşturur. Bu sekonder metabolit, mikotoksin olarak bilinir. Mikotoksinler çok toksik, mutajenik, teratojenik, karsinojenik ve immünosüpresif özelliklere sahip bir grup kimyasal bileşikler sınıfıdır.

Mikotoksinler, toksinin doğasına, miktarına, organizmaya alınma süresine, makroorganizmanın türüne, yaşına ve onun beslenme karakterine (niteliğine) bağlı olarak çeşitli klinik belirtileri olan hastalıklara neden olabilir (Bilgrami ve Choudhary 1998; Styriak 1998; Deryagina 2002).

Günümüzde yaklaşık 250 mikroskopik fungus türü bilinmektedir ve yaklaşık 300'ü mikotoksin türlerini üretmektedir. En tehlikeli olanı da, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* fungus cinslerinin toksinleri bilinmektedir. En tehlikeli mikotoksinler arasında aflatoksinler, okratoksinler, zearalenon, trikotesen mikotoksinler, sikrin, patulin, tremorjenik mikotoksinler, ergotoksinler yer almaktadır. Hepsi çok kararlı ve uzun süre kontamine özelliğini koruyabilmektedirler (Bilgrami ve Choudhary 1998).

Aflatoksinler son yıllarda üzerinde en çok çalışılan mikotoksinler arasındadır. Aflatoksinler genelde *Aspergillus* soyundan olan *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen bir mikotoksin türüdür.

Dünya çapında temel gıda ürünlerinde oldukça toksik ve kanserojen mikotoksinler önemli miktarlarda bulunur ve bu da hammaddelerin, gıdaların ve yemlerin detoksifiye edilmesine yönelik metodların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur. Aflatoksinlerin detoksifiye edilmesine yönelik yöntemler, mekanik, fiziksel ve kimyasal yöntemleri içerir. Mekanik detoksifikasyon yöntemleri, kontamine olmuş hammaddelerin elle ayrılması veya elektronik

kolorimetrik ayırıcıların kullanılması ile ilişkilidir. Fiziksel yöntemler ise çok sert ısı işlemine dayanır (otoklavlama) ve ayrıca ultraviyole ışınlama ve ozonlama ile ilişkilidir. Kimyasal yöntem, maddenin güçlü oksitleyicilerle işlenmesine dayanır. Bu yöntemlerin her birinin kendine özgü dezavantajları olduğu unutulmamalıdır: mekanik ve fiziksel yöntemlerin kullanımı yüksek bir etki sağlamaz, aynı anda yüksek madde kaybına neden olur. Kimyasal yöntemler sadece aflatoksinlerin değil aynı zamanda yararlı besinlerin değerinin de yok olmasına neden olur. Örneğin, yemlerin yükseltilmiş basınç ve sıcaklıkta amonyakla veya hidrojen peroksitle kimyasal olarak detoksifikasyonu, aflatoksin içeriğinin güvenli bir seviyeye indirilmesine izin verir. Fakat bununla birlikte, ürünün besin değerinin bir kısmı kaybolur (Tolmacheva 2013). Bu yöntemlere alternatif, bazı mikroorganizmalar tarafından aflatoksin ve diğer mikotoksinlerin biyolojik detoksifikasyonu umut verici bir yöntemdir.

Son zamanlarda ön plana çıkan biyolojik yöntemlerin biri mikro organizmaların immobilizasyonudur. Immobilizasyonun bir çok üstünlükleri vardır, örneğin: mikro organizmaları farklı taşıyıcılara tutuklayarak, daha kararlı, sıcaklığa dayanıklı, tekrar kullanılabilirliğin artırılması en önemlisi de çevre dostu ve ekonomik hale getirilebilir olmasıdır.

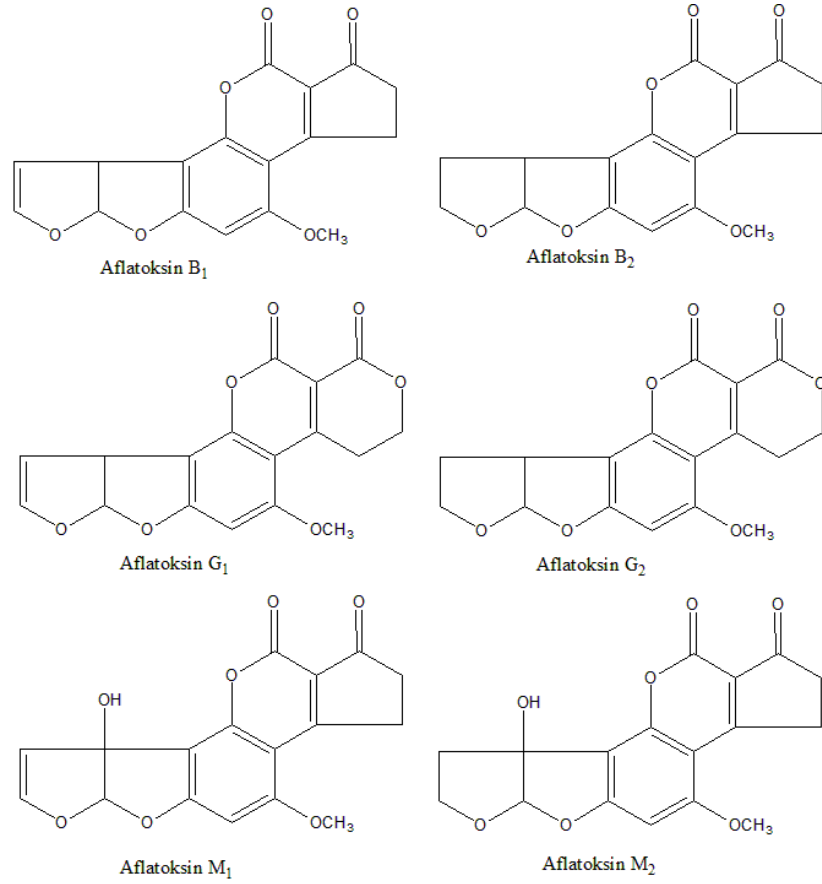
Geniş ve iyi tanımlanmış yüzey alanları, seçiciliği ve daha düşük kütle transferine direnç göstermeleri gibi özellikleri nedeniyle  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülleri umut verici bir destek materyalidir. Ayrıca bu nanopartiküller üzerine tutuklanmış hücreler/enzimler kendilerine öz performanslarını koruyabilmeleriyle birlikte aynı zamanda kolayca ayrılabilir ve geri dönüşümlü olabilirler. Buna benzer avantajlardan dolayı manyetik nanoparçacıkların enzim immobilizasyonu için potansiyel uygulama alanları araştırılmıştır.

Bu tezde serbest ve manyetik nanopartiküllere tutuklanmış beyaz çürükçül fungus *Morchella esculenta* ile aflatoksinlerden toksisitesi yüksek olan,  $AFB_1$ 'in biyolojik yıkımı çalışılmıştır.

## 2. AFLATOKSİNLER

### 2.1 Aflatoksinlerin kimyasal yapısı

Küflü yem toksisitesi, 1950'lerde ciddi bir hayvancılık sorunu olarak kabul edilmiştir ancak 1960 yılında, Birleşik Krallıkta hindi "x" hastalığı olarak adlandırılan küflü yem toksikoza araştırmalarında, *A. flavus* ve *A. parasiticus'un*; yemdeki toksinin, oluşmasından sorumlu organizmalar olduğu tespit edilmiştir. Aflatoksin terimi, *A. flavus* mantar grubunun suşlarından izole edilen bisfuranocoumarin metabolitleri grubunu ifade eder. *A. flavus*'dan elde edilen toksik maddeye 1962'de "aflatoksin" adı verilmiştir (Sargeant 1963). Günümüzde 18 farklı aflatoksin tanımlanmıştır, ancak bunların sadece 4 tanesi doğal koşullar altında tespit edilmiştir: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>. Kimyasal olarak aflatoksinler, difurokumarosiklopentenon ve difurokumarolakton türevleridir. Yapıları, pentenone halkalı kumarin merkezine kaynaşmış bifuran halka içeren (B ve M aflatoksinlerinde) yada altı üye lakton halkalı G aflatoksinler gibi olmaktadır (Şekil 2.1). Bu dört aflatoksin fraksiyonları uzun dalga boyulu ultraviyole ışığı altında farklı floresan özellik göstermeleri ve renk farkları ile ayrılırlar (B- mavi, G-mavi). Diğer iki M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> aflatoksinler süt ve idrarda bulunmuştur ve AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>'lerin metabolitleri oldukları belirlenmiştir (Patterson 1978; Devero 1999).



**Şekil 2.1:** En çok bilinen aflatoksinlerin kimyasal yapıları

## 2.2 Kimyasal ve fiziksel özellikleri

Kimyasal olarak, aflatoksinler, aseton, asetonitril, izopropanol ve metanol gibi polar organik çözücüler ile kolayca çözünebilen, suda ise 10-20 mg/L'ye kadar çözünen ve ultraviyole ışığında yoğun olarak floresan olan ve çok yüksek sıcaklıkta (260°C) bile yıkılmayan, kristal maddelerdir (Bilgrami ve diğ. 1998).

Aflatoksinlerin kimyasal reaktivitesi ve davranışları, yapıların aydınlatılmasıyla izah edilmiştir. Bununla birlikte, aflatoksin B<sub>1</sub>'in katalitik hidrojenasyonunun, tetrahidro deoksi türevi ile 3 mol hidrojenin reaksiyonunun tamamlanması ile sağlandığı gösterilmiştir (Asao ve diğ. 1963). 1 mol hidrojenin alınmasından sonra hidrojenasyon prosedürünün kesintiye uğraması, aflatoksin B<sub>2</sub>'nin niceliksel verimde üretilmesine neden olur. Ayrıca, aflatoksin B<sub>1</sub>'in, kuvvetli asidin katalitik etkileri altında, hidroksil gruplarıyla katılma reaksiyonunu verdiği rapor edilmiştir (Andrellos ve Reid 1964).

Formik asit tanyonil klorid, asetik asit tanyonil klorür veya trifluoroasetik asit ile muamele edilmesi, aflatoksinlerin kromatografik özelliklerin büyük ölçüde değişmesinin yanı sıra nispeten değişmemiş floresan özelliklerine yol açar.



Ozonoliz ile aflatoksin bozunma mekanizması, furan halkasının C8-C9 çift bağına elektrofilik bir saldırı ile başlar ve primer ozonitlerin oluşumuna neden olur, ardından aldehydler, ketonlar ve organik asitler gibi monozonit türevlerine yeniden düzenlenir. Ozonoliz sonucu aflatoksin B<sub>1</sub> parçalanmaya uğrar ve bu reaksiyonun ürünleri, levulinik, süksinik, malonik ve glutarik asitleri içerir (Andrellos ve Reid 1964; Proctor ve diğ. 2004).

Aflatoksinlerin yapısında lakton halkasının bulunması kolay hidroliz olmasına yol açar. Bu bileşiğin değişkenliği, alkalik hidrolizine ve hidroliz ürünlerinin asitleştirilmesinden sonra kısmen geri halkalaşmaya yatkın olmaları şeklinde rapor edilmiştir (De Iongh ve diğ. 1962).

Aflatoksinlerin 4 ana bileşiği ilk, İngiltere'de araştırmacılar tarafından izole edilmiştir (Sargeant ve diğ.1963). Bileşiklerin bazı fiziksel özellikleri aşağıdaki Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.1:** Aflatoksin fiziksel özellikleri

Aflatoksin	Molekül formülü	Molekül ağırlığı	Erime Noktası °C	[α] <sub>D</sub> <sup>23</sup>
B1	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269*	-559
B2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289*	-492
G1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246*	-533
G2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240*	-473

\* Dağılıma/ çözünme

Aflatoksinlerin spektral özellikleri birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir ve Tablo 2.2'de verilmiştir. Ultraviyole absorpsiyon spektrumları çok benzerdir ve her biri 223, 265 ve 363 nm'de maksimum emisyon göstermiştir. Bununla birlikte, molar sönme katsayılarının son iki piklerinde B<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin G<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub>'ye göre bu dalga boylarında daha yoğun emilim gösterdiği belirlenmiştir. Yapısal konfigürasyonda benzerlikler nedeniyle, dört bileşiğin kızıl ötesi absorpsiyon spektrumları da gösterildiği gibi çok benzerdir.

**Tablo 2.2:** Aflatoksinlerin spektral özellikleri

Aflatoksin	Ultraviolet absorption ( $\epsilon$ )		Infrared absorption ( $\text{cm}^{-1}$ ) $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$					Fluorescence emission ( $\text{m}\mu$ )
	265 $\text{m}\mu$	363 $\text{m}\mu$						
B1	13400	21800	1760	1684	1632	1598		425
B2	9200	14700	1760	1685	1625	1600		425
G1	10000	16100	1760	1695	1630	1595	1562	450
G2	11200	19300	1760	1694	1627	1597		450

### 2.3 Aflatoksinlerin oluşumu için koşullar

Aflatoksinlerin oluşumu sıcaklık, nem, havanın bileşimi (atmosferik gazların bileşimi), substratın doğası gibi fiziksel, kimyasal faktörlerden etkilenir. Özellikle tropikal veya subtropikal ülkelerde ılık ve nemli havalarda yetişen bitki türleri, ılıman kuşak iklimindekilerden daha fazla aflatoksin kirlenmesine eğilimlidir. Biyolojik faktör de etkiler bunlar; ortamda bulunan fungus yada sporlarının yoğunluğu, gelişen türlerin toksin oluşturma güçleri, ürünün ve yetiştirilen çeşidin direnci, mikroorganizmalar arası rekabet, bitki stresi, böcek veya diğer zararlıların faaliyetidir (Çoksöyler 1999; Weidenböner 2001). Aflatoksinlerin oluşumu için vitaminler, mineraller (özellikle çinko), amino asitler, yağ asitleri ve enerji kaynağı (tercihen nişasta şeklinde) gibi belirli besinler de gereklidir.

*A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından aflatoksin üretimi için sınırlayıcı sıcaklıklar 12-41°C olarak bildirilmiştir ve optimum üretim sıcaklık 25 ve 32°C arasında olup, nisbi nem %70 ve üzeri olması gerekmektedir (Arrus ve diğ. 2005). Sıcaklık ve su aktivitesi gibi faktörler ile aflatoksinlerin üretimi ve misellerin gelişimi kontrol edilir. Küf gelişimi ve toksin oluşumu için gereksinim duyulan sıcaklık ve su aktivite değerleri aynı olmamakta ve türe göre de değişiklik göstermektedir. Örneğin, *A. flavus*'un gelişmesi ve mikotoksin üretiminde su aktivitesi sırasıyla 0,73 ve 0,85'dir ve 19-35° C'de en iyi gelişim aralığı iken 12-45° C'de toksin üretmektedir (Giorni ve diğ. 2008).

### 2.4 Aflatoksinlerin toksitesi ve sağlığa etkileri

Aflatoksinler, genellikle insan ve hayvan vücuduna, kontamine yiyecekler yoluyla alınır ancak toksijenik sporların solunumu ve doğrudan dermal temas da önemli alım yollarıdır (Zinedine ve Mañes 2009). Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (International Agency of Research on Cancer (IARC)) tarafından birinci sınıf

karsinojen olarak sınıflandırılan, aflatoksinler, insan sağlığını çeşitli şekillerde etkiler (IARC 1993).

Aflatoksin maruziyeti, böbrek, kalp, testis ve yumurtalık gibi birçok organda birçok yan etki üretebilir. Örneğin, mutajenez, bağışıklığı zayıflatması, büyüme geriliği ve üreme sistemleri gibi ciddi etkilere yol açabilir (Fetaih ve diğ. 2014). Aflatoksin hemen hemen tüm hücre bileşenlerini etkiler ve aynı anda plazma zarının geçirgenliğini ihlal eder. Aflatoksin, kanserli hücre oluşumunu indükleyen guanin ile deoksiribonükleik asit (DNA) katkısı oluşturur (Bren ve diğ. 2007). Ayrıca çekirdek içi DNA replikasyonunu, mRNA'yı sentezleyen DNA-bağımlı RNA polimeraz aktivitesini inhibe etmekle birlikte, transkripsiyon sürecini inhibe eder. Mitokondride, aflatoksinler membran geçirgenliğinin artmasına, mitokondriyal DNA ve protein sentezinin bloke olmasına, elektron taşıma sisteminin bozunmasına ve böylece hücrenin enerji "açlığına" neden olurlar. Aflatoksin etkisi altında endoplazmik retikulumda patolojik değişiklikler gözlenir: protein sentezinin inhibe edilmesi, trigliserid, fosfolipidler ve kolesterol sentezlerinde düzensizlik oluşur. Aflatoksin lizozomlar üzerinde doğrudan bir etki eder, bu da membrana zarar vererek aktif hidrolitik enzimlerin salınımına sebep olur ve bu hücre sel bileşenlerini yıkıma uğratar. Yukarıda belirtilenlerin tümü bir metabolitik düzensizliğe ve hücre ölümüne yol açmaktadır.

Aflatoksin B<sub>1</sub> hepatotropik bir zehirdir ve öncelikle karaciğeri etkiler. Hayvanlarda, karaciğerde dejeneratif değişiklikler, gemmarajik diyatezin, hidroperikardit, pulmoner ödem, asit ve diğer lezyonlara eşlik eden akut ve kronik zehirlenmelere neden olabilir. Zehirlenme için yetersiz olan fakat vücuda sürekli veya tekrar tekrar giren çok küçük dozlarda aflatoksinlerin etkisi ile siroz veya karaciğer kanseri gelişir. Karaciğerde A vitamini düzeyini düşürür ve yağ içeriğini artırır. Karaciğerde boyut artmasına, sarımsı kahverengi bir renk almasına ve yapı gevşemesine neden olur ( Terao ve Ueno 1978; Wild ve Montesano 2009).

Aflatoksinler, prothrombin (koagülasyon faktörü) içeriğini ortalama %20 oranında azaltır ve bu da hayvanların morarmaya yatkınlığını artırır ve bazen de bağırsak kanamaları görülmüştür ( Ramesh 2011).

## **2.4.1 İnsan ve hayvan sağlığına etkisi**

### **2.4.1.1 Aflatoksikoz**

Aflatoksikoz, aflatoksinlerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu akut ve kronik seyirli mikotoksikozdur. Aflatoksikoz iki genel formda, akut ve kronik formlarda ortaya çıkar. Kronik primer aflatoksikoz, düşük ila orta derecede aflatoksin düzeylerinin alınmasından kaynaklanır. Kronik aflatoksikoz iki formda olur: (1) Konjenital malformasyonlarla ilişkili teratojenik etkiler, (2) Aflatoksinlerin genetik kodda değişikliklere (mutasyonlara) neden olduğu, DNA'yı değiştiren, kromozom parçalarının yeniden düzenlenmesi, kromozomların kaybı/kazancı veya bir gen içindeki değişiklikler (Wild ve Montesano 2009).

### **2.4.1.2 Akut toksisite**

Aflatoksinlerin başlıca hedef organı karaciğerdir. Aflatoksinlerin karaciğere yayılmasından sonra, lipitler hepatositlere sızar ve nekroz veya karaciğer hücresi ölümüne yol açar. Bunun başlıca nedeni, aflatoksin metabolitlerinin, farklı hücre proteinleri ile negatif reaksiyona girmesidir, bu da karbonhidrat ve lipid metabolizmasının inhibisyonuna ve kontrolsüz protein sentezine yol açar.

İnsanlarda, yüksek ateş, kusma ve ayaklarda ödem, yüksek renkli idrar, sarılık, hızla gelişen asit, portal hipertansiyon ile karakterize edilir.

Hayvanlarda ise, akut aflatoksikoz iştah kesilmesi, vücut ağırlık kaybı, mukoz membranlarda sarılık, nörolojik anormallikler, kasılma ve sonunda ölüm ile sonuçlar. Karaciğerde rengin açılması veya tamamen renksizleşme ve yağ birikimi belirgin olarak görülür. Ayrıca karaciğerde renksizleşme ve yağ birikimi, bağırsak ile böbreklerde kanama gibi büyük sorunlar oluşur (Bullerman 1979).

### **2.4.1.3 Kronik toksisite**

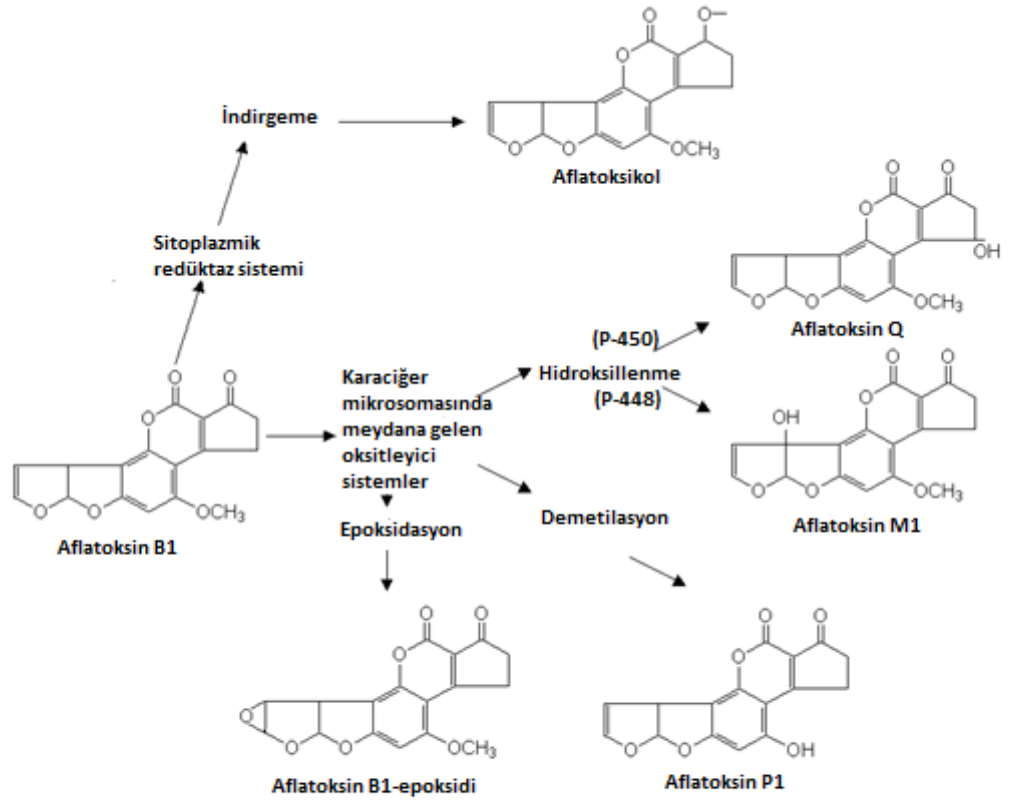
AF yüksek oranda lipitte çözünen bileşiklerdir ve genellikle sindirim ve solunum yoluyla kan akışına maruz kaldıkları yerden kolayca emilirler. Vücuda girdikten sonra, kan dolaşım sistemi ile farklı dokular ve ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumlu olan ana organı karaciğere ulaşırlar. AFB<sub>1</sub> insanlarda hepatosellüler karsinom (HCC) tetikleyicisi olarak belirtilmiştir. Karaciğerde ağırlıklı olarak, G'den T'ye dönüşüm mutasyonları ile sonuçlanan bir pro mutajenik AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanin-DNA eklentisi oluşturan bir AFB<sub>1</sub>-8, 9-ekso-epokside metabolize edilir. İnsan HCC'sinde yüksek aflatoksine maruz kalan alanlarından tümörlerin

%50'sine kadar TP53 tümör baskılayıcı geninin (kodon 249<sup>Ser</sup> mutasyonu) kodon 249'unda AGT nokta mutasyonuna spesifik bir AGG'yi taşıdığı gösterilmiştir (Hussain ve diğ. 2007).

Hayvanlarda ise aflatoksinler, mikrozomal ve stoplazmik oksigenaz enzim sistemleri tarafından metabolize edilmektedir. Karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan bu enzim sistemleri, sitokromla ilişkili enzimlerle, O<sub>2</sub>'ye ve NADPH'a bağımlı enzimlerin kompleks bir organizasyonudur. Bu enzimler, AFB<sub>1</sub>'in oksidatif metabolizmasını katalize etmektedir ve bu aflatoksinin çeşitli hidroksillenmiş türevleri ve yüksek reaktif özelliğe sahip epoksid metabolitin oluşmasıyla sonuçlanır (Ueno ve Hsieh 1985).

#### **2.4.1.4 Aflatoksinin karaciğer içerisindeki metabolizması**

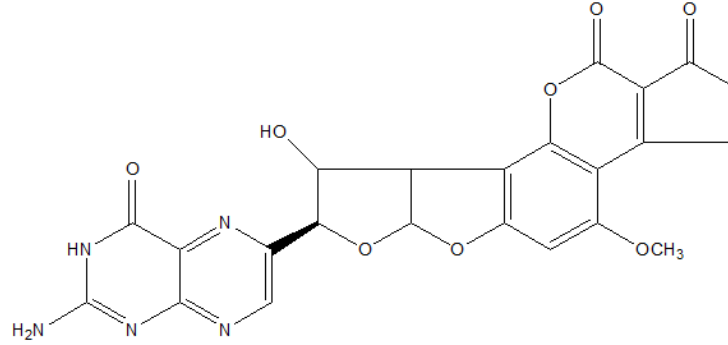
Karaciğere ulaştıktan sonra, AFB<sub>1</sub> mikrosomal enzimler tarafından hidroksilasyon, hidrasyon, demetilasyon ve epoksidasyon yoluyla farklı metabolitlere metabolize olur (Şekil 2.2). AFB<sub>1</sub>'in C<sub>4</sub> ve C<sub>22</sub>'de hidroksillenmesi sonucu sırayla karsinojenik gücünün AFB<sub>1</sub>'den 10 kat daha düşük olan M<sub>1</sub> ve Q<sub>1</sub> aflatoksin türleri elde edilir. C<sub>2</sub> - C<sub>3</sub> çift bağının hidrasyonu, bazı kuş türlerinde hızlı bir şekilde oluşan AFB<sub>2a</sub>'nın oluşumuyla sonuçlanır (Çoksöyler 1999). AFB<sub>1</sub>'in 2, 3 çift bağlarında epoksidasyonu sonucu AFB<sub>1</sub>'in epoksi türleri üretilirken o-demetilasyon reaksiyonu ile AFP<sub>1</sub> oluşur. Aflatoksikol, çözünür bir sitoplazmik redüktaz enzim sistemi ile üretilen AFB<sub>1</sub>'in tek metabolitidir.



**Şekil 2.2:** Aflatoksinin karaciğer içerisindeki metabolizması

En önemlisi de bu biyotransformasyon olaylarıyla meydana gelen, AFB<sub>1</sub>'in

epoksidasyon prosesidir. Eposidasyon sonucu çok reaktif bir epoksid formu oluşur. Meydana gelen elektrofilik epoksid hücrel makromoleküllerdeki (DNA, RNA, protein vs.) çeşitli nükleofilik merkezlere kovalent olarak kolayca bağlanabilmektedir. Böyle reaksiyonun sonucu ise DNA-AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>Guanin kompleksi (Şekil 2.3) bilinmektedir. Böyle bir kompleks organizma veya hücreler için biyolojik bir tehlike oluşturmakta ve karsinojenik ve genotoksik etkilerin sorumlusu olarak değerlendirilmektedir (Ueno ve Hsieh 1985; Groopman ve diğ. 1988).



**Şekil 2.3:** AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanin kompleksin yapısı

## 2.5 Aflatoksin Dekontaminasyon/ Detoksifikasyon Yöntemleri

### 2.5.1 Kimyasal yöntemler

#### 2.5.1.1 Amonyaklama

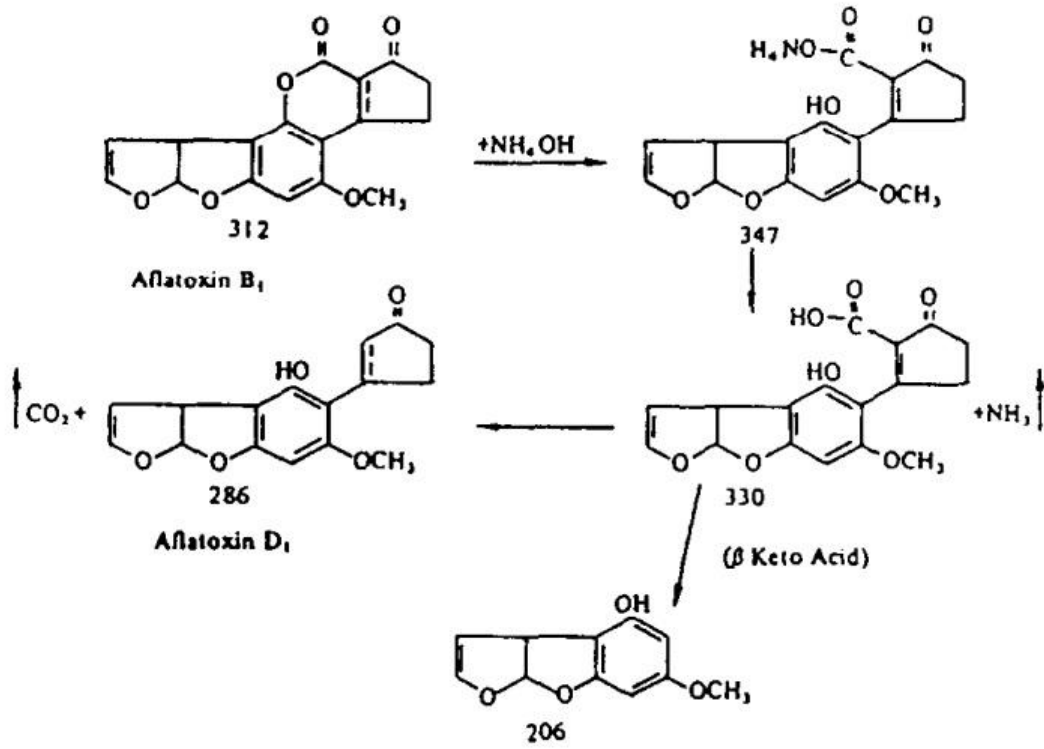
1990' larda amonyaklama, gıda ürünlerinde aflatoksinlerin detoksifiyesi için en gelişmiş ve ekonomik aynı zamanda uygulanabilir bir teknik olarak kabul edilmiştir. Amonyakın gaz fazında, çözelti içinde ya da amonyak üretebilen maddelerle muamelesi, yer fıstığı, pamuk ve mısır öğünlerinin detoksifiye edilmesinde optimum sonuçlar vermiştir. Amonyakla detoksifikasyonun etkinliğinde, kullanılan miktar, reaksiyon süresi, sıcaklık, basınç ve formaldehit ile kombinasyon ile pozitif ilişkili olduğu yaygın bir şekilde gösterilmiştir. Ayrıca, amonyağa maruz kalmanın yeterince uzun sürmesi halinde AFB<sub>1</sub>'nin, moleküler yapısının geri dönüşsüz olarak değiştirildiği gözlenmiştir. Aksine, eğer maruziyet yeterince uzun değilse, molekül orjinal haline dönebilir. İlaveten, amonyaklanan besinler ile beslenen süt ineklerinde taşınmayı doğrulamayı amaçlayan bazı testler (Fremy ve Quillardet 1985), AFB<sub>1</sub> yüzdelerini, sindirilmiş AFB<sub>1</sub> ile karşılaştırıldığında %10- 20

arasında sütte metabolit eliminasyonunu (yani aflatoksin M<sub>1</sub> veya AFM<sub>1</sub>) ortaya çıkarmıştır. Bu yüzdeler genellikle % 1' den % 3'e kadar değişmektedir. Bu, detoksifikasyon, reaksiyon mekanizması incelenerek açıklanırsa, Şekil 2.4'de gösterildiği gibi birinci basamak tersinir olup, aflatoksin siklik lakton halkasının açılmasıyla başlar. Ayrıca, asit ortamda (midedeki gibi) tepkime dengesi AFB<sub>1</sub>'nin yeniden üretimi ile orijinal ürünlere doğru kayabilir. Bu durumda, hayvanlar, analitik sonuçlara kıyaslandığından da daha çok miktarda toksin sindirebilirler ve bu da sütteki yüksek AFM<sub>1</sub> yüzdesini açıklamaktadır.

AFB-amonyak reaksiyonunu tetikleyebilen ürünler çeşitli kimyasal özelliklere sahiptir. Bunu detoksifikasyon reaksiyonuna müdahale edebilen ve işlenmiş yemde kolaylıkla tanımlanamayan bileşiklere yol açan maddelerin varlığı ile belirlenebilir. Aflatoksin D<sub>1</sub> (AFD<sub>1</sub>), moleküler ağırlığı 286 olup böylece AFB<sub>1</sub> molekülüne göre lakton karbonik fonksiyonel grubun yokluğunu ortaya çıkaran, floresan olmayan bir fenol olarak tanımlanan en iyi bilinen reaksiyon ürünlerinden biridir (Lee ve diğ. 1974) (Şekil 2.4). Ayrıca, yapı ve molekül ağırlığı için homojen bir analog bileşik, 100°C'de sodyum hidroksit ile reaksiyona girerek meydana gelir. AFD<sub>1</sub> oluşumuna yol açan reaksiyon yolunda diğer bileşiklerin oluşumunu izleyen alternatif yolları takip edebilir.

Amonyala detoksifikasyon işlemlerin dezavantajları ise, esas olarak amonyak metali korozyona uğrattığı için özel bir ekipman inşa edilmesi gerekir ve hacminde % 15' in üzeri karışımlarda havada patlayıcı hale gelir.





Şekil 2.4: Aflatoksinin amonyaklanması (Cucullu ve diğ. 1976)

### 2.5.1.2 Sodyum Bisüfit ile detoksifikasyon

Bu yöntem geçerli/yasal bir AFB<sub>1</sub> detoksifikasyon stratejisidir (Hagler ve diğ. 1982). Amonyak detoksifikasyonundan daha az etkili olmasına rağmen, amonyak yöntemlerinin tipik dezavantajlarının bir kısmının üstesinden gelir ve çok daha düşük maliyetlidir. Ayrıca, Doyle ve Marth bisüfitin aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> ile reaksiyona girerek, bunları yapısal modifikasyona işaret eden, suda çözünebilir hale dönüştürdüğünü bulmuşlardır ( Marth ve Doyle 1978). Bisüfitin son derece reaktif bir kimyasal olduğunu ve buna ek olarak, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan esmerleşmeyi, birçok mikroorganizmanın büyümesini inhibe etme kabiliyeti nedeniyle kuru meyvelere, şaraplara, reçellere, meyve sularına ve diğer bazı gıda ürünlerine yaygın olarak eklenmiş bir gıda katkı maddesi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bisüfitin bir antioksidan ve indirgeyici madde olarak da hizmet eder. Bisüfit ve aflatoksin arasındaki reaksiyonun ana ürünü izole edilmiştir ve 15 $\alpha$ - sodyum sülfonat veya aflatoksin B<sub>1</sub>S olarak tanımlanmıştır (Winston ve diğ. 1983; Yagen ve diğ. 1989). Bu bileşik, NaHSO<sub>3</sub>'ün furan halkasının çift bağına bağlanmasıyla, AFB<sub>1</sub> molekülün ana DNA'ya bağlanmasını engeller ve böylece mutajenik potansiyelin azalmasına neden olur.

### **2.5.1.3 Nötral elektrolizlenmiş okside su ile**

Elektrolizlenmiş oksitleyici su (EOW(Electrolyzed oxidizing water)), saf suyun sodyum klorür hariç, kimyasal maddelerin içermediği, anotların ve katotların seçici olmayan bir membran ile ayrıldığı bir elektroliz ekipmanında üretilir. Anotta klorür iyonları ve su molekülleri hipokloröz asit (HOCl), hipoklorit iyonları (ClO<sup>-</sup>) ve klor (Cl<sub>2</sub>) gibi klorin oksitleyicilere dönüşür (Guentzel ve diğ. 2010). Bu işlem sonucu, iki tip su üretilmektedir: nötr elektrolizlenmiş su (NEW(Neutral electrolyzed oxidizing water)) ve asidik elektrolize su (AEW(Acidic electrolyzed water)). Her iki ürünün antimikrobiyal mekanizması temel olarak üç fizikokimyasal özelliklere bağlıdır: pH, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli (ORP(Oxidation-reduction potential)) ve mevcut klor konsantrasyonu (ACC(available chlorine concentration )) (Audenaert ve diğ. 2012). AEW, önemli bir biyosidal aktiviteye sahiptir, ancak klor gazı evrimi yoluyla ORP ve Cl<sub>2</sub>'yi hızla kaybeder ve böylece etkinliğini azaltır. Bu açıdan NEW AEW'ye göre avantajlıdır ve insan sağlığı ve güvenlik endişelerini en aza indirdiği, korozyonu azalttığı ve toksik yan etkileri sınırladığı için aflatoxin detoksifikasyonunda daha güvenli ve sosyal olarak kabul edilebilir yöntemlerin geliştirilmesi için kullanılabilir.

## **2.5.2 Fiziksel Yöntemler**

### **2.5.2.1 Ekstrüzyon pişirme**

Ekstrüzyonla pişirme, gıda endüstrisinde özellikle tahıl ve tahıl ürünleri için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem bir termomekanik pişirme işlemidir, yani kısa sürede yüksek sıcaklık ve basınçta ulaşarak pişirmektir. Söz konusu olan işlem ile enzim inaktivasyonu ve mikrobiyal kontaminasyon azalması sağlanır. Bu nedenle ekstrüzyonla pişirme işleminin, doğal olarak ortaya çıkan bazı toksinlerin, örneğin deoksinivalenolün yıkımında uygulanabileceği tahmin edilmiştir ve detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Örneğin, Cazzaniga ve arkadaşları (2001), bu yöntemin mısır unu içindeki deoksinivalenolün ve aflatoxinlerin dekontaminasyonu konusundaki etkinliğini değerlendirmek için deneylerin sonuçları % 95'ten fazla deoksinivalenolün yıkımında etkin olduğu ve AFB<sub>1</sub> yıkımında ise sodyum metabisülfite (%10-25) ilavesiyle bile düşük afinite gösterdiği not edilmiştir (Cazzaniga ve diğ. 2001). Buna benzer farklı katkı maddeleri ile AFB<sub>1</sub> yıkımı çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak, ekstrüzyonla pişirme işlemi, yalnızca aflatoxinleri detoksifiye etmek için etkili ve pratik bir strateji olarak kabul edilemez.

Her ne kadar bazı katkı maddeleri ile bu yöntemin daha iyi sonuç verdiğini görürsek de, bu ilavelerin gıda kalitesi ve hatta insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini takiben, ilave kalıntı problemlerini görmezden gelemeyiz. Ekstrüzyon pişirme işleminin eksiklikleri açıktır. Yüksek sıcaklık ve basınçtaki talepler çok fazla enerji tüketir ve suda çözünen vitaminler ve proteinler gibi diğer besin yapılarını tahrip eder.

#### **2.5.2.2 Magnetik karbon**

Aktif karbon, yüksek yüzey alanı ve ucuz bulunabilirliği nedeniyle organik ve inorganik toksinleri adsorbe etmesinde yaygın olarak uygulanır (Kahani ve diğ. 2007). Bununla birlikte, su kaybı ve tuz eksikliği ve dışkıdan toplama zorluğundan dolayı dünya çapında uygulanması engellenmiştir. Aktif karbon yerine, manyetik karbon ideal bir alternatif adsorban olarak ortaya çıkmıştır. İlk olarak Khan ve Zahoor (2014) kümes hayvanlarında AFB<sub>1</sub>'in detoksifikasyonunda şeker kamışı küspesinden elde edilen manyetik karbonun etkinliğini değerlendirmişler (Khan ve diğ. 2014). Sonuç olarak, piliç tavuklarında AFB<sub>1</sub>'i çıkarmak için % 0.3 / kg yemin en etkili ve tamamen güvenli bir miktar olduğu gösterilmiştir. Bu araştırma, aflatoksinlerin detoksifikasyonunda ve kümes hayvanları ile çevre güvenliğinin sağlanmasında manyetik karbonun yüksek bir potansiyeli olduğunu göstermiştir.

#### **2.5.2.3 Başka absorbanların uygulanması**

Aflatoksinlerin vücut içindeki etkinliğini azaltmak için bir başka yeni ve etkili strateji olarak çeşitli absorbanlar kullanıma geçmiştir. Örneğin, sulu sodyum kalsiyum alüminosilikat (HSCAS), NovaSil kili (NS), monometilamin/Ca(OH)<sub>2</sub>. Bazı çalışmalara göre HSCAS aflatoksin enterosorbenti olarak işlev görür ve hayvanların üst gastrointestinal yolunda seçici ve kuvvetli bir şekilde bu toksinleri bağlayarak ve daha sonra ilgili toksisitelerin yanı sıra aflatoksinlerin biyoyararlanımını azalttığını belirtmişler. Ayrıca in vitro çalışmalara göre HSCAS'ın AFB<sub>1</sub>'i yüksek affinite ile absorbe ettiğini ve inek, keçi sütlerindeki AFM<sub>1</sub> seviyesin etkin bir şekilde düşürdüğünü belirtilmiştir (Phillips ve diğ. 1988; Phillips ve diğ. 1990; Phillips ve diğ. 1995). HSCAS'ın analogu olan NovaSil kilinin çeşitli hayvan türlerini aflatoksinlerden koruduğu gösterilmiştir. NS, HSCAS ile karşılaştırıldığında, NS, Faz I ve Faz II klinik denemeleri tarafından onaylanan, diyetle % 0.25 seviyesinde çinko ile etkileşime girmemesi ve ayrıca insanlarda güvenli olması açısından avantaj sağlar (Phillips ve diğ. 2008). Buna benzer

absorbanlar verimliliği, uygulanabilirliği ve ekonomi açısından tarım pazarlarında ve gıda endüstrisinde güçlü bir şekilde yayılmasına hak ediyor. Fakat, absorbanların besinler arasındaki negatif etkileşimleri ve güvenlik değerlendirmeleri yeterince araştırılmamıştır.

### 2.5.3 Biyolojik yöntemler

#### 2.5.3.1 Probiyotikler ve laktik asit bakterilerini kullanarak

Birkaç laktik bakterilerin AFB<sub>1</sub>'i organizmanın yüzeyinde *in vitro* ve *in vivo* bağlayabilmekte ve iki yönü dikkate almaktadır: toksinin bağlanması ve salınması (Bueno ve diğ. 2007). Fazeli ve arkadaşlarının (2009) çalışmasına göre laktik asit bakterileri (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus casei*) 72 saat 37 ° C'de 2 x 10<sup>10</sup> CFU / mL seviyesine kadar AFB<sub>1</sub>'i indirme kabiliyetinde olduğunu belirtmişler (Fazeli ve diğ. 2009). Ayrıca, HPLC ile yapılmış analiz sonuçları şu şekildedir: 3 bakterilerin tümü AFB<sub>1</sub> yıkabilmektedir ve %25 ile %61 arasındadır; AFB<sub>1</sub>'in yıkımı hızlıydı ama aynı zamanda geri dönüşümlü idi; *L. casei*, AFB<sub>1</sub> ile diğer iki bakteriden daha güçlü bağlanmaktadır (Bueno ve diğ. 2007).

*L. plantarum*, zeytin yüzeyine yapışır ve diğer istenmeyen mikro organizmaların yapışmasını etkileyen biyofilmleri üretir ve antioksidan aktivitedeki artışı destekler, sonuç olarak AFB üretimini zayıflatır. Bu azalma aynı zamanda, *L. Plantarum*'un oksijen çekiciliğinden kaynaklanır, böylece poliollerin oksidasyona karşı korunması ve AFB<sub>1</sub> biyosentezinin inhibisyonunun artmasına neden olur (Kachouri ve diğ. 2014).

Magnusson ve ortakların (2003) çalışmasına göre, laktik bakterilerin antimikrobiyal etkinliğini üç mekanizma açıklayabilir. Bunlar organik asit üretimi, besleyici elementi için rekabeti ve antagonist üretimidir (Magnusson ve diğ. 2003).

#### 2.5.3.2 Aktinomisetler

Son yıllarda aktinomiset gurubu mantarların kullanımına bağlı olarak yeni kontrol stratejileri geliştirilmiştir. Küba toprağı üzerinde yapılan bir araştırma, *Candida*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Penicillium chrysogenum* ve *Colletotrichum musae*' ye %50.7 karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu 563 aktinomisetin izolasyonuna yol açmıştır. Bu etkinin nedeni ise muhtemelen, aminoglikosit, antrasiklin veya polietter iyonofor ve polien makrolid antibiyotik ailelerine ait antibiyotiklerin üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Iznaga ve diğ. 2004).

Aktinomisetlere ait *Nocardia corynebacteroides* , Ross 308 civcivlerinde aflatoksin detoksifikasyon kabiliyeti açısından test edilmiştir ve bağırsak mukozasının lezyonlarında hafifleme, kuş ağırlığı ve yem tüketiminde artışlar gözlemlendi (Tejada-Castañeda ve diğ. 2008). Ek olarak, karaciğerdeki lipid içerikleri de belirgin şekilde yükselmiştir. Bu sonuçlar *Nocardia corynebacteroides* 'nin civcivleri aflatoksinden etkili bir şekilde koruyabildiğini ve yeterince güvenli olduğunu göstermiştir.

Bu yöntemin dezavantajları ise mikroplar tarafından salınan istenmeyen metabolik ürünler, hayvanların beslenme durumunu etkileyebilir ve daha sonra üretimde azalmayı tetikleyebilir.

### **2.5.3.3 Mantar biyomoleküllerini kullanarak detoksifikasyon**

PgAFP, NFAP ve PC-Arctin bir mantar proteinleridir ve sistein bakımından çok zengin, küçük boyutlu moleküllerdir (Rodríguez-Martín ve diğ. 2010, Kovács ve diğ. 2011, Chen ve diğ. 2013). NFAP, hassas mantarlarda apoptoza neden olan oksidatif bir strese neden olurken (Galgóczy ve diğ. 2013), PgAFP bazı toksijenik küflerde büyümeyi inhibe eder. Son çalışmalara göre, önemli değişikliklerle birkaç protein içeren ve PgAFP'in konsantrasyonu 9.38 µg/mL 'den daha yüksek olması *A. flavusun* büyümesinde azalma gözlemlenmiştir. PgAFP ile muamile edilen hücreler daha yoğun bir oksidasyon etkisini göstermiştir (Delgado ve diğ. 2015).

### **2.5.3.4 Bitkilerin biyoaktif maddelerini kullanarak detoksifikasyon**

*Armillariella tabescens*'in bir enzimi olan *Aflatoxin Oksidaz*, AFB<sub>1</sub>'e doğru detoksifiye edici bir aktivite sunar. Aflatoxin oksidaz detoksifikasyon reaksiyonunda çok önemli bir rol oynayabilen oksijen ve hidrojen peroksit üretmektedir (Wu ve diğ. 2015).

*Mangan peroksidaz* (MnP), yenilebilir, beyaz çürükçül mantarı olan *Pleurotus Ostreatus*'tan süzülen bir enzimdir. Bu enzim aromatik yapıları okside etmesi için ve daha sonra kovalent bağların kırılması için radikal üretmektedir (Evans ve diğ. 1994). Yehia'nın (2014) çalışmasına göre, AFB<sub>1</sub>'in yıkımı enzim konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olup, bu detoksifikasyon 48 saat inkübasyon sırasında 1,5 IU/mL enzimde % 90'a ulaşan yıkım sonucu elde edilmiştir (Yehia 2014). *Lakkaz* (Lac), AFB<sub>1</sub>'in detoksifiyesinde etkin olan başka bir enzimdir (Zeinvand-Lorestani ve diğ. 2015).

Minimum etki ile yüksek özgülüklü mikrobiyal veya enzimatik araçlar kullanan biyolojik prosedürler, kontamine olmuş gıdaların işlenmesi için uygun bir seçimdir; ayrıca kullanım kolaylığı, erişilebilirlik ve çevre dostu olma özelliği en büyük avantajdır. Biyolojik prosedürlerin kullanılması, maksimum verim için pH ve sıcaklık gibi koşulların en uygun olmasını gerektirir (Forootanfar ve diğ. 2016).

### 3. BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL MANTARLAR

Beyaz çürüklüklü mantarlar, canlı ağaçlarda öz odunların ortak parazitleridir ve orman ekosistemlerinde agresif odunsu moloz ayrıştırıcılarıdır (Rayner 1988). Beyaz çürükçül mantarları lignin dahil tüm hücre duvarı bileşenlerini bozabilir. Genellikle normal ahşap renginin ağarmasına neden olur. Odunda lignin miktarını metabolize edebilme yetenekleri mikroorganizmalar arasında benzersizdir. Beyaz çürüklüğe neden olan binlerce tür, belirli bir hücre duvarı bileşeninin daha büyük veya daha az miktarını bozabilecek heterojen bir gruptur. Bazı türler tercihen lignini odundan ayırır ve tamamen selülozdan oluşan beyaz birikinti, bozulmuş hücrelerin bırakır, bazıları ise aynı anda lignini ve selülozu bozar (Blanchette 1991). Beyaz çürükçül mantarları tarafından ligninin parçalanması oksidatif bir süreçtir. Bu süreçte lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz (Lac) gibi fenol oksidazlar anahtar enzimlerdir (Kuhad ve diğ. 1997; Leonowicz ve diğ. 1999). MnP etkili bir peroksidaz olup aromatik eterleri, aminleri, fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri yükseltgeyebilir (Kirk ve Cullen 1998). Mavi-bakır phenoloksidazlar olan lakkazlar, fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri yükseltgerler. Bu tür mantarlara *Morchella esculenta* (*M. esculenta*), *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Hebeloma crustuliniform* örnek verilebilir.

Biyoteknolojik süreçlerin temel konsepti, atıkların mikroorganizmalara besin maddesi olarak kullanılması ve çevreye zararsız bileşiklere dönüştürülmesidir. Günümüzde, bu çevre dostu funguslar bilim adamların biyoteknoloji alanında uygulanmasına yönelik araştırmalar ilgilerini çekmekte. Örneğin, Alberts ve arkadaşları (2009) beyaz çürükçül fungusların ürettiği lakkaz enzimi yardımıyla AFB<sub>1</sub>'in yıkımını araştırmışlar ve HPLC sonuçlarına göre AFB<sub>1</sub> molekülünün floresan özelliklerinin azaldığı ve ayrıca, mutajenitede önemli bir kayıp gözlemlendiğini belirtmişler (Alberts ve diğ. 2009). Buna benzer, beyaz çürükçül mantarların enzimlerin boyar madde, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), atık su ve buna

benzer doğa kirleticilerin yıkımında/iyileştirmesinde kullanılması gibi çalışmalar çok yaygındır. Ayrıca, enzimlerin daha kararlı ve ömrün daha uzun olması için çeşitli immobilize metodları ve modifikasyonlar uygulanmaktadır.

#### 4. NANOTEKNOLOJİ

Bugüne kadar dünyada, nanoteknolojilerin ve nanürümlerin ne olduğunu açıklayan tek bir standart olmamıştır.

"Nanoteknoloji" tanımına yaklaşımlar arasında şunlar yer almaktadır:

ISO / TC 229 Teknik Komitesinde “nanoteknoloji” tanımını aşağıdakiler gibi ifade edilmiştir:

- Bir boyut etkisinin (fenomen) devreye alınması yeni uygulamaların ortaya çıkmasına yol açtığı, bir kural olarak, 1 nm'lik bir ölçekte, fakat bir ya da daha fazla boyutta 100 nm'den daha küçük bir leği hariç tutmayan bilgi ve işlem kontrolü;
- nesnelerin ve malzemelerin özelliklerini, serbest atomların veya moleküllerin özelliklerinden ve ayrıca bu atomlar veya moleküllerden oluşan bir maddenin kütle özelliklerinden farklı olan, bu özellikleri uygulayan daha gelişmiş materyaller, cihazlar, sistemler oluşturmak için nanometre ölçeğinde kullanmak;

Nanoteknolojinin pratik yönü, atomların, moleküllerin ve nanoparçacıkların işlenmesi ve manipölasyonu için gerekli cihazların ve bileşenlerinin imalatının oluşturulmasını içerir. Bir nesnenin mutlaka en az bir 100 nm'den daha küçük bir doğrusal boyuta sahip olması gerekmediği anlaşılmaktadır - bunlar, atom yapısı tek tek atom seviyesinde çözünürlükle kontrollü bir şekilde kontrol edilebilen veya nano nesneler içeren makro nesneler olabilir. Daha geniş bir anlamda, bu terim aynı zamanda bu yöntemlerin teşhisi, karakterizasyon ve araştırma yöntemlerini de kapsar.

Daha sonra “nanoteknoloji” olarak adlandırılacak yöntemleri İngiliz kaynaklar, ilk olarak Richard Feynman'ın 1959 yılında Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde yıllık Amerikan Fizik Toplumu toplantısında yaptığı, " Dipte Daha Bol Oda Var" ( «*There's Plenty of Room at the Bottom* ») konuşmasıyla bağlıyorlar. Richard Feynman, tekli atomları mekanik olarak uygun boyutta bir manipölatörle hareket

ettirmenin mümkün olduğunu belirtmiştir. Bu manipülatörün yapılmasını aşağıdaki şekilde önermiştir. Kendi kopyasını yaratacak bir mekanizma inşa etmek gerekiyor, sadece daha küçük bir boyutta. Oluşturulan daha küçük mekanizma, yine kendi kopyasını yaratmalı ki bir atomun büyüklüğü ile orantılı olana kadar küçük boyuta ulaşmasını gerektiğini söylemiştir. Ayrıca, bu durumda mekanizmanın yapısında değişiklik yapmak gerekeceğini belirtmiştir. Bunun nedeni ise makrodalada etki eden yerçekimi kuvvetleri daha az ve daha az etkiye sahip olacağı ve moleküller arası etkileşimlerin kuvvetleri ve Van der Waals kuvvetleri mekanizmanın çalışmasını giderek daha fazla etkileyeceğini söylemiştir. Bu güne kadar, hiç kimse bu olasılığı reddedemedi, ancak henüz kimse bu mekanizmaları yaratmayı başaramamıştır.

“Nanoteknoloji” terimi ilk kez 1974'te Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır.

#### **4.1 Nanopartiküller**

1 ve 200 nanometre arasında değişen parçacıklar genellikle "nanopartiküller" olarak adlandırılır. Minyatürleşmeye yönelik mevcut eğilim, maddenin çok küçük bir parçasını alırsak bu maddenin tamamen yeni özelliklere sahip olabileceğini göstermiştir. Böylece, bazı malzemelerin nanoparçacıkları çok iyi bir katalitik ve adsorpsiyon özelliklere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer malzemeler ise şaşırtıcı optik özellikleri göstermektedir, örneğin, güneş pillerinin üretiminde kullanılan ultra ince organik malzeme filmler.

Nano nesnelere 3 ana sınıfa ayrılır:

Üç boyutlu nesnelere: Parçacıkların iletkenlerin patlaması, plazma sentezi, ince filmlerin geri kazanılması gibi yöntemler ile üretilmektedir.

İki boyutlu nesnelere: CVD, ALD gibi filmlerin moleküler ve iyon kaplama gibi metodları ile elde edilmektedir.

Tek boyutlu nesnelere: Bu nesnelere moleküler kaplama yöntemi, maddelerin silindirik mikro gözeneklere sokulması gibi metodlarla yapılmaktadır.

Ayrıca, nanokompozitler, karbon ve metal bazlı nanomateryaller de vardır. Nanokompozitler ise nanopartiküllerin herhangi bir matrise girmesiyle (sokulmasıyla) elde edilmektedir. Örneğin, silica jel, killer, akriv alumina. Karbon bazlı nanomateryallere fulleren, karbon nanotüpler örnek verilebilir. Demir bazlılar



ise metal oksitler (MgO, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO vs), nano-altın/gümüş gibi nanopartikülleri içerir. Yüksek adsorpsiyon kapasitesine, elektriksel iletkenliğe ve fotokatalik yeteneğe sahip olan bu metal oksit nanopartiküller toksik özellikleri üzerinde incelemeler de yapılmıştır. Sonuç olarak, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hariç diğer nanopartiküllerin tümü DNA hasarına yol açan toksik etkileri vardır. Ayrıca, CuO ise en toksik özelliklere sahip olduğu açığa çıkmıştır. Demir oksit en çok kullanılan manyetik özellikte bir nanopartiküldür.

## **4.2 Manyetik nanopartiküller (MNP)**

Manyetik nanopartiküller demir, nikel, kobalt, krom, manganez, gadolinyum ve bunların kimyasal bileşikleri gibi manyetik elementlerden oluşan nanomalzemelerdir. Manyetik nanopartiküller, nano ölçekli boyutlarından ötürü süper paramanyetik ve sade formlarında çeşitli uygulamalarda büyük potansiyeller sunar veya özel kullanımlar için seçilen bir yüzey kaplaması ve fonksiyonel grupları ile kaplanır. Ferrit nanopartikülleri veya demir oksit nanopartikülleri (maghemit veya manyetit kristal yapısındaki demir oksitler), bugüne kadar en çok keşfedilen manyetik nanopartiküllerdir.

### **4.2.1 Demir Oksit Nanopartiküller**

Demir oksitler; Fe<sub>x</sub>O (vustit), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (manyetit),  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit),  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (hematit) olmak üzere farklı manyetik özellikte ve değişik kimyasal bileşenlerden oluşmaktadır. Manyetik nanopartiküllerin özellikleri sentez yöntemine ve kimyasal yapısına bağlıdır. Ayrıca, oksidasyona az duyarlı olmaları nedeniyle kararlı manyetik özelliklerini korumaktadırlar. Çoğu durumda, manyetik nanopartiküller 1-100 nm arasında değişir ve süper paramanyetizma gösterebilir. Süper paramanyetizma, termal dalgalanmaların daha önce doymuş bir düzeneğin kendiliğinden manyetik olarak bozulmasını sağlayacak kadar güçlü olduğu termal etkilerden kaynaklanır; bu nedenle, bu parçacıklar sıfır zorlayıcılığa sahiptir ve histerezisi yoktur.

Genel olarak en çok araştırılan ve çalışılan demir oksitler, manyetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ve maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)'dir (Tablo 3).

**Tablo 3.1:** Manyetit ve Maghemit'in farklılık ve benzerlikleri

Manyetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )		Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )
<ul style="list-style-type: none"><li>• Manyetit (<math>\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3</math> yada <math>\text{Fe}_3\text{O}_4</math>), 2:1 molar oranında <math>\text{Fe}^{3+}</math> ve <math>\text{Fe}^{2+}</math> iyonlarından oluşmaktadır.</li><li>• <math>\text{Fe}^{3+}</math> iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı oktahedral ve <math>\text{Fe}^{2+}</math> iyonlarının hepsi oktahedral düzenlenmiştir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Manyetit ve maghemit aynı fiziksel özelliklere sahiptir</li><li>• Her ikisi de ferrimanyetik özellik gösterir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Maghemitin mıknatıslık özelliği manyetite göre daha düşüktür</li><li>• Sadece <math>\text{Fe}^{3+}</math> iyonlarından oluşmaktadır</li><li>• Kristal yapısında <math>\text{Fe}^{3+}</math> iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı da oktahedraldir.</li></ul>

Manyetik nanopartiküller (MNP'ler) olan  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , güçlü manyetik özellik, düşük toksisite ve biyolojik malzemelerle biyolojik uyumluluk sağlamasıyla son zamanlarda çok dikkat çekmektedirler (Liu 2006). Nanopartiküller yüksek spesifiklikte yüzey alanları nedeniyle enzimler ve birçok biyoaktif molekül için iyi bir destek materyal özelliğindedirler. Bunların parçacık boyutları nano boyutlarda ölçüm yapılarak kontrol edilebilir ve nanomateryal yüzeye biyolojik uyumluluk sağlayabilen spesifik fonksiyonel grupları bağlayarak biyolojik moleküller ile etkileşimlerini artırılabilir. Manyetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanopartiküllerin kullanımı ve özellikleri dikkate alındığında bu partiküllerin yüzey özellikleri ve kimyası büyük önem taşımaktadır. Manyetitin sudaki dispersiyonu ne pozitif ne de negatiftir, çözeltinin pH'ına bağlıdır. Manyetitin izoelektrik noktası 6.8'dir. Manyetit nanopartiküllerin elektrostatik çift tabaka oluşturulması, sterik stabilizasyonu veya izoelektrik noktasının sitrat yada silika kaplanarak modifiye edilmesiyle stabilizasyonu sağlanmaktadır. Demir oksit nanopartiküllerin kararlı hale getirilmesi, kararlı bir manyetik kolloidal sıvı oluşturulması için çok önemlidir (Sun ve Zeng 2002).

### **4.3 Manyetik nanopartiküllerin sentezi**

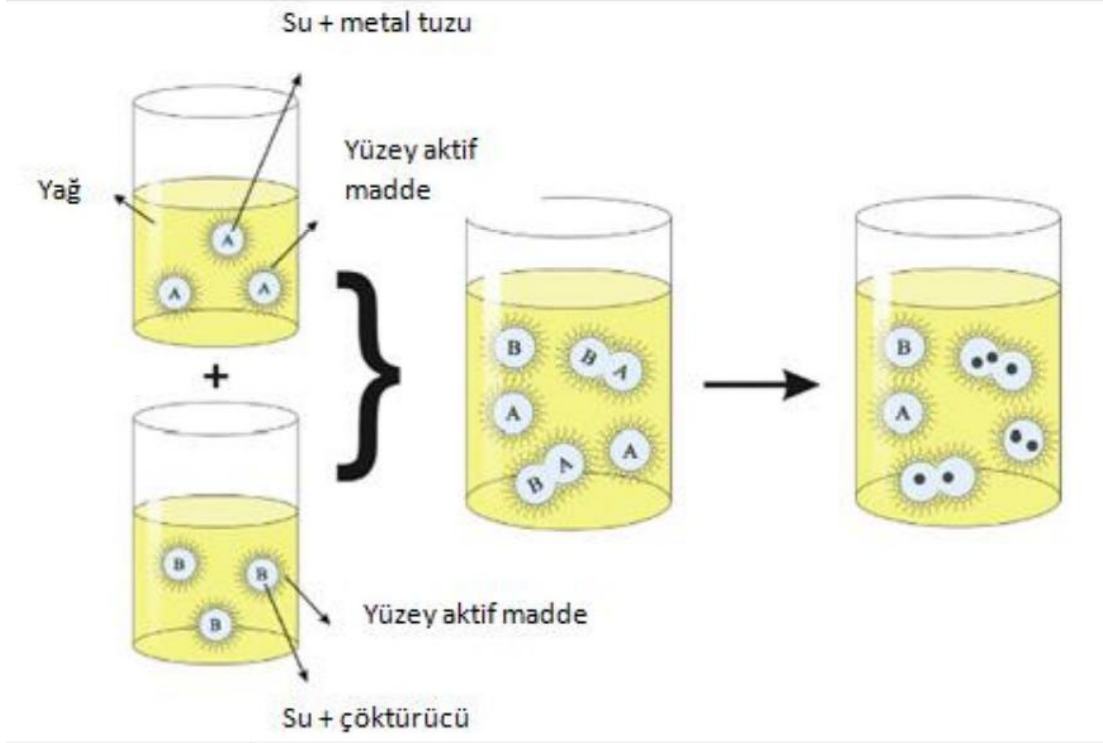
Günümüzde manyetit ve maghemit nanopartiküllerin sentezi hakkında pek çok literatürde birçok yöntem bulunmaktadır ve genel olarak, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç farklı metota göre sentezlenir. Bu yöntemler özellikle partikül yapısının kontrolü, kararlılığı, biyolojik olarak uyumlu olması açısından oldukça önemlidir.

Yaygın olarak kullanılan ve yüksek verimle demir oksit nanopartiküllerin elde edildiği yöntemler, mikroemülsiyon, termal parçalanma, hidrotermal sentez ve ortak çöktürmedir.

#### **4.3.1 Mikroemülsiyon**

Mikroemülsiyon, nanoparçacıkların formasyonunda nano-reaktör olarak kullanılır. Yüzey aktif madde ortamında iki karışmayan sıvının (yağ/su) isotropik olarak dağılması bu metodun temelidir. Yağ ve su ara yüzeyinin sürfaktan vasıtasıyla kararlılığı sağlanır ve oluşan su küreleri (nano-boyutta) sıvı içine dispers olurlar. Bu kürelerin/misellerin boyutları yüzey aktif madde ve su molar oranına göre değişir. Parçacıklar miseller içinde büyütülür ve çözücü ekleyerek (aseton, etil alkol) çöktürülür.

**Şekil 4.1:** Mikroemülsiyon ile sentezin şematik gösterimi



#### 4.3.2 Hidrotermal sentez

Bu metod ile, yüksek sıcaklık ve basınç altında buhara maruz bırakılarak, otoklav gibi kapalı sistemlerde sentezlenir. Ayrıca, bu yöntemde serbest tek kristal parçacıkların büyümesi ve diğer yöntemlere göre daha iyi bir kristal form kazanması amacıyla yapıyı kristallendiren yaş kimyasal yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntem, yüksek kristal yapıda olan manyetik nanopartiküllerin sentezinde önemli bir metoddur.

$FeCl_3$ , yüksek kaynama noktalı çözücü olan etilen glikol, elektrostatik itme sağlayıp, parçacıkların birleşmelerini engelleyen sodyum asetat ve yüzey aktif madde rolünde olan polietilen glikol basınçlı kaplara iyice karıştırılarak konur ve reaksiyon  $130-250^{\circ}C$  de 6-72 saat arasında gerçekleştirilir.

#### 4.3.3 Termal parçalanma

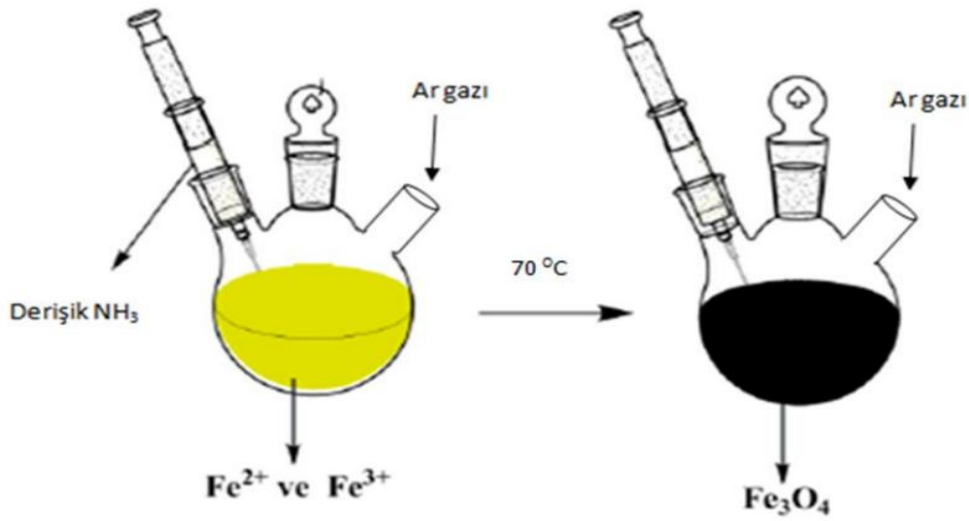
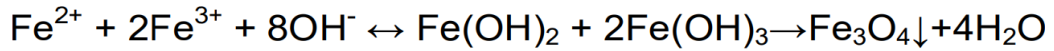
Organik bazlı bir yöntemdir. Demir komplekslerin yüksek sıcaklıkta oleik asit varlığında yüksek kaynama noktalı organik çözücülerde karıştırmasına dayanan bir yöntemdir. Yüksek sıcaklıkta kompleks parçalanırken elde edilen demir ortamdaki oksijen varlığında manyetite dönüşür. Oluşmakta olan manyetit parçacıkları ortamdaki yüzey aktif madde sayesinde fazla büyümeden kalır. Bu yöntemle elde edilen nanokristaller çok iyi monodisperstir ve kloroform hekzan gibi organik

çözgenlerde çok iyi dispers olurlar. Partikül boyutu sıcaklığa ve kaynama süresine bağlı olarak 5-22 nm arasında değişir.

#### 4.3.4 Ortak çöktürme

Bu metotta  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  iyonları uygun oranlarda bazik ortamda karıştırılarak çöktürülür. Sentez yüksek sıcaklıkta ya da oda sıcaklığında da yapılabilir. Bu yöntemle elde edilen parçacık boyutları  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  oranı, kullanılan tuzun türüne (klorürler, sülfatlar, nitratlar, perkloratlar), pH, sıcaklık, baz tipi, karıştırma ve baz çözeltisinin damlatma hızı, iyonik şiddet gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca,  $Fe_3O_4$ 'ün  $Fe_2O_3$ 'e yükselmesini engellemek için reaksiyon ortamı inert olmalıdır.

Ortak çöktürme reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



Şekil 4.2: Ortak çöktürme sentezi

#### 4.4 Manyetik Nanopartikülün Yüzey Modifikasyonu

Manyetik nanopartikül yüzeyine modifikasyonu ile üç farklı özellikte yapı oluşur, bunlar suda dağılabilen, yağda dağılabilen ve amfifilik yapılardır. Kararlı bir çözelti hazırlanması, etkileşimin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi, çözücünün seçimi, kümelenmenin önlenmesi gibi faktörler yüzey modifikasyonu açısından çok önemlidir.

Yağda dağılabilen yapılar, çözücü ortamında zayıf etkileşimde olan alkil fenol, yağ asidi gibi hidrofobik gruplardan oluşur. Bu modifikasyon tipinin tercih

edilmesinin nedeni ise nanoparçacıkların kararlılığının artması, partiküllerin eşboyutlu oluşması ve kümelenmenin önlenebilir olmasıdır ve uzun karbon zincirli hegzadekan içinde dağılabilmektedir.

Suda dağılabilen yapılar, çözücü ortamında kuvvetli etkileşimler yapabilen polyol, amonyum tuzu, lisin gibi hidrofilik özellikteki kimyasal gruplardan oluşur.

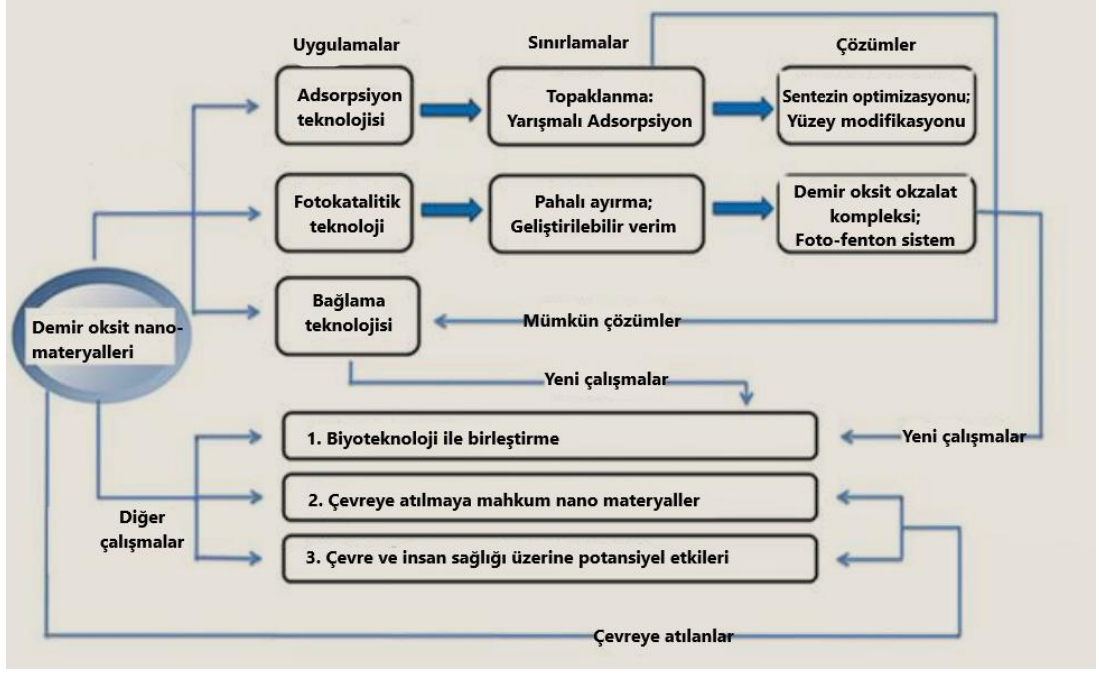
Amfifilik yapılar ise hem hidrofobik hem de hidrofilik kimyasal gruplardan oluşup, hem suda hem de yağda dağılabilir olması çok önemlidir.

Manyetik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonunda oldukça sık ve yaygın kullanılan reaktiflerin biri silikadır. Bu reaktif toksik olmayan, biyo-uyumlu, optik olarak şeffaf, kimyasal olarak inert, termal olarak kararlı ve iyi bilinen bir yüzey kimyasına sahip olması sebebiyle tercih edilir (Wong ve diğ. 2011). Ayrıca, dielektrik özelliği nedeniyle, silika dipol-dipol etkileşimlerini tarayabilir ve manyetik nanopartikülün topaklanmasını önleyebilir. Silika, sulu çözeltide MNP'in stabilitesini artırabilen hidrofilik bir maddedir. Ek olarak, kompozit nanopartiküllerin su veya polar çözücüler içinde dağılmasını sağlayan silanol (Si-OH) fonksiyonel grubuna sahiptir. Dahası, Si-OH diğer fonksiyonel gruplarla modifiye edilebilir veya biyo-konjugasyon için bağlanma bölgesi sağlayabilir (Lu ve diğ. 2007; Laurent ve diğ. 2008; Teja ve Koh 2009; Elingarami ve Zeng 2011). Silika ile kaplama metodlarından yaygın olarak Stöber yöntemleri, sol-jel tekniğidir. Stöber metodu ile MNP üzerine silika kaplama mekanizmaları veya büyümesi, alkollü ortamda dağılmış MNP varlığında, TEOS gibi silika prekürsörünün hidrolizi ve silisin MNP yüzeylerine yoğunlaştırılmasını içermektedir. Amonyak genellikle katalizör olarak kullanılır. Bu prosedür normalde mekanik karıştırma altında gerçekleştirilir. Bununla birlikte, karıştırma için ultrasonik ışınlamanın kullanıldığı da bildirilmiştir (Morel ve diğ. 2008).

#### **4.5 Manyetik Nanopartiküllerin Kullanım Alanları**

MNP'nin yüzey karakteristik özellikleri, şekil, boyut ve özellikle manyetik özelliklerinden dolayı; katalizör, çevresel iyileştirme, veri depolama, ferrosivilar, manyetik kaydedici araçlar, manyetik rezonans görüntüleme için kullanılan kontrast maddeler, ilaç taşıyıcı, biyomedikal araştırma ve geliştirme gibi çok geniş uygulama alanına sahiptir (Nasir Baig ve Varma 2013).

Modifiye edilmiş manyetik nanopartiküller biyo-ayırma için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni ise manyetik özelliklerin biyomolekülleri karmaşık karışımlardan kolaylıkla seçerek ayırmasıdır. Örneğin, silika kaplı manyetik nanopartiküller, genomik DNA'yı çıkarmak ve saflaştırmak için kullanılmıştır (Taylor ve diğ. 2000); immünomagnetik nanopartiküller ise hedef hücreleri ayırmak için kullanılmıştır (Chen ve diğ. 2014); amino-modifiye silika kaplı manyetik nanoparçacıklar bakteriyel patojenleri ayırmak için kullanılmıştır (Huang ve diğ. 2010); organik küçük moleküller veya biyo-makromoleküller mannoz (El-Boubbou ve diğ. 2007), kitosan (Liu ve diğ. 2000), vankomisin (Kell ve diğ. 2008) ve aptamerler (Ozalp ve diğ. 2014) gibi ile konjuge edilmiş manyetik nanoparçacıklar, bakteri ve virüsleri ayırmak için kullanılmıştır; ve oligonükleotit etiketli manyetik nanoparçacıklar, hedef nükleik asit sekanslarını yakalamak için kullanılmıştır (Ashtari ve diğ. 2005).



Şekil 4.3: Demir oksit nano materyallerin uygulamaları, sınırlamaları ve çalışmaları

## 4.6 Karakterizasyon Yöntemleri

### 4.6.1 Infrared spektroskopisi (IR)

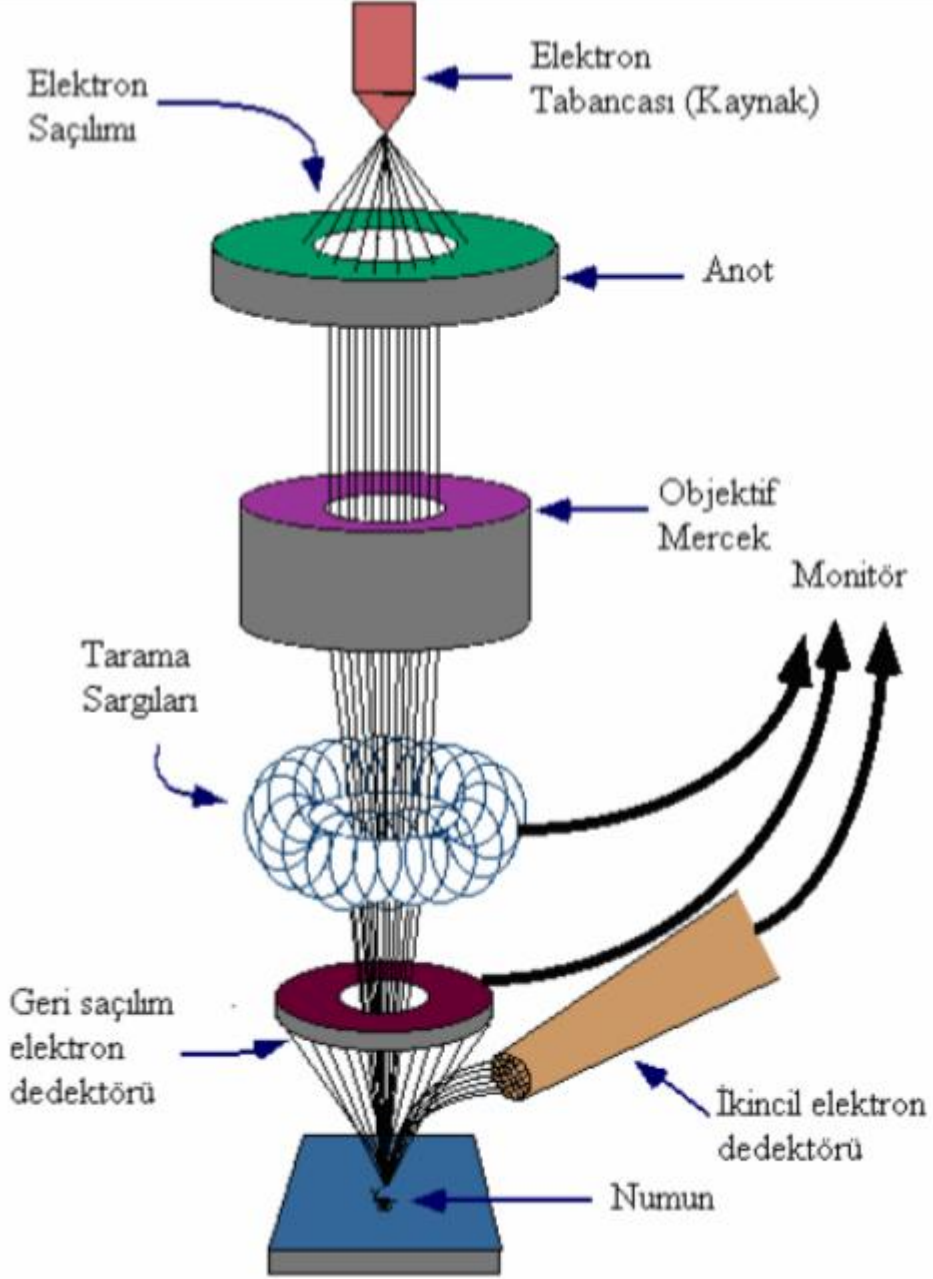
Infrared spektroskopisi, madde moleküllerindeki çeşitli bağların infrared ışını ile etkileşimini inceleyen spektroskopinin bir bölümüdür. Kızılötesi ışını, molekülleri uyarır. Bununla birlikte, infrared ışının absorpsiyonu, tüm spektrumunda değil, yalnızca, incelenen moleküllerdeki salınımların uyarılma enerjilerine karşılık gelen dalga boylarında meydana gelir. Sonuç olarak, IR radyasyonunun maksimum absorpsiyonunun gözlemlendiği dalga boyları (veya frekansları), numune moleküllerinde bazı fonksiyonel grupların ve diğer fragmanların varlığını gösterebilir ve böylece bileşiklerin yapısını aydınlatmakta yardımcı olur. Elektromanyetik spektrumun IR bölgesi, dalga sayısı  $12800-10\text{ cm}^{-1}$  veya dalga boyu  $0.77-1000\text{ nm}$  aralığındaki ışını kapsar.

### 4.6.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), bir görüntü oluşturmak için bir yüzey üzerinde çok küçük alana odaklanmış olan yüksek enerjili elektron ışını tarar. Işındaki elektronlar örnekle etkileşime girerek yüzey topografyası ve bileşimi hakkında bilgi edinmek için kullanılacak çeşitli sinyaller üretir. Elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkiler,



uygun algılayıcılarda toplanıp sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılır. Taramalı electron mikroskobu electron kaynağı, optic kolon, electron dedektörü, numune hücresi ve görüntüleme sistemi gibi ana parçalardan oluşmaktadır. Ayrıca, numuneler iletkenliği arttırmak için altın veya paladyum gibi ağır bir metaller ile kaplama yapılır.



Şekil 4.4: SEM' in şematik yapısı (Valderama 2011)

## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Stok Çözeltiler

- Çalışma boyunca, çözeltilerin hazırlanması ve seyreltilmesinde ters faz osmoz sistemiyle üretilen, direnci 18.2 mΩ olan deiyonize-saf su kullanılmıştır. Yüksek saflıktaki su, Human Power I plus marka saf su cihazından alınmıştır.
- Hücre ortamının hazırlanmasında kullanılan maddeler;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , Glikoz, Yeast Extract.
- Manyetik nanopartikül sentezinde ve modifikasyonunda  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , Tri-metoksi metil silikat, tetra etil orto-silikat (TEOS),  $\beta$ -siklodekstrin (BCD), 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES), toluen, etanol, fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.0), glutaraldehit kimyasalları kullanılmıştır.
- HPLC-FLD analizleri için, kromatografik saflıkta metanol (MeOH) (Merck, Darmstadt-Germany), potasyum bromür (KBr) (Riedel, Germany), sodyum hidroksit (NaOH), aseton, Nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) ve sodyum klorür (NaCl) kullanılmıştır.
- Kullanılan stok  $25000 \text{ ng ml}^{-1}$  Aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) standardı acetonitril içindeki standard çözeltisi r-biopharm'dan (Darmstadt-Germany) sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan kartuş immuno afinite sorbent özellikli Alfaprep imonuafinity column SPE kartuş R-Biopharm (Glasgow) firmasından sağlanmıştır.

### 5.2 Hücre Ortamının Hazırlanması

**Tablo 5.1:** Hücre ortamı

Madde	Miktar (g/L)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{CaCl}_2$	0,01
Glikoz	10,00
Yeast Extract	0,025

Hücre ortamı beher içine yukarıdaki maddelerden konulup 1000 mL su içinde çözülerek hazırlanmıştır. Hücre ortamının pH'ı 5-5.5 değerleri arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışılacak konsantrasyona göre erlen sayısı hazırlanır ve her erlene 100 mL hücre ortamı konulup, otoklavlanır.

### **5.3 Hücre süspansiyonunun hazırlanması**

*M. esculenta* (2) % 2 (w/v) malt ekstrakt içeren ortamlarda 4 °C'de buzdolabında saklanıp 26°C'de 3 gün aktive edilmiştir. Miseller steril % 0,9 NaCl ile 100 mL % 2 malt ekstrakt broth (pH 4,5) içeren 250 mL'lik erlenlere aktarılıp ve 4 gün 26°C ve 175 rpm'de orbital çalkalayıcıda gelişmesi sağlanmıştır.

### **5.4 Hücre İmmobilizasyonu**

AFB<sub>1</sub> giderimi serbest formdaki ve immobilize formdaki hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin immobilizasyonunun en büyük avantajı; immobilize hücrelerin kullanımda tekrarlana bilirligi ve ortamdan kolay uzaklaştırılabilmesidir. Bu da serbest hücrelere göre daha ekonomik materyal geliştirilmiş olur.

Bu kapsamda beyaz çürükçül mantarı olan *M. esculenta* farklı fonksiyonel gruplarla modife edilmiş manyetik nanopartiküllerine immobilize edilmiştir.

#### **5.4.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin sentezi ve hücrelerin immobilizasyonu**

##### **5.4.1.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülün (MNPs) sentezi**

14,5 g FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O ve 10 g FeCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O alkali ortamında 200 mL deionize suda çözülüp, 90°C'ye kadar ısıtılmıştır. Bu karışıma 40 mL NH<sub>4</sub>OH (25%) yavaşça damlatılarak ilave edildi ve 50 dakika 90°C'de karıştırılıp, oda sıcaklığına kadar soğuması beklendi ve çökelti miknatisla toplanmıştır. Toplanan çökelti birkaç kez deionize su ve etanol ile yıkandı, 60°C'de kurutuldu ve toz haline getirilmiştir (Fenoll ve diğ. 2017).

##### **5.4.1.2 MNP'i SiO<sub>2</sub> ile kaplanması**

Sol-gel metodu örneğe alınarak kaplama işlemi yapılmıştır. Öncelikle, 1 g MNP 400 mL etanol, 100 mL deionize su ve 12 mL NH<sub>4</sub>OH ile karıştırılıp, sonra üniform süspansiyon hale getirilmiştir. Bu süspansiyon üzerine 3.5 mL Tri-metoksi metil silikat 15 dakika boyunca damlatılarak ilave edildi ve 5 saat karıştırılmıştır. Oluşan partiküller miknatis ile toplanıp, deionize su ile bir kaç kez yıkandı ve

50°C'de kurutulmuştur. Elde edilen manyetik partikül MNP@SiO<sub>2</sub>(M) olarak belirlendi.

Aynı işlem MNP'in tetra etil orto-silikat (TEOS) ile kaplanmasında yapılmıştır. Elde edilen manyetik partikül MNP@SiO<sub>2</sub>(T) olarak belirlendi.

SiO<sub>2</sub> ile kaplama Tri-metoksi metil silikat/TEOS'un hidrolizi alkali ortamda sentezleri gerçekleştirilir (Fortes ve diğ. 2017).

#### **5.4.1.2.1 MNP@SiO<sub>2</sub>'nin fonksiyonlendirilmesi**

*BCD(β-cyclodextrin) ile* - Önce 10 g FeCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O ve 14.5 g FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O, 200 mL ultra saf suda çözüldü ve 90 °C'ye ısıtıldı. Daha sonra, 40 mL amonyum hidroksit (%25) ve 1.2 mL BCD içeren 100 mL NaCl solüsyonu sırayla çabucak ilave edildi. İnert ortamda (N<sub>2</sub> atmosphere) 50 dakika sürekli karıştırıldı ve oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Soğutulduktan sonra etanol ve ultra saf su ile birkaç kez yıkandı ve etüvünde kurutuldu (Tavares ve diğ. 2013).

*APTES (3-aminopropyl-triethoxysilane) ile*- Daha önce hazırlanmış ve kurutulmuş Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T)'den 0,8 g tartıldı ve 80 mL kuru toluende homojen suspanyon elde edilene kadar karıştırıldı. Oluşan karışıma APTES (3,46 mL, 15 mmol) ilave edildi ve 90°C'de 24 saat inert ortamda reflaks edildi. Reflaks edildikten sonra süzülüp, birkaç defa iyice toluenle yıkandı ve 110°C'de kurutulmuştur (Zhang ve diğ. 2014). Sentezlenen manyetik nanopartikül Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> olarak belirlendi.

#### **5.4.2 Hücre tutuklama işlemi**

% 2.5 glutaraldehit çözeltisi (1.0 mL), amino/BCD ile modifiye edilmiş Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri içeren 10 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.0) ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 saat sürekli karıştırılarak bekletildi. Tekrarlanan yıkama ve manyetik ayırma ile elde edilen 50 mL enzim üretim ortamındaki destek materyaline, *M. esculenta* süspansiyonundan 20 mL ilave edildi. Periyodik olarak alınan örneklerin OD 560 nm'deki hücre yoğunlukları ölçülerek, adsorblanan hücre ve optimum immobilizasyon süresi belirlenmiştir (Fortes ve diğ. 2017).

#### **5.5 Aflatoksin Standardının Numunelere Aşılması ve degradasyonu**

Hücre tutuklama işleminin sonra elde ettiğimiz enzim üretim ortamındaki destek materyaline tutuklanmış hücre ortamına 25 µg/L Aflatoksin B1 stok

çözeltisinden 3, 4 ve 5 ppb derişiminde olacak kadar ilave edilmiştir ve degradasyon çalışması başlatılmıştır. Tüm numuneler oda sıcaklığında, 26°C’de 175 rpm’de orbital çalkalayıcıda inkübe edildi ve günü birlik örnek alınarak ölçümler yapılmıştır. Deneyde kullanılan bütün cam malzemeler, destek materyalleri ve kültür ortamı kullanılmadan önce sterillemiştir.

## **5.6 Sentezlenen Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları**

### **5.6.1 FT-IR Analizleri ve Spektrum Taraması**

Bu yöntemde infrared ışınları moleküllerin titreşim hareketleri tarafından absorplanır. Her maddenin kendine has bir spektrumu vardır. Deneysel çalışmalarda sentezlenen ve ardından toz haline getirilen numunelerin analizinde Perkin Elmer FT-IR kullanılmıştır. Numunelerin 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında yapısındaki fonksiyonel grupların absorbands değerleri belirlenerek maddenin yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır.

### **5.6.2 SEM Analizleri**

Taramalı Elektron Mikroskobu veya SEM (Scanning Electron Microscope), çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlarla yüzeyin taranması prensibine dayanan bu yöntemle sentezlenen MNP taneciklerin şeklin, yüzey morfolojisi, tanecik boyutu ve immobilizasyonun, yani *M. escullente* hücrelerin MPs üzerlerine tutunup tutunmadığı aydınlatılmıştır. Bütün numunelerin FESEM SUPRA 40VP marka Elektron Mikroskobu cihazında FESEM görüntü analizi yapılmıştır.

## **5.7 Enzim Aktivite Tayinleri**

Lakkaz aktivitesi 2,2’-azinobis-(3 etilbenzotiyazolin- 6-sülfonik asit) (ABTS)’in 420 nm’deki enzimatik oksidasyonunun ölçülmesi ile belirlenmiştir ( $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) (Eggert ve diğ. 1996).

Mangan peroksidaz (MnP) (EC 1.11.1.13) aktivitesi pH 4,5’de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’in malonik asiti oksidasyonundaki artışın 270 nm’deki ölçülmesi ile belirlenmiştir ( $\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Wariishi ve diğ. 1992).

## **5.8 Degradasyon Çalışmalarından Sonra AFB<sub>1</sub>’in analizi**

AFB<sub>1</sub>’in degradasyon sonrası nicel analizi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Floresans Dedektör (HPLC-FL) ile yapılmıştır. HPLC analizleri için Shimadzu LC-20AD pompa, RF-20A model floresans dedektör (FLD) ve SIL-20A model otomatik örnekleyici (HPLC-FLD) ile tayinler gerçekleştirilmiştir. RP-18

(LiChroCART) 125 mm x 3 mm ID ve 5 µm partikül boyutuna sahip paslanmaz çelik kolon kullanılmıştır. Numuneleri okutmadan önce tek kullanımlık İmmunosorbent özellikli SPE den 2 mL/dk akış hızında geçirildi.

## 6. SONUÇ VE TARTIŞMA

### 6.1 Sentezlenen Manyetik Partiküllerin Karakterizasyonu

Farklı fonksiyonel grupları ile modifikasyonu tanımlamak için  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4@SiO_2(M)$ ,  $Fe_3O_4@SiO_2(T)$ ,  $Fe_3O_4@SiO_2-APTES$  ve  $Fe_3O_4@BCD$ 'nin FT-IR spektrumları tarandı ve Şekil 6a-6f'de gösterilmiştir.  $544\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik, Fe-O bağının germe titreşimine ve  $3028$  ve  $1390\text{ cm}^{-1}$ 'deki bant, kafes matrislerinde adsorbe edilmiş suyun O-H gerilme titreşimine aittir (Şekil A.1).  $1108$ ,  $1074$ ,  $1066\text{ cm}^{-1}$  ve  $952$ ,  $952\text{ cm}^{-1}$  etrafındaki geniş bantlar sırasıyla Si-O-Si ve Si-OH gerilme titreşimleriyle ilgilidir ve  $771$ ,  $800$ ,  $794\text{ cm}^{-1}$  etrafındaki bantlar ise, manyetit yüzeyindeki silika kaplamasını yansıtan O-Si-O 'nin eğilme titreşimine karşılık gelmektedir (Şekil A.2, A.3 ve A.4 ) (Chen ve diğ. 2010).  $Fe_3O_4@SiO_2-APTES$  numunesinin propil karbon zincirlerinin sırasıyla simetrik ve asimetrik C-H gruplarının titreşimlerine ait  $2901\text{ cm}^{-1}$  ve  $2988\text{ cm}^{-1}$  'de karakteristik pikler göstermiştir. Ek olarak,  $1393\text{ cm}^{-1}$ 'deki titreşim primer amin gruplarının varlığını göstermektedir. Şekil A.5'de gözlenen  $2988\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik siklodekstrine ait CH gerilimidir. Ayrıca,  $1052\text{ cm}^{-1}$  'de C-O'e ve simetrik ve asimetrik karboksilik gruba ait gerilim  $1396\text{ cm}^{-1}$  ve  $1628\text{ cm}^{-1}$  'de gözlenmiştir (Chalasanı ve Vasudevan 2012). Ek olarak, Şekil A.5 ve A.6'ı karşılaştırıldığında saf BCD'e karakteristik bütün pikler bulunmaktadır.

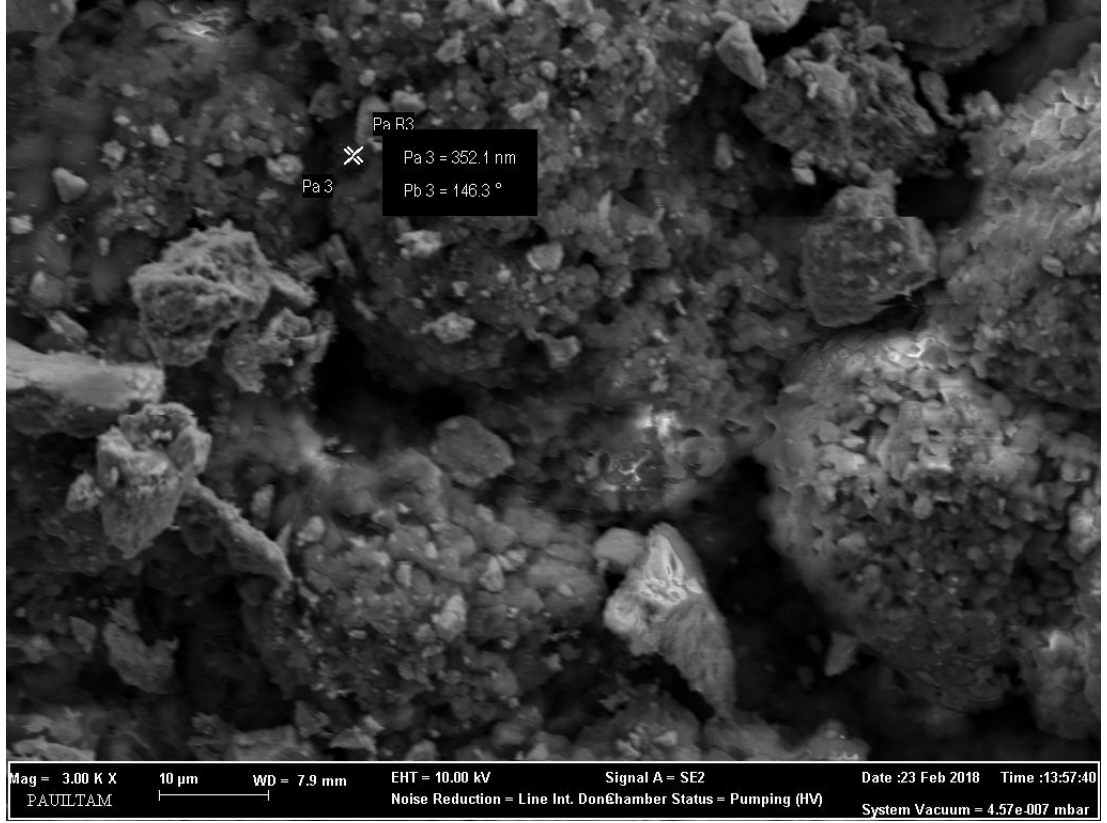
### 6.2 SEM analizi

Sentezlenen numuneler  $90^\circ\text{C}$ 'de olabilecek nemden kurutuldu ve iletkenliği sağlamak için Au/Pd kaplama cihazında 120 saniye kaplanmıştır. Farklı büyütme oranları ve  $200-1\text{ }\mu\text{m}$  arası SEM görüntüleri denenmiştir ve en net görüntü 100.00 kat büyütme ve  $200\text{ nm}$  çözünürlükte olan görüntüler seçilmiştir. SEM görüntülerine göre sentezlenen partiküllerin yüzey morfolojisi ve tanecik şekli, boyutu hakkında bilgi edinmiştir. Sentezlenen saf  $Fe_3O_4$  partikülün SEM görüntüsü Şekil 6.1'de verilmiştir. Görüldüğü gibi Şekil 6.1'de saf, kaplanmamış demir oksit partikülün SEM görüntüsü 3 kat büyütme ve  $7.9\text{ mm}$  çözünürlükte,  $352\text{ nm}$  boyutlarında olan

partiküller

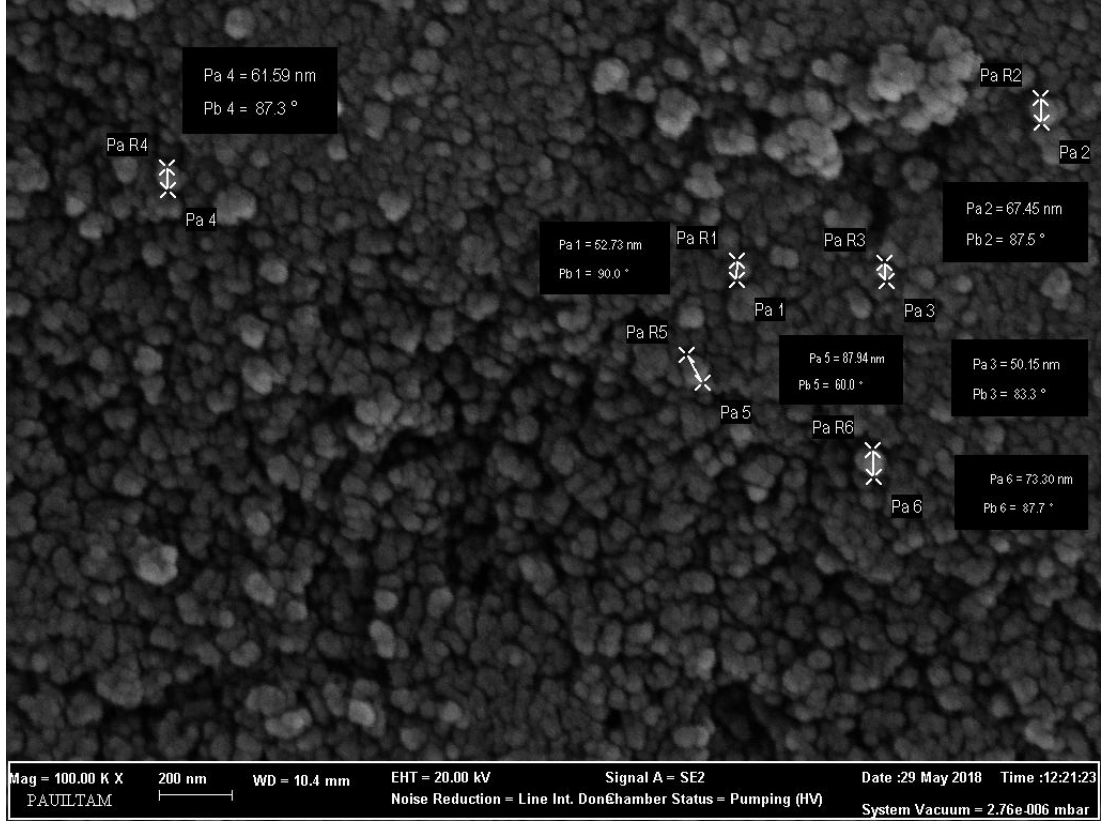
örüntüsü

verilmiştir.



**Şekil 6.1:** Sentezlenen MNP partikülün SEM görüntüsü

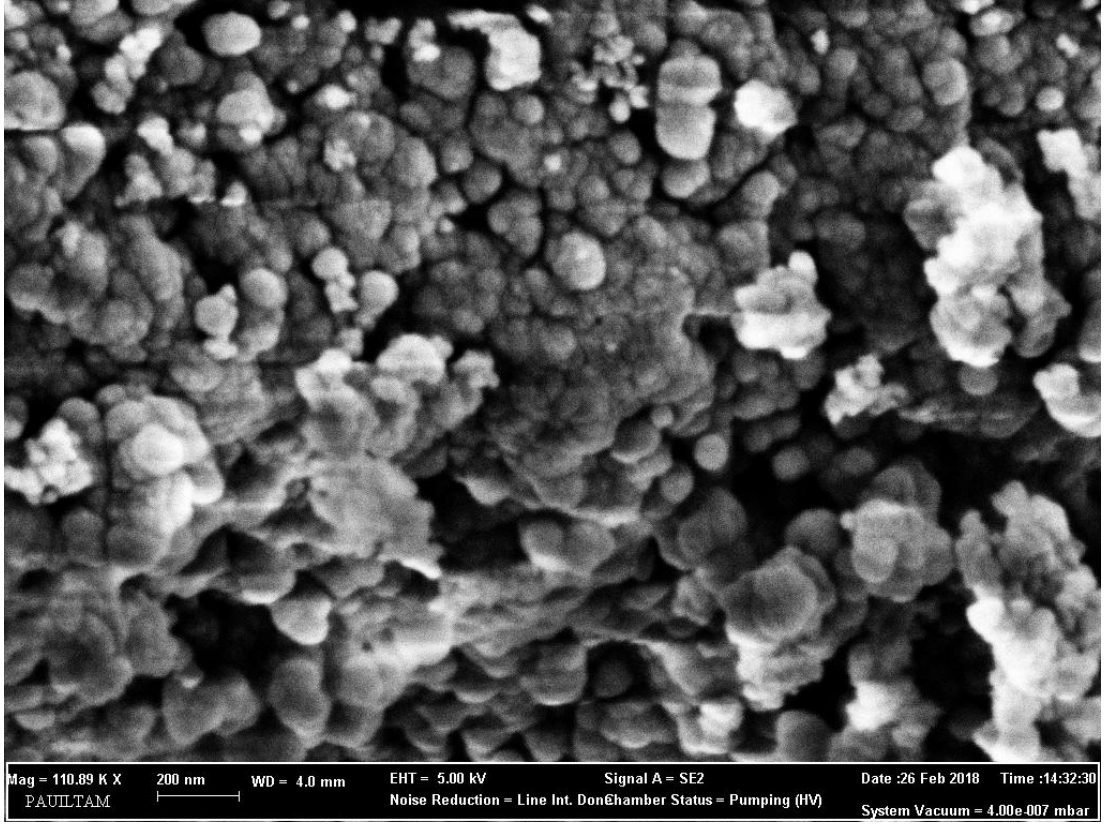
Şekil 6.2’de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{M})$  bileşiğin SEM görüntüsü verilmiştir ve görüldüğü gibi sentezlenen partikül homojen bir şekilde dağılmış, partikül boyutları 50.15-87.94 nm arası değişen tek tip ve küresel şekildedir.



**Şekil 6.2:**  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2(M)$  bileşiğın SEM görüntüsü

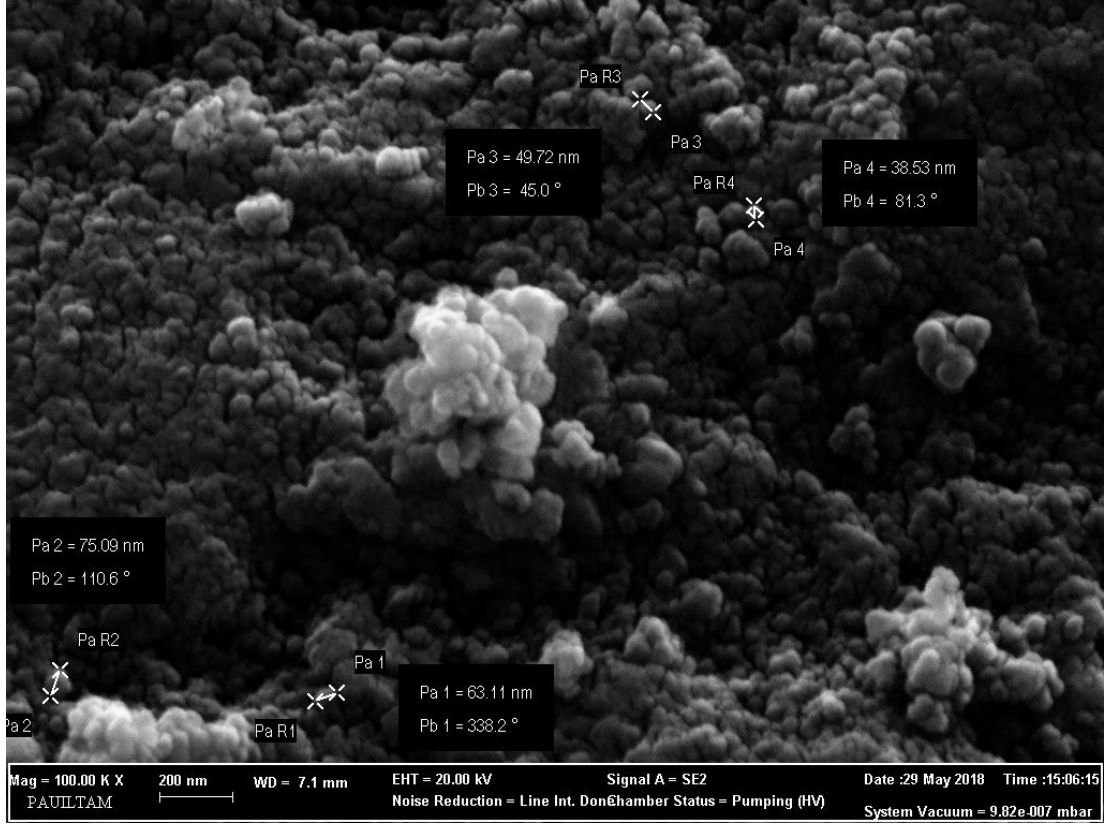
$\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2(T)$  partikülü küresel, boyutları ise nm arası değişmektedir ve SEM görüntüsü Şekil 6.3’de verilmiştir.





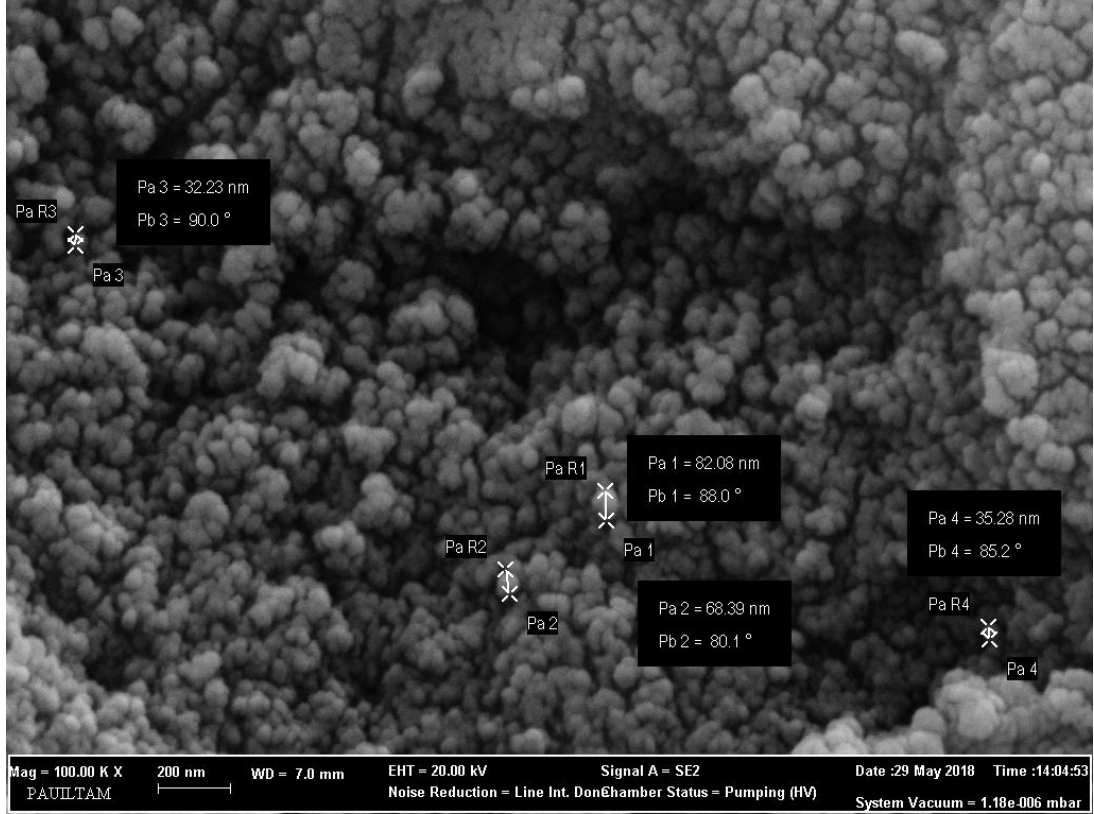
**Şekil 6.3:**  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{T})$  bileşiğın SEM görüntüsü

Silika ile kaplı  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{T})$  partikülünün amino grubu ile fonksiyonellendirilmiş yeni bileşiğın ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ) SEM görüntüsü Şekil 6.4'de verilmiştir. Görüldüğü gibi tek tipteki homojen dağılmış ve küresel şekilde olan, partikül boyutu 38.53-75.05 nm arası değişen bileşik elde edilmiştir.



**Şekil 6.4:**  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  bileşiğın SEM görüntüsü

BCD ile modife edilmiş MNP'in SEM görüntüsü Şekil 6.5'de verilmektedir. Aynı şekilde homojen dağılmış, partikül boyutları 32.23-82.08 nm arası değişen tek tip ve küresel şekilde olan partikül elde edilmiştir.

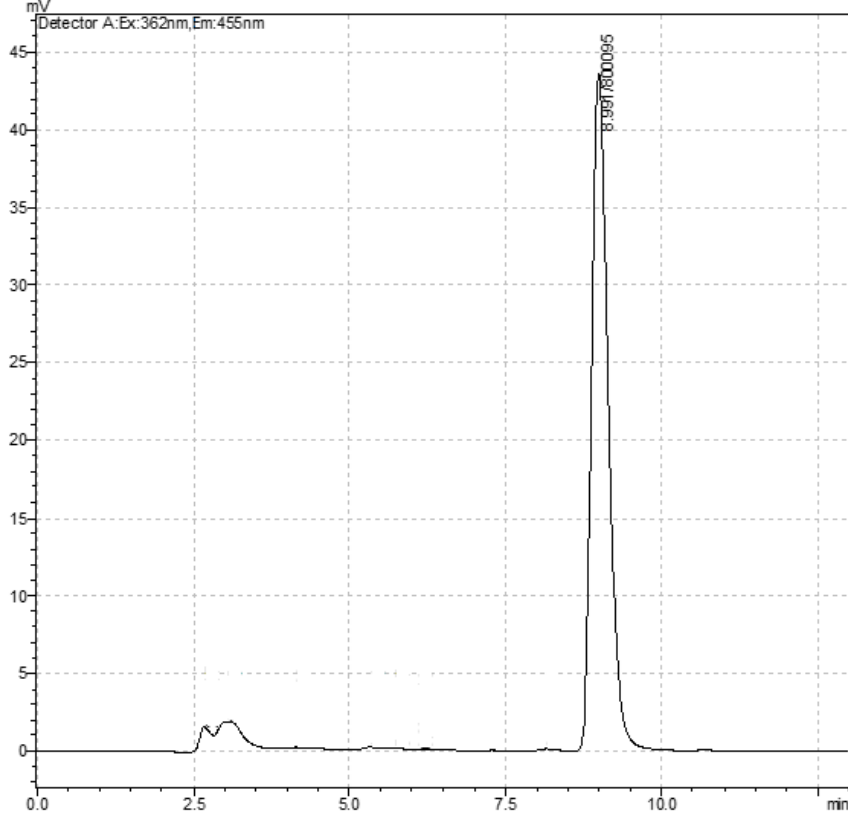


Şekil 6.5: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD bileşiğinin SEM görüntüsü

Sonuç olarak, tüm sentezlenen partiküller nano boyutta ve küresel şekilde olduğu tespit edilmiştir.

### 6.3 HPLC-FLD Çalışma Şartlarının Optimizasyonu

Standart stok çözeltilerden hazırlanan 5 ppb derişimde model çözeltilerin analiz şartları için HPLC’de izokrotik elüsyon şartlarında hareketli faz ve akış hızı denemeleri yapılmıştır. Mobil faz, R-Biopharm ALFAPREP P07 yöntemi olarak revize edildi. Çalışılan elüsyon şartlarının optimizasyonu sonucunda, elüsyonun izokrotik elüsyon ve kolon akış hızında 1 mL/dak. olarak belirlenmiştir. Hareketli faz oranları su: MeOH (55:45, 119 mg KBr ve HNO<sub>3</sub> 1L hareketli faza eklendi) optimum olarak seçilmiştir. Şekil 6.6’de optimizasyonu yapılmış elüsyon çalışmalarında elde edilen kromatogram verilmiştir.



**Şekil 6.6:** 5 ng/mL aflatoksin B<sub>1</sub> standardın MeOH:Su (55: 45, v/v) hareketli faz oranında elde edilen HPLC-FLD kromatogramı.

### 6.3.1 Yöntem Geçerlilik Testleri

Kalibrasyon eğrisi, her bir konsantrasyon değerine karşı elde edilen AFB<sub>1</sub> sinyallerin grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Yani, pik alanına (P/A) karşı derişim olarak çizildi. AFB<sub>1</sub> analizi için uygulanan HPLC-FLD yönteminde doğrusal aralık eğri denklemi  $y = 40126x - 7274,2$ ;  $R^2 = 0.9982$  (n=5) olarak saptanmıştır.

Gözlenebilme sınırı (LOD) ve kantitatif tayin sınırı (LOQ), bu analitik yöntem değerleri EURACHEM Kılavuzuna göre hesaplandı (EURACHEM 1998) . Hesaplama için 10 tane kör çalışma yapılmış, analitlerin alıkonma zamanındaki piklerin pik alan değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. LOD ve LOQ aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır:

$$LOD = X + 3s,$$

$$LOQ = X + 10s,$$

“X”, takviye edilmiş numune değerlerinin ortalama konsantrasyonu, “s” ise numune standart sapmasıdır.

Ortalama pik alan değeri, standart sapmasının 3 katı ile toplanarak elde edilen pik alan değeri kalibrasyon doğrusunda yerine konarak gözlenebilme sınırları belirlendi (S/N=3). Tayin sınırı ise (LOQ) ise ortalama pik alan değeri, standart sapmasının 10 katı ile toplanarak kalibrasyon denkleminde yerine koyularak hesaplanmıştır (S/N=10). AFB<sub>1</sub>'in HPLC ile analizi yönteminin mutlak geri kazanımı aflatoksin içermeyen numuneye belli derişimde AFB<sub>1</sub> eklenmiş ve buna ait alan değeri ile asetonitrilde aynı derişimlerde hazırlanan çözeltilerdeki aflatoksin alan değerinin oranının karşılaştırılmasıyla hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 6.1 gösterilmiştir.

Kesinlik ve doğruluk çalışmalarında standart ekleme yöntemi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar gün içi ve günler arası olarak tek yönlü ANOVA testi uygulanarak bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır (Tablo 6.2).

**Tablo 6.1:** AFB<sub>1</sub>'in HPLC analizinde geri kazanım çalışma sonucu

Standart		Kör örnek (N:4)
AFB <sub>1</sub>	Ortalama ± SS	<LOQ
	Eklenen	2 µg
	Bulunan	1,71 ± 0,07
	% Geri kazanım	85,50
	% BSS	4,10

SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma, LOQ: tayin sınırının altında

**Tablo 6.2:** Yöntemin analitik verileri

Analitler	Kalibrasyon eşitlikleri	R <sup>2</sup>	LOD (ng kg <sup>-1</sup> )	LOQ (ng kg <sup>-1</sup> )	Kesinlik ANOVA* (%)	
					Gün içi	Günler arası
AFB <sub>1</sub>	y = 40126x - 7247,2	0,9982	118,4	394,3	7,05	6,55

\*Tek yönlü ANOVA (2 µg standart ekleme sonuçlarına göre hesaplanmıştır)

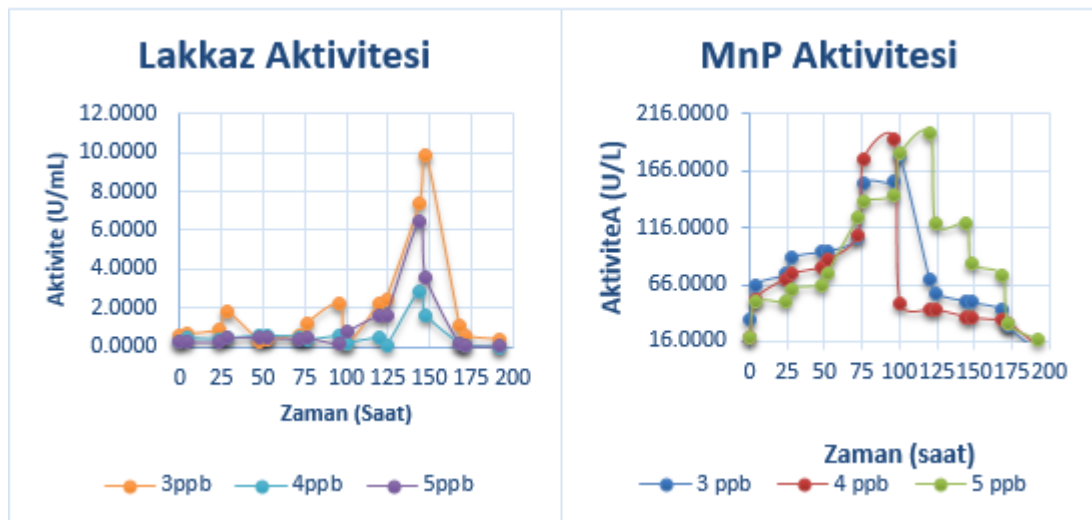
Yöntemin kesinliği için yapılan gün içi çalışmalarda 3 tekrarlı olarak aynı gün ve ardışık beş ayrı günde çalışmalar yapıldı. Yapılan çalışma sonunda gün içi bağıl standart sapma değeri %7,05 bulunmuştur. Günler arasında elde edilen sonuçların yüzde bağıl standart sapma değeri ise 6,55 bulundu.

#### 6.4 AFB<sub>1</sub>'in biyolojik yıkımı

Bu çalışmada AFB<sub>1</sub>'in biyolojik yıkımı *M. esculenta* hücrelerin serbest ve farklı manyetik nanopartiküllere tutuklanmış formlarda çalışılmıştır.

#### 6.4.1 Serbest Hücrelerle AFB<sub>1</sub> yıkımı

Serbest hücrelerle degradasyon deneyleri, enzim üretim kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan steril kültür ortamlarında (100 mL) 3, 4 ve 5 ppb derişiminde olacak şekilde AFB<sub>1</sub> ilave edilmiştir ve 26°C'e 175 rpm'de inkübe edilmiştir. Günü birlik ve sekiz gün boyunca enzim aktivite takibi yapılmıştır. Yıkım deneyleri için kullanılan Lac ve MnP enzim aktiviteleri (U/mL) sırasıyla 0,1389-9,8333 ve 7,3339-179,3788 (3 ppb için) arasında değişmiştir (Şekil 6.7). Şekilde de görüldüğü gibi yıkımda en etkin enzim MnP'dır.

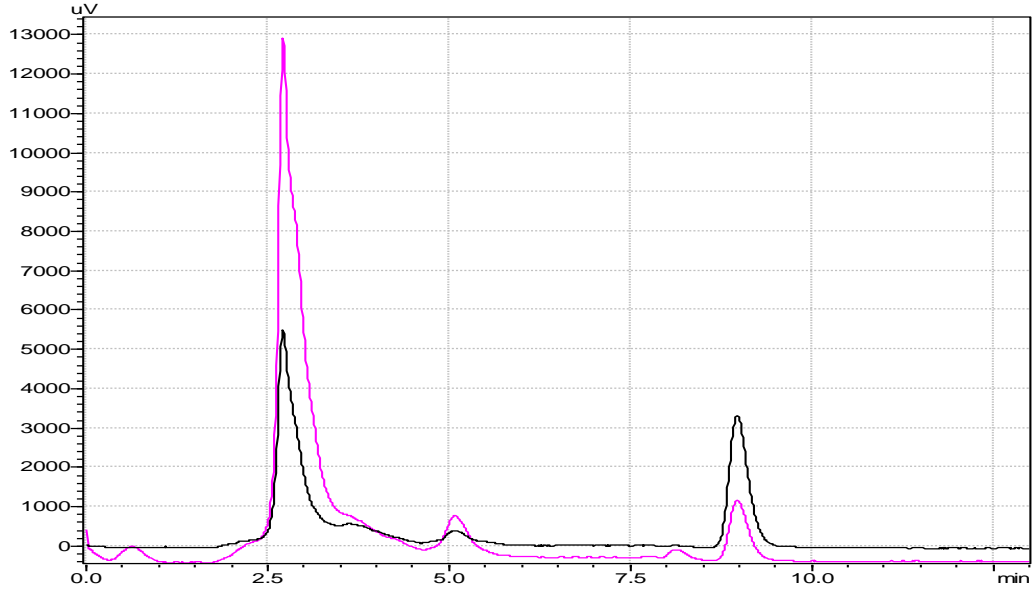


Şekil 6.7: Serbest hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri

İnkübasyonun ardından AFB<sub>1</sub>'in yıkımını kantitatif olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiş ve degradasyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{Degradasyon} = (1 - \text{AFB}_1 \text{'in yıkım pik alanı} / \text{AFB}_1 \text{'in kontrol pik alanı}) \times 100$$

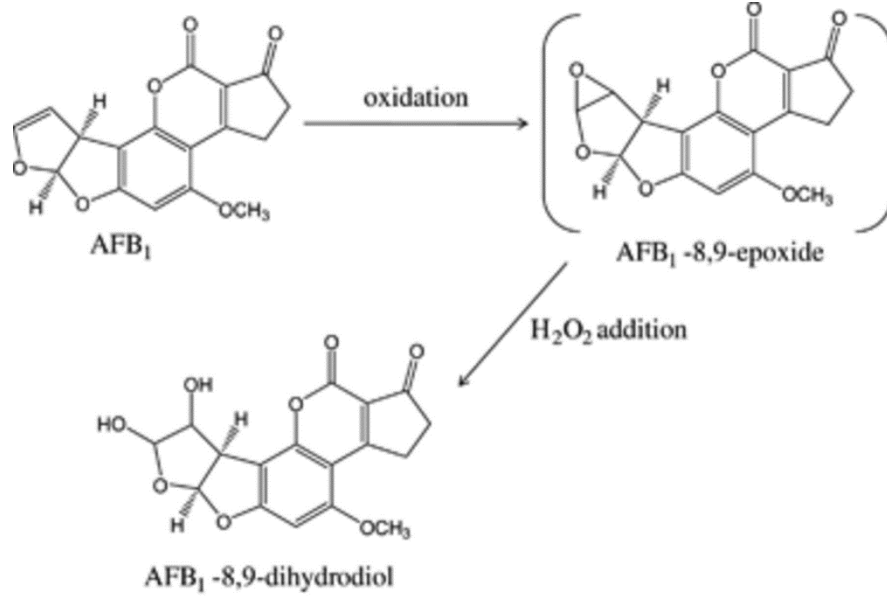
10. gün degradasyon çalışmasının sonunda elde edilen yıkım yüzdeleri sırasıyla 3, 4 ve 5 ppb için %54,97; %48,05 ve %42,45 olarak bulunmuştur ve şematik olarak 3 ppb için yıkım 0. ve 10. günde alınan HPLC kromatogramı Şekil 6.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 6.8:** Serbest hücrelerle 3 ppb AFB<sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı

Alberts ve arkadaşlarının (2009) farklı kültür ortamlarında farklı beyaz çürükçül fungusların lakkaz enzimleri ile AFB<sub>1</sub> yıkımını gerçekleştirmişler. Bu çalışma sonunda *Trametes versicolor*'un (1 U/mL) saf lakaz enzimi ve *Aspergillus niger* D15-Lcc2 # 3 (118 U/L) tarafınan üretilen rekombinant lakkazı ile yıkım sonuçları sırasıyla %87,34 ve %55 olarak bulmuşlar (Alberts ve diğ. 2009). Bizim çalışma ile kıyasladığımızda, AFB<sub>1</sub> yıkımında saf enzim kullanımı değil hücre kullanımı daha etkili olduğu görülmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde serbest hücrelerle AFB<sub>1</sub> yıkımını oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görülmektedir. Ayrıca, alıkonma zamanı 3dk civarında yeni bir metabolitin, aflatoksin türevinin oluştuğu görülmektedir. Wang ve arkadaşlarının (2011) benzer çalışmasında beyaz çürükçül mantarının MnP enzimi ile AFB<sub>1</sub> yıkımı sonucunda HPLC kromatogramında gözlenen yeni bir metabolitin oluştuğunu bulmuşlar. Daha sonra yapıyı aydınlatma çalışmaları, <sup>1</sup>H-NMR ve HR-ESI-MS analizi, AFB<sub>1</sub>'in ilk önce MnP tarafından AFB<sub>1</sub>-8,9-epoksite oksitlendiğini ve sonra AFB<sub>1</sub>-8,9-dihidrodiol'e hidrolize edildiğini tespit etmişler (Şekil 6.9) (Wang ve diğ. 2011). Bu kompleks Schiff baz reaksiyonları ile proteinlerdeki primer amin gruplarıyla reaksiyona girebilen, reaktif bir dialdehiti yeniden düzenleyebilir ve oluşturabilir (Sabbioni ve diğ. 1987). Bu nedenle de daha az toksiktir ve mutasyonlara neden olabilecek DNA katılım bileşiklerin oluşumunu önler. Şekil 6.9'de tahmini AFB<sub>1</sub> oksidasyonu mekanizması (Wang ve diğ. 2011). Bu çalışmadan yola çıkarak, bizim

çalışmada da enzim aktivitelere göre MnP enzimin daha aktif ve etkin olduğu görülmektedir ve elde edilen HPLC kromatogramındaki oluşan yeni pik belki AFB<sub>1</sub>'in oksitlenmiş epoksit bileşiğidir.



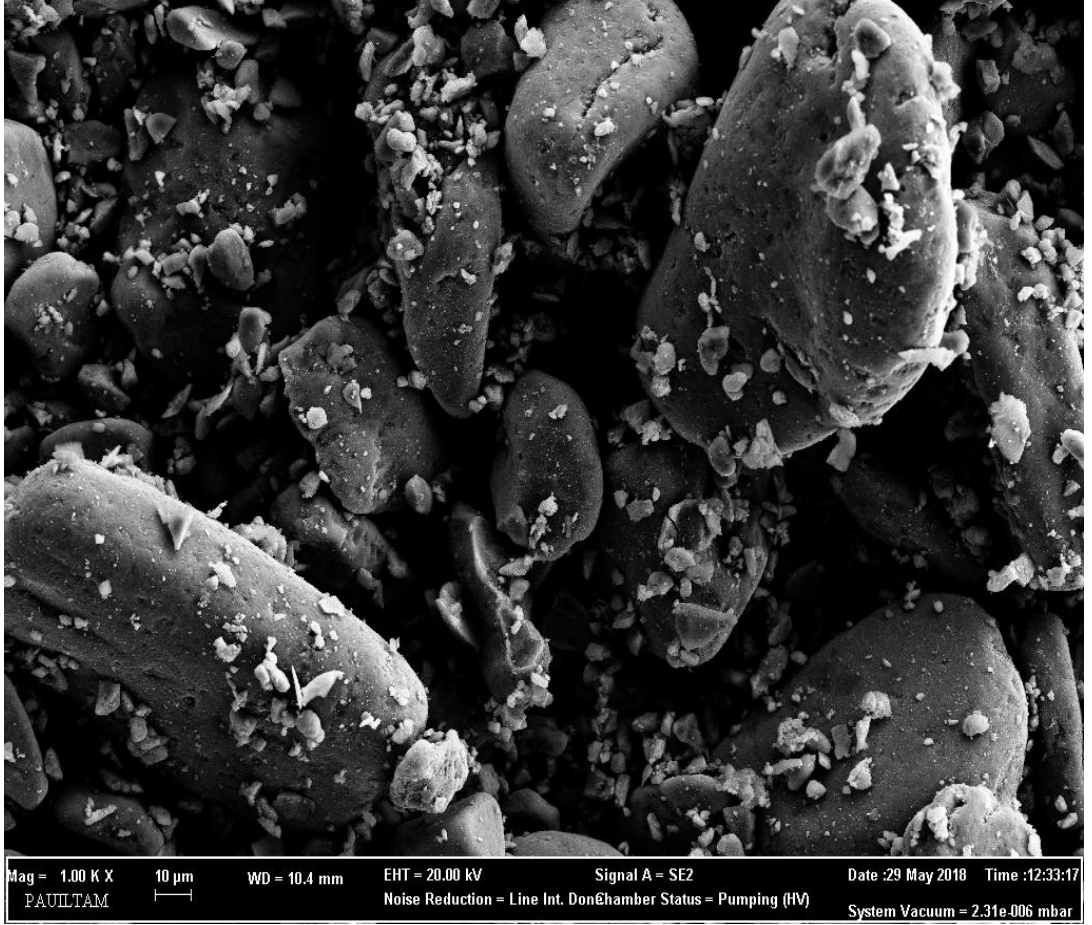
**Şekil 6.9:** Tahmini AFB<sub>1</sub> oksidasyonu mekanizması (Wang ve diğ. 2011)

#### 6.4.2 MNP taşıyıcılarına tutuklanmış fungal hücreleri ile AFB<sub>1</sub> yıkımı

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, biyoyumluluk, stabilite, yüksek yüzey alanı ve süperparamanyetik özellikleri nedeniyle ideal taşıyıcılar olarak kabul edilir. Ayrıca, çıplak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNPs'ler, yüksek aktiviteli gözenekli olmayan malzemelerdir ve atmosferik havada kolayca okside olurken, manyetik vazgeçilmezlik özelliklerin kaybına neden olur. MNP'lerin stabilitesi, etkili koruma stratejileri, yani yüzey modifikasyonu ile geliştirmektedir. Silika, süper paramanyetik çekirdeğin sıvı ortamda aggregasyonunu/toplanmasını önlediği ve böylece stabiliteyi, biyobozunurluğu ve biyoyumluluğu arttırdığı ve en önemlisi toksisiteyi en aza indirdiği bilinen bir inert kaplama malzemesidir (Kunzmann ve diğ. 2011). Bu yüzey modifikasyonunun diğer bir avantajı ise silanol grupların olmasıdır. Silanol organik bileşiklerle kolay reaksiyona girebilmektedir ve enzimlerin molekülleri ile etkileşerek onların immobilizesinde yardımcı olurlar (Dehghannejad ve diğ. 2014). Enzimlerin immobilizesinde destek materyal olarak manyetik nanopartiküllerini kullanmak bazı avantajlar sunmaktadır. Bunlar: bol miktarda enzimin bağlanmasına izin veren yüksek spesifik alan; reaksiyon ortamından immobilize enzimin dış manyetik alan uygulamasıyla seçimli ve kolay uzaklaştırılması (Long ve diğ. 2015); tekrarlanabilirlik ve enzim ömrünün daha uzun olmasıdır. Çalışmamızda sentezlenen

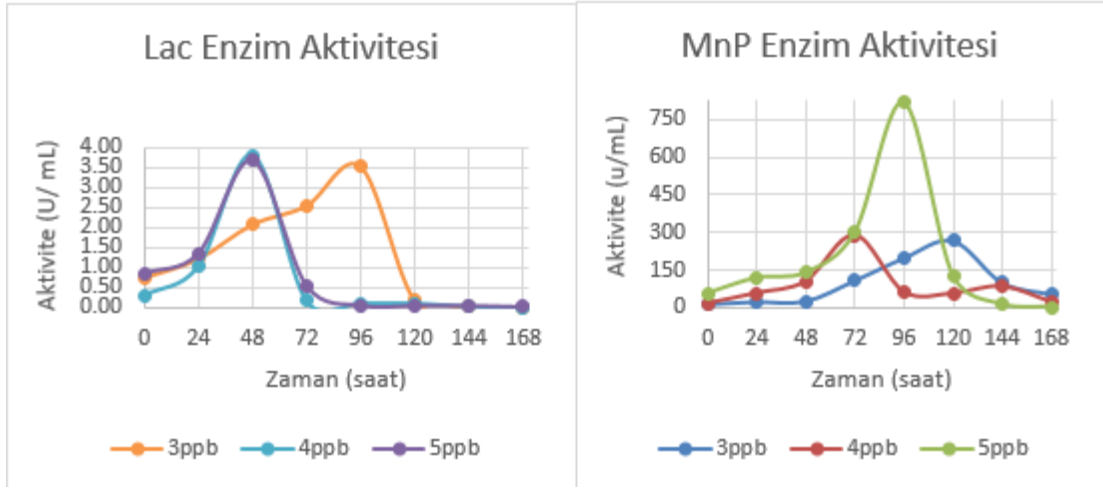


manyetik nanopartikül,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{M})$ , otoklavda sterillemiştir ve hücre tutuklama işleminin sonra üç enzim üretim ortamlarına aktarılmıştır. Hücrelerin destek materyaline tutulduğu Şekil 6.10'de SEM analiz görüntüsünde gösterilmiştir.

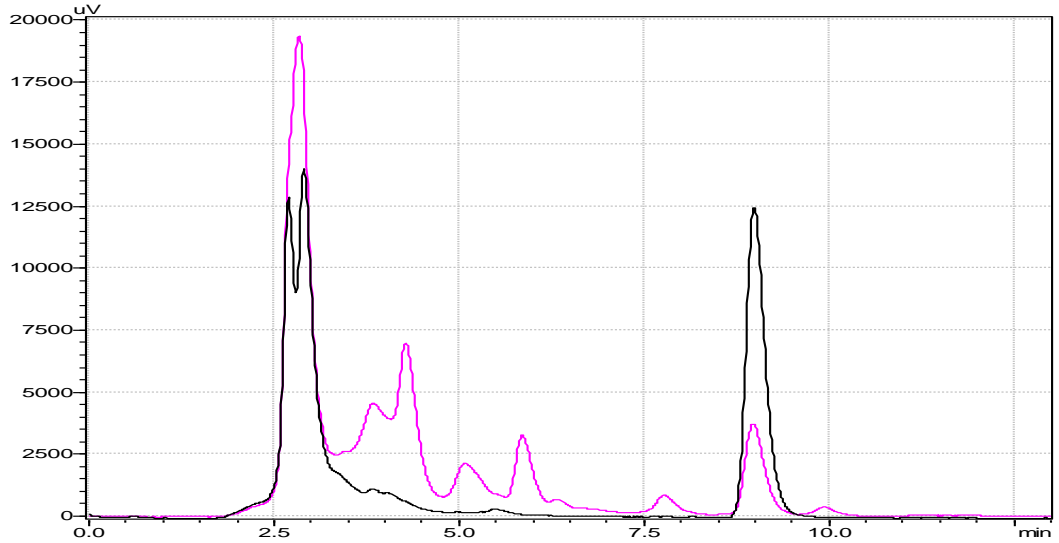


**Şekil 6.10:** Fungal hücrelerin  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{M})$  destek materyaline tutuklanmış SEM görüntüsü

Serbest hücrelerle çalışıldığı gibi  $\text{AFB}_1$ 'in yıkımı üç farklı konsantrasyonlarda gerçekleşti ve Lac ve MnP enzim aktiviteleri (U / ml) sırasıyla 0,0278-3,5278 ve 11,6480-266,3503 (3 ppb için) arasında değişmiştir (Şekil 6.11).

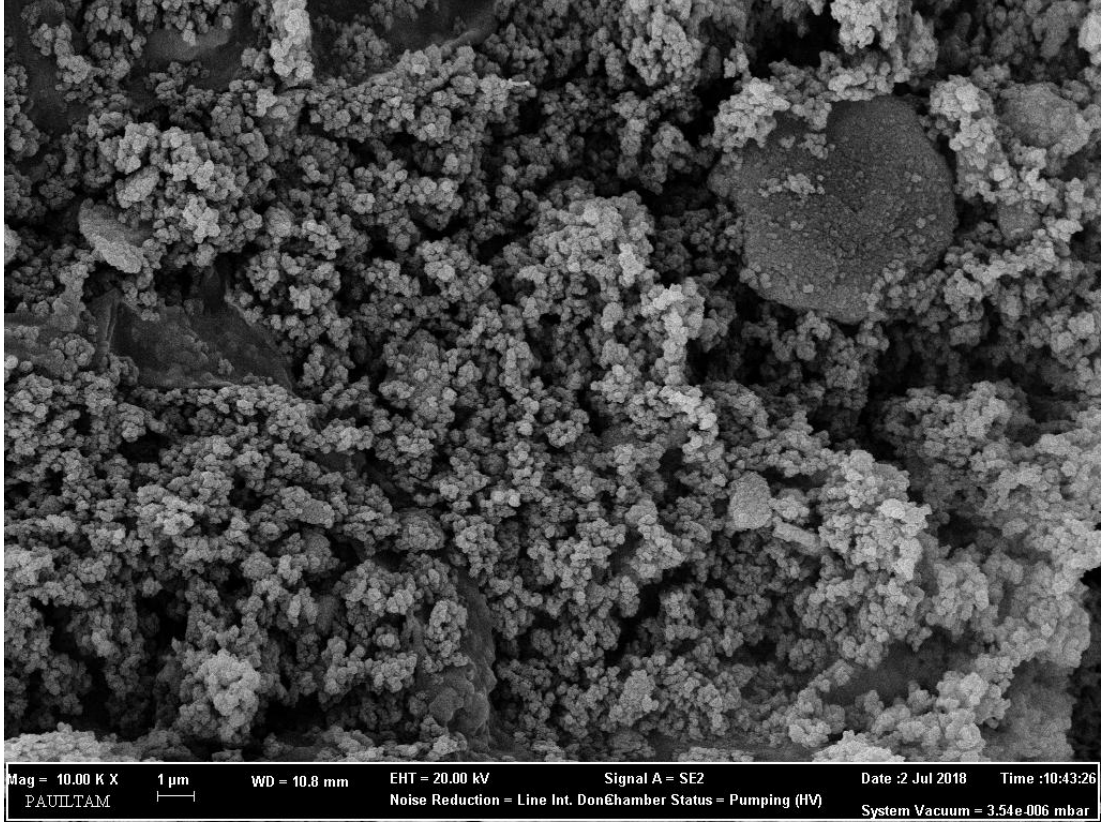


**Şekil 6.11:**  $Fe_3O_4@SiO_2(M)$ 'e tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri. Degradasyon çalışması 9 gün sürmüştür ve HPLC analizi ile yıkım yüzdeleri sırasıyla 3, 4 ve 5 ppb için %85,85; 73,45 ve 54,85 olarak bulunmuştur. Şekil 6.12'de 3 ppb için yıkım 0. ve 10. günde alınan HPLC kromatogramında görülmektedir. Daha önce yorumlandığı gibi yeni metabolitlerin oluşmuş olabileceği düşünülmüştür.



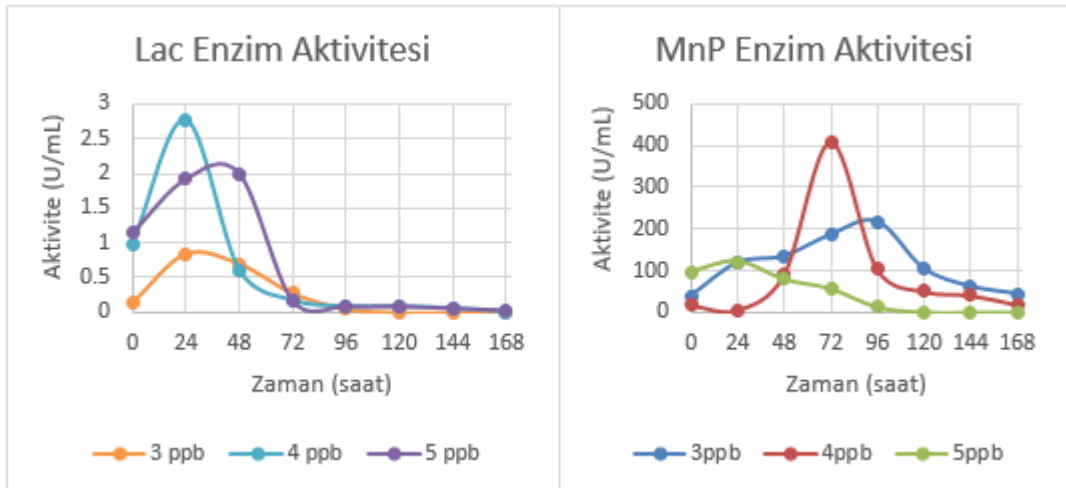
**Şekil 6.12:**  $Fe_3O_4@SiO_2(M)$ 'e tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB<sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı

$Fe_3O_4@SiO_2(T)$  sol-gel metodu ile sentezlenmiştir ve üzerine çapraz bağlama reaktifi ile fungal hücre immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyonun başarılı olduğu SEM analiz görüntüleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 6.13).



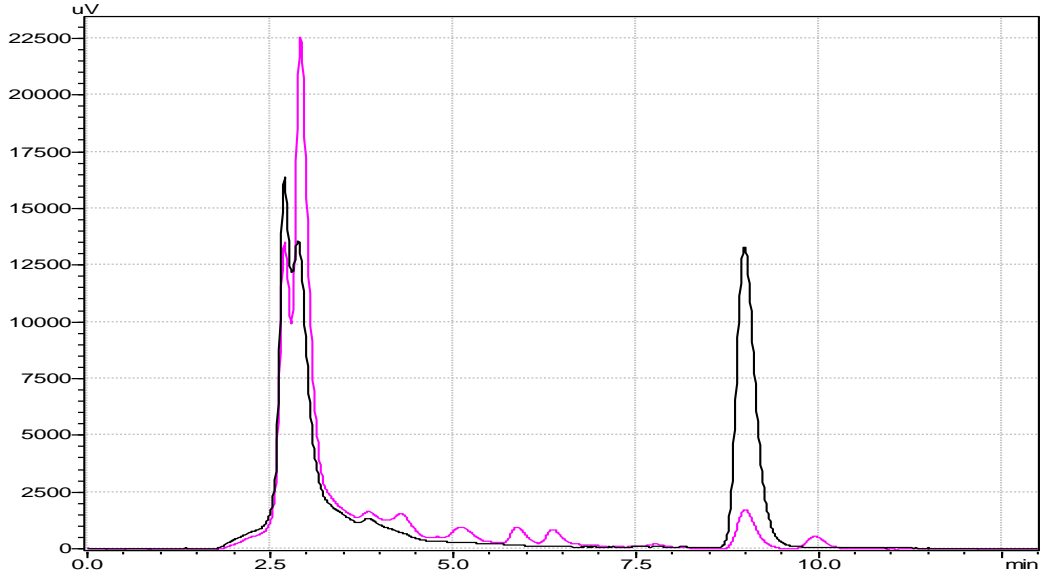
Şekil 6.13: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T)'e tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB<sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı

AFB<sub>1</sub>'in yıkımı üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi. Lac ve MnP enzim aktiviteleri (U / ml) sırasıyla 0,1388-0,8333 ve 37,8775-216,8248 (3 ppb için) arasında belirlenmiştir (Şekil 6.14).



Şekil 6.14: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T)'e tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri

AFB<sub>1</sub> degradasyon çalışması 9 gün sürmüştür ve HPLC analizi ile bulunan yıkım yüzdeleri sırasıyla 3, 4 ve 5 ppb için %95,07; 89,49 ve 88,63 olarak bulunmuştur. Şekil 6.15’da 3 ppb için yıkım 0. ve 10. günde alınan HPLC kromatogramı gösterilmiştir. Daha önce görüldüğü gibi farklı metabolitlerin oluştuğu tespit edilmiştir.

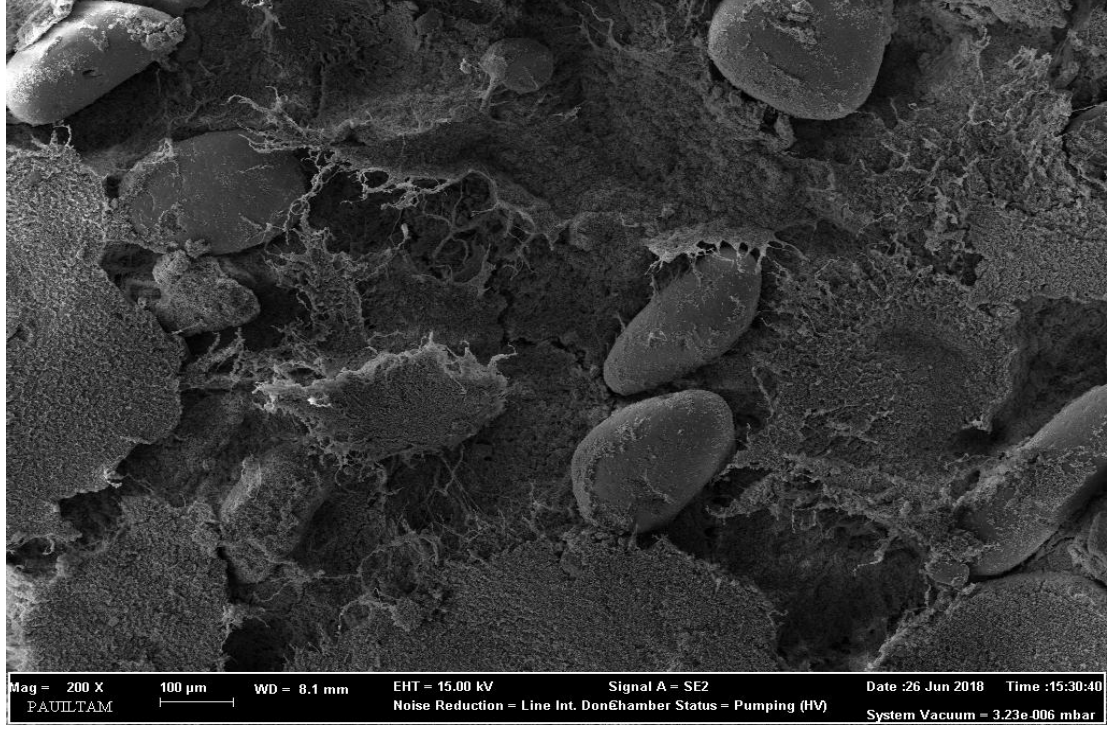


**Şekil 6.15:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T)’ye tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB<sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı

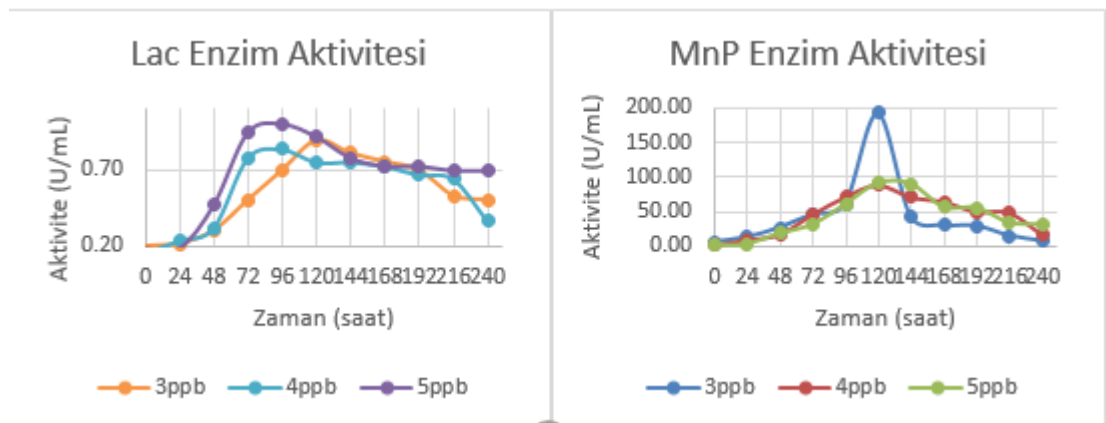
Thangaraj ve arkadaşları (2016) manyetik nanopartikül kaplama işleminde Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: TEOS(silika) oranlarının önemli olduğunu belirtmişler ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller üzerindeki silika kaplaması arttırıldığında büyük ölçüde aktivite geri kazanımı, immobilizasyon verimliliğinin azaldığını buldular. Bunun nedeni, TEOS'un daha yüksek dozu nedeniyle partikül boyutunun artması ve bunun sonucu olarak, enzim immobilizasyon verimliliğinin, yüzey / hacim oranındaki sınırlama nedeniyle azalmasıydı. Ayrıca, kaplamada TEOS miktarının artması manyetik nanopartikülün mıknatıslenme yeteneğinin azalmasına, böylece reaksiyon ortamından kolaylıkla dış mıknatıs uygulanmasıyla uzaklaştırılmasına engel olduğunu belirtmişler (Thangaraj ve diğ. 2016).

Çalışmamızda, sol-gel metodu ile sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T) amino fonksiyonel grubu içeren APTES ile modife edilmiştir ve üzerine çapraz bağlama reaktifi ile fungal hücre immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Oluşan Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>

bileşigi primer amin grubunu içermektedir ve enzim immobilizasyonunda oldukça etkilidir. İmmobilizasyonun başarılı olduğu SEM analiz görüntüleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 6.16). AFB<sub>1</sub>'in yıkımı 3, 4 ve ppb derişimlerinde gerçekleştirildi. Lac ve MnP enzim aktiviteleri (U / ml) sırasıyla 0,2-0,8889 ve 6,0557-193,0975 (3 ppb için) arasında değişmiştir (Şekil 6.17).

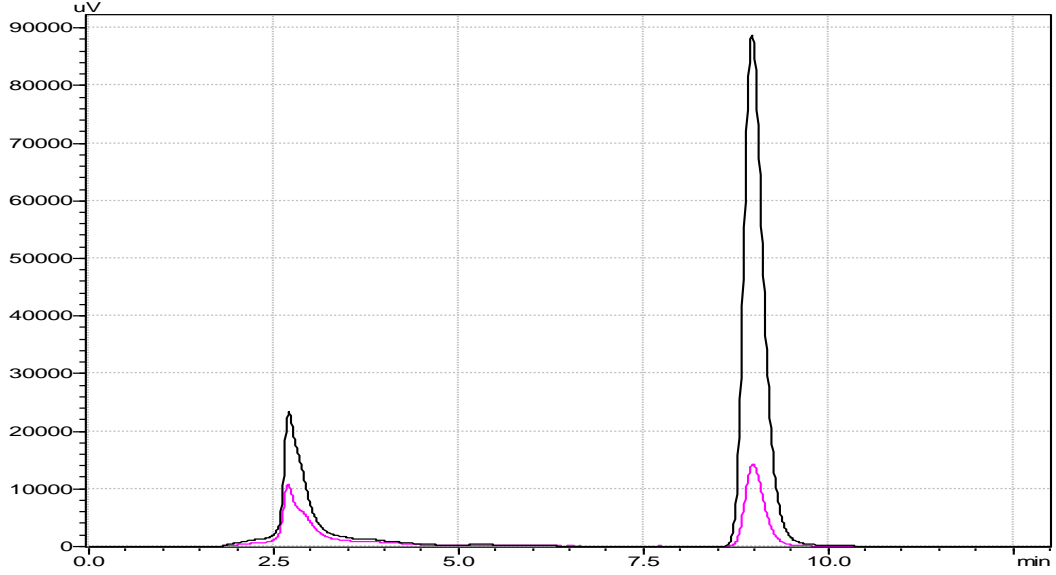


**Şekil 6.16:** Fungal hücrelerin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> destek materyaline tutuklanmış SEM görüntüsü



**Şekil 6.17:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> üzerine tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri

HPLC analizi ile bulunan AFB<sub>1</sub> yıkım yüzdeleri sırasıyla 3, 4 ve 5 ppb için %84,48; 65,12 ve 56,51 olarak bulunmuştur ve şematik olarak 3 ppb için yıkım 0. ve 10. günde alınan HPLC kromatogramı Şekil 6.18’de gösterilmiştir.



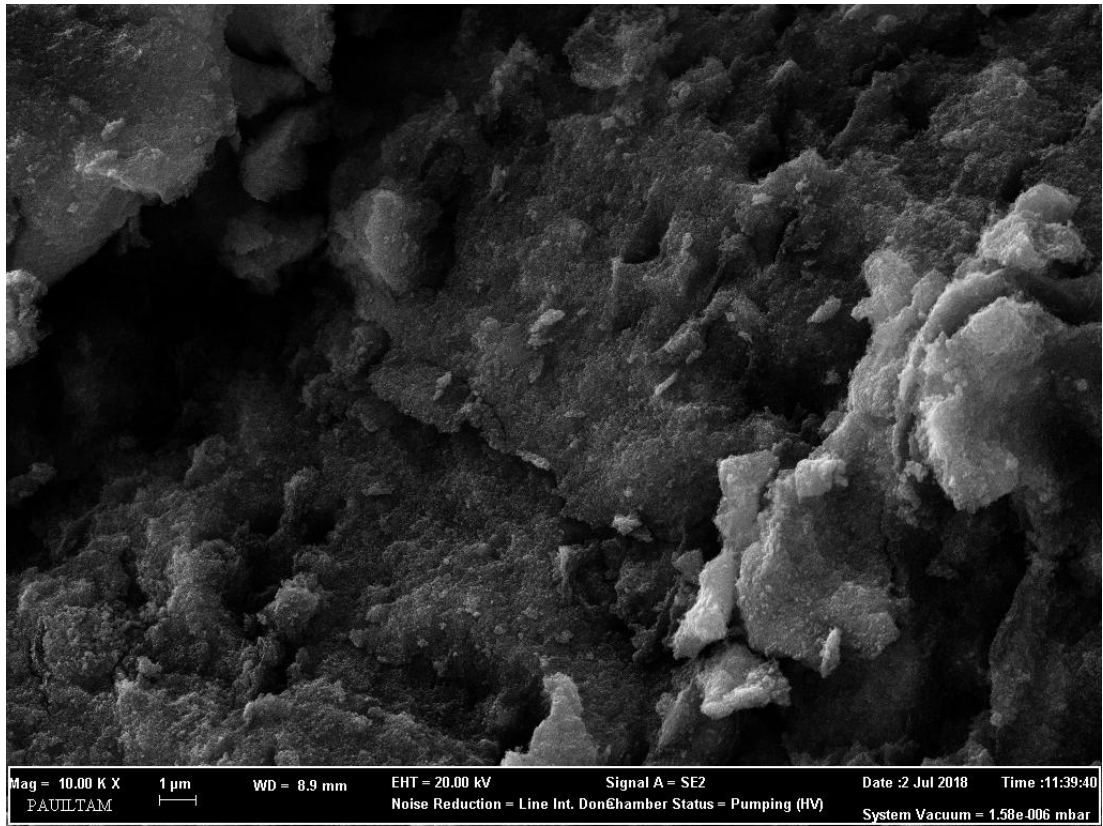
**Şekil 6.18:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> üzerine tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB<sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı

Abdollahi-Basir ve arkadaşları silika kaplı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'in APTES ile fonksiyonellendirmesinin avantajlarının, çevre dostu, toksik ve uçucu olmayan, yeniden kullanılabilir bir katalizör olarak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> nanoparçacıkların etkinliğinde önemli bir kayıp olmadan en az altı kez başarılı bir şekilde geri kazanılabilir ve geri dönüştürülebilirliğin belirtmişlerdir (Ghazemzadeh ve diğ. 2015).

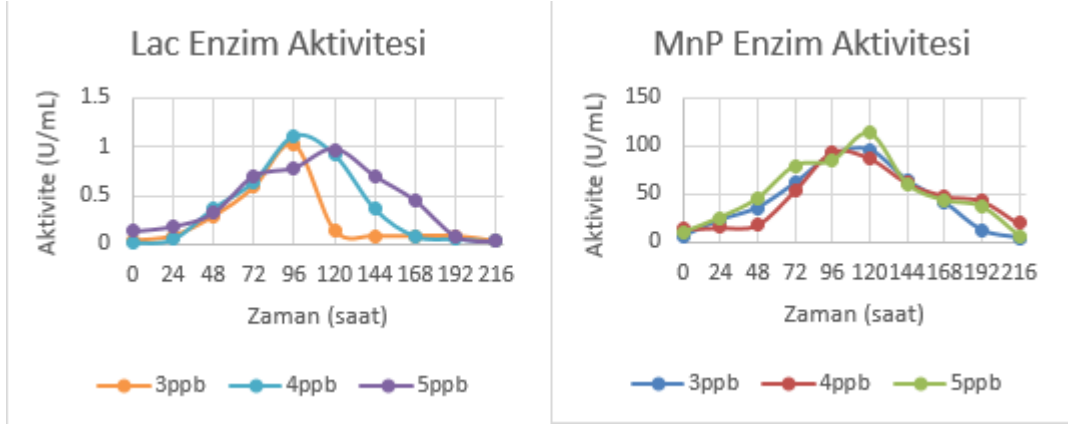
Siklodekstrinler aynı anda güzel hidrojen alıcısı ve verici bir moleküllerdir. Bu molekül halkanın içi hidrofobiktir ve dış tarafı hidrofilik özelliktedir. Hidrofobik özelliğin nedeni ise hidrojen atomları ve elektronca zengin ortam. Bu ortam glikozidik oksijen atomları tarafından sağlanmaktadır. Hidroksil grupları ise hidrofilik özelliği kazandırmaktadır. Siklodekstrinlerin böyle ilginç yapıları sayesinde yapılarındaki boşluğuna sığabilecek büyüklükteki hidrofobik molekülleri veya amfilik moleküllerin apolar kısımlarını hapsederek, bu moleküllerle konuk-konak kompleksi oluşturmaktalar. Bu konuk-konak kompleks oluşturabilme potansiyeli ve zengin hidroksil grupları üzerinde çok fazla kimyasal modifikasyon imkanı sayesinde siklodekstrinlerin kullanım alanı oldukça geniştir. Ayrıca, önceki çalışmalarda aflatoksinlerin β-siklodekstrinlerle stabil kompleksler oluşturduğunu

gösterilmiştir (Dall'asta ve diğ. 2008) ve bundan yola çıkarak siklodekstrin polimerlerinin sulu çözeltilerden mikotoksin uzaklaştırmasında uygun olabileceği hipotezini almak mantıklıdır.

Tez kapsamında sentezlediğimiz ve üzerine *M. esculenta* hücreleri immobilize edilmiş MNPs@BCD partikülleri AFB<sub>1</sub> yıkımında kullanılmıştır. İmmobilizasyonun başarılı olduğu SEM analiz görüntüleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 6.19). AFB<sub>1</sub>'in yıkımı 3, 4 ve 5 ppb konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. Lac ve MnP enzim aktivitelerinin (U/mL) sırasıyla 0,028-1,028 ve 4,14-96,29 (3 ppb için) arasında değiştiği hesaplanmıştır (Şekil 6.19).

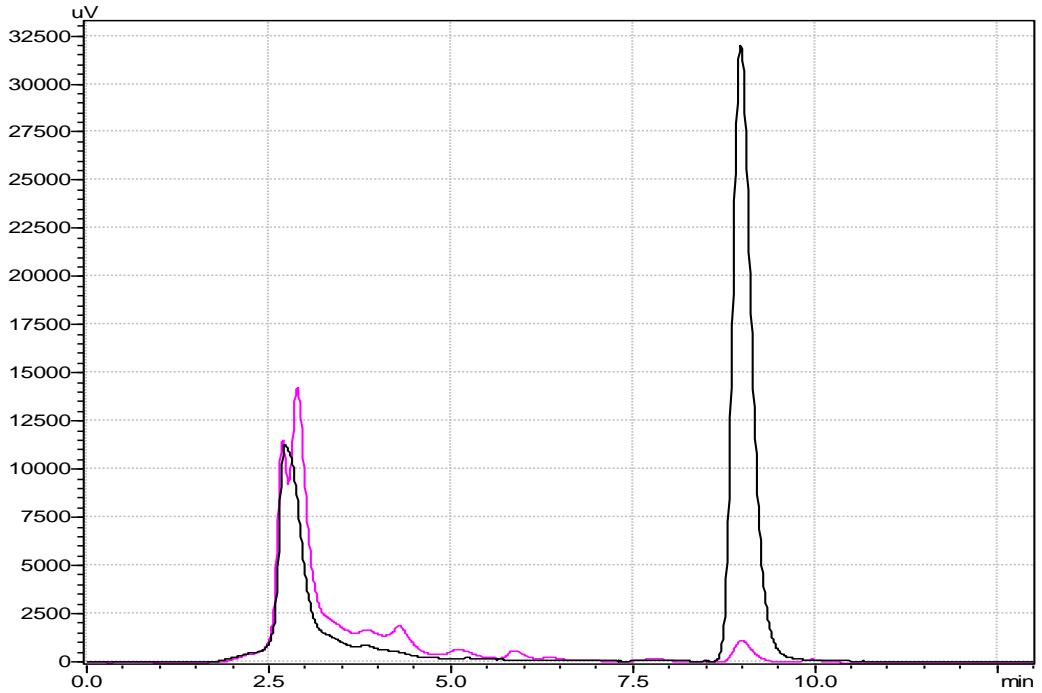


**Şekil 6.19:** Fungal hücrelerin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD destek materyaline tutuklanmış SEM görüntüsü



**Şekil 6.20:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD üzerine tutuklanmış hücrelerin Lac ve MnP enzim aktiviteleri

Degradasyon çalışması 9 gün sürmüştür ve HPLC analizi ile yıkım yüzdeleri sırasıyla 3, 4 ve 5 ppb için %96,52; %94,25 ve %93,42 olarak bulunmuştur. 3 ppb için yıkım 0. ve 10. günde alınan HPLC kromatogramı Şekil 6.21’de gösterilmiştir.



**Şekil 6.21:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD üzerine tutuklanmış hücrelerle 3 ppb AFB<sub>1</sub> 0. ve 10. gün (pembe) degradasyon HPLC kromatogramı

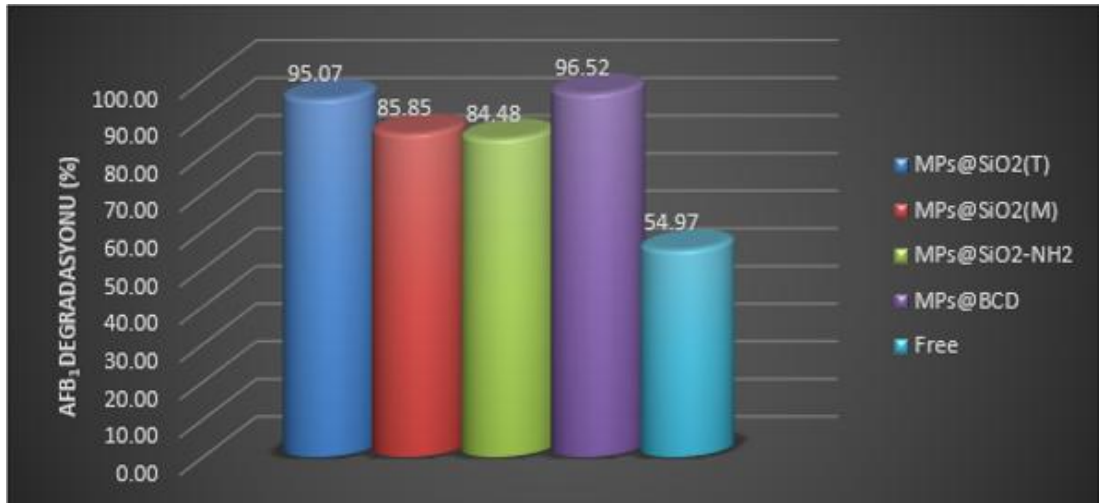
Poor ve arkadaşları (2018) beta-siklodekstrin boncuk polimerini kullanarak mikotoksinler ailesinen biri olan zearalenon ve zearalenollerin sulu çözeltilerden uzaklaştırmasını çalışmışlar. Bu çalışma, siklodekstrin polimerinin nispeten küçük miktarlarda bile sulu çözeltilerin mikotoksin içeriğini kuvvetli bir şekilde azaltabileceğini göstermektedir. Ayrıca, mikotoksinle konuk-konak kompleksini



oluşturan siklodekstrinin geri kazanımın organik çözeltilerde yıkayarak, mikotoksinin siklodekstrin boşluklarından çıkarılmasıyla, elde edilebildiğini tespit etmişler (Poór ve diğ. 2018).

Villalonga ve arkadaşlarının (2003) çalışmasında kimyasal olarak modifiye edilmiş BCD'nin enzimle kompleks oluşturularak enzimin termal stabilitesini yükselttiğini ve otolitik degradasyona direncini arttırdığını belirtmişler (Villalonga ve diğ. 2003).

Bizim çalışmada kullanılan  $Fe_3O_4@BCD$  partikülün tüm diğer destek materyallerine göre  $AFB_1$ 'in degradasyonunda daha etkin olduğu görülmektedir (Şekil 6.22). Bunun tahmini nedeni de BCD ile modifiye edilmiş nanopartikülün  $AFB_1$  ile konuk-konak kompleksin oluşturmuş olması, tutuklanan hücrelerin enzimlerinin stabilitesini yükselterek  $AFB_1$ 'in yıkımında yardımcı olmasıdır.



**Şekil 6.22:**  $AFB_1$ 'in serbest ve farklı destek materyallere tutuklanmış fungal hücreleri ile yıkımı

## 7. SONUÇ

Günümüzün en büyük problemlerinin biri mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ürünlerinin piyasada olması ve insan sağlığına tehlike olmasıdır. Aflatoksinin detoksifikasyonu, gıda endüstrisi için devam eden büyük bir zorluktur. Mikotoksin yıkımı için geleneksel stratejiler arasında önleme ve detoksifikasyon bulunur. Sunulan bu çalışma  $AFB_1$  mikotoksinin çevre dostu olan *M. esculenta* beyaz çürükçül mantarının hücreleri ile yıkımı çalışılmıştır. Bu çalışmada hücrelerin serbest ve tutuklanmış hali ile degradasyon çalışmaları yürütülmüştür. Sonuç olarak

hücrelerin bu iki formda kullanılmasının oldukça etkili olduğu ve degradasyonda MnP enzimin Lac enzimine göre daha aktif rol oynadığı tespit edilmiştir. Hücrelerin destek materyallerine tutuklama çalışmaları başarılı olup, AFB<sub>1</sub>'in yıkımında olumlu sonuçlar vermiştir. İmmobilize hücreler ile AFB<sub>1</sub>'in yıkım yüzdeleri hesaplanmıştır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(M) destek materyali ile yıkım yüzdeleri 3 ppb için %85,85; 4 ppb %73,45 ve 5 ppb %54,85 bulunmuştur. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T) destek materyali ile yıkım yüzdeleri ise 3 ppb %95,07; 4 ppb %89,49 ve 5 ppb %88,63 bulunmuştur. Fonksiyonlendirilmiş destek materyalin biri Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> ile degradasyon sonucu 3 ppb %84,48; 4 ppb %65,12 ve 5 ppb %56,51 olarak bulunmuştur. En iyi immobilizasyon materyali, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD olduğu tespit edildi ve yıkım yüzdeleri 3 ppb %96,52; 4 ppb %94,25; 5 ppb %93,42'dir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(M), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T) ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> destek materyalleri ile çalışmalarında yıkım yüzdelerinin aflatoksin derişiminin artması ile düştüğü görülmektedir ve en az %10'a düşmektedir. Aksine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD ile yıkımda ise degradasyon yüzdesinde toksin derişimin artması ile keskin bir değişiklik gözlenmemektedir. Bunun nedeni ise Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD'in aflatoksinin toksitesine dirençli olduğu ve yıkımda hücrelerin aktivitesinin, etkinliğin korumaktadır. Elde edilen verilere göre tez kapsamında oldukça başarılı ve çevresel kontaminantların bertarafında umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmanın daha etkili olması için gerçek örneklerde AFB<sub>1</sub> detoksifikasyonunun, oluşan metabolitlerin aydınlatılması ve in vitro çalışmaları gibi pekiştirici ekstra çalışmalar gerekmektedir.

## 8.KAYNAKLAR

Alberts, J. F., Gelderblom, W. C. A., Botha, A., Van Zyl, W. H., "Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes." *International Journal of Food Microbiology*, 135(1), 47-52, (2009).

Andrellos, P. J. and Reid, G.B., "Confirmatory tests for aflatoxin B." *J. Assoc. Offic. Ag. Chemists*, 47, 801-803, (1964).

Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R., Holley, R. A." Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts." *Journal of Stored Products Research*, 41(5), 513-527, (2005).

Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, Emily L., Wogan, G. N., "Aflatoxins B and G." *Journal of the American Chemical Society*, 85(11), 1706-1707, (1963).

Ashtari, P., He, X., Wang, K., Gong, P., "An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles." *Talanta*, 67(3), 548-554, (2005).

Avreneva L.I., Sobolev V.S., Kravchenko V.S., Tutelyan V.A., "Mycotoxins in feeds." *Hygiene and sanitation*, 2, 27-28, (1987).

Audenaert, K., Monbaliu, S., Deschuyffeleer, N., Maene, P., Vekeman, F., Haesaert, G., et al., "Neutralized electrolyzed water efficiently reduces *Fusarium* spp. in vitro and on wheat kernels but can trigger deoxynivalenol (DON) biosynthesis." *Food Control*, 23(2), 515-521, (2012).

Bilgrami, K.S. and Choudhary, A.K., Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. In: Sinha, K.K. and Bhatnagar, D (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker., New York. PP, 1-43, (1998).

Blanchette, R. A., "Delignification by Wood-Decay Fungi." *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29(1), 381-398, (1991).

Bren, U., Guengerich, P. F., Mavri, J., "Guanine Alkylation by the Potent Carcinogen Aflatoxin B1: Quantum Chemical Calculations." *Chemical Research in Toxicology*, 20(8), 1134-1140, (2007).

Bueno, D.J.; Casale, C.H.; Pizzolitto, R.P.; Salvano, M.A.; Oliver, G. "Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model." *J. Food. Prot.*, 70, 2148–2154, (2007).

Bullerman, L. B., "Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health." *Journal of Food Protection* 42(1): 65-86, (1979).

Cazzaniga, D., Basílico, J.C., González, R.J., Torres, R.L., De Greef, D.M., "Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour." *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 144-147, (2001).

Chalasanani, R. and Vasudevan, S., "Cyclodextrin functionalized magnetic iron oxide nanocrystals: a host-carrier for magnetic separation of non-polar molecules and arsenic from aqueous media." *Journal of Materials Chemistry*, 22(30), 14925-14931, (2012).

Chen, H., Deng, C., Zhang, X. "Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@PMMA Core-Shell-Shell Magnetic Microspheres for Highly Efficient Enrichment of Peptides and Proteins for MALDI-ToF MS Analysis." *Angewandte Chemie International Edition*, 49(3), 607-611, (2010).

Chen, J., Shi, X., Gehring, A. G., Paoli, G. C., "Automated immunomagnetic separation for the detection of Escherichia coli O157:H7 from spinach." *Int. J. Food Microbiol.*, 179, 33-37, (2014).

Chen, Z., Ao, J., Yang, W., Jiao, L., Zheng, T., Chen, X., "Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10381-10390, (2013).

Çoksöyler, N., "Farklı yöntemlerle kurutulan kırmızıbiberlerde *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoksin oluşumunun incelenmesi." *Gıda*, 24(5), 297– 306, (1999).

Cucullu, Alva F., Lee, Louise S., Pons, Walter A., Stanley, James B., "Ammoniation of aflatoxin B1. Isolation and characterization of a product with molecular weight 206." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(2), 408-410, (1976).

Dall'asta, C., Faccini, A., Galaverna, G., Corradini, R., Dossena, A., Marchelli, R., "Complexation of the mycotoxin zearalenone with beta-cyclodextrin: Study of the interaction and first promising applications." *Mycotoxin Res.*, 24(1), 14-18, (2008).

De Iongh, H., Beerthuis, R. K., Vles, R. O., Barrett, C. B., Ord, W. O., "Investigation of the factor in groundnut meal responsible for "turkey X disease"." *Biochimica et Biophysica Acta*, 65(3), 549-551, (1962).

Dehghannejad, N., Hashemikia, S., Ghasemnejad, M., Tabebordbar, H., "Synthesis and surface modification of mesoporous silica nanoparticles and its application as carriers for sustained drug delivery." *Drug Delivery*, 21(3), 164-172, (2014).

Delgado, J., Owens, R. A., Doyle, S., Asensio, M. A., Núñez, F., "Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(20), 8701-8715, (2015).

Deryagina V.P, Kravchenko L.V., "Effect of T-2 toxin on the functional activity of blood neutrophils and peritoneal fluid." *Toxicological Herald*, 3, 26-28, (2002).

- Devero, A., "Aflatoxins: The effects on human and animal health." *Biol.*, 4900, (1999).
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D., Eriksson, K. E. L., "A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase." *Febs Letters*, 391(1-2), 144-148, (1996).
- El-Boubbou, K., Gruden, C., Huang, X., "Magnetic Glyco-nanoparticles: A Unique Tool for Rapid Pathogen Detection, Decontamination, and Strain Differentiation." *Journal of the American Chemical Society*, 129(44), 13392-13393, (2007).
- Elingarami, S. and Zeng, X., "A short review on current use of magnetic nanoparticles for bio-separation, sequencing, diagnosis and drug delivery." *Advanced Science Letters*, 4(11-12), 3295-3300, (2011).
- Eurochem, The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guideto method validation and related topics. Middlesex, TW11 0LY, United Kingdom: EURACHEM Working Group, (1998).
- Evans, C. S., Dutton, M. V., Guillén, F., Veness, R. G., "Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation." *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3), 235-239, (1994).
- Fazeli, M. R., Hajimohammadali, M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M. R., et al., "Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria." *Journal of Food Protection*, 72(1), 189-192, (2009).
- Fenoll, J., Garrido, I., Pastor-Belda, M., Campillo, N., Vinas, P., Yanez, M. J., et al., "Solar detoxification of water polluted with fungicide residues using ZnO-coated magnetic particles." *Chemical Engineering Journal*, 330, 71-81, (2017).
- Fetaih, Hamdy A., Dessouki, Amina A., Hassanin, Abeer A. I., Tahan, Ahmed S., "Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats." *Pathology - Research and Practice*, 210(12), 1079-1089, (2014).
- Forootanfar, H., Rezaei, S., Zeinvand-Lorestani, H., Tahmasbi, H., Mogharabi, M., Ameri, A., et al., "Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes." *J. Environ. Health Sci. Eng.*, 14, 7, (2016).
- Fortes, C. C. S., Daniel-da-Silva, A. L., Xavier, A. M. R. B., Tavares, A. P. M., "Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions." *Chemical Engineering and Processing*, 117, 1-8, (2017).
- Fremy, J. M. and Quillardet, P., "The 'carry-over' of aflatoxin into milk of cows fed ammoniated rations: Use of an HPLC method and a genotoxicity test for determining milk safety." *Food Additives & Contaminants*, 2(3), 201-207, (1985).

Galgóczy, L., Kovács, L., Karácsony, Z., Virágh, M., Hamari, Z., Vágvölgyi, C., "Investigation of the antimicrobial effect of neosartorya fischeri antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in aspergillus nidulans." *Microbiology (United Kingdom)*, 159(2), 411-419, (2013).

Ghasemzadeh, M. A., Abdollahi-Basir, M. H., Babaei, M., "Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> core-shell nanocomposite as an efficient and green catalyst for the multi-component synthesis of highly substituted chromeno[2,3-b]pyridines in aqueous ethanol." *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 40-49, (2015).

Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N., "Effect of aw and CO<sub>2</sub> level on Aspergillus flavus growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest." *International Journal of Food Microbiology*, 122(1), 109-113, (2008).

Groopman, J. D., Cain, L. G., Kensler, T. W., "Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer." *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 19(2), 113-145, (1988).

Guentzel, Jane L., Lam, Kang Liang Callan, Michael A., Emmons, Stuart A., Dunham, Valgene L., "Postharvest management of gray mold and brown rot on surfaces of peaches and grapes using electrolyzed oxidizing water." *International Journal of Food Microbiology*, 143(1), 54-60, (2010).

Hagler, W. M., Hutchins, J. E., Hamilton, P. B., "Destruction of Aflatoxin in Corn with Sodium Bisulfite." *Journal of Food Protection*, 45(14), 1287-1291, (1982).

Huang, Y. F., Wang, Y. F., Yan, X. P., "Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens." *Environ. Sci. Technol.*, 44(20), 7908-7913, (2010).

Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W., Harris, C. C., "TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer." *Oncogene*, 26, 2166, (2007).

Iarc, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, France, IARC Press. 82: 171-274, (1993).

Iznaga, Y., Lemus, M., González, L., Garmendía, L., Nadal, L., Vallín, C., "Antifungal activity of actinomycetes from cuban soils." *Phytotherapy Research*, 18(6), 494-496, (2004).

Kachouri, F. Ksontini, H. Hamdi, M., "Removal of aflatoxin B<sub>1</sub> and inhibition of Aspergillus flavus growth by the use of Lactobacillus plantarum on olives." *Journal of Food Protection*, 77(10), 1760-1767, (2014).

Kahani, S. A., Hamadani, M., Vandadi, O., "Deposition of magnetite nanoparticles in activated carbons and preparation of magnetic activated carbons." *Nanotechnology and Its Applications*, 929, 183, (2007).

Kell, A. J., Stewart, G., Ryan, S., Peytavi, R., Boissinot, M., Huletsky, A. et al., "Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of Gram-positive and Gram-negative bacteria." *ACS Nano* 2(9), 1777-1788, (2008).

Khan, H., Atwater, A., Hengartner, U., "A Comparative Evaluation of Implicit Authentication Schemes." In: Stavrou A., Bos H., Portokalidis G. (eds) *Research in Attacks, Intrusions and Defenses*. RAID 2014. Lecture Notes in Computer Science, vol 8688. Springer, Cham., 255-275, (2014).

Kirk, K. and Cullen, D., "Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi." In: Young, R. A., Akhtar, M., editors, *Environmental friendly technologies for pulp and paper industry*, New York: John Wiley and Sons, (1998)

Kovács, L., Virágh, M., Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, C., Galgóczy, L., "Isolation and characterization of Neosartorya fischeri antifungal protein (NFAP)." *Peptides*, 32(8), 1724-1731, (2011).

Kuhad, R. C., Singh, A., Eriksson, K. E., "Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls." *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 57, 45-125, (1997).

Kunzmann, A., Andersson, B., Vogt, C., Feliu, N., Ye, F., Gabrielsson, S., "Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(2), 81-93, (2011).

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications." *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110, (2008).

Lee, L. S., Stanley, J. B., Cucullu, A. F., Pons, W. A., Jr. Goldblatt, L. A., "Ammoniation of aflatoxin B1: isolation and identification of the major reaction product." *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57(3), 626-631, (1974).

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N., "Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi." *Fungal Genetics and Biology*, 27(2), 175-185, (1999).

Liu, C., Honda, H., Ohshima, A., Shinkai, M., Kobayashi, T., "Development of chitosan-magnetite aggregates containing *Nitrosomonas europaea* cells for nitrification enhancement." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(5), 420-425, (2000).

Liu, W. T., "Nanoparticles and their biological and environmental applications." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(1), 1-7, (2006).

Long, N. V., Yang, Y., Teranishi, T., Thi, C. M., Cao, Y., Nogami, M., "Biomedical Applications of Advanced Multifunctional Magnetic Nanoparticles." *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 15(12), 10091-10107, (2015).

- Lu, A. H., Salabas, E. L., Schüth, F., "Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application." *Angewandte Chemie-International Edition*, 46(8), 1222-1244, (2007).
- Magnusson, J., Ström, K. R., Stefan Sjögren, J., Schnürer, J., "Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria." *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129-135, (2003).
- Marth, E. H. and Doyle M.P., "Bisulfite Degrades Aflatoxin: Effect of Temperature and Concentration of Bisulfite." *Journal of Food Protection*, 41(10), 774-780, (1978).
- Morel, A. L., Nikitenko, S. I., Gionnet, K., Wattiaux, A., Lai-Kee-Him, J., Labrugere, C., "Sonochemical approach to the synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core - Shell nanoparticles with tunable properties." *ACS Nano*, 2(5), 847-856, (2008).
- Nasir Baig, R. B. and Varma, R. S., "Organic synthesis via magnetic attraction: benign and sustainable protocols using magnetic nanoferrites." *Green Chemistry*, 15(2), 398-417, (2013).
- Ozalp, V. C., Bayramoglu, G., Kavruk, M., Keskin, B. B., Oktem, H. A., Arica, M. Y., "Pathogen detection by core-shell type aptamer-magnetic preconcentration coupled to real-time PCR." *Anal Biochem*, 447, 119-125, (2014).
- Patterson D.S., Galaney E.M., Roberts B.A., "The estimation of AFM1 in milk using 2-dimensional TLC. ." *Fd.Cosmet toxicol.*, 16, 49-50, (1978).
- Phillips, T. D., Afriyie-Gyawu, E., Williams, J., Huebner, H., Ankrah, N. A., Ofori-Adjei, D., et al., "Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(2), 134-145, (2008).
- Phillips, T. D., Clement, B. A., Kubena, L. F., Harvey, R. B., "Detection and detoxification of aflatoxins: Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate." *Veterinary and Human Toxicology*, 32, 15-19, (1990).
- Phillips, T. D., Kubena, L. F., Harvey, R. B., Taylor, D. R., Heidelbaugh, N. D., "Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin." *Poultry science*, 67(2), 243-247, (1988).
- Phillips, T. D., Sarr, A. B., Grant, P. G., "Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay." *Natural Toxins*, 3(4), 204-213, (1995).
- Poór, M., Faisal, Z., Zand, A., Bencsik, T., Lemli, B., Kunsági-Máté, S., "Removal of Zearalenone and Zearalenols from Aqueous Solutions Using Insoluble Beta-Cyclodextrin Bead Polymer." *Toxins*, 10(6), 216, (2018).



Proctor, A. D., Ahmedna, M., Kumar, J. V., Goktepe, I., "Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment." *Food Additives & Contaminants*, 21(8): 786-793, (2004).

Ramesh C.Gupta., *Reproductive and Developmental Toxicology*, San Diego: academic Press, 753-763, (2011).

Rayner, A. D. M. and Boddy, L., *Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology*. New York, Wiley, (1988).

Rodríguez-Martín, A., Acosta, R., Liddell, S., Núñez, F., Benito, M. J., Asensio, M. A., "Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*." *Peptides*, 31(4), 541-547, (2010).

Sabbioni, G., Skipper, Paul L., Tannenbaum, Steven R., Büchi, G., "Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B 1 in vivo in rats." *Carcinogenesis*, 8(6), 819-824, (1987).

Sargeant K., Carraghan R.B., Allcroft R., "Toxic products in groundnuts. Chemistry and origin. ." *Chem. And Ind.*, 53-55, (1963).

Styriak I., C. E., Laciakovâ A., Böhm J., "Prevention of fumonisin production by microorganisms." *Zivoc. vyroba.*, 10(43), 449-452, (1998).

Sun, S. and Zeng, H., "Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society*, 124(28), 8204-8205, (2002).

Tavares, A. P. M., Rodriguez, O., Fernandez-Fernandez, M., Dominguez, A., Moldes, D., Sanroman, M. A., et al., "Immobilization of laccase on modified silica: Stabilization, thermal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid." *Bioresource Technology*, 131, 405-412, (2013).

Taylor, J. I., Hurst, C. D., Davies, M. J., Sachsinger, N., Bruce, I. J., "Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA." *J. Chromatogr. A.*, 890(1), 159-166, (2000).

Teja, A. S. and Koh, P. Y., "Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles." *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials.*, 55(1-2), 22-45, (2009).

Tejada-Castañeda, Z. I., Ávila-Gonzalez, E., Casaubon-Huguenin, M. T., Cervantes-Olivares, R. A., Vásquez-Peláez, C., Hernández-Baumgarten, E. M., et al., "Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed." *Poultry Science*, 87(8), 1569-1576, (2008).

Terao, K. and Ueno, Y., Morphological and functional damage to cells and tissues, In: *Toxicology, Biochemistry and Pathology of Mycotoxins*, ed. Uruguchi, K., and Yamazaki, M., Wiley and Sons, New York, 189-238, (1978).

Thangaraj, B., Jia, Z., Dai, L., Liu, D., Du, W., "Effect of silica coating on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production." *Arabian Journal of Chemistry*, (2016).

Tolmacheva, T.A., "Aflatoxins and their impact on food raw materials and disinfection methods." *Herald of SUSU*, 1(2), 40-44, (2013).

Ueno, Y. and Hsieh, D. P. H., "The Toxicology of Mycotoxins." *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 14(2), 99-132, (1985).

Valderama, C., " Scanning electron microscope (SEM) & how it works. [online]",(22 March 2011), <http://emicroscope.blogspot.com/2011/03/scanning-electron-microscope-sem-how-it.html> , (2011).

Villalonga, M. L., Fernandez, M., Frago, A., Cao, R., Villalonga, R., "Functional stabilization of trypsin by conjugation with beta-cyclodextrin-modified carboxymethylcellulose." *Prep Biochem Biotechnol*, 33(1), 53-66, (2003).

Wang, J., Hirai, H., Kawagishi, H., Ogata, M., "Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624." *FEMS Microbiology Letters*, 314(2), 164-169, (2011).

Wariishi, H., Valli, K., Gold, M. H., "Manganese(II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium* - Kinetic Mechanism and Role of Chelators." *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23688-23695, (1992).

Weidenbörner, M., *Encyclopedia of food mycotoxins*. Germany: Springer, 12-13, (2001).

Wild, C. P. and Montesano, R., "A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention." *Cancer Letters*, 286(1), 22-28, (2009).

Winston, M. Hagler Jr., James, E Hutchins., Pat, B Hamilton., "Destruction of Aflatoxin B<sub>1</sub> with Sodium Bisulfite: Isolation of the Major Product Aflatoxin B<sub>1</sub>S." *Journal of Food Protection*, 46(4), 295-300, (1983).

Wong, Y. J., Zhu, L., Teo, W. S., Tan, Y. W., Yang, Y., Wang, C., et al., "Revisiting the Stöber method: Inhomogeneity in silica shells." *Journal of the American Chemical Society*, 133(30), 11422-11425, (2011).

Wu, Y. Z., Lu, F. P., Jian, H. L., Tan, C. P., Yao, D. S., Xie, C. F., et al., "The furfuran-ring selectivity, hydrogen peroxide-production and low K<sub>m</sub> value are the three elements for highly effective detoxification of aflatoxin oxidase." *Food and Chemical Toxicology*, 76, 125-131, (2015).

Yagen, B., Hutchins, J.E., Cox, R.H., Hagler, W.M. Jr., Hamilton, P.B., "Aflatoxin B<sub>1</sub>S: Revised Structure for the Sodium Sulfonate Formed by Destruction of

Aflatoxin B1 with Sodium Bisulfite." *Journal of Food Protection*, 52(8), 574-577, (1989).

Yehia, R. S., "Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*." *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 127-133, (2014).

Zeinvand-Lorestani, H., Sabzevari, O., Setayesh, N., Amini, M., Nili-Ahmadabadi, A., Faramarzi, M. A., "Comparative study of in vitro prooxidative properties and genotoxicity induced by aflatoxin B1 and its laccase-mediated detoxification products." *Chemosphere*, 135, 1-6, (2015).

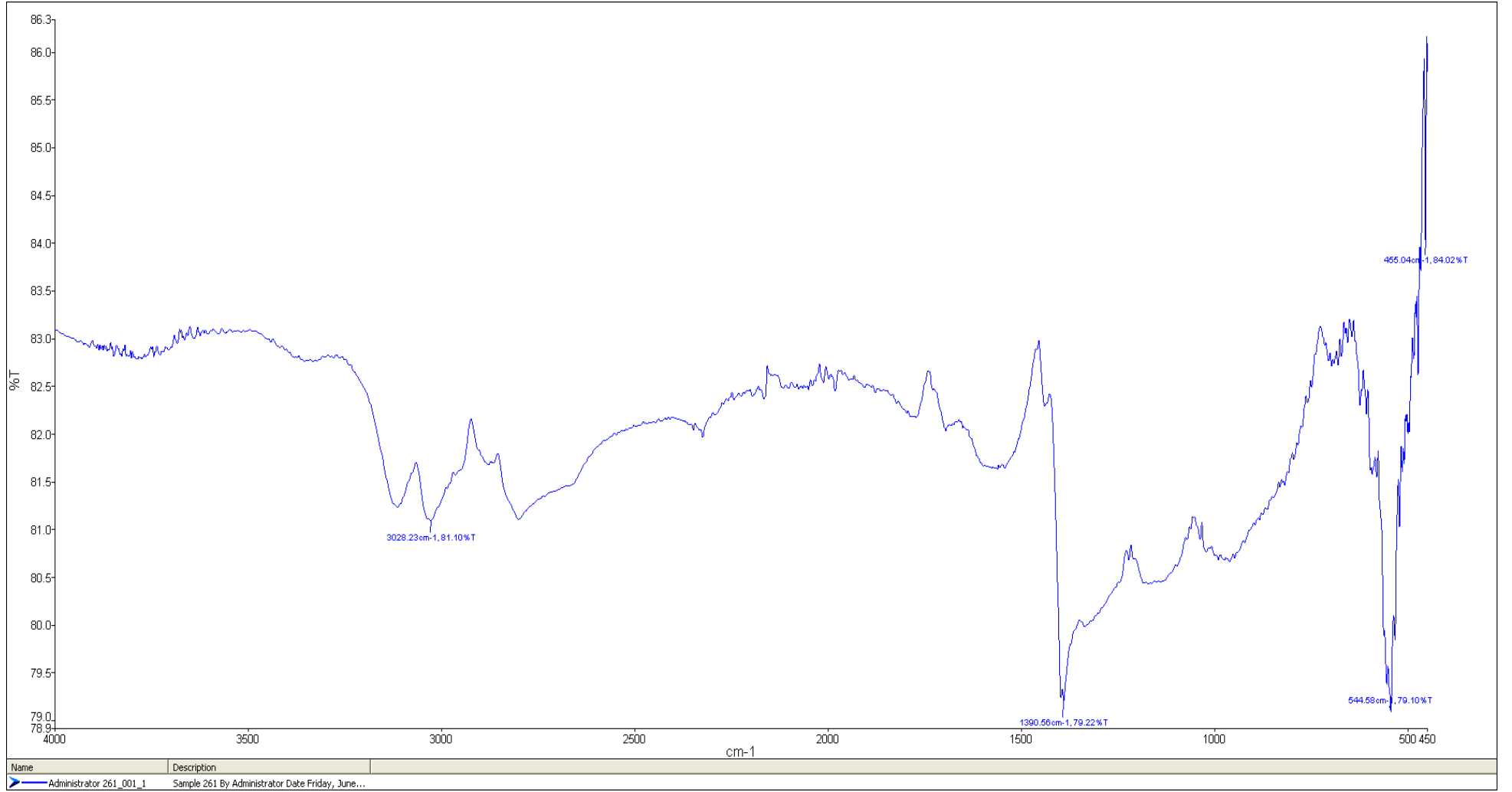
Zhang, X., Wang, Y., Yang, S., "Simultaneous removal of Co(II) and 1-naphthol by core-shell structured  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @cyclodextrin magnetic nanoparticles." *Carbohydrate polymers*, 114, 521-529, (2014).

Zinedine, A. and Mañes, J., "Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco." *Food Control*, 20(4), 334-344, (2009).

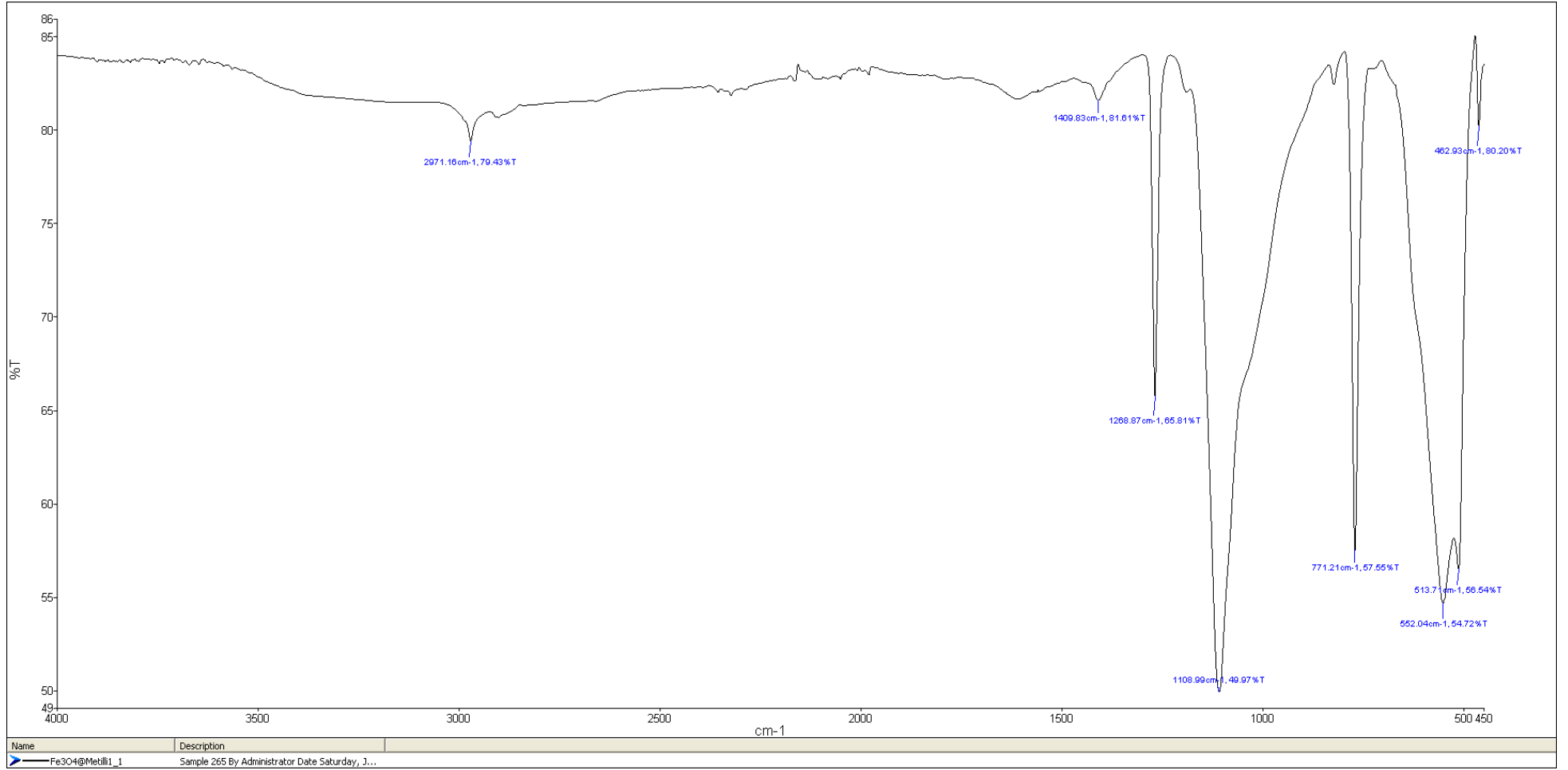
# **EKLER**

## **9 EKLER**

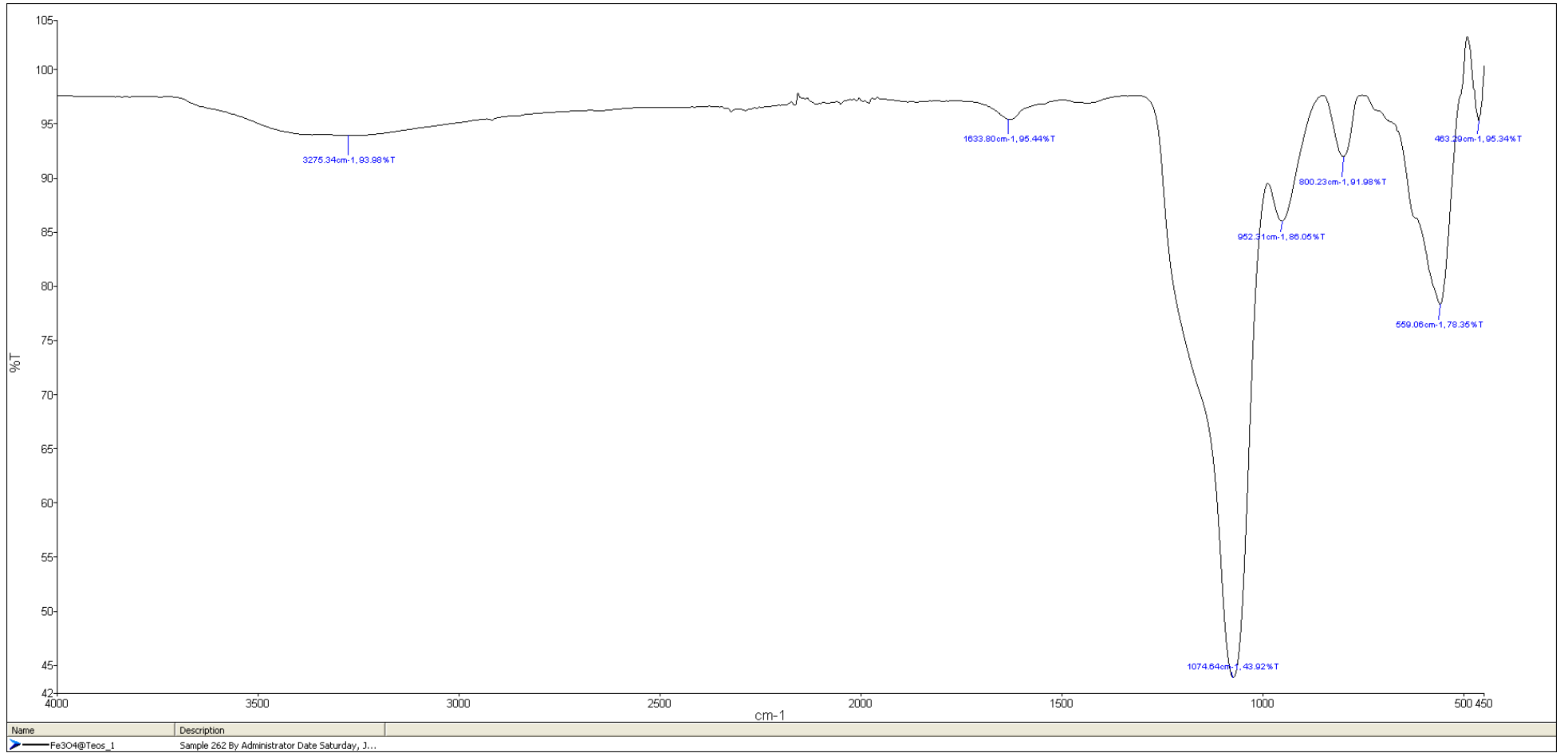
### **EK A: SPEKTRUMLAR**



Şekil A.1: Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(MNP) FT-IR spektrumu

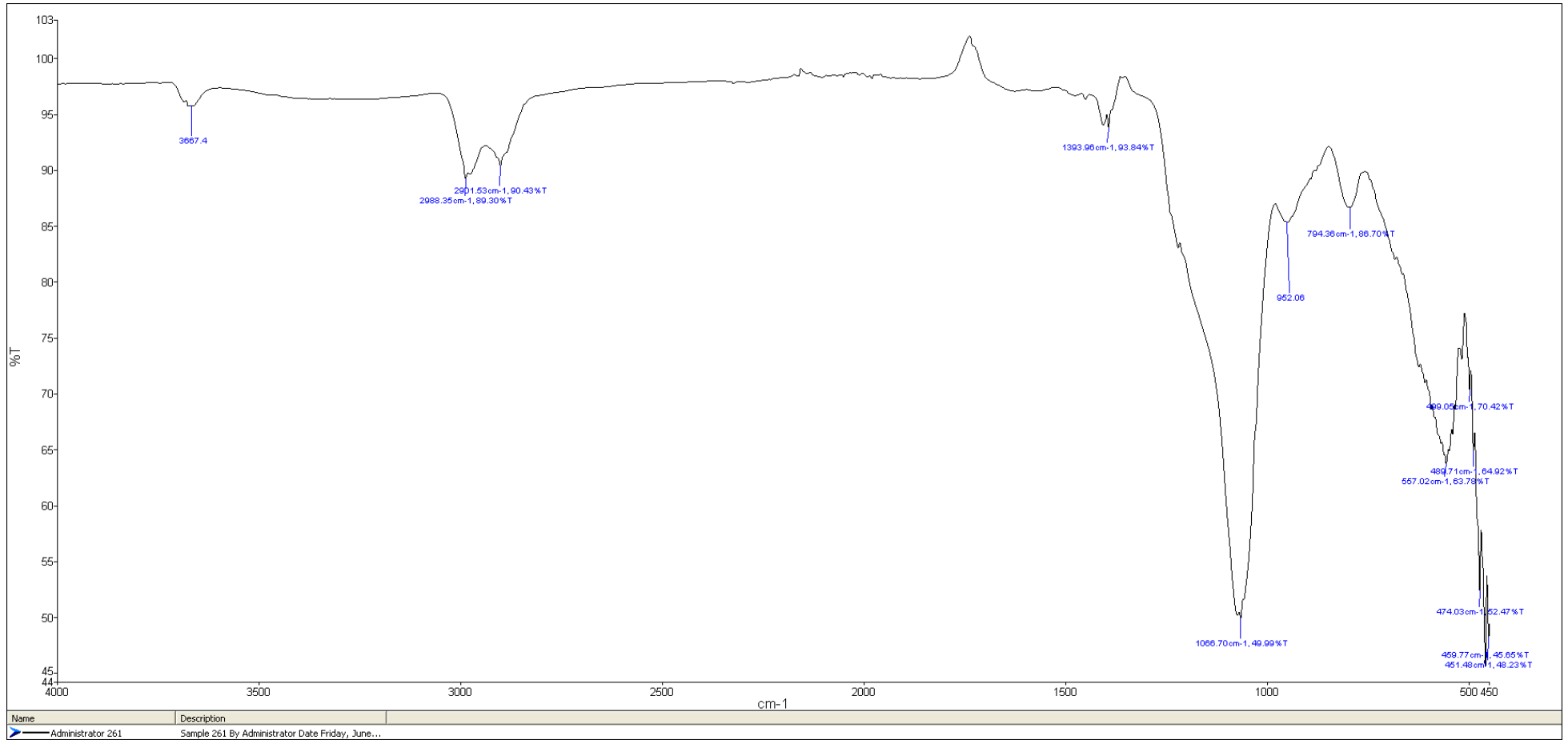


Şekil A.2: Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(M) FT-IR spektrumu

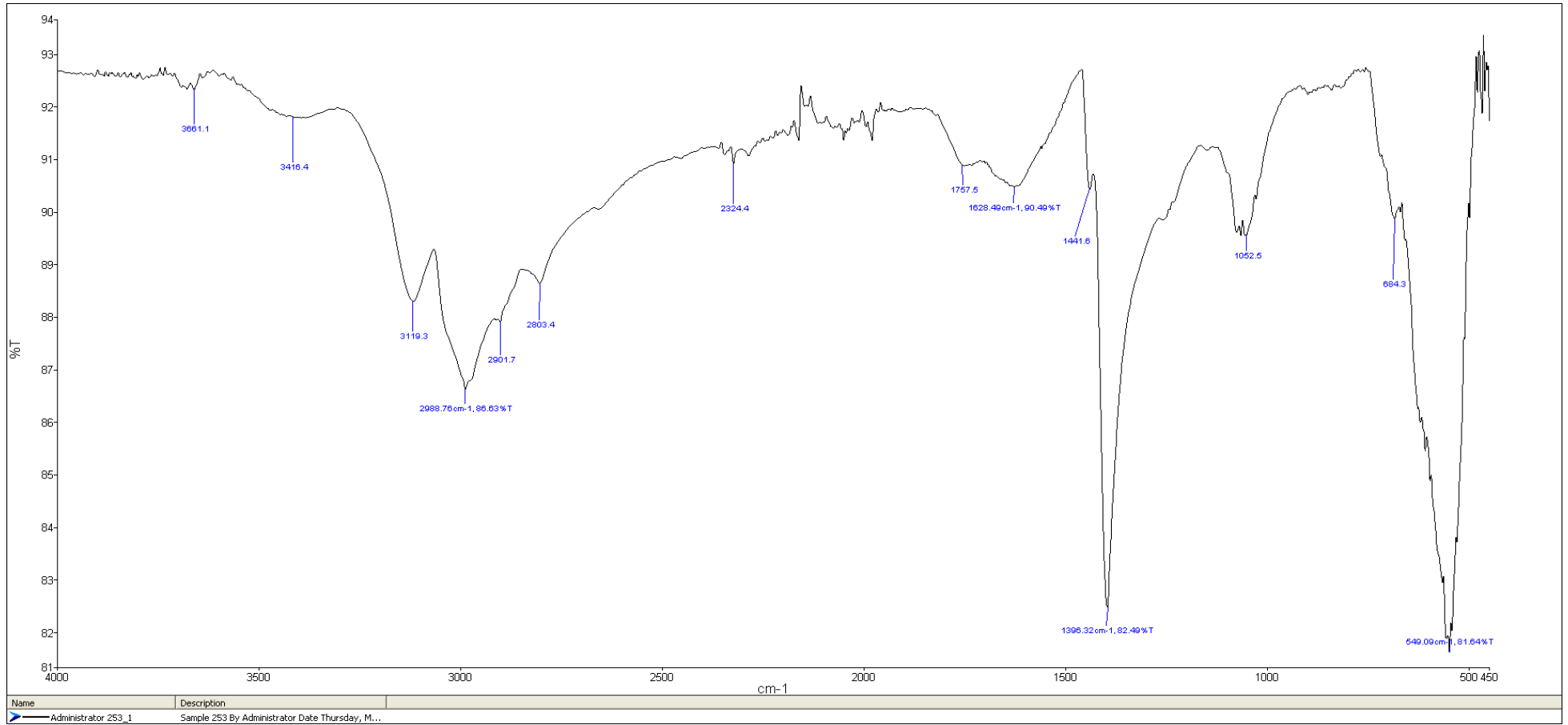


Şekil A.3: Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(T) FT-IR spektrumu

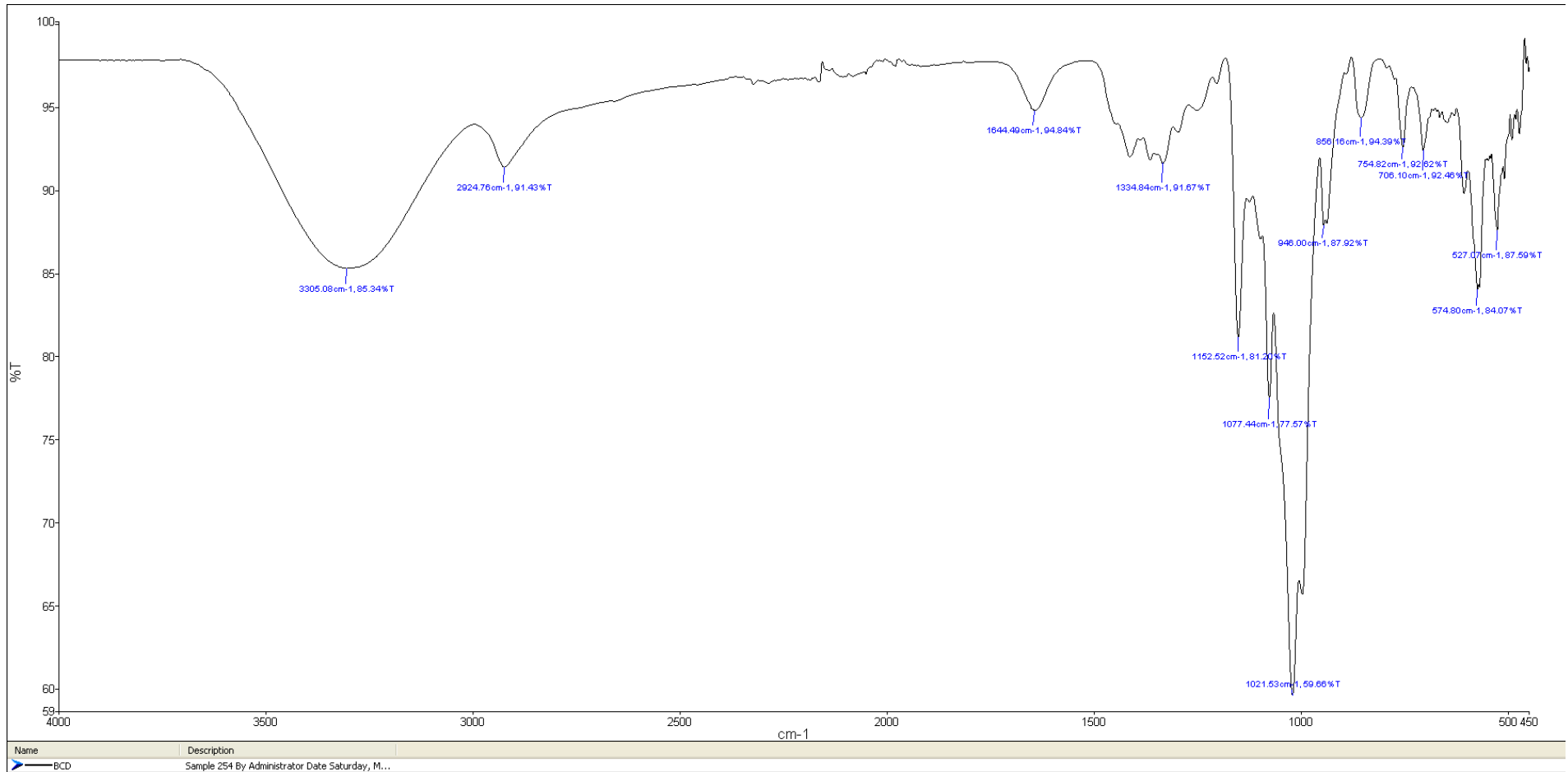




Şekil A.4: Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> FT-IR spektrumu



Şekil A.5: Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BCD FT-IR spektrumu



Şekil A.6: Saf BCD FT-IR spektrumu

## 10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : AİDAİ DUİŞHEMAMBET KYZY

Doğum Yeri ve Tarihi : KIRGIZİSTAN, 18.08.1994

Lisans Üniversite : PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

Elektronik posta : aydaykg8@gmail.com

İletişim Adresi :

**Yayın Listesi** :

• Dayi, B., Duishemambet kyzy, A., Abduloglu, Y., Cikrikci, K. and Ardag Akdogan H., “Investigation of the ability of immobilized cells to different carriers in removal of selected dye and characterization of environmentally friendly laccase of *Morchella esculenta*”, *Dyes and Pigments*, 151: 15-21, (2018).

Dayi, B., Duishemambet kyzy, A., and Ardag Akdogan H., “Characterization of recuperating talent of white-rot fungi cells to dye-contaminated soil/water”, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 27:3, 634-638, (2019).