

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KAYMAK VE
TEREYAĞLARDA AFLATOKSİN M1 VARLIĞI**

Proje No: TYL-2015-5810

Proje Türü

Yüksek Lisans

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi

Araştırmacının Adı Soyadı

Nuri Aydın ÖZKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi

Nisan 2017

KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

**PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KAYMAK VE
TEREYAĞLARDA AFLATOKSİN M1 VARLIĞI**

**Hazırlayan
Nuri Aydın ÖZKAN**

**Danışman
Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Mart 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

**PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KAYMAK VE
TEREYAĞLARDA AFLATOKSİN M1 VARLIĞI**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Nuri Aydın ÖZKAN**

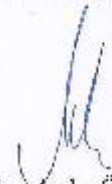
**Danışman
Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2015-5810 kodlu proje ile desteklenmiştir**

**Mart 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.



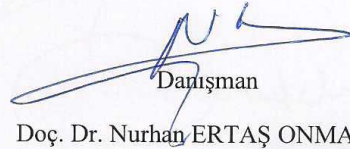
Nuri Aydın ÖZKAN

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

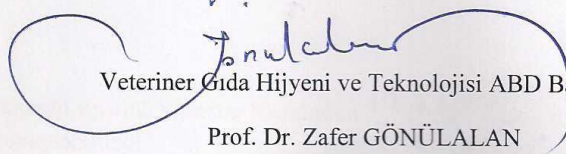
“Perakende Olarak Satışa Sunulan Kaymak ve Tereyağlarda Aflatoksin M1 Varlığı” adlı **Yüksek Lisans tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan
Nuri Aydın ÖZKAN



Danışman
Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ



Veteriner Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD Başkanı
Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN

Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ danışmanlığında Nuri AYDIN ÖZKAN tarafından hazırlanan “Perakende Olarak Satışa Sunulan Kaymak Ve Tereyağlarında Aflatoksin M1 Varlığı” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

07/04/2017

JURİ:**İMZA**

Danışman: Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ
(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Üye: Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN
(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Üye: Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM
(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Fulden KARADAL
(Ömer Halisdemir Üniversitesi Bor Meslek Yüksekokulu)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Harun HIZLISOY
(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 17.4.2017 tarih ve 779 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ'a, Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN, Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, Yard. Doç. Harun HIZLISOY'a çalışmam sırasında analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Serhat AL'a ve tez projesini, TYL-2015-5810 proje koduyla maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yetkililerine, çalışmalarım sırasında ve tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli aileme ve umut ışığım Almira'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Nuri Aydın ÖZKAN

Kayseri, Mart 2017

PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KAYMAK VE TEREYAĞLARDA AFLATOKSİN M1 VARLIĞI

Nuri Aydın ÖZKAN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans, Nisan, 2017
Danışman: Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ**

KISA ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Kayseri'deki pazarlarda satışa sunulan tereyağı ve kaymak örneklerinde aflatoksin M1'in (AFM1) varlığı ve düzeyleri Enzyme-Linked İmmune Sorbent Assay (ELISA) tekniği ile araştırmaktır. Bu amaçla, pazarlardan rastgele toplam 100 örnek (50 tereyağı ve 50 kaymak) alındı. Bu çalışmada, numunelerin tamamında (%100) saptanabilir düzeyde (5 ng/kg) AFM1 bulundu. Tereyağı ve kaymak örneklerindeki AFM1 kontaminasyon seviyeleri sırasıyla 6.58-128.69 ng/kg ve 5.70-26.62 ng/kg arasında değişiyordu. Analiz edilen örneklerin yalnızca bir tanesi (%2) (tereyağı) Türk Gıda Kodeksinin maksimum yasal sınırları aşmıştı. Sonuç olarak, tereyağı ve kaymaktaki AFM1 varlığı muhtemel bir halk sağlığı problemi olarak düşünülebilir. Bu nedenle, süt ve süt ürünleri, AFM1 kontaminasyonu varlığı yönünden sürekli izlenmelidir.

Anahtar Kelimeler: AFM1, ELISA, krema, tereyağı

**PRESENCE OF AFLATOKSIN M1 IN SALES AS RETAIL BUTTER
AND TURKISH CREAM**

Nuri Aydin OZKAN

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Veterinary Food Hygiene and Technology

Master Thesis, April, 2017

Supervisor: Associate Prof. Dr. Nurhan ERTAS ONMAZ

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the presence and level of aflatoxin M1 (AFM1) in butter and Turkish cream samples marketed in Kayseri, Turkey with Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) method. For this purpose, a total of 100 samples (50 butter and 50 Turkish cream) were randomly collected from bazaar. In this study, AFM1 at detectable level (5 ng/kg) was found in all (100 %) of the samples. The AFM1 contamination levels in butter and Turkish cream samples ranged from 6.58 to 128.69 ng/kg and 5.70 to 26.62 ng/kg, respectively. Only one (2 %) of analysed samples (butter) exceeded the maximum legal limits according to Turkish Food Codex. In conclusion, the occurrence of AFM1 in the butter and cream may be considered as a possible public health problem. Therefore, milk and milk products have to be monitored continuously for the presence of AFM1 contamination.

Keywords: AFM1, butter, ELISA, Turkish cream

İÇİNDEKİLER

PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KAYMAK VE TEREYAĞLARDA AFLATOKSİN Mİ VARLIĞI

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUKHata! Yer işareti tanımlanmamış.	
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYIHata! Yer işareti tanımlanmamış.	
KABUL VE ONAYHata! Yer işareti tanımlanmamış.	
TEŞEKKÜR	iii
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MİKOTOKSİNLERİN TARİHÇESİ	3
2.2. MİKOTOKSİNLERİN GIDA VE YEMLERE BULAŞMASI	4
2.2.1. Rutubet	5
2.2.2. Sıcaklık	5
2.2.3. pH.....	5
2.2.4. Oksijen ve Karbondioksit	6
2.2.5. Gıda Maddesinin Yapısı	6
2.2.6. Zaman.....	6
2.2.7. Diğer Faktörler	6
2.3. MİKOTOKSİNLERİN SINIFLANDIRILMASI	7
2.4. AFLATOKSİNLER.....	8
2.4.1. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri	8

2.4.2. Aflatoksinlerin Etkileri.....	11
2.4.3. Aflatoksin Bakımından Önemli Gıdalar.....	14
2.4.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin	15
2.4.5. Gıdalarda Aflatoksinlerin Belirlenmesi.....	19
2.5. KÜFLENMENİN ÖNLENMESİ VE AFLATOKSİN DETOKSİFİKASYONU	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. GEREÇ	22
3.1.1. Numuneler	22
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	22
3.2. YÖNTEM.....	24
3.2.1. AFM1 Ekstraksiyonu	24
3.2.2. ELISA Prosedürü	24
3.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	25
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	28
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ	42

KISALTMALAR

AFB1	: Aflatoksin B1
AFM1	: Aflatoksin M1
BEN	: Balkan Endemik Nefropatisinin
BLUE	: Mavi floresans renk
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FIA	: Floresan İmmunoassay
Gb3	: Globotriosylceramide
GLISA	: Gold Labelled Immuno Sorbent Assay
GMP	: İyi Üretim Teknikleri
GREEN	: Yeşil floresans renk
HC	: Hemorajik Kolit
HPLC	: Yüksek basınçlı likit kromatografi
HUS	: Hemolitik Üremik Sendrom
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
IMS	: İmmuno manyetik Seperasyon
LT	: Heat Labile Toksin
mTBS	: Modifiye Tryptone Soy Broth
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIA	: Radio immuno assay
Rf	: Rate of flow
SLT	: Shiga Like Toksin
ST	: Heat Stabile Toksin
STX	: Shiga Toksin
TTP	: Trombotik Trombositopenik Purpura
UV	: Ultraviyole

VT : Veratoksin

WHO : Dünya Sağlık Teşkilatı

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Funguslar, bulaşma kaynakları ve üreme koşulları	7
Tablo 1.2. Gıda ve yemlerde üreyen ve mikotoksin üreten başlıca fungus cinsleri ve ürettikleri mikotoksinler.....	8
Tablo 1.3. Bazı mikotoksinlerin çeşitli etkileri ve neden oldukları hastalıklar	13
Tablo 1.4. Türk Gıda Kodeksi'ne göre süt ve ürünlerinde aflatoksinlere ait yasal limit değerler	15
Tablo 4.1. AFM1 analizinde kullanılan standartların absorban değerlerine göre elde edilen referans aralıkları	26
Tablo 4.2. Çalışmada incelenen örneklerle ait AFM1 düzeyleri	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Aflatoksin Türevlerinin Kimyasal Yapıları (Applebaum)	10
Şekil 4.1. AFM1 analiz kalibrasyon eğrisi	26

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Küfler, ortam sıcaklığı ve rutubetin uygun olduğu koşullarda besin maddelerinde üreyerek ürünün bozulmasına neden olmalarının yanı sıra, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen teratojenik, karsinojenik ve mutajenik etkili toksik metabolitler (mikotoksin) oluşturmaktadırlar (1). Aflatoksinler, hakkında en çok araştırma yapılan mikotoksinlerdir. Aflatoksinler, başta *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus* ve bazı *Penicillium* türleri tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir. Belirlenmiş 13 tür aflatoksinden 5'i gıda ürünlerinde tespit edilebilmektedir. İnsan ve hayvanlarda akut ve kronik zehirlenmelere neden olan bu metabolitler, aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1'dir (2). Aflatoksin B1 (AFB1) ile kontamine olmuş yemlerle beslenen süt hayvanlarında, yemde bulunan AFB1 karaciğerde metabolize olarak Aflatoksin M1'e (AFM1) dönüşmektedir. Oluşan AFM1 daha sonra süt bezleri yoluyla süte geçmektedir (3). Toksin, pastörizasyon gibi ısı işlemlere son derece dayanıklıdır (4). Bu nedenle tereyağı ve kaymak dahil hemen hemen tüm süt ve süt ürünlerinde; Aflatoksin M1 kontaminasyonu görülmektedir (2, 5). Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC) tarafından AFB1'in 1. derecede, AFM1'in ise 2. derecede kanserojen madde sınıfına alınması süt ve ürünlerinin aflatoksinlerle kontamine olmasının halk sağlığını açısından risk oluşturduğunu göstermektedir (6).

Tüm memelilerin beslenmesinde önemli bir yeri olan süt, organizmanın ihtiyaç duyduğu besin elementlerini içermesi bakımından temel gıda maddelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Süt, binlerce yıldır insanlar tarafından doğrudan yada değişik lezzet, aroma, yapıya sahip birçok ürüne dönüştürülerek süt ürünleri şeklinde tüketilmektedir (7). Süt bileşenleri içinde süt yağı, yüksek miktardaki ve karmaşık yağ asidi kompozisyonu ile kaymak ve tereyağı gibi çeşitli süt ürünlerinin üretiminde temel hammadde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca süt yağı, esansiyel yağ asitlerini (linoleik, araşidonik ve

linolenik) ve yağda çözünen (A, D, E, K) vitaminleri içerdiğinden beslenmede oldukça önemlidir (8).

Kaymak ve tereyağı ülkemizde süt yağından üretilen iki önemli süt ürünüdür. Ülkemizde kendine özgü lezzeti ve aroması ile çeşitli tatlıların yanında ve kahvaltıda severek tüketilen kaymak, yağ oranı yüksek manda sütünden ya da krema ilave edilmiş inek sütünden üretilmektedir (9). Diğer bir süt yağı ürünü olan tereyağı ise ülkemizde krema ve yayık ayranından üretilmekte ve gıda sektöründe birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca günlük beslenmede lezzet ve aroması, enerji kaynağı olması, kolay sindirilebilmesi, içerdiği A vitamini ve esansiyel yağ asitleri nedeniyle önemli bir yere sahiptir (10).

AFM₁, laktasyondaki hayvanların aflatoksin B₁ içeren yemleri tüketmesinden sonra bu toksinin metaboliti olarak sütle atılır. Dolayısı ile bu toksin süt ve süt ürünlerinde (sıklıkla peynir, yoğurt, süt tozu, düşük oranla tereyağı) bulunabilmektedir. Süt ve ürünleri, bebekler, emziren anneler, çocuklar, yaşlılar ile süt ve ürünleri ile beslenen yavru hayvanlar için temel besin kaynağı olduğundan, bu ürünlerdeki AFM₁ miktarları önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada, Kayseri ili ve ilçelerinde tüketilen kaymak ve tereyağı örneklerinde AFM₁ düzeylerinin tespit edilmesi amaçlandı. AFM₁'in başta karaciğer olmak üzere birçok organda ciddi hastalık belirtilerine ve kansere neden olan önemli bir halk sağlığı sorunu olması dolayısı ile araştırma bölge insanının sağlığı bakımından da önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Hayvanların beslenmesinde kullanılan yem maddeleri, insanların gıda maddesi olarak kullandıkları ürünler tüketim aşamasına gelinceye kadar çeşitli bozulma etkenlerine maruz kalmaktadır. Heterotrofik tabiata sahip olan küf mantarları (funguslar), çevre koşullarına olan dayanıklılıkları ve doğada çok yaygın bulunmalarıyla bu bozulma etkenleri arasında önemli yer tutmaktadırlar (11, 12). Küf mantarları, gıda ve yemlerde üremeleri esnasında sentezledikleri mikotoksin adı verilen düşük molekül ağırlıklı bazı metabolitleri ortama bırakmaktadırlar. Mikotoksin kelimesi Yunanca küf anlamına gelen “Mykis” ve Latince zehir anlamındaki “Toxikon” kelimelerinden oluşmaktadır. Mikotoksinler; filamentöz yapıdaki çeşitli mantar türlerinin sekonder metabolizması sonucunda oluşmakta ve insan ve hayvanlarda latent, akut veya kronik zehirlenmelere neden olmaktadır (1,2).

Mikotoksin alımına bağlı olarak gelişen çoğunlukla birden fazla belirti ile karakterize klinik tabloya “mikotoksikoz” denir. Mikotoksikozda bireyde oluşan belirtilerin tipi ve şiddeti vücuda alınan mikotoksin türü, miktarı ve bir ya da birden fazla çeşitte olmasının yanı sıra vücut ağırlığı, fiziksel ve beslenme durumu gibi kişisel özelliklere bağlı olarak da farklılıklar gösterebilmektedir (12,13). Mikotoksin üreten en önemli fungus türleri; Deuteromycota (Fungi imperfecti) içinde Hypomycetes sınıfında yer alan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine giren türlerdir (14).

2.1. MİKOTOKSİNLERİN TARİHÇESİ

Mikotoksin zehirlenmesi ile ilgili ilk kayıtlara 5000 yıllık Çin kaynaklarında rastlanmaktadır. *Claviceps purpurea* tarafından oluşturulan nekroz ve gangren ile karakterize ergot zehirlenmesi orta çağda Avrupa ülkelerinde “kutsal ateş” olarak tanımlanmış ve birçok kişinin ölümüne neden olmuştur. Paris’te küflü karavanın ve Japonya’da küflü pirincin tüketilmesine bağlı zehirlenmeler 1800’lü yıllarda bildirilen mikotoksikoz olaylarıdır (15). Almanya ve İskandinav ülkelerinde domuzlarda görülen

nefropatinin ve Balkan ülkelerinde ortaya çıkan Balkan Endemik Nefropatisinin (BEN) nedeninin de *Aspergillus ochraceus* oluşturduğu okratoksin A olduğu ilerki yıllarda yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (3,13).

İkinci dünya savaşı sırasında Rusya'nın Orenburg bölgesinde nüfusun yaklaşık %10'u savaş nedeniyle tarlada zorunlu olarak bekletilen buğday ve darı gibi tahılları tüketmek durumunda kalmışlardır. Bu kişiler ürünlerde oluşan küf mantarlarının meydana getirdikleri mikotoksinlerden zehirlenmiş ve beslenmeye bağlı toksik etki ile kanda lökosit sayısının düşmesi sonucu lösemi tablosu (Alimentary Toxic Aleukia) ortaya çıkmıştır (14).

İngiltere'de 1960 yılında, 100.000'den fazla hindi palazının ölümüne neden olan karaciğer nekrozu ve safra kanalı hiperplazisi ile karakterize “hindi X hastalığı” (Turkey X Disease) tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar, hastalığa hindilere protein kaynağı olarak verilen ve Brezilya'dan ithal edilen yer fıstığında bulunan toksik maddelerin neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu toksik maddelerin “*Aspergillus flavus*” ve “*Aspergillus parasiticus*” isimli toksijenik mantarlar tarafından sentezlendiği ve ince tabaka kromatografi yöntemi ile analizi sonucunda bir dizi floresan bileşikler ortaya çıkardığı bildirilmiştir. Bu bileşiklere kendini oluşturan fungusun adına istinaden “aflatoksin” adı verilmiştir (16-20).

2.2. MİKOTOKSİNLERİN GIDA VE YEMLERE BULAŞMASI

Yemlerde ve gıdalarda saprofit olarak bulunan küfler lifli-tozlu bir görüntü oluşumuna neden olurlar. Yem ya da gıdalarda oluşan bu görüntü “küflenme” olarak tanımlanmaktadır (1-3).

Küflenmenin oluşması için ortamda küf sporunun bulunması gerekmektedir. Küf sporları hava ve su ile kolaylıkla etrafa yayılarak kontaminasyona neden olurlar. Uygun ortam bulduklarında çoğalırlar ve gıdaların küflenmesine neden olurlar. Eğer gelişmelerine uygun ortam bulamazlar ise yıllarca spor formda kalabilirler (1, 2, 4).

Küf mantarlarının gıda ve yemlerde gelişebilmeleri ve mikotoksin üretebilmeleri için öncelikle gıda ve yemin bileşimi olmak üzere sıcaklık, pH, rutubet, oksijen ve karbondioksit düzeyi gibi şartların uygun olması gerekmektedir. Bu ortamda mantarın

türü ve diğer mikroorganizmalarla olan rekabeti de üretilen mikotoksinin çeşidini ve miktarını belirlemektedir (21).

2.2.1. Rutubet

Küflerin gelişimi ve toksin üretme yeteneği üzerinde ortam rutubetinin büyük etkisi vardır. Küflerin üremeleri ve toksin üretmeleri ortamın relatif rutubet oranı artışı ile doğru orantı bulunmaktadır. Ortamda mevcut rutubetin azaltılması ile küf gelişimi ve toksin oluşumu engellenir (11, 14). Küflerin ortamda üreyip gelişebilmeleri için gerekli olan rutubet oranı küfün toksin sentezleyebilmesi için gerekli olan rutubet oranından daha azdır. Gıdaların su aktivite değeri küflerin gelişimi üzerinde oldukça önemlidir. Ortamdaki rutubet ile su aktivitesi arasında pozitif bir bağlantı bulunur. Gıda maddesindeki su aktivitesinin 0.68 ve üzerindeki değerlerde olduğu durumlarda küfler oldukça rahat üreyebilir ve toksin salgılayabilir (1, 14).

2.2.2. Sıcaklık

Sıcaklık, küflerin hem üremesi hem de mikotoksin sentezlemelerine oldukça etkilidir. Ayrıca sıcaklık küfler tarafından salgılanan mikotoksinlerin türlerini de etkiler. Geniş sıcaklık aralığında (≤ 5 ile 45°C) üreyebilen küflerin optimum üreme sıcaklıkları 20°C - 30°C arasındadır (13, 14, 18, 19). Bunun yanı sıra bazı küf türleri (*Penicillium spp* ve *Fucarium spp*) 5°C ve daha düşük sıcaklıklarda gelişebilmekte iken bazı küf türleri ise (*Aspergillus spp*) üreyebilmeleri ve toksin sentezleyebilmeleri için daha yüksek sıcaklık derecelerine gereksinim duyarlar. Bu küflerin aflatoksini en fazla üretebildikleri sıcaklık aralığı 25°C ile 30°C 'dir (1, 13). Yemlerin muhafaza edildiği depoların sıcaklığını küflerin optimum gelişme sıcaklığı olan oda sıcaklığının altında tutmak, depolarda sağlanacak hava sirkülasyonu ile ürünlerin rutubetinin %13'ün altına düşürmek, küf gelişimini engellemek ve gıda, süt ve süt ürünlerinin kontaminasyonu önlemek açısından önemlidir (14).

2.2.3. pH

Küflerin gelişip çoğalabilmeleri için optimum pH aralığı 5 ila 6'dır, aynı zamanda küfler geniş bir pH aralığında (1.5-11) gelişip çoğalabilme yeteneğine sahiptir.

2.2.4. Oksijen ve Karbondioksit

Yem ve gıda maddelerinin bulunduğu ortamlarda oksijen miktarının düşürülerek karbondioksit miktarının artırılması, küflerin gelişimini ve toksin salgılamalarını olumsuz yönde etkiler. Çünkü, obligat aerobik özellikte olan küfler, gelişimleri ve toksin salgılamaları için oksijene ihtiyaç duyarlar (1, 13, 14). Ortamda Oksijen miktarının %1'e kadar düşürülmesi ve karbondioksit miktarının %10 ve daha üst düzeylere çıkarılması küflerin üremesi ve toksin oluşumunu önemli derece de etkiler (1, 14).

2.2.5. Gıda Maddesinin Yapısı

Küfler üreyip gelişebilmeleri ve toksin sentezleyebilmeleri için ortamda, azot kaynağı olarak amino asitler, pepton gibi organik maddelere, karbonhidrat ve inorganik besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Yulaf, pirinç, buğday, pamuk tohumu, mısır, yer fıstığı gibi karbonhidrat ve yağ içeriği fazla olan gıda ve yemlerde küfler çok kolay bir şekilde üreyerek mikotoksin oluşturabilir (1).

2.2.6. Zaman

Küflerin yem ve gıda maddesinde üreyerek çoğalabilmeleri ve toksin oluşturmaları için için belirli bir süre gerekir. Küf sporları ile kontamine olmuş bir gıda maddesinde bu süre uygun sıcaklık ve rutubette 2 ile 4 gün arasında değişir. Dolayısı ile yem ve gıda'ların depolanma süresi uzadıkça küflerin üremesi ve toksin sentezleme olasılıkları da artar (1, 13).

2.2.7. Diğer Faktörler

Küflerin üremesi ve mikotoksin sentezine; gıda maddelerinde meydana gelen mekanik hasarlar, ortamdaki ışık durumu, ortamda farklı küf türlerinin var olması, hasat zamanı, mevsim ve iklim koşulları ve deponun havalandırma durumları da etkilidir (1, 14).

Küf mantarlarının gıda ve yemlere bulaşma kaynakları çeşitlilik göstermektedir (1,2);

1. *Cladosporium spp*, *Helminthosporium spp*, *Claviceps spp* ve *Pullaria spp* gibi küfler tarlada bitkinin büyümesi esnasında bitki paraziti olarak hayatlarını sürdürürler. Koşullar gelişmesi için uygun hale geldiğine üreyerek küflenmeye neden olurlar.

2. *Aspergillus spp* ve *Penicillium spp* bitkilerin hasat döneminde bulaşan ve düşük sıcaklık ve rutubet şartlarına sahip koşullarda gelişebilirler ve ürünlerin küflenmesine neden olurlar.

3. *Fusarium spp*, *Sardaria spp*, *Populaspora spp*, *Trichoderma spp* ve *Stachybothria spp* gibi küfler ise depo koşullarında iyi gelişerek ürünü kontamine ederler. Bu kaynaklar Tablo 1.1’de kısaca özetlenmektedirler.

Tablo 1.1. Funguslar, bulaşma kaynakları ve üreme koşulları (14, 22, 23).

Funguslar	Bulaşma kaynakları	Üreme
<i>Fusarium spp</i> , <i>Claviceps spp</i> , <i>Cladosporium spp</i> , <i>Helminthosporium spp</i> , <i>Pullaria spp</i>	Bitki paraziti olarak tarladaki bitkilerde yaşarlar	Ortam koşulları uygun olduğunda ürerler
<i>Aspergillus spp</i> , <i>Penicillium spp</i>	Tahıllara hasat işlemi sırasında bulaşır.	Uygun sıcaklık ve nem ortamına sahip ambar ortamında ürerler. Makine ile yapılan hasat bulaşmayı artırır.
<i>Fusarium spp</i> , <i>Trichoderma spp</i> <i>Sardaria spp</i> , <i>Stachybothria spp</i> <i>Populaspora spp</i>	Depo koşullarında bulaşır.	Depoların iyi temizlenmemesi ile bir sonraki hasatta kontamine ederler.

2.3. MİKOTOKSİNLERİN SINIFLANDIRILMASI

Mikotoksinlerin sınıflandırılmasında karmaşık kimyasal yapıları, farklı biyolojik etkileri ve değişik tür küfler tarafından sentezlenmeleri güçlük yaratmıştır. Bu nedenle mikotoksinlerin sınıflandırılmaları, bilim adamlarının çalışma alanlarına göre farklılıklar göstermiştir. Klinisyenler mikotoksinleri etki yerlerine göre, hepatotoksinler, nefrotoksinler, nörotoksinler, immunotoksinler ve oluşturdukları hastalık tablosuna göre Saint Antonio ateşi, stachybothryotoksikozis vs. olarak sınıflandırırken; biyologlar sağlık risklerine göre; karsinojen, mutajen, teratojen ve alerjen olarak sınıflandırmaktadırlar. Ayrıca biyokimyacılar biyosentetik orijinlerine göre; aminoasit türevleri ve poliketidler; organik kimyacılar kimyasal yapılarına göre; kumarin ve lakton; mikolojistler ise toksini oluşturan fungusun cinsine göre *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* vb toksinler olarak sınıflandırmaktadırlar (13, 14, 24).

Bilinen başlıca fungal toksinler; aflatoksinler, okratoksinler, zearalenon, sitrinin, patulin, kojik asit, sterigmatosistin, trikotesenler, *Penicillium roqueforti* toksini (P.R. toksin), penisillik asit, sporidesmin, ergot alkaloidleri, streoviridin, alternariol, tenuazonik asit,

rubratoksinler, sikloklorotin, luteosikrin, tremorin A ve okzalik asittir (25, 26). Gıda ve yemlerde gelişen ve mikotoksin üreten başlıca küf türleri ve ürettikleri mikotoksinler Tablo 1.2’de özetlenmiştir (12,14).

Tablo 1.2. Gıda ve yemlerde üreyen ve mikotoksin üreten başlıca fungus cinsleri ve ürettikleri mikotoksinler

Fungus Cinsi	Ürettiği Mikotoksinler
<i>Aspergillus spp.</i>	Aflatoksinler: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2, AFB2a, AFG2a, AFB3 Aspertoksin, Sitrinin, Sterigmatosistin, Okratoksin A, Patulin, Penisilik asit, Rugulovasin A, Rugulovasin B, Verrukulotoksin
<i>Penicillium spp.</i>	Sitrinin, Okratoksin A, Sitreoviridin, Rubratoksin A, Rubratoksin B, Patulin, Penisilikasit, PR toksin, Luteosikrin, İzlanditoksin, Ksantosilin-X
<i>Fusarium spp.</i>	Zearalenon (F-2 toksin), Triketesenler, Deoksinivalenol, Nivalenol, Diasetoksisirpenol, T-2 toksin, HT-2 toksin, Tremortin, Fusarin-C, Fumonis B1, Moniliformin, Siklopiazonikasit, Sitromisetin, Rugulosin, Ksantomegnin
<i>Alternaria spp.</i>	Alternariol, Alternariolmono-metil-eter, Alteredtoksin, Tenuazonikasit

2.4. AFLATOKSİNLER

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsine ait *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, *Asp. nomius* türleri ve *Asp. flavus* var. *columnaris*, *Asp. parasiticus* var. *globosus* alt türleri tarafından oluşturulan yüksek karsinojenik ve mutajenik özelliğe sahip mikotoksik ajanlardır (12, 20, 27, 28). Aflatoksin kelimesi, *Aspergillus*’un ilk harfi “a” ile *flavus*’un ilk üç harfi “fla”nın sonuna latince zehir anlamına gelen “toksin” kelimesinin ilave edilmesi ile oluşturulmuştur (29).

2.4.1. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri

Aflatoksinler kimyasal olarak difurokumarosiklopentenon ve difurokumarolakton grubunda bulunan, bifuran halkası ve lakton bağı içeren nispeten düşük molekül ağırlıklarına sahip kumarin derivatlarıdır (30).

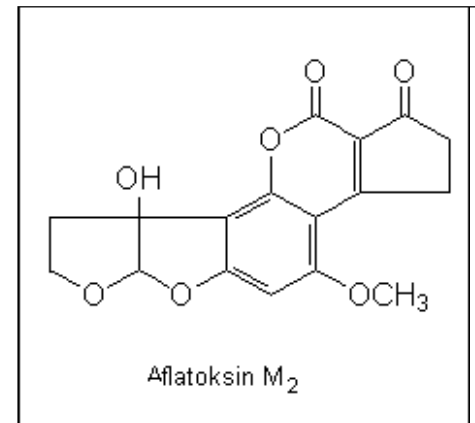
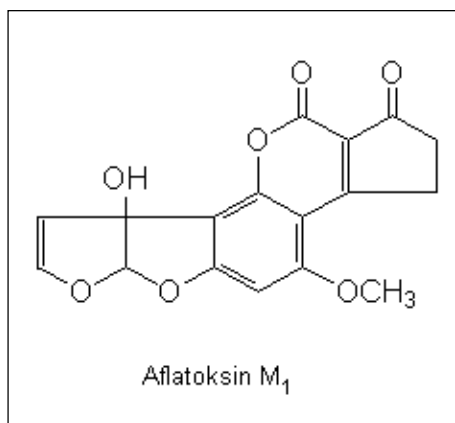
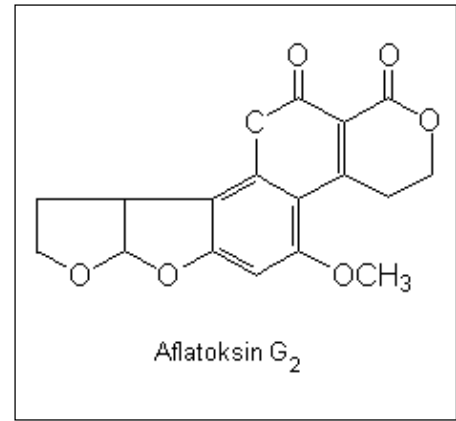
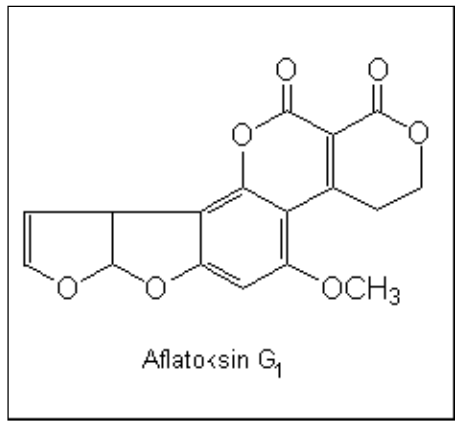
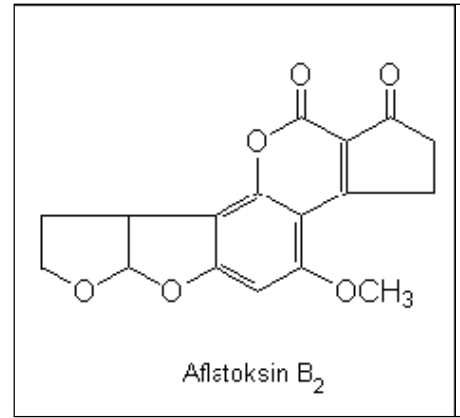
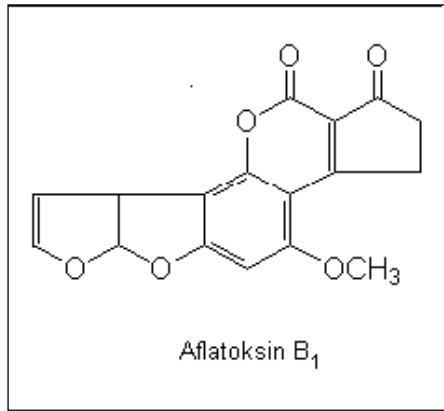
Aflatoksinlerin B1, B2, G1, G2, olmak üzere dört ana bileşiği vardır. Aflatoksinin B1 ve B2 formu ince tabaka kromatografisinde uzun dalga boylu (366 nm) ultraviyole (UV) ışığı altında mavi floresans renk (Blue), G1 ve G2 formu ise yeşil floresans renk (Green)

gösterdiklerinden dolayı bu şekilde isimlendirilmişlerdir (31, 32). Bunların dışında B2a, G2a, P1, Q1 ve aflatoksikol gibi çeşitli aflatoksin türevleri bildirilmiştir (27, 33).

Aflatoksinin diğer iki formu olan ve sütte salgılanması nedeniyle “milk toxin” adını alan M1 ve M2, AFB1 ve AFB2 içeren yemlerle beslenen laktasyondaki hayvanların sütünden izole edilmişlerdir (14, 29). AFB1 ve AFB2 içeren yemlerle beslenen hayvanların karaciğerinde bu iki toksin metabolize olarak OH içeren derivatlara dönüşmektedirler. Sütteki AFM1, vücuttaki AFB1 molekülünün AFM2 de, AFB2 molekülünün 4. karbon atomunun hidroksilasyonu sonucunda meydana gelmektedir (30). Yemle alınan toksinlerin yaklaşık % 2-6’sının AFM1 ve AFM2’ye dönüşerek süte geçtiği, bu geçiş oranlarının hayvana, güne ve hatta bir sağımdan diğer bir sağım arasına göre bile değişebileceği belirtilmektedir (32, 34, 35). AFM1’in sütte bulunma süresi 3 gün civarında olduğu, aflatoksin içeren yem maddesinin tüketiminden sonra yaklaşık 12 saat içinde sütte AFM1 tespit edildiği rapor edilmektedir (31).

Sütte bulunan diğer M serisi aflatoksiner, AFG1, AFG2, AFB2a ve AFG2a’nın hidroksile olmuş derivatları olan Aflatoksin GM1 (AFGM1), Aflatoksin GM2 (AFGM2), Aflatoksin M2a (AFM2a) ve Aflatoksin GM2a (AFGM2a)’dır. (27, 36). Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boylu UV ışığı altında B serisi toksinlerinden daha düşük R_f (Rate of flow) değerlerinde mavi floresan verirler (36).

Aflatoksiner, metanol, kloroform, aseton ve birçok organik maddede iyi, suda çok az (10-30 µg/mL) çözünürler, petrol eterinde çözünmezler. Nötre yakın pH’lardaki gıda ve yem maddelerinde oldukça stabildirler. Ancak çok düşük (<3) ve yüksek (>10) pH’larda, okside edici ajanlarla temas ettiklerinde ve oksijenli ortamda UV ışığına maruz bırakıldıklarında aktivitelerini kolayca yitirirler. AFM₁’in silindir metodu ile süt tozu üretimi ve pastörizasyonu işlemlerinden etkilenmediği bildirilmiştir (14, 17, 31). Aflatoksin türevlerinin kimyasal yapıları Şekil 1’de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Aflatoksin Türevlerinin Kimyasal Yapıları (Applebaum)

2.4.2. Aflatoksinlerin Etkileri

Aflatoksinlerin organizmada neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden zehirlenme tablosu “aflatoksikoz” olarak isimlendirilmektedir. Aflatoksinlerin toksik, immunosupresif, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri, aflatoksin bileşikleri organizmada karaciğere ulaştıktan sonra karaciğerin mikrozomal enzimleri vasıtasıyla, uğradıkları metabolik değişiklikler sonucu oluşan epoksit türevleri (AFB₁-2,3 epoksit) tarafından oluşturulmaktadır. (18, 20, 37-39). AFB₁, karaciğer mikrozomal sitokrom P450 enzimleri tarafından oksidasyonu sonucu, DNA ve proteinlere bağlanma yeteneğinde reaktif bir form olan AFB₁-8,9-epoksit formuna çevrilir (2). AFB₁-8,9-epoksit formu DNA ile kovalent olarak bağlanarak AFLB₁N⁷-Gua kompleksi oluşturur, bu kompleks karsinojenik ve genotoksik etkileri ile organizma için biyolojik bir tehlike oluşturmaktadır (40-42). Ayrıca DNA polimeraz enziminin DNA çift sarmalına bağlanmasını engelleyip mRNA sentezini yavaşlatmakta ve sonuç olarak protein sentezi engellenmekte ve hücresel bütünlük bozulmaktadır (20, 36). Aflatoksinler ayrıca RNA polimeraz, ribozomal translokaz gibi protein sentezi ile ilgili enzimleri ve çeşitli DNA formlarını karaciğerde biyolojik moleküllerle bağlarlar AFB₁, karaciğer hücre DNA’larındaki guanine hücrede protein sentezini düzenleyen genetik kodu ve hücre bölünme düzenini bozarak tümör oluşumuna neden olur (43). AFB₁-8,9-epoksit, GSH-S-transferaz katalizörlüğünde, GSH (Glutatyon) ile birleşerek veya *epoksit hidrolaz* ile ya da kendiliğinden AFB₁-8,9-dihydrodiol’e dönüşerek inaktive olur. Bu inaktivasyon olayı, birçok türde AFB₁’in detoksifikasyonunda oldukça önemli bir yoldur. Aflatoksinlerin mikrozomal hidroksilasyon ve demetilasyon reaksiyonları sonucunda oluşan AFP₁ ve AFQ₁ metabolitleri, mutajenik aktivitesi AFB₁’den daha düşük olan metabolitlerdir. Bu nedenle bu reaksiyonlar, bir bakıma detoksifikasyon işlemi olarak kabul edilmektedir. (2, 36,18, 44-46).

Aflatoksin türevleri içinde toksik ve kanser yapıcı etkisi en fazla olan AFB₁ olduğu; bunu azalan sırayla AFG₁, AFB₂, ve AFG₂ izlediği bildirilmektedir. AFB₁’in kronik dozlarla alınması, karaciğer kanserlerinin ortaya çıkmasında önemli bir sebebi olduğu düşünülmektedir. (2, 33, 47). Aflatoksinlerin kimyasal yapısında meydana gelen değişiklikler, biyolojik aktivitelerini de etkilemektedir. Örneğin, AFB₁’in dihidro derivatı olan AFB₂, AFB₁’den daha az toksiktir. B grubu toksinlerde bulunan siklopentenon halkasının terminal 5 halkasında oluşan laktona değişim sonucunda G grubu toksinler

meydana gelmektedir (3). Dünya Sağlık Teşkilatı'na (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) 1993 tarihinde, AFB₁'nin, insan karsinojeni, AFM₁'nin ise insanlar için muhtemel karsinojenik bileşik olduğunu bildirmiştir (28, 29).

Aflatoksinlerin insanlara bulaşması, toksinle kontamine gıda maddelerinin tüketimi veya solunum, plasenta ve emzirme yoluyla olmaktadır (1, 45). Hastalığın şiddeti ve seyrini alınan aflatoksin dozu, sıklığı, vücuda alınış yolu, maruz kalan canlının yaşı, beslenme koşullarına bağlı olarak değişmektedir (2, 3). Ayrıca protein, karoten ve vitamin B12 eksiklikleri ile ışığa maruz kalma toksisiteyi artırmaktadır (1, 43). Hayvanlar arasında domuz, hindi, ördek, kedi, köpek ve alabalıklar; tavuk türleri içinde ise broylerler aflatoksine daha duyarlıdır, ayrıca aynı türün genç olanları yaşlı olanlardan daha duyarlıdır (1). Birçok hayvan türünde toksik etki gösterebilecek aflatoksin miktarı 10 ile 100 ppm seviyelerindedir. Bir günlük ördek yavrularında AFB₁ ve AFM₁ için belirlenen LD₅₀ değerleri sırasıyla 0.24 mg/kg ve 0.32 mg/kg olarak bildirilmektedir. (14, 31, 43).

Aflatoksinler alım sıklığı, miktarı ve duyarlılık gibi faktörlere bağlı olarak canlılarda akut, subakut ve kronik şekillerde seyreden toksisite göstermektedirler. Yüksek miktarda aflatoksin alımına bağlı olarak oluşan akut formda, şiddetli karaciğer hasarını takiben şiddetli intoksikasyona bağlı solunum güçlüğü, kanlı ishal, doku ve organlarda kanamalar ve ölüm; subakut formda sarılık, bağırsaklarda kanama, trombosit sayısında azalma ve karaciğer hasarı görülmektedir (1, 14, 36). Akut aflatoksikozisin klinik bulguları; iştah azalması, ağırlık kaybı, solunum güçlüğü, burun akıntısı, durgunluk, bitkinlik, uyku hali (letarji)'dir. Bu belirtilerin yanında, kansızlık, öksürük, kanlı ishal, nörolojik anormallikler, mukoz membranlarda sarılık, kapillar damar dayanıklılığının azalması sonucu doku ve organlarda kanama, vücut boşluklarında sıvı birikimi, kasılma ve en sonunda birkaç saat ile birkaç gün içinde meydana gelen ölüm şekillenir. Karaciğerde rengin açılması veya tamamen renksizleşme ve yağ infiltrasyonu belirgin olarak görülür (1,36, 45, 48).

Düşük dozlarda ve uzun süreki aflatoksin alımına bağlı olarak oluşan kronik subletal dozlar ise beslenme bozukluklarına ve bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olmaktadır (49). Kronik aflatoksikozisin klinik bulguları; iştahın, büyüme hızının, yem tüketiminin ve yemden yararlanmanın azalması, kıl kalitesinin bozulması, kansızlıktır. Özellikle broylerlerde karkas kalitesinde düşme, ette berelenme ve çürüme, karın

boşluğunda sıvı toplanmasından dolayı karnın büyümesi, hafif sarılık, sığırlarda yavru atma ve süt veriminde azalma, kanatlılarda yumurta verimi, yumurtadan yavru çıkma oranı ve yumurta ağırlığında azalma gibi bozukluklarla seyreder. (1, 2, 47). AFB1, kanserojen etkisinin yanı sıra mutajen, teratojen ve immunosupresif etkilere de sahiptir. Bu etki nedeniyle hayvanlarda aşı sonrası yeterli bağışıklık sağlanamamakta, hayvanın çeşitli enfeksiyonlara (salmonellosis, koksidiomikosis) karşı direnci azaltmaktadır (14). Aflatoksinle bulaşık gıdalarla beslenen insanlarda karaciğer kanseri, siroz ve özellikle çocuklarda Reye's Sendromu vakalarına rastlanmaktadır. Bazı mikotoksinlerin çeşitli etkileri ve neden oldukları hastalıklar tablo 1. 3'de özetlenmiştir.

Tablo 1.3. Bazı mikotoksinlerin çeşitli etkileri ve neden oldukları hastalıklar

Üreten Fungus	Mikotoksin	Toksik Etkisi	Neden Olduğu Hastalıklar
<i>Aspergillus</i>	Aflatoksin B1	Karsinojenite Teratojenite	İnsanda primer karaciğer kanseri Turkey-X disease
<i>Penicillium Aspergillus</i>	Sitrinin	Nefrotoksisite	
<i>Penicillium Aspergillus</i>	α -Siklopiyazonik asit	Nörotoksisite	
<i>Claviceps</i>	Ergotoksinler (ergotamin)	Vazokonstrüksiyon Nörotoksisite	Ergotizm İnsanda St. Anthony Ateşi
<i>Fusarium</i>	Fumonisin B1	Karsinojenite Nörotoksisite	Atlarda Ensefalomalazi Domuzlarda Pulmoner Ödem
<i>Aspergillus Penicillium</i>	Okratoksin A	Karsinojenite Nefrotoksisite	Domuzlarda ve Kümes Hayvanlarında Nefropati
<i>Penicillium</i>	Patulin	Mutajenite Antibakteriyal	Domuzlarda ve Kümes Hayvanlarında Nefropati
<i>Penicillium</i>	Penitrem A	Nörotoksisite	
<i>Phomopsis</i>	Fomopsin A	Hepatotoksisite	Koyunlarda lupinosis
<i>Pithomyces</i>	Sporidesmin A	Hepatotoksisite Fotosensitivite	Koyunlarda lupinosis
<i>Fusarium</i>	Trikotesenler (T-2 toksin)	Dermatoksisite Hematopoetik Etki	Alimentary toxic aleukia (ATA)
<i>Fusarium</i>	Zearalenon	Östrojenizm Üreme Bozuklukları	Domuzlarda hiperöstrojenizm, Vulvovajinit ve düşükler

2.4.3. Aflatoksin Bakımından Önemli Gıdalar

Aflatoksin üreten *Aspergillus* türleri bütün dünyada yaygın bir şekilde bulunur ve buğday, mısır, çavdar, arpa, yulaf, pirinç tahıllar, soya fasulyesi, nohut gibi baklagil daneleri, ceviz, fındık, antep fıstığı, badem, yer fıstığı gibi yağlı tohumlar ve meyvelerde gözle görünür şekilde ve önemli düzeyde ürerler (13, 50, 51, 52).

Tüm ürünün gözle görülür şekilde küflenmesi ürünün işlenmesine ve tüketilmesine engel olur. Bu şekildeki küflenmiş ürünler kullanılmayarak Aflatoksin kontaminasyonu açısından risk teşkil etmezler. Asıl risk, ürünün çok az bir kısmının küflenmesi ve depolama süresinde mikotoksin üretiminin devam etmesidir. Mikotoksin içeren tahıllardan yapılan unlu mamuller, küf mantarlarının ürettiği meyvelerden üretilen meyve suları, önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Ayrıca kakao, kahve (çekirdek), bira, şarap gibi ürünlerde de aflatoksinle rastlanmaktadır. Uygun şartlarda depolanmayan hayvan yemlerinde kısmi küflenme ile başlayan mikotoksin üretimi, hayvanın mikotoksinli yem tüketmesi ile sonuçlanmaktadır. Yem üretiminde kullanılan yağlı tohumlardan da pamuk, ayçiçeği, susam ve kolza tohumlarında aflatoksinlere sıklıkla rastlanır. Sorgum, darı, mısır ve çeşitli küspeler (yer fıstığı, soya, pamuk, ayçiçeği tohumu küspeleri) gibi hayvan yemleri aflatoksin ile yüksek düzeyde kontaminasyon riski taşırlar. Süt, yumurta ve et ürünlerinin de bazen aflatoksin bakımından kontamine olmaları, hayvanların aflatoksin içeren yemlerle beslenmesi sonucu gözlenmektedir (36, 50-55). Aflatoksin sentezleyen *Aspergillus* türleri her türlü iklim koşulunda kolayca üreyebilirler. Çevre sıcaklığının 24 – 45°C olduğu ortamda ürün çeşidine göre % 9-14 arası veya daha yüksek oranlarda rutubet içeren besinler 3–4 günde bile ağır bir şekilde küflenebilirler. Aflatoksin sıklıkla hasattan önce tarlada ekinlerde oluşur. Zayıf gübreleme ve yabancı otlar tarladaki küf gelişimini artırmaktadır. Eğer ekin yeterince kurutulmazsa hasat sonrası kontaminasyonu gözlenir. Yüksek sıcaklık, böcek ve kemirgen istilası da bazı depolanmış ürünlerde küf gelişimini ve toksin oluşumunu kolaylaştırmaktadır (38, 50, 52, 56, 57).

Tablo 1.4’de Türk Gıda Kodeksi’ne göre süt ve ürünlerinde bulunan aflatoksinlere ait yasal limit değerler belirtilmiştir.

Tablo 1.4. Türk Gıda Kodeksi'ne göre süt ve ürünlerinde aflatoksinlere ait yasal limit değerler (58).

GIDA	Maksimum Limit (µg/kg)		
	B1	B1+B2+G1+G2,ç	M1
AFLATOKSİN			
Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025

2.4.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin

Laktasyondaki çiftlik hayvanlarının AFB₁ ile kontamine yemlerin tüketmesi sonucu vücuda alınan toksinin metabolize olması ile oluşan derivatların sütte salgılanması ile toksisitesi yüksek AFM₁ ortaya çıkar. AFM₁ hem sütte hem de kontamine sütlerden hazırlanan peynir, yoğurt, süt tozu, kaymak ve tereyağı gibi süt ürünlerinde bulunur (13, 27, 50, 59-66).

Sütte birlikte salgılanan aflatoksin miktarı mevsime ve laktasyon periyoduna göre değişmektedir. Sütteki AFM₁ seviyesi laktasyonun ilk dönemlerinde son dönemlerine göre; kış aylarında ise yaz aylarına göre daha yüksektir (31, 50, 66, 67).

Süt ve ürünlerinde AFM₁ seviyesi ile ilgili ülkemizde yapılan araştırmalarda, çiğ süt, peynir, pastörize süt, yoğurt, ayran, peyniraltı suyu ve sütlü tatlılarda toksine rastlandığı rapor edilmektedir (66, 68-70).

Sütte bulunan AFM₁'in süt içinde dağılımının homojen olmadığı bu yüzden süt ürünlerindeki miktarı ürünlere göre değişiklik gösterdiği belirtilmektedir. Yağı ayrılmış sütte, AFM₁'in %80'ninden fazlası kazeine bağlanma özelliğinden dolayı yağsız süt kısmında kalmaktadır. AFM₁'in yaklaşık %10'luk kısmının süt yağına geçtiği belirtilmektedir (19, 31, 32, 71). Buna bağlı olarak, süt ürünlerinden peynir çeşitlerinde AFM₁ konsantrasyonlarının diğer süt ürünü çeşitlerine göre daha yüksek olduğu; süt yağından elde edilen kaymak ve tereyağı gibi ürünlerde de daha düşük olduğu rapor edilmektedir. Yine de yapılan araştırmalarda AFM₁ miktarının tereyağında da halk sağlığı riski oluşturabilecek düzeylerde olabileceği ortaya konmuştur (66, 72-77)

Organizma için gerekli tüm esansiyel aminoasitleri içeren süt, aynı zamanda birçok besleyici ve fonksiyonel özelliğe sahip süt yağını da içermektedir. Süt yağının karmaşık yağ asidi kompozisyonu, yağda eriyen vitamin, mineral madde ve %30-50 oranındaki doymamış yağ asidi içeriği beslenmede önem arz etmektedir. Fonksiyonel özellikleri nedeniyle çeşitli süt ürünlerinin üretiminde önemli bir kalite kriteri olan süt yağı, ülkemizde ve dünyada bazı süt ürünlerinin üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Kaymak, ülkemizde süt yağının hammadde olarak kullanıldığı; özellikle manda yetiştiriciliğinin yapıldığı Afyon, Edirne, Kocaeli, Bursa, İstanbul ve Ankara gibi illerimizde üretilen yöresel bir süt ürünüdür (9, 78). Türk Gıda Kodeksi Krema ve Kaymak Tebliği' ne göre; ağırlıkça en az %60 oranında süt yağı bulunduran kremaya "Kaymak" denir. Afyon kaymağı, aynı tebliğde; "Manda sütünün tekniğine uygun olarak kaynatılarak 92°C'de 2 dakika tutulması ve tekniğine uygun olarak soğutulması ile elde edilen ürün" olarak tanımlanmaktadır (79).

Tereyağı ise Tereyağı Standardı (TS-1331) "Tereyağı, krema (kaymak) ve yoğurdun tekniğine uygun metot ve aletlerle işlenmesi sonucunda elde edilen, gerektiğinde Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde izin verilen katkı maddeleri de ilave edilebilen kendine özgü tat, koku ve kıvamdaki bir süt ürünü" olarak tanımlar (80).

Türk Gıda Kodeksi'nde ise tereyağı; ağırlıkça en az %80, en fazla %90 oranında süt yağı, en fazla %2 oranında yağsız süt kuru maddesi ve en fazla %16 oranında su içeriğine sahip süt ürünü olarak adlandırmaktadır (81).

Aflatoksinler, süt ürünleri yapımı esnasında uygulanan ısıtma işlemi, ya da tuz ilave edilmesi gibi prosedürlerden etkilenmemektedir. Yapılan literatür taramalarında tereyağında aflatoksin M1'in suda çözünbilme özelliğinden ve kazeine olan affinitesinden dolayı diğer süt ürünlerine göre daha az bulunduğu belirtilmektedir (66, 76, 77). AFM1 ile kontamine olmuş kremadan tereyağı üretimi sırasında mikotoksinin büyük bir çoğunluğunun yıkama suyuna geçtiği belirtilmiştir (3, 4).

Dünyanın birçok bölgesinde ve Türkiye'de süt ve süt ürünlerinde Aflatoksin M1'in varlığı ve kontaminasyon düzeylerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmaların büyük çoğunluğunda incelenen süt ve/veya süt ürününün farklı düzeylerde AFM1 içerdiği gösterilmiştir.

Kaniou-Grigoriadou ve ark. (56) Yunanistan’da 2002 yılında 54 süt örneğinde AFM1 analiz çalışmalarında süt örneklerinin 27’sinin (%50) AFM1 ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar süt örneklerindeki toksin düzeylerinin 10 - 18.2 ng/L arasında değişen değerlerde olduğunu bildirmişlerdir.

Herzallah ve ark. (5) 2007 yılında Ürdün’deki farklı yerlerden elde ettiği 220 örneği (et, süt, yumurta ve yem) mikotoksin varlığı yönünden analiz ettiği çalışmada incelenen örneklerin farklı düzeylerde mikotoksin içeriğini göstermişlerdir.

Siddappa ve ark. (27) Hindistan’da 2011 yılında topladıkları 45 UHT süt ve 52 çiğ süt örneklerinde AFM1 varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar inceledikleri UHT süt örneklerinin %38’nin, çiğ süt örneklerinin % 62.5’unun kabul edilebilir maksimum limitten fazla AFM1 içeriğini tespit etmişlerdir.

Barbieri ve ark. (30) İtalya’da 1991 yılında 200 adet parmesan peynirlerini AFM1 yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar inceledikleri peynir örneklerinin 18’inin (%9) düşük konsantrasyonlarda AFM1 içerdiğini göstermiştir.

Martins ve Martins (2000) 1999 yılında Portekiz’de çiğ ve UHT süt örneklerinde yapmış oldukları AFM1 tarama çalışmalarında 31 çiğ süt ve 70 UHT süttten oluşan 101 süt örneğin % 83’ünde AFM1 kontaminasyonu olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Araştırmacılar, çiğ süt örneklerinin %80.6’sında, UHT süt örneklerin ise % 84.2’sinde AFM1 belirlediklerini rapor etmişlerdir.

Nakajima ve ark. (2004) 2001 ve 2002 yılları arasında Japonya’da inceledikleri 208 pastörize sütlerin 207’sinde (%99.5) AFM1 içerdiğini bildirmişlerdir.

Dashti ve ark.(62) Kuveyt’te 2005 ile 2007 yılları arasında topladıkları 321 süt (taze süt, uzun ömürlü süt, süt tozu ve insan sütü) ve 40 peynir örneklerini AFM1 kontaminasyonu yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar bir örnek hariç bütün süt örneklerinin 0.9-68.7 ng/kg düzeylerinde, uzun ömürlü sütlerde, belirlenebilir limitlerin altında ve 88.8 ng/kg aralığında, süt tozlarında; 2.04-4.14 ng/kg aralığında, insan sütlerinin sadece 5 tanesinde 8.83-15.2 ng/kg aralığında ve peynir örneklerinin ise %80’inde 23.8-452 ng/kg aralığında AFM1 içerdiğini belirtmişlerdir.

Nuryono ve ark. (64) 2006 yılında Endonezya’da gerçekleştirdikleri bir çalışmada 113 taze süt örneklerinde AFM1 araştırmışlardır. Çalışmada, inceledikleri süt örneklerinin 48’inin (% 42.5) 5-10 ng/L aralığındaki düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir

Türkiye’de, Bakırcı (2001) 1994 yılında Van’da yaptığı çalışmada, incelediği 90 adet süt örneğinin 79’unda (% 88), 12.5 ile 123.6 ng/L aralığında AFM1 belirlemiştir.

Ertaş ve ark. (70) Kayseri ilindeki 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, 210 adet süt ve süt ürünüde AFM1 varlığı ve düzeylerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, inceledikleri 210 süt ürünü örneğinin 135’inde (%64) AFM1 tespit etmişlerdir. Çalışmada, süt örneklerinin 43’ünde (%86) 1-30 ng/L arasında, peynir örneklerinin 38’inde (%63) 12-378 ng/kg arasındaki değerlerde, yoğurt örneklerinin 28’inde (%56) 2.5-78 ng/kg aralıklarında ve sütlü tatlı örneklerinin 26’sında (%52) 1.5-80/kg arasında değişen seviyelerde mikotoksin içerdiği rapor edilmiştir.

Sarımehmetoğlu ve ark. (68) 2001 ve 2002 yılları arasında, Ankara’daki marketlerden aldıkları 400 adet süt ürünüde (100’er beyaz peynir, tulum peyniri, kasar peyniri ve eritme peyniri) yaptıkları AFM1 analizinde, incelenen örneklerin 327’sinde (% 81.75) 50 ile 800 ng/kg arasında toksin tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, beyaz peynir, tulum peyniri, kasar peyniri, eritme peynirindeki AFM1 dağılımının sırasıyla, %82, %81, %85, %79 olduğunu rapor etmişlerdir.

Tekinşen ve Uçar (75), 2005 yılında İstanbul, İzmir, Kayseri, Konya, Tekirdağ’dan elde ettikleri 100 krem peynir örneklerinin %99’unun 0 - 4100 ng/kg aralığında değişen düzeylerde AFM1 içerdiğini, ve incelenen örneklerden %18’inin Türk Gıda Kodeksinde belirtilen maksimum kabul edilebilir limiti aştığını bildirmişlerdir.

Kireççi ve ark. (69), 2005 ile 2006 yılları içerisinde Kars ilinin Sarıkamış ilçesindeki satış noktalarından topladığı 80 adet süt ve peynir örneğinde (20 çiğ süt, 20 beyaz peynir, 20 kasar peyniri ve 20 eritme peyniri) AFM1 varlığını incelemişlerdir. Araştırmacılar, inceledikleri süt ürünlerinin 68 (%85)’inde AFM1 belirlemiş ve bu örneklerin 30 (%37.5)’unda ise AFM1 miktarının Türk Gıda Kodeksi’ne göre kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğunu rapor etmişlerdir.

2.4.5. Gıdalarda Aflatoksinlerin Belirlenmesi

Aflatoksinlerin gıda ve yemlerde günümüzde hassas ve güvenli belirlenmesi için ince tabaka kromatografisi, yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC), immunoaffinite kolon, minikolon tekniği, florometrik metod, radioimmunoassay (RIA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve çok kısıtlı kullanım alanı bulunan kütle spektrofotometresi yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Tüm bu teknikler içerisinde en yaygın ve pratik kullanım alanına sahip olan yöntem ELISA'dır (14, 56, 82, 83).

Immunolojik yöntemlerden olan (ELISA), antijen antikor reaksiyonlarının direkt olarak saptandığı primer bir reaksiyondur. Bu tip primer reaksiyonlarda, antikorum antijene bağlanıp bağlanmadığı direkt olarak saptanmaktadır. ELISA yöntemleri, heterojen ve homojen immunoassay olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Homojen immunoassay yönteminde test sistemi; antikor, işaretlenmiş antijen ve örnek antijeni olmak üzere 3 faktör içerir. Homojen immunoassay reaksiyonu yarışmalı bir reaksiyon olup, bu reaksiyonda örnek antijeni ve işaretlenmiş antijen, ortamda sınırlı miktarda bulunan spesifik antikorla bağlanma yarışına girerler. Sistemde işaretleme amacıyla kullanılan enzim, antijene kovalent olarak bağlanmıştır, bu komplekse antikor bağlandığına enzimin yapısında değişiklik meydana gelir ve aktivitesini kaybeder. Bu yöntem heterojen immunoassay yöntemine kıyasla daha kolay ve pratik olmasına karşın, duyarlılığı az ve ortamda mevcut diğer maddelerle meydana gelebilecek istenmeyen reaksiyonlar açısından da riskli bir yöntemdir (36, 52, 59, 82, 84).

Heterojen bir immunoassay yöntemi olan ELISA yöntemi, enzim-antijen veya enzim-antikor konjugatlarından birinin kullanıldığı yarışmalı teknik ve yarışmasız teknik olmak üzere iki şekilde uygulanır. Bu yöntemde, homojen immunoassay yönteminden farklı olarak, antijen ve antikor reaksiyonu sonucu işaretlemede kullanılan enzim aktivitesinde bir değişme söz konusu değildir. Antijen ile birleşmeyen işaretlenmiş antikor veya antikorla birleşmeyen işaretlenmiş antijen, enzim-antijen-antikor kompleksinden ayrıldıktan sonra her iki fraksiyondan birinde enzim aktivitesi ölçülür (14, 52, 61, 85).

2.5. KÜFLENMENİN ÖNLENMESİ VE AFLATOKSİN DETOKSİFİKASYONU

Küfler tarafından oluşturulan mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden korunmanın en etkili yolu yem ve gıdaların küflenmesini önlemektir (1, 2) Bu amaçla;

- Küf üremesine ve toksine dirençli bitkisel ürünlerin yetiştirilmesi,
- Modern üretim yöntemlerinin kullanılması,
- Ürün tam olgunlaşmadan hasat edilmemesi,
- Zararlılarla mücadele,
- Hasat işleminden sonra ürünün yeterince kurutulması,
- Hasat edilen ürünün depoya taşınmasında kullanılan aracın temiz ve kuru olması,
- Deponun kuru olması, temiz olması ve sıcaklığın 20 °C'nin altında olması,
- Depoda muhafaza edilen yemlerin laktik asit, asetik asit, sorbik asit ve benzoik asit gibi kimyasal maddelerle muamele edilmesi,
- Küf ile kontamine olmuş ürünlerin depoya alınmayarak diğer yem ve gıdalara maddelerine bulaşmasının önlemek, küflenmenin önlenmesi konusunda oldukça önemlidir (1, 46, 49).

Ortamda ve gıda maddelerinde bulunan mikotoksinler fiziksel (ısı, gamma ve X ışınları, ultraviole (UV) lambalar vs.), kimyasal (asit ve tuzları ile muamele, amoniasyon) ve biyolojik (bakteri) uygulamalarıyla da azaltılabilir (19).

Pastörizasyon, buhara tabi tutma ve sterilizasyon gibi işlemlerlerden etkilenmezler. Süt ve süt ürünlerinde bulunan AFM1 sütlerin pastörizasyon ya da sterilizasyon işleminden etkilenmezken yer fıstığı 160 °C'de 30 dakika süreyle kavrulduğunda toksin kontaminasyonu büyük oranda (%90) azalmaktadır. Yem ve tahılların güneş ışığında bir iki gün bekletilmesi de aflatoksin düzeylerini oldukça azaltmaktadır.

UV, gamma ve X ışını uygulamaları aflatoksin detoksifikasyonunda kısmen etkili olmaktadır. UV ışınlarının ürüne nüfuz etme gücünün az olması nedeniyle istenilen sonucu vermemektedir. Bununla birlikte kuruyemiş ve bakliyatların UV ışık altında kontamine olan ve mavi-yeşil renk verenlerin uzaklaştırılması ile aflatoksin oranı yarı yarıya azaltılabilmektedir. Ancak bu işlem yüksek dozlarda UV ışını ile gerçekleştiği için Dünya Sağlık Teşkilatı tarafından uygun görülmemektedir (14).

Etanol, propiyonik asit gibi organik çözücüler, su ve tuzlu çözeltiler aflatoksinlerin detoksifikasyonunda başarı ile kullanılan kimyasallardır. Hidrojenperoksit, amonyak, sodyumhipoklorit ve ozon gibi oksidan kimyasallar aflatoksinlerin detoksifikasyonunda oldukça etkilidir. Ancak bu kimyasallar gıda ve yem maddesinin yapısını bozduğu için gıda maddelerinde kullanımları uygun değildir. Aflatoksinler içerdikleri lakton bağından dolayı özellikle alkalik yapıda olan kimyasallara duyarlıdır. Yemlerde aflatoksin detoksifikasyonu amacı ile en sık kullanılan amonyak gazı (amonyasyon) uygulamasıdır. Yemlerin %5 amonyakla muamele edilip 40 °C’de 1 saat bekletilmeleri sonucunda yemdeki aflatoksin düzeyi önemli ölçüde azalır. Bu yöntem, amonyanın ürüne kokusunun geçmesi, ürünün rutubet miktarını artırması ve rengini değiştirmesi gibi olumsuz durumlara sebep olmaktadır (1, 14, 19, 46).

Bu nedenlerle, aflatoksin oluşumunun önüne geçmek için uygun, ürünün özelliğini ve kimyasını bozmayacak ve insan sağlığını olumsuz etkilemeyecek uygulamalar yapılmalıdır. Laktik asit, sorbik asit, asetik asit, benzoik asit, propiyonik asit ve tuzları, aflatoksin detoksifikasyonunda bu amaçla kullanılan kimyasallardır. Yine, inorganik maddelerden selenyum ve A, C, E vitaminleri karaciğerde aflatoksinlerin neden olduğu karsinogen etkinliği mikrozomal enzimleri aktive ederek önler (46).

.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Numuneler

Çalışma kapsamında, Kayseri’deki açık pazar yerlerinden alınan 50 adet tereyağı ve 50 adet kaymak materyal olarak kullanıldı. Eylül-Aralık 2015 tarihleri arasında iki haftalık periyodik aralıklarla temin edilen her bir örnek 200-250 gr arasındaydı. Örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek analiz edildi.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Aflatoxin M1 Analizi Test Kiti (r-biopharm, R 1101 Almanya): Bu çalışmada analiz edilen tereyağı ve kaymak numunelerindeki AFM1 seviyesini belirlemek için kullanıldı.

Kit İçeriği:

1. 1 Adet antikor kaplanmış mikrotiter pleyt: AFM1’e karşı oluşmuş antikorlarla kaplı 96 kuyu içerir.
2. 6 Adet Aflatoksin standart solüsyonları (3'er mL): Standartların içerdikleri toksin konsantrasyonları aşağıda belirtildi.

Standart 1 : 0 ppt

Standart 2 : 5 ppt

Standart 3 : 10 ppt

Standart 4 : 20 ppt

Standart 5 : 40 ppt

Standart 6 : 80 ppt

3. Buffer 1, 20 mL
4. Buffer 2, 12 mL
5. 1 Adet Enzim Konjugat, 1.3 mL (konsantre, analiz için kullanılmadan önce Buffer 2 ile 1/11 oranında seyreltili.)
6. 1 Adet Kromojen, 7 mL(tetrametil benzidin içerir)
7. 1 Adet Substrat, 7 mL (üre peroksidaz içerir)
8. 1 Adet Stop solüsyonu, 12 mL (Sülfürik asit içerir)

Kit içerisinde mevcut olan mikrotiter pleyttteki kuyucuklar aflatoksin M1'e özel antikorlarla kaplıdır. Farklı konsantrasyonlarda AFM1 içeren standart solüsyonların ve analiz edilen örneklerin kuyucuklara inoküle edilmesi sonucunda örneklerin içerdiği AFM1, kuyucuklardaki antikorlar tarafından bağlanır. Geride kalan bağlanmamış antikorlar test prosedürüne göre ilave edilen enzim konjugata bağlanır. ELISA işleminde yapılan yıkama aşamasında ise bağlanmamış enzim konjugatlar uzaklaştırılır. Substrat ve kromojenin mavi bir renge dönüştürür. Stop solüsyonu ilavesi reaksiyonu durdurur ve mavi rengin sarıya dönüşmesine neden olur. Sonuçta örneğin içeriği AFM1 konsantrasyonu ELISA cihazında belirli bir dalga boyunda direkt okunur. Okunan absorbans değeri örnek içindeki aflatoksin M1 konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Çalışmada, kit içeriğindeki bütün reaktifler ELISA işleminden önce oda ısısına getirildi. Test prosedürünün uygulanırken mikro kuyucukların kurumamasına özen gösterildi. Testin doğruluğu büyük ölçüde mikro kuyucukların yıkanmasındaki hassasiyete bağlı olduğundan, yıkama işlemlerinde prosedürde belirtilen yıkama talimatlarına dikkatli bir şekilde uyuldu ve pleytlerin reaktifler ilave edildikten sonra inkübasyonları sırasında direkt güneş ışığı ile temastan kaçınıldı. İncelenen yağ örnekleri için duyarlılık limiti 25 ppt, geri alma oranı %95'tir. Analiz öncesinde örneklerin temizlenmesi için, geri alma oranı yaklaşık %90 olan Rida Aflatoksin Kolondan (r-biopharm, R 5001/R 5002, Almanya) yararlanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. AFM1 Ekstraksiyonu

Stomacher torbasına 5 gr tartılan yağ örneği 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda (Nüve®, BM401, Türkiye) eritildi. Daha sonra örneklerin üzerine 25 mL (%70'lik) metanol eklendi. Elde edilen karışımı eritmek amacı ile 40°C'de sıcak su banyosunda inkübe edildi. Stomacher'de 10 dakika homojenize edilen karışım, soğutmalı santrifüjde 10 °C'de 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Bu süre sonunda elde edilen süspansiyon filtre (Whatman No:1, 125 mm) kağıdından süzüldü. Süzüntüden 5 mL alındı ve üzerine 15 mL distile su ve 0,25 mL Tween-20 ilavesinden sonra 2 dakika homojenize edilerek kolondan geçirildi. Kolondan geçirilme işleminde; 2 mL distile su ile 1 dk yıkanarak kalibre edilen kolonun üzerine örneklerin konulduğu hazne olarak kullanılmak amacı ile 20 mL'lik enjektör takıldı. Daha sonra ekstratın 1 mL'si kolona ilave edilirken kalan ekstrat enjektöre konuldu ve ekstratın kolondan yavaşça ve sürekli olarak geçmesi sağlandı ve kolondan atıldı. Bu işlemin sonunda kolon 10 mL distile su ile yıkandı. Daha sonra 0.5 mL absolut metanol ilavesi ile kolonda tutulan AFM1 elüe edili ve eppendorflara alındı. Elde edilen elüentten 100 µL alındı ve 900 µL Buffer 1 ile 1:9 oranında dilüe edildi. Bu şekilde hazırlanan tereyağı örnekleri için dilüsyon faktörü 5 olarak belirlendi ve bu karışımın 100 µL'si AFM1 analizi için teste kullanıldı (74, 86, 87).

3.2.2. ELISA Prosedürü

1. Standart solüsyonlar ve hazırlanan tereyağı ve kaymak örnekleri kit içerisinde yer alan antikor ile kaplı mikrotiter kuyucuk pleyte yerleştirildi.
2. Standart solüsyonların ve ekstrakte edilen örneklerin herbirinden 100'er µL alınarak kuyucuklara ilave edildi ve 22-25 °C'de ışık almayan ortamda 1 saat bekletildi.
3. Bu süre sonunda pleyt ELISA otomatik yıkayıcıda (ELX 50, Bio-Tek Instruments, ABD.) iki kez yıkatıldı.
4. Her bir kuyucuğa 100'er µL enzim konjugat ilave edilerek 22-25 °C'de karanlık ortamda 15 dakika bekletildi.

5. Bu süre sonunda pleyt otomatik yıkayıcıda üç kez yıkandı.
6. Her bir kuyucuğa 50 µL substrat ve 50 µL kromojen ilave edildikten sonra nazikçe karıştırılarak oda ısısında, karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi.
7. En son aşama olarak her bir kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu koyularak sarsmadan pleyt iyice karıştırıldı. Pleyt, ELISA otomatik okuyucuda (Thermo, Finlandiya) 450 nm’de okutularak absorbanslar kaydedildi.

3.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

ELISA testi sonuçlarının değerlendirilmesinde aşağıda belirtilen formül kullanıldı;

$$\frac{\text{Standartlar ve örnekler için bulunan absorbans değerlerinin ortalama değerleri} \times 100}{\text{Birinci standartın (0 ppt standartı) absorbans değeri}}$$

Standartlar için hesaplanan değerler, semilogaritmik grafik kağıdı üzerine ng/L (ppt) cinsinden AFM1 konsantrasyonuna karşı koordinatlar sistemine girilmesi, elde edilen konsantrasyonların yağ örnekleri için belirlenen dilüsyon katsayısı ile çarpılması işlemleri, ELISA okuyucusu tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi. Analiz edilen her bir örneğin AFM1 konsantrasyonu eğri üzerinden ng/L cinsinden okundu.

3.2.4. İstatistiksel Analizler

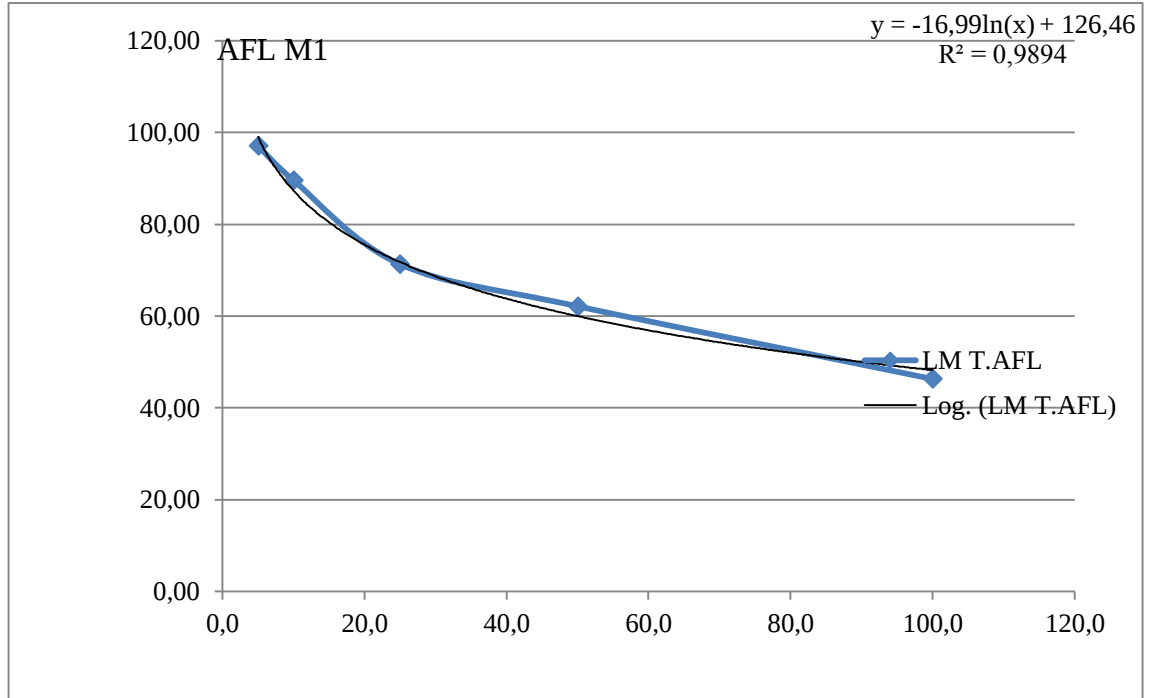
Çalışmada, tereyağ ve kaymak örnekleri arasında AFM1 varlığı açısından istatistiksel bir farklılık olup olmadığı t-testi ile araştırıldı. Çalışmada yapılan tanımlayıcı istatistiklerde SPSS 15.0 paket program kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında, analiz edilen toplam 100 örneğin tamamında AFM1 düzeyi, belirlenebilen minumum limitin (5ng/kg) üzerindeydi. Analiz edilen tereyağı ve kaymak örneklerinin AFM1 düzeylerinin tespit edilmesi amacı ile kullanılan standartların absorbans değerleri tablo 4.1’de ve kalibrasyon eğrisi ise şekil 4.1’de gösterildi.

Tablo 4.1. AFM1 analizinde kullanılan standartların absorbans değerlerine göre elde edilen referans aralıkları

Standart	Konsantrasyonları (ng/L)	Ortalama Absorbans değeri	% Standart Sapma (SS)	%CV	% B/B0
1	0	1.339	0.009	0.5	100.00
2	5	1.300	0.008	0.5	97.09
3	10	1.220	0.009	0.4	89.62
4	25	0.955	1.00	0.5	71.32
5	50	0.832	0.009	0.4	62.16
6	100	0.620	0.006	0.4	46.30



Şekil 4.1. AFM1 analiz kalibrasyon eğrisi

Çalışma süresince analiz edilen tereyağı numunesinin 2'sinde (%4) ve kaymak örneklerin 1'inde (%2) AFM1 düzeyi yağ örnekleri için belirlenen duyarlılık limiti olan 25 ng/kg'ın üzerindeydi.

Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ'de (2011) tereyağı ya da kaymak için maksimum bir sınır belirtilmemiştir. Ancak tereyağı numunelerinden 1'inde (% 2) ve Türk Gıda Kodeksinin (TGK) süt ürünleri için belirlemiş olduğu maksimum limit olan 50 ng/kg'ın üzerinde aflatoxin M1 tespit edildi. Çalışmada incelenen kaymak ve tereyağı numunelerinde sırasıyla 5.70 ng/kg-26.62 ng/kg, 6.58 ng/kg-128.69 ng/kg aralıklarında AFM1 içerdiği belirlendi. Çalışmada analiz edilen kaymak ve tereyağ örnekleri arasında AFM1 varlığı açısından istatistiksel bir farklılık belirlenmedi ($p=0.210$).

Analiz edilen tereyağı ve kaymak örneklerine ait AFM1 dağılımları tablo 4.2'de özetlendi.

Tablo 4.2. Çalışmada incelenen örneklere ait AFM1 düzeyleri

Analiz Edilen Örnek	Örnek Sayısı	Örneklere ait AFM1 dağılımı /(%)			AFM1 Konsantrasyonu (ng/kg)		
		<25 ng/kg	25-50 ng/kg	> 50 ng/kg	$\bar{x} \pm S_x$	Min	Max
Kaymak	50	49 (%98)	1 (%2)	-	9.87 $\pm$ 0.47	5.70	26.62
Tereyağı	50	48 (%96)	1 (%2)	1 (%2)	13.01 $\pm$ 2.44	6.58	128.69
Toplam	100	97 (%97)	2(%2)	1(%1)			

$\bar{x} \pm S_x$: ortalama $\pm$ standart hata

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt bütün insanlar için temel besin kaynaklarından biridir. Yüksek kalsiyum ve protein içeriği nedeniyle beslenmede oldukça önemli rol oynar. Sütün soframıza gelene kadar çeşitli toksin maddeler ile kontamine olması günümüzdeki en büyük sorunlar birisidir. Yapılan bazı çalışmalar (9, 68, 74) süt ve süt ürünlerinde yüksek konsantrasyonlarda AFM1 içerdiğini göstermiştir. AFM1 içeren süt ve süt ürünlerini tüketen kişilerde (özellikle bebek, çocuk ve yaşlılar) toksikasyon riskinin yüksek olduğu bildirilmektedir (29, 56).

Yapılan çalışmada incelenen 50 kaymak ve 50 tereyağı örneklerinin hepsinde minimum belirleme limitinin (5ng/kg) üzerinde AFM1 belirlendi. Ancak, yalnızca bir (%2) tereyağı örneğinde belirlenen AFM1 düzeyi (128.69 ng/kg konsantrasyonunda) süt ürünleri için belirlenen maksimum tolerans seviyesinin (50ng/kg)'ın üzerindeydi. Bu durum, AFM1'in yağda çözünmemesi ve kazeine affintesinden dolayı %10 düzeylerindeki çok düşük miktarı yağa geçerken yaklaşık %80'lerde olan büyük bölümü proteine bağlanarak sütte kalmasına (3, 66, 88, 50, 67) bağlanabilir. Bu nedenle, hidrofilik özellikte olan AFM1'in tereyağında belirlenen düzeyi halk sağlığı açısından önemli olabilir.

Son yıllarda dünyada ve Türkiye'de süt ve süt ürünlerinde AFM1'in varlığı ve düzeyleri ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (9, 67, 68, 70, 74). Ancak tereyağı ve kaymakta AFM1 ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Özbek (87) Samsun'da tüketime sunulan toplam 250 adet süt ve süt ürününün (50'ser adet süt, tereyağı, beyaz peynir, kaşar peyniri ve eritme peynirlerini) 151'inde (% 60) ELISA tekniği ile AFM1 saptamıştır. Araştırmacı analiz ettiği 50 adet tereyağı örneğinin 14'ünde (%28) AFM1 belirlediğini ve bu tereyağlarının 4'ünde toksin konsantrasyonunun 65 ng/kg-130 ng/kg arasında olduğunu (>50 ng/kg) bildirmiştir. Aynı zamanda iki tereyağı örneğinde tespit ettiği 110 ng/kg ve 130 ng/kg AFM1

konsantrasyonlarının tüketici sağlığını tehdit edebilecek düzeylerde olabileceğini ve bu miktarların en azından minimum değerlere çekmek gerektiğini vurgulamıştır. Özbek (87) tarafından elde edilen AFM1 konsantrasyonları bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Ayçiçek ve ark. (72) İstanbul'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada toplam 183 örnekte (119 adet beyaz peynir ve 64 adet tereyağı) ELISA yöntemi kullanarak AFM1 araştırmışlardır. İnceledikleri tereyağı örneklerinin 52'sinde (% 81) 10 ng/kg - 2200 ng/kg aralığında AFM1 belirlemişlerdir. Araştırmacılar, AFM1 belirlenen 52 tereyağı örneğinin 20'sinin (% 31.25) 50 ng/kg'dan yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Bildirilen çalışmada AFM1'in tereyağında varlığı açısından bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir fakat maksimum konsantrasyon limitini AFM1 oranı (%31.25) bizim çalışma sonucumuza (%2) göre oldukça yüksektir.

Ayçiçek ve ark. (73) Ankara'da satışa sunulan 49 adet krem peynir, 94 adet beyaz peynir, 53 adet kaşar peyniri ve 27 adet tereyağı içeren toplam 223 süt ürününde örneklerinde ELISA tekniği ile 202'inde (%90.58) AFM1 saptamışlardır. Araştırmacılar analiz ettikleri tereyağı örneklerinin 25'inin (%92.6) bu toksin ile kontamine olduğunu ancak sadece bir örneğin (%3.7) kabul edilebilir maksimum limiti aştığını bildirmişlerdir. Ayçiçek ve ark. (73)'in ortaya koyduğu sonuç bu çalışma ile uyumludur.

Aydemir ve ark (74) tarafından Erzurum'daki marketlerden toplanan 89 tereyağı örneğinde ELISA metodu ile yapılan AFM1 analizinde 66 (%82.5) tereyağı örneğinin 10-121 ng/kg aralığında toksin içerdiiği ve 13 (%16.3) tereyağı örneğinin ise yasal limitin üzerinde olduğu saptanmıştır. Aydemir ve ark (74)'ın belirttiği kontaminasyon düzeyi bu çalışmaya nispeten yüksektir.

Tekinşen ve Uçar (75) İstanbul, İzmir, Kayseri, Konya, Tekirdağ'dan rastgele topladıkları 192 süt ürünü (100 krem peynir ve 92 tereyağı) örneğinin ELISA ile analizi sonucunda %99'unun AFM1 içerdiiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar analiz ettikleri tereyağı örneklerinin tamamında (%100) belirlenebilir düzeyde toksin bulunduğunu ve 26 (%28) tereyağı örneğinin de AFM1 konsantrasyonunun kabul edilebilir maksimum limitten fazla olduğunu göstermişlerdir. Tekinşen ve Uçar (75)'in açığa çıkardığı sonuçlardan bütün numunelerde belirlenebilir düzeyde toksin bulunması yönünden bu çalışma ile paralellik olsa da araştırmacıların belirttiği yasal limiti geçen örnek sayısı daha yüksektir.

Adana’da 2008 yılında Var ve Kabak tarafından ELISA tekniği ile analiz edilen 70 adet süt ürününden (20 steril süt, 20 beyaz peynir, 20 kaşar peyniri ve 10 tereyağı) 49’unun (%70) 10 - 388 ng/kg aralığında AFM1 içerdiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar 40 - 70 ng/kg düzeylerinde toksin içerdiğini belirledikleri 3 (%30) tereyağı örneğinin 2’sinin 50 ng/kg’ın üzerinde çıktığını göstermişlerdir (77).

Bakırcı (66) Van’da yaptığı çalışma kapsamına dahil ettiği 183 süt ve süt ürünü örnekleri arasında ince tabaka kromatografisi tekniği ile analiz ettiği tereyağı ve kaymak örneğinin hepsinde AFM1 saptadığını, ancak tereyağı örneklerindeki mevcut AFM1’in 50 ng/kg’ın altında kaldığını vurgulamıştır ve bu durumu; AFM1’in kimyasal yapısı ve kazeine olan affinitesi ile ilişkilendirmiştir.

Aksoy ve ark. (89) Karadeniz bölgesinde topladıkları 40 adet tereyağı örneğinde AFM1 varlığını belirlenmesinde ELISA ve HPLC yöntemi kullanmışlardır. Araştırmacılar analiz ettikleri tereyağı örneklerinin hiç birinde AFM1 tespit edilmediğini ve AFM1 tespitinde kullanılan HPLC metodunun doğrulayıcı ve hassas bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır.

Ayyıldız (90) tarafından yapılan bir çalışmada materyal olarak Türkiye’deki organik marketlerden toplanan 193 adet örnekte (44 adet UHT süt, 26 adet yoğurt, 54 adet peynir ve 32 adet tereyağı) ELISA metodu ile AFM1 analizi yapılmıştır. Araştırmacı toplamda örneklerin 107’sinde (%55) AFM1 tespit ederken tereyağı örneklerinde ise AFM1’e rastlanmadığını bildirmiştir. Benzer şekilde Demirer ve ark. (91) süt ve süt ürünlerinde yaptığı çalışma da analiz ettikleri toplam 22 adet tereyağı örneğinin hiçbirisinde AFM1 saptamadıklarını rapor etmişlerdir.

Maqbool ve ark. (92) tarafından Pakistan’da 21 adet taze süt, 10 adet yoğurt ve 10 adet tereyağından oluşan toplam 41 adet süt ürünü örneğinde ELISA tekniği ile AFM1 varlığı araştırılmıştır. Araştırmacılar tereyağında AFM1’in son derece düşük düzeylerde (0.007 µg/L) olduğunu rapor etmişlerdir.

Fallah (50) İran’daki marketlerden topladığı 298 süt ürünü örneğinde (91 pastörize süt, 72 beyaz peynir, 68 yoğurt ve 31 tereyağı) ince tabaka kromatografisi tekniği ile 203 ürünün (%68) AFM1 içerdiğini tespit etmiştir. Pozitif çıkan numune sayısının 8 (%25) olduğunu ve üç adet (%9.6) tereyağı örneğinin legal sınırları aştığını bildirmiştir.

Sakuma ve ark. (93) Japonya’da süpermarketlerden topladıkları 60 peynir ve 30 tereyağından oluşan toplam 90 örnekte HPLC tekniği ile AFM1 varlığına bakmış ancak inceledikleri örneklerin hiçbirinde AFM1 tespit etmediklerini yayımlamışlardır.

Ashraf (94) Sudi Arabistan’da satışa sunulan 132 tereyağı örneğinde ELISA tekniği ile yaptıkları AFM1 analizinde 94 (%71.2) örneğin AFM1 ile kontamine olduğunu belirlemiştir. Araştırmacı kontamine tereyağı örneğinin 4’ünde (%3) AFM1 düzeyinin maksimum kabul edilebilir değerden fazla olduğunu rapor etmiştir.

Daha önce yapılan araştırmalar (72, 74,75, 89-93) ile bu çalışma arasındaki farklılıklar, örneklerin alındığı mevsim ve coğrafik koşullardan kaynaklanabilir (50, 66, 68). Süt ve süt ürünlerinde AFM1 varlığı ve düzeyleri ve coğrafik koşullardan ve mevsimsel değişikliklerden etkilenmektedir (31, 66). İlkbahar ve yaz mevsiminde merada taze otlarla beslenen hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünleri kışın kapalı alanda kesif yemle beslenen hayvanlardan elde edilenlere göre daha düşük düzeyde AFM1 içerdiği bildirilmiştir (31, 60, 66-68). Bu çalışmada incelenen örneklerin sonbahar ve kış aylarında toplanmış olması, bu dönemde analiz edilen tereyağı örneklerinin tamamında belirlenebilen minimum sınırların üzerinde AFM1 belirlenmesinin sebebi olarak gösterilebilir. Bunlara ilaveten sonuçlar arasındaki çeşitlilik, tereyağı yapımında kullanılan sütlerdeki AFM1 düzeyleri ve tereyağı yapım yöntemlerindeki farklılıklardan, AFM1 analizinde kullanılan metotlardaki farklılıklardan (50, 66), mandra ve satış yapılan yerlerdeki hijyen durumu ve saklama koşullarındaki farklılıklar kaynaklanabilir (4, 74, 75).

Bu çalışmada incelenen kaymak örneklerin belirlenebilir düzeyde AFM1 bulunmuştur fakat örneklerin hiçbirisinde AFM1 konsantrasyonu 50 ng/kg’ın üzerinde olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında konu ile ilgili sadece Bakırcı (66) incelediği süt ve süt ürünlerinden tereyağı ve kaymaktan çok düşük düzeylerde AFM1 belirlemiştir. Bu çalışma da elde edilen sonucun aksine, araştırmacı analiz ettiği örnekler arasında kaymak örneklerinin süttten çok daha az fakat tereyağından biraz fazla oranda toksin içerdiğini saptamıştır. AFM1’in kimyasal yapısı (yarı polar, su bazlı) ve kazeine affinitesi ve protein fraksiyonlarına adsorbe olması düşünüldüğünde kaymakta tereyağına göre daha yüksek düzeylerde olduğu bilinmektedir (66). Bu durum kaymak ve tereyağı

örneklerinin yapımında kullanılan sütlerdeki AFM1 düzeylerindeki farklılıklarla, açıklanabilir.

Süt ve süt ürünlerinde, tüketici sağlığını korumak için AFM1 kontaminasyonunun önlenmesinde hayvan beslenmesinde kullanılan bitkilerde küf gelişiminin ya da yemlere depolama esnasında aflatoksinleri bulaşmasını engellemek veya en alt düzeye çekmek için gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir (75, 90). Hayvan sahiplerine, küflenmiş besin maddelerini hayvanlarına yedirmeleri sonucunda, karşılaşılabilecekleri ekonomik kayıpları hakkında bilgi verilmelidir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Kayseri’de satışa sunulan tereyağı ve kaymak örneklerinin belirlenebilen düzeylerde AFM1 ile kontamine oldukları ortaya çıkarıldı. Analiz edilen örneklerden sadece birinin AFM1 içeriği yasal sınırların üzerinde çıkmış olsa da söz konusu örneğin tereyağı olması ve AFM1 kimyasal yapısı göz önüne alındığında halk sağlığı açısından göz ardı edilemeyecek bir öneme sahip olduğu görülmektedir. Dolayısı ile ülkemizde süt, peynir, yoğurt gibi tereyağı ve kaymaklarda Aflatoksin açısından önemli bir sağlık sorunu olabileceği kanısına varılmıştır. Tereyağı örneklerinin AFM1 seviyesi, tereyağı üretimi için kullanılan sütteki aflatoksin konsantrasyonu ve diğer ilgili faktörlerle yakından ilişkilidir. Dolayısıyla, yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi çok önemlidir. Bulaşmayı önleme, süt ve süt ürünlerinin insan tüketimi için güvenliğini sağlamanın tek pratik yoludur. Bu nedenle, tereyağı ve kaymakların sağlıklı ham maddelerden üretilmesi ve aflatoksin oluşumunu önlemek için uygun koşullarda muhafaza edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu amaçla, tereyağı ve kaymak AFM1 miktarının minimum düzeylerde tutulabilmesi için, mandralarda ve süt işletmelerinde yağ yapımında kullanılan sütlerde AFM1 analizlerinin yapılması, depolama ve satış yerlerinin hijyenik durumlarının düzenli olarak kontrol edilmelidir. Bunlara ilaveten çiftçilere, işletmecilere ve tüketicilere resmi kurumlar tarafından aflatoksinler hakkında düzenli eğitimler verilerek bilinçlendirilmesi halk sağlığının korunmasında en önemli ve en ekonomik çözüm yolu olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Whitlow LW, Hagler JrWM. Mycotoxins in feeds. Feedstuffs 2002; 74(28):1-10.
2. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3):497-516.
3. Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. J Food Protect 1982; 45(8):752-777.
4. Wiseman DW, Marth EH. Behaviour of Aflatoxin M1 During Manufacture and Storage of Queso Blanco and Bakers' Cheese. J Food Protect 1983; 46(10): 910-913.
5. Herzallah SM. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. Food Chem 2009; 114 (3): 1141-1146.
6. Dragacci S, Glezies E, Fremy JM, Candlish AAG. Use of immuno affinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. Food Add and Cont 1995; 12(1): 59-65.
7. Metin M. Süt Teknolojisi-Sütün Bileşimi ve İşlenmesi (Yedinci Baskı). Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayın No: 33, 2008; 802 s.
8. Akalın AS, Tokuşoğlu Ö, Gönç S, Ökten S. Detection of biologically active isomers of conjugated linoleic acid in kaymak. Grasas Y Aceites, 2005; 56 (4): 298-302.
9. Tekinsen OC, Tekinsen KK. Süt ve Süt Ürünleri: Temel Bilgiler, Teknoloji, Kalite Kontrolü, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2005.
10. Seçkin AK, Gürsoy O, Kinik O, Akbulut N. Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products. LWT 2005; 38(8): 909-915.

11. Baker RL, Brown RL, Chen ZY, Cleveland TE, Fakhoury AM. A maize trypsin inhibitor (ZmTIp) with limited activity against *Aspergillus flavus*. Department of plant, soil and agricultural systems, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois 62901, USA. *J Food Prot* 2009; 72 (1):185-188.
12. Andrade PD, De Mello MH, França JA, Caldas ED. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2013; 30(1): 127-136.
13. Steyn PS, Stander MA. Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin, In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM. eds *General and Applied Toxicology*, 2nd Edition. United Kingdom: Macmillan Reference Ltd. 1999; 2145-2176.
14. Tunail N. Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Ankara, 2000; 81-184(3): 522 s.
15. Dohlman E. Mycotoxin Hazards and Regulations: Impacts on Food and Animal Feed Crop Trade,” *International Trade and Food Safety: Economic Theory and Case Studies*, Jean Buzby (editor), Agricultural Economic Report 828. USDA ERS, 2003: 97-108.
16. Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (3rd Ed.) American Public Health Association, Edwards Brothers, Ann Arbor ISBN: 0-87553-173-3, 1992: 239-245.
17. Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE, Marth EH. Physical, Chemical and Biological Degradation of Mycotoxins in Foods and Agricultural Commodities. *J Food Prot* 1982; 45(10): 964-971.
18. Coulombe AR. Biological action of mycotoxins. *J Dairy Sci*, 1993; 76(3): 880-891.

19. Van Egmond HP. Aflatoxin M1: Occurrence, toxicity, regulation. In: Van Egmond HP (Ed.), *Mycotoxins in Dairy Products*, London, 1989: 11-49.
20. Ueno Y. The toxicology of mycotoxins. *CRC Crit Rev Toxicol* 1985; 14(2):99-132.
21. Ominsk K, Marquardi RR, Sinha RN, Abramson D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. İçinde JD Miler and HL Trenholm St. Paul Minnesota, *Mycotoxins in grains: Compounds other than aflatoxins*. Eagan Press, USA, 1994: 287-314.
22. Abramson D, Mills JT, Marquardt RR, Frohlich AA. Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from Western Canada 1982-1994. *Can J Vet Res* 1997; 61:49-52.
23. Yiannikouris A, Jouany JP. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim Res* 2002;51:81-99.
24. Scott PM. Analysis of oil seeds, fats and fatty foods, JB Rossell ve JLR Pritchard (Eds.), Elsevier Applied Science, London, 1991.
25. Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ* 1999; 77(9):754-766.
26. EC, Commission Regulation (EC) No.1525/98 of July 1998, Amending Regulation (EC) No.194/97 of 31 Jan. 1997, Setting Maximum Levels For Certain Contaminants in FoodStuffs. *Official Journal of The European Communities*, 1998.
27. Siddappa V, Nanjegowda DK, Viswanath P. Occurrence of aflatoxin M(1) in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu, *Food Chem Toxicol* 2012; 50(11): 4158-4162.
28. Jackson PE, Groopman JD. Aflatoxin and liver cancer. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1999; 13(4): 545-555.

29. Creppy EE. Update of survey regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127(1-3): 19-28.
30. Barbieri G, Bergamini C, Ori E, Pesca P. Aflatoksin M1 in parmesan cheese: HPLC determination. *J Food Sci* 1994; 59(6): 1313-1331.
31. Galvano F, Galofaro V, Galvano G. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *J Food Prot* 1996; 59:1079-1090.
32. Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update review. *Rev Med Vet* 1998; 149:479-492.
33. Bankole AS, Adebajo A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *Afr J Biotechnol* 2003; 2(9): 254-263.
34. Karakaya Y, Atasever M. Mısır silajında aflatoksin B1 varlığının ve süte geçme durumunun araştırılması. *Kafkas Üni Vet Fak Derg* 2010; (16): 123-127.
35. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit Contam* 2000;17(10): 871-874.
36. Bbosa GS, Kitya D, Odda J, Ogwal-Okeng J. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health* 2013;5(10A): 14-34.
37. Akdemir Ç, Altıntaş A. Ankara’da işlenen sütlerde aflatoksin M1 varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. *Ankara Üni Vet Fak Derg* 2004; 51: 175-179.
38. Dini A, Khazaeli P, Roohbakhsh A, et al. Aflatoxin contamination level in Iran’s pistachio nut during years 2009-2011. *Food Control* 2013; 30(2): 540-544.
39. Ruadrew S, Craft J, Aidoo K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 653-658.

40. Groopman JD, Hall AJ, Whittle H, et al. Molecular dosimetry of aflatoxin-N7-guanine in human urine Obtained in the Gambia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1 (3): 221-227.
41. Özkaya G, Temiz A. Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg* 2003; 1(1): 1-21.
42. Verma RJ. Aflatoxin cause DNA damage. *Int J Hum Genet* 2004; 4(4): 231-236.
43. Agag BI. Mycotoxins in foods and feeds. *Ass Univ Bull Environ Res* 2004; 7(1): 173-205.
44. Moss MO. Recent studies of mycotoxins. *J Appl Microbiol Symp Suppl* 1998; 84:62S-76S.
45. Goldman R, Shields PG. Food Mutagens. *J Nutr* 2003;133 (3):965-973.
46. Özkaya S, Temiz A. Aflatoksinler: kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 2003; 1:1-21.
47. D'Mello JPF, Macdonald AMC. Mycotoxins. *Anim Feed Sci Techno* 1997; 69: 155-166.
48. Caloni F, Stammati A, Friggè, Angelis ID. Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. *Toxicon* 2006; 47 (4): 409-415.
49. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(5): 1106-1122.
50. Fallah AA. Aflatoxin M1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control* 2010; 21(11): 1478-1481.
51. Stroka J, Anklam E. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. *Trends in analytical chemistry* 2002; 21(2): 90-95.

52. Mutlu A, Kusun O, Kasımoğlu A, Dukel M. Determination of aflatoxin M₁ levels and antibiotic residues in the traditional Turkish desserts and ice creams consumed in Burdur city center. *J Anim Vet Adv* 2010; 9(15): 2035-2037.
53. Lynch P.G. Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. *J Dairy Sci* 1972; 55(9):1243-1255.
54. Veldman A, Meijst JAC, Borggreve GJ, Heeres JJ. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim Prod* 1992; 55(2): 163-168.
55. Diaz DE, Hagler Jr WM, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA. Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 2004; 157(2):233-241.
56. Kaniou-Grigoriadou I, Eleftheriadou A, Mouratidou T, Katikou P. Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control* 2005; 16(3): 257-261.
57. López C, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L, Perez J. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int J Food Microbiol* 2001; 64(1-4): 211-215.
58. Anonim. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, 2011/63.
59. Stroka J, Anklam E. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. *Trends Analyt Chem* 2002; 21(2): 90-95.
60. Nakajima M, Tabata S, Akiyama H, et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in domestic milk in Japan during the winter season. *Food Addit Contam* 2004; 21 (5): 472-478.
61. Uchigashima M, Saigusa M, Yamashita H, et al. Development of a novel immunoassay column for aflatoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody. *J Agric Food Chem* 2009; 57(19):8728-8734.

62. Dashti B, Al-Hamli S, Alomirah H, et al. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control* 2009; 20 (7): 686-690.
63. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(5): 984-991.
64. Nuryono N, Agus A, Wedhastri S, Maryudani YB, et al. A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. *Food Control* 2009; 20(8): 721-724.
65. Oveisi MR, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Nikzad A. Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control* 2007;18(10): 1216-1218.
66. Bakırcı I. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 200; 12(1): 47-51.
67. Fallah AA, Rahnema M, Jafari T, Saei-Dehkordi SS. Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control* 2011; 22(10):1653-1656.
68. Sarımehtetoğlu B, Kuplulu Ö, Çelik TH. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control* 2004; 15(1): 45-49.
69. Kireççi E, Savaşçı M, Ayyıldız A. Detection of Aflatoksin M1 in milk and cheese products consumed in Sarıkamış, Türkiye. *Turkish J Infect* 2007; 21 (2): 93-96.
70. Ertaş N, Gönülalan Z, Yıldırım Y, Karadal F. a survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control* 2011; 22(12): 1956-1959.
71. Zerfiridis G. Potential aflatoxin hazards to human health from direct mold growth on Teleme Cheese. *J Dairy Sci* 1984; 68(9): 2184-2188.

72. Ayçiçek H, Yarsan E, Sarımeahmetoğlu B, Çakmak Ö. Aflatoxin M1 in white cheese and butter consumed in Istanbul, Turkey. *Vet Human Toxicol* 2002; 44(5):295-296.
73. Ayçiçek H, Aksoy A, Saygı S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control* 2005;16(3): 263-266.
74. Aydemir AM, Adıgüzel G, Atasever M, Ozturan K. Determination of aflatoxin M1 level in butter samples consumed in Erzurum, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16 (Suppl-A): 159-162.
75. Tekinsen KK, Ucar G. Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. *Food Control* 2008;19(1):27-30.
76. Koçsarı FS, Taşcı F, Mor F. Survey of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Burdur, Turkey. *Int J Dairy Technol* 2012; 65(3): 365-371.
77. Var I, Kabak B. Detection of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Adana, Turkey. *Int J Dairy Technol* 2008; 62: 15-18.
78. Dereli Z, Şefik R. Modifiye Atmosferde Paketlenerek Depolanan Afyon Kaymağında Oluşan Kimyasal Değişimler. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2011;6 (2): 1-8.
79. Anonim. Türk Gıda Kodeksi Krema ve Kaymak Tebliği R.Gazete 06.02.2009-27133.
80. Anonim. Tereyağı Standardı (TS-1331) Türk Standartları Enstitüsü, Ankara 1995.
81. Anonim. Türk Gıda Kodeksi Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tebliğ No: 2005/19.
82. Trucksess MW. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds, In: WJ de Koe, RA Samson, HP Van Egmond, J Gilbert & M Sabino (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. 2001: 29-40

83. Ünlütürk A, Turantaş F. Gıda Mikrobiyolojisi (Birinci Baskı), Mengi Tan Basımevi, İzmir, 1999; ISBN: 975-483-383-4: 189, 573-578.
84. Duncan HE, Hagler WM. Aflatoxins and other mycotoxins. National Corn Handbook, 1989.
85. Huwig A, Freimund S, Käppli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicol Lett 2001; 122:179-188.
86. R-Biopharm GmbH. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins. Ridacreen Aflatoxin M1 Art. No: R-1121, Darmstadt, Germany, 2015.
87. Özbek E. Marmara bölgesi askeri birliklerinde tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M1 düzeylerinin belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Vet Fak, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 2006
88. Khaniki RJ. Chemical contaminants in milk and public health concerns: A review. Int J Dairy Sci 2007; 2(2): 104-115.
89. Aksoy A, Atmaca E, Yazıcı F, Güvenç D, Gül O, Dervişoğlu M. Tereyağlarında aflatoksin M1 düzeylerinin ELISA ve HPLC ile karşılaştırmalı analizi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2016; 22 (4): 619-621.
90. Ayyıldız T. Organik Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M1 varlığının araştırılması. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012.
91. Demirer MA. Süt ve süt mamüllerinde aflatoksin M1 ve B1 aranması üzerinde araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1973; 1: 421- 443.
92. Maqbool U, Anwar-Ul-Haq, Ahmad M. ELISA determination of aflatoxin M1 in milk and dairy products in Pakistan. Toxicol Environ Chem 2009; 91(2):241-249.
93. Sakuma S, Kamata H, Sugita-Konishi Y, Kawakami H. Method for determination of aflatoxin M1 in cheese and butter by HPLC using an immunoaffinity column. Food Hyg Saf Sci 2011; 52(4): 220-225.
94. Ashraf MW. Determination of aflatoxin levels in some dairy food products and dry nuts consumed in Saudi Arabia. Food and Public Health 2012; 2(1): 39-42.

ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Nuri Aydın ÖZKAN
2. Doğum Tarihi : 20.04.1987
3. Doğum Yeri : Ankara
4. Unvanı : Veteriner Hekim
5. Medeni Durumu : Bekar
6. İş Tecrübesi : Serbest Hekim (2014-2016), Seben Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü Veteriner Hekim (2016-)
7. Yabancı Dil : İngilizce

1. Öğrenim Durumu:

Derece	Üniversite	Fakülte	Yıl
Lisans	Erciyes	Veteriner	2007-2012
Y. Lisans	Erciyes	Sağlık Bilim. Enst.Veteriner Gıda Hij. Ve Tek.	2013-

Adres : Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü Seben-BOLU
Tel : 0542 584 64 92
E-mail : nuriaydinozkan@gmail.com