

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

**KAYSERİ YÖRESİ MANDA YOĞURTLARINDA AFLATOKSİN M1'İN
PREVALANSI**

Proje No: TYL-2013-4407

Proje Türü

Yüksek Lisans Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Adı Soyadı

Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD

Araştırmacının Adı Soyadı

Okan KAYALAP

Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD

Aralık 2013

KAYSERİ

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

**KAYSERİ YÖRESİ MANDA YOĞURTLARINDA AFLATOKSİN
M1'İN PREVALANSI**

**Hazırlayan
Okan KAYAALP**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2013
KAYSERİ**

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

KAYSERİ YÖRESİ MANDA YOĞURTLARINDA AFLATOKSİN
M1'İN PREVALANSI

Hazırlayan
Okan KAYAALP

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2013-4407 no'lu proje ile desteklenmiştir

Aralık 2013
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 gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı- Soyadı: Okan KAYAALP

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kayseri Yöresi Manda Yoğurtlarında Aflatoksin M1’in Prevalansı” adlı **Yüksek Lisans tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Okan KAYAALP

Danışman

Yrd. Doç. Dr Nurhan ERTAŞ

Veteriner Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD Başkanı V.

Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ danışmanlığında **Okan KAYAALP** tarafından hazırlanan “**Kayseri Yöresi Manda Yoğurtlarında Aflatoksin M1’in Prevalansı**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

20/12/2013

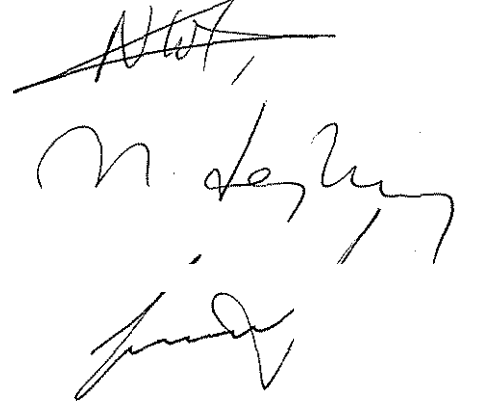
JÜRİ:

Danışman:Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

Üye: Prof Dr. Yusuf DOĞRUER

Üye: Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

İMZA



ONAY:

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

...../...../.....

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı öğretim üyesi danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ'a, Anabilim dalı Başkanı Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, çalışmam sırasında analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Araştırma görevlisi Serhat AL'a, tez projesini TSD-12-4119 proje koduyla maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yetkililerine, çalışmalarım sırasında ve ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Okan KAYAALP
Kayseri, Aralık 2013

KAYSERİ YÖRESİ MANDA YOĞURTLARINDA AFLATOKSİN M₁'İN PREVALANSI

Okan KAYAALP

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Yüksek Lisans, Aralık, 2013

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

KISA ÖZET

Bu çalışmanın amacı Kayseri ilinde tüketime sunulan manda yoğurtlarında Aflatoksin M₁ (AFM₁) varlığını incelemektir. Bu çalışmada toplam 100 manda yoğurdu örneği incelendi. Örneklerdeki AFM₁ düzeylerini belirlemek için Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tekniği kullanıldı. Çalışmada, analiz edilen 100 yoğurt örneğinin tamamında (%100) AFM₁ tespit edildi ve sadece 7 (%7) manda yoğurdu örneğinde AFM₁ düzeyi Türk Gıda Kodeksinde belirtilen yasal limitlerin üzerinde idi (50 ng/kg). İncelenen örneklerin 36'sının (% 36) 2,7- 10 ng/kg, 14'ünün (% 14) 10-25 ng/kg arasında, 43'ünün (% 43) ise 25-50 ng/kg aralığında AFM₁ içerdiği belirlendi. Bu çalışma sonucunda, Kayseri ilinde satılan manda yoğurtlarında AFM₁ varlığının halk sağlığı için potansiyel bir tehlike olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Aflatoxin M₁, ELISA, Kayseri, manda yoğurdu

PREVALANCE OF AFLATOXIN M₁ IN WATER BUFFALO YOGHURT IN KAYSERI

Okan KAYALAP

Erciyes University, Institue of Health Sciences

Department of Veterinary Food Hygiene and Technology

Master Thesis, December, 2013

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Nurhan ERTAŞ

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the presence of aflatoxin M₁ (AFM₁) in water buffalo yoghurt samples in Kayseri /Turkey. ELISA test was used to determine Aflatoxin M₁ levels of 100 samples collected. Aflatoxin M₁ were found in all samples analyzed (100 %) . Only 7 (7%) of yoghurt samples were found contaminated at levels above the legal limits (50 ng/kg). AFM₁ level of the samples were ranging from 2.70 to 79.27 ng/kg. AFM₁ was detected in 36 (%36) samples ranging from 2.7 to 10 ng/kg, in 14 samples (% 14) from 10 to 25 and in 43 samples (%43) from 25 to 50 ng/kg. It is concluded that the presence of AFM₁ in water buffalo yoghurt retailed in Kayseri may be regarded as a potential hazard for human health.

Keywords: Aflatoxin M₁, ELISA, Kayseri, water buffalo yoghurt

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	iv
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	v
ONAY.	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
KISA ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR	xi
TABLolar VE ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	13
2.GENEL BİLGİLER.....	15
2.1.TARİHÇE.....	15
2.2.MİKOTOKSİNLER	16
2.3.AFLATOKSİNLER.....	17
2.3.1. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri	17
2.3.2. Aflatoksinlerin Etkileri.....	19
2.3.3. Aflatoksinlerle Kontamine Gıdalar.....	13
2.3.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin	27
2.3.5. Mikotoksinlerin Belirlenmesi.....	28
2.3.6. Mikotoksinlerin Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. GEREÇ.....	31
3.1.1. Numuneler	31
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Araç Gereç, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	31
3.2. YÖNTEM	32
3.2.1. Manda Yoğurdu Numunelerinden AFM ₁ Ekstraksiyonu	32
3.2.2. Enzim İmmunoassay (ELISA) Prosedürü.....	32
3.2.3. Test Prosedürü.	33
3.2.4. Sonuçların Değerlendirilmesi.	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
6. KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

AFB	Aflatoksin B
AFG	Aflatoksin G
AFM	Aflatoksin M
ATA	Alimentary Toxic Aleukia
CV	Coefficient of variation
ELISA	Enzym Linked Immuno Assay
GSH	Glutasyon
HPLC	Yüksek basınçlı likit kromatografi
PBS	Fosfat Buffer Solüsyon
RIA	Florometrik metod, radioimmunoassay
R_f	Rate of flow
SS	Standart Sapma
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

TABLÖLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 2.1.	Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler	5
Tablo 2.2.	Bazı mikotoksinlerin çeşitli etkileri ve neden oldukları hastalıklar özetlenmiştir.....	12
Tablo 2.3.	Türk Gıda Kodeksine göre gıdalarda aflatoksinlere ait yasal limit değerler (Anonymous 1990 Anonymous 1991).....	14
Tablo 4.1.	Çalışmada kullanılan standartların 450 nm de okunan absorbnslarına göre elde edilen referans aralıkları	23
Tablo 4.2.	Çalışmada incelenen manda yoğurdu örneklerinde ortalama AFM ₁ düzeyleri	24
Tablo 4.3.	Çalışmada incelenen yoğurt örneklerinin AFM ₁ miktarları (ng/kg) ve yüzde oranları.....	24
Şekil 2.1.	Aflatoksin Türevlerinin Kimyasal Yapıları	7
Şekil.2.2.	Aflatoksin B ₁ 'in vücuttaki metabolizması	9
Şekil 4.1.	Çalışmada standartların absorban değerlerine göre elde edilen konsantrasyon eğrisi	22
Şekil 4.2.	Çalışmada incelenen yoğurt örneklerinin AFM ₁ miktarlarının Türk Gıda Kodeksi limit değerine göre kıyaslanması.....	24

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gıdalarda üreyebilen ve bunların tüketilmesi ile vücuda alınan küfler ve oluşturdıkları toksik metabolitler (mikotoksinler) günümüzde önemli bir araştırma konusudur. Küfler uygun koşullarda gıdalarda üreyerek ürünün niceliğini ve niteliğini değiştirerek bozulmasına neden olurken diğer yandan insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen ve tehdit eden; teratojenik, karsinojenik ve mutajenik etkili toksik maddeler oluştururlar (1, 2).

Yoğurt kolay sindirimi ve yüksek besin değeriyle, ülkemizde tüketilen süt ürünleri arasında önemli bir yer edinmiştir (3). Yoğurt tüketiminin fazla olduğu Ortadoğu ve Akdeniz ülkelerinde yoğurdun çoğunlukla aile tipi ürün olarak evde, buna karşın Avrupa ülkelerinde ise daha çok ticari olarak üretildiği bildirilmektedir (4). Türkiye’de manda yetiştiriciliği yapan işletmeler geleneksel aile tipinde olup % 83’ü küçük ölçeklidir. Yoğurt üretimi genellikle evlerde ve geleneksel yöntemlerle yapılmaktadır (5). Protein, karbonhidrat, yağ ve mineral madde açısından inek sütünden daha zengin olan manda sütü ile yapılan yoğurtların besleyici değerinin daha yüksek, ayrıca manda yoğurdunun daha kıvamlı, aromatik ve kolay sindirilebilir olduğu belirtilmektedir (6,7).

Mikotoksinler içinde dünyada en çok bilinen ve en fazla araştırılan mikotoksin aflatoksindir. Aflatoksinler, başta *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* ve ayrıca bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri tarafından sentezlenen toksik metabolitlerdir. Belirlenmiş 13 tür aflatoksin

vardır. Gıdalarda bu türlerden beş tanesine rastlanmaktadır. İnsan ve hayvanlarda akut, kronik zehirlenmelere neden olan bu metabolitler, aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ve M₁'dir. Aflatoksin B₁ ile kontamine olmuş yemlerle beslenen süt hayvanlarında, yemde bulunan Aflatoksin B₁ metabolize olarak Aflatoksin M₁'e dönüşür. Oluşan Aflatoksin M₁ daha sonra süt bezleri ile süte salgılanır. Süte geçen toksin, pastörizasyon gibi ısı işlemlere son derece dayanıklıdır. Bu sebeple hemen hemen her gün raflarda gördüğümüz bütün süt ve süt ürünlerinde özellikle de peynir ve yoğurtta Aflatoksin M₁ kontaminasyonu görüldüğü bildirilmektedir. (8-10).

Aflatoksin türevleri içinde toksik ve kanser yapıcı etkisi en fazla olan Aflatoksin B₁ (AFB₁)'dir (11). AFB₁ ile bulaşık yemleri tüketen çiftlik hayvanları, yemlerdeki AFB₁'i metabolize ederek AFM₁ şeklinde sütleri ile atmaktadırlar ve dolayısıyla kontamine süt ve süt ürünleri hayvan ve halk sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır.

AFM₁ mikroorganizma kaynaklı, başta karaciğer olmak üzere bir çok organda ciddi hastalık semptomlarına ve kansere neden olan önemli bir halk sağlığı sorunu olması dolayısı ile araştırma bölge insanının halk sağlığı bakımından da önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, Kayseri ili ve ilçelerinde sıklıkla tüketilen manda yoğurdu örneklerinde AFM₁ düzeylerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Mikotoksinler; filamentöz yapıdaki çeşitli mantar türlerinin sekonder metabolizması sonucunda oluşan ve insan ve hayvanlarda latent, akut veya kronik zehirlenmelere neden olan düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip toksik metabolitlerdir (11-14). Mikotoksin üreten funguslar (küfler) dünyanın her tarafında yaygın olarak bulunurlar. Heterotrofik tabiata sahip olmaları nedeniyle çok farklı çevresel koşullara kolayca adapte olup hemen hemen her türlü gıda niteliği taşıyan organik maddede gelişebilmektedirler (14-16). Mikotoksin üreten en önemli türler; *Deuteromycota (Fungi imperfecti)* içinde *Hypomycetes* sınıfında yer alan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine giren üyelerdir (17).

2.1. TARİHÇE

Mikotoksinlerin varlığına ilişkin ilk bilgiler yaklaşık 5000 yıl öncesine ait, Çinlilerin ergot ve mantar zehirlenmelerine ait kayıtlarıdır. Fransa'nın Paris şehrinde 1843 yılında askeri birlikte tüketilen küflü karavanaya bağlı zehirlenme, 1861 yılında Rusya'da yaşanan zehirlenme olayları ve 1891 yılında Japonya'da küflü pirinç yenilmesine bağlı zehirlenmeler, bildirilen ilk mikotoksikozis vakalarından bazılarıdır (18). Mikotoksikozisten sorumlu bir ajana ilişkin ilk çalışma, 1960 yılında İngiltere'de, 100.000'den fazla hindi palazının, Brezilya'dan ithal edilen yer fıstıklarının tüketmesi sonucu ölmeleri ile başlamıştır. Yapılan otopsiler sonucunda ölen hindi palazlarında karaciğer nekrozu ve safra kanalı hiperplazisi görülmüştür. Önceleri, hindi palazlarındaki ani ölümlerin sebebi anlaşılamamış ve hastalığa "hindi X hastalığı" ismi verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, yer fıstıklarından *Aspergillus flavus* adı verilen toksijenik bir mantar türü izole edilmiş ve sonraları ince tabaka kromatografi yöntemi ile yemlerin analizleri neticesinde bir dizi floresan bileşikler ortaya çıkarılmıştır. Aflatoksin adı verilen bu bileşikler ani ölümlerin sorumlusu olarak gösterilmiştir (12,13,15,17,19,20).

1928 yılında Almanya ve İskandinav ülkelerinde domuzlarda nefropati belirlenmiş, Yugoslavya, Bulgaristan, Romanya gibi ülkelerde ortaya çıkan Balkan nefropatisinin nedeninin de böbrek hastalığına neden olan ve *Aspergillus ochraceus* tarafından oluşturulan klor içeren izokumarin yapısındaki okratoksin A olduğu çok daha sonra anlaşılmıştır. 1942-1944 yılları arasında Rusya'nın Orenburg bölgesinde binlerce insanın ölümü ile sonuçlanan mikotoksikozis olayı "Alimentary Toxic Aleukia, ATA" (beslenmeye bağlı toksik etki ile kanda lökosit sayısının düşmesi sonucu oluşan lösemi) olarak tarihe geçmiştir. Bu büyük yıkıma, savaş nedeniyle zorunlu olarak tarlada kışlatılan tahılların yol açtığı anlaşılmıştır (17).

2.2. MİKOTOKSİNLER

Mikotoksinlerin sınıflandırılması farklı kimyasal yapılara sahip olmaları, biyosentetik orijinlerinin, biyolojik etkilerinin, sentezleyen türlerinin çeşitlilik göstermesi dolayısı ile oldukça güçtür ve sınıflandırmayı yapan kişiye göre farklılıklar gösterebilmektedir. Mikotoksinler etki yerlerine göre, hepatotoksinler, nefrotoksinler, nörotoksinler, immunotoksinler şeklinde sınıflandırılabilirken, jenerik özelliklerine göre teratojenler, mutajenler, karsinojenler ve allerjenler, organik yapılarına göre laktonlar ve kumarinler, biyosentetik orijinlere göre poliketidler ve aminoasit deriveleri, oluşturduğu hastalık tablosuna göre Saint Antonio ateşi, stachybothryotoksikozis ya da toksini oluşturan fungusun cinsine göre *Aspergillus*, *Penicillium* toksinleri olarak sınıflandırılabilirler. 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 (12,21-23). Tablo 2.1' de Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler belirtilmiştir (16,17).

Tablo 2.1. Gıda ve yemlerde görülen başlıca mikotoksin üreten cinsler ve ürettikleri mikotoksinler (16,17)

<i>Aspergillus</i> toksinleri	<i>Penicillium</i> toksinleri	<i>Fusarium</i> toksinleri	<i>Alternaria</i> Toksinleri
Aflatoksinler AFB ₁	Sitrinin Okratoksin A	Zearalenon (F-2 toksin)	Alternariol Alternariolmono-
AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂	Sitreoviridin Rubratoksin A Rubratoksin B	Trikotesenler Deoksinivalenol Nivalenol	metil-eter Alertoksin Tenuazonikasit
AFM ₁	Patulin	Diasetoksisirpenol	
AFM ₂	Penisilikasit	T-2 toksin	
AFB _{2a} AFG _{2a}	P-R (Pen. roqueforti)-toksin	HT-2 toksin Tremortin,	
AFB ₃	Luteosikrin	Fusarin-C	
Aspertoksin	İzlanditoksin	Fumonisin B1	
Sitrinin	Ksantosilin-X	Moniliformin	
Sterigmatosistin		Siklopiazonikasit	
Okratoksin A		Sitromisetin	
Patulin		Rugulosin	

Penisilikasit	Ksantomegnin
Rugulovasin A	
Rugulovasin B	
Verrukulotoksin	
Emodin	

2.3. AFLATOKSİNLER

Aflatoksin kelimesi, cins ismi olan *Aspergillus*'un ilk harfi "A" ile tür ismi *flavus*'un ilk üç harfi olan "FLA" harflerinin birleştirilmesi ve sonuna latince zehir anlamına gelen "TOKSİN" kelimesinin ilave edilmesi ile oluşturulmuştur (18). Aflatoksin filamentli funguslardan *Aspergillus* cinsine ait üç tür ve iki alt tür tarafından oluşturulur. Bunlar; *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, *Asp. nomius* türleri ve *Asp. flavus* var. *columnaris*, *Asp. parasiticus* var. *globosus* alt türleridir (16,19-21,24). Aflatoksinler oldukça yüksek karsinogenik, mutajenik özelliğe sahiptirler ve halk sağlığı açısından üzerinde önemle durulan ilk mikotoksik ajandır. Aflatoksin kontaminasyonu çoğunlukla sıcak ve rutubetli iklime sahip Afrika, Asya ve Güney Amerika ülkelerinde görülmekle birlikte, Kuzey Amerika ve Avrupa'da da yaygındır (17,25,26).

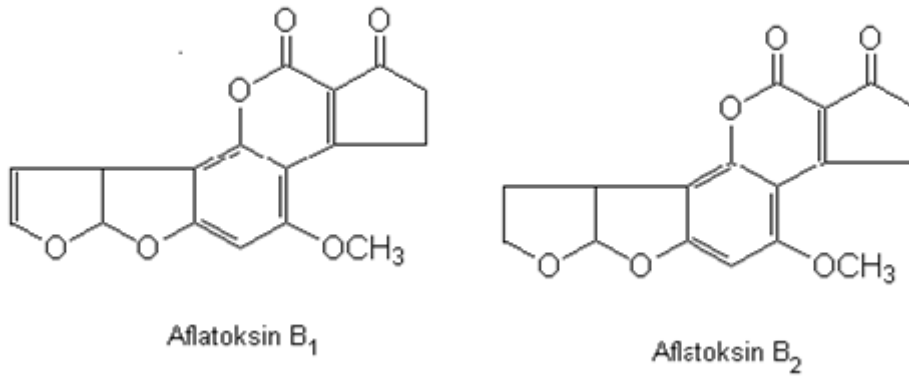
2.3.1. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri

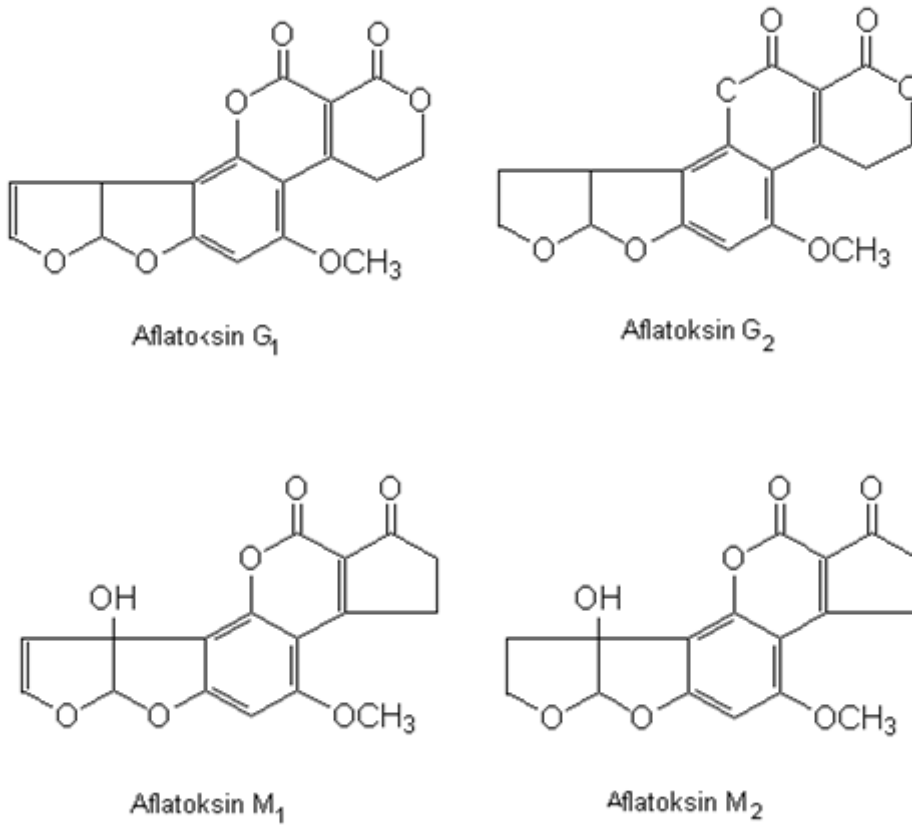
Aflatoksinler (AF) kimyasal olarak bifuran halkası ve lakton bağı içeren kumarin derivatlarıdır (12,17). Kimyasal yapıları önemli derecede farklılıklar göstermekle birlikte, hemen hepsi nispeten düşük molekül ağırlıklarına sahiptirler (27).

Aflatoksinler B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere başlıca dört ana fraksiyondan oluşmaktadır (12,20,21,28,29). Bu isimlendirme, ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boylu ultraviyole (UV) ışığı altında; mavi floresans verenler aflatoksin B₁ (AFB₁) ve AFB₂, yeşil floresans verenler ise AFG₁ ve AFG₂ olarak adlandırılır (12,21,29). AFB₁ ve AFB₂ içeren yemlerle beslenen ineklerde bu iki toksinin metabolize olması sonucunda OH içeren derivatlara dönüşürler. Bu derivatlar sütte salgılanması nedeniyle "milk toxin" yani süt toksininin kısaltılmış şekli olup "M" ile simgelenmiştir. Hayvan vücuduna alınan aflatoksinlerin büyük kısmı metabolize olur, idrar ve dışkı ile atılır. Vücuda alınan toksinlerin % 2 kadarı AFM₁ ve AFM₂'ye dönüşerek süte geçer (2,20,28,30). Toksinlere verilen rakamlar ise toksisite derecesini gösterir. 1 numara ile simgelenenler yüksek toksisiteyi, 2 numara ile gösterilenler daha düşük toksisiteyi ifade ederler (16,17,21,31). AFB₁'in AFM₁'e dönüşmesi,

karaciğer mikrozomal oksidaz sistemiyle olmaktadır. Sütteki AFM₁, vücuttaki AFB₁ molekülünün 4. karbon atomunun hidroksilasyonu sonucunda meydana gelmektedir. AFM₂ de, AFB₂ molekülünün 4. karbon atomunun hidroksilasyonu sonucunda oluşmaktadır. Sütte bulunan diğer M serisi aflatoksinler, Aflatoksin GM₁ (AFGM₁), Aflatoksin GM₂ (AFGM₂), Aflatoksin M_{2a} (AFM_{2a}) ve Aflatoksin GM_{2a} (AFGM_{2a})'dır. Bunlar da, AFG₁, AFG₂, AFB_{2a} ve AFG_{2a}'nın hidroksile olmuş derivatlarıdır (20,21,26). Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boylu UV ışığı altında mavi floresan verirler ve B toksinlerinden daha düşük Rate of flow (Rf) değerlerine sahip olmalarıyla ayrılırlar. Uzun dalga boyuna sahip UV ışığı altında göstermiş oldukları floresan formlarının farklı olması, aflatoksinlerin tayininde kullanılan birçok tekniğin temelini oluşturmaktadır (13,19,21,26).

AFM₁'in pastörizasyon işlemine olan dayanıklılığına ilişkin yapılan çok sayıdaki araştırmaya bağlı olarak, AFM₁'in silindir metodu ile süt tozu üretimi ve pastörizasyonu işlemlerinden etkilenmediği, ısıtma işlem uygulamasının süt proteinleri üzerindeki ve süt tuzlarının çözünürlüğü üzerinde oluşturduğu etkilere bağlı olarak AFM₁'in ekstraksiyonunda değişimlerin olabileceğini bildirilmiştir (32). Aflatoksinler suda az 10-30 µg/ml), metanol, kloroform gibi organik çözücüde kolay çözünürler. Isıya karşı stabildirler. Aflatoksin B₁, 268-269 °C ergime noktasında, renksiz kristaller oluşturur (17,21,31). Şekil 2.1'de Aflatoksin türevlerinin kimyasal yapıları belirtilmiştir.





Şekil 2.1. Aflatoksin Türevlerinin Kimyasal Yapıları (21)

2.3.2. Aflatoksinlerin Etkileri

Mikotoksin alımına bağlı olarak gelişen klinik tabloya “mikotoksikoz” denir. Ancak bu klinik tablo; tanımlanması oldukça güç olan ve bir veya çoğunlukla birden fazla hastalıkla karakterize bir durumdur. Mikotoksikozda görülen belirtilerin şiddeti, etkilerin, görülen hastalıkların tipi, genel olarak maruz kalınan mikotoksin türü, miktarı, birden fazla mikotoksin varlığının yanı sıra vücut ağırlığı, fiziksel ve beslenme durumu gibi kişisel özelliklere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir (2,16).

Aflatoksinler, akut toksik, immunosupresif, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkilere sahiptirler. Vücuda alınan aflatoksinin (özellikle AFB₁) neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden zehirlenme tablosu “aflatoksikoz” olarak isimlendirilir. Akut seyreden aflatoksikozta vücutun direkt etkilenen bölgesi karaciğerdir (25,27-29,33).

Kimyasal yapıda meydana gelen değişiklik, aflatoksinlerin biyolojik aktivitesinde de değişikliğe neden olmaktadır. Örneğin, AFB₁'in dihidro derivatı olan AFB₂, AFB₁'den daha az toksiktir. B grubu toksinlerde bulunan siklopentenon halkasının terminal 5 halkasında laktona olan değişim sonucunda G grubu toksinler meydana gelmektedir (21). Aflatoksin türevleri içinde toksik ve kanser yapıcı etkisi en fazla olan AFB₁ dir. Bunu azalan sırayla AFG₁, AFB₂, ve AFG₂ izler (12,13,19,28,29).

Dünya Sağlık Teşkilatı'na (WHO) bağlı Uluslar arası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) 1993 tarihinde, AFB₁, insan karsinojeni, AFM₁'in ise insanlar için muhtemel karsinojenik bileşik olduğunu bildirmiştir (34).

Aflatoksinlerin metabolik aktivasyonu sonucu toksik, karsinojenik ve mutajenik etkili metabolitler oluşur. AFB₁' in akut toksik etkisinden ziyade kronik dozlarla ortaya çıkan karaciğer kanserlerinin önemli olduğu düşünülmektedir. AFB₁, karaciğer mikrozomal sitokrom P450 enzimleri tarafından oksidasyonu sonucu, DNA ve proteinlere bağlanma yeteneğinde reaktif bir form olan AFB₁-8,9-epoksit formuna çevrilir. 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, bir çok türde AFB₁'in detoksifikasyonunda oldukça önemli bir yoldur (12,23,26,33,35,36). Aflatoksin B₁'in vücuttaki metabolizması Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

immunosupresif etkilere sahip olduğu hayvan denemeleriyle gösterilmiştir (8). Immunosupresif etkisi nedeniyle aflatoksin hayvanlarda çeşitli aşılara karşı iyi bir bağışıklık oluşmasını engellemekte, çeşitli enfeksiyonlara (Salmonellozis, Koksidiomikozis) karşı da direnci azaltmaktadır (17).

Aflatoksinlerin mikrozomal hidroksilasyon ve demetilasyon reaksiyonları sonucunda oluşan AFP₁ ve AFQ₁ metabolitleri, mutajenik aktivitesi AFB₁’den daha dūřuk olan metabolitlerdir. Bu nedenle bu reaksiyonlar, bir bakıma detoksifikasyon işlemi olarak kabul edilmektedir. Buna karşın; AFB₁ molekülündeki siklopentano halkasının NADPH’a bağımlı sitosolik enzimler tarafından hidroksillenmesiyle oluşan aflatoksikol metaboliti, AFB₁’e kısmen geri dōnūřümü nedeniyle detoksifiye bir metabolit olarak kabul edilmez (26,33).

İnsanların aflatoksine dođrudan maruz kalmaları, aflatoksinle bulařık gıda maddelerini tūketmek suretiyle sindirim yoluyla, ayrıca bulařık gıdalara temas sonucunda da deri ve solunum yoluyla olmaktadır. AFB₁ ile kontamine gıdaların tūketilmesi sonucu organizmaya alınan aflatoksin, plasenta aracılıđıyla (*transplacental yol*) ve emzirme yoluyla yeni dođanlara da tařınmaktadır (36). Aflatoksinlerin yūksək dozları karaciđer hasarına, bunu takiben akut řiddetli intoksikasyon ve ōlūme sebep olur. Kronik subletal dozlar ise beslenme bozukluklarına ve bağıřıklık sisteminin baskılanmasına neden olmaktadır (38). Vūcutta akūmūlasyon eđilimi olan aflatoksinler, uzun sūreli dūřuk miktarda alınması, kanser oluřumuna neden olabilmektedir (26,38).

Dūnyanın çeşitli bōlgelerinde aflatoksine bulaşık gıdalarla beslenen insanlarda karaciğer kanseri, siroz ve ōzellikle çocuklarda Reye’s Sendromu vakalarına rastlanmıştır. şiddetli malnutrisyon sendromu olan Kwashiorkor hastalığının da pediatrik aflatoksikozisin bir formu olduğu varsayılmaktadır (12,27).

Aflatoksinlere duyarlılık hayvan tūrū, cins, yař, cinsiyet, sağlık durumu, beslenme koşulları, alınan toksin miktarı ve sıklığı ile vūcuda alınış yoluna bağılı olarak değişmektedir (12,21). Domuz, hindi, ōrdek ve alabalıklar aflatoksine son derece duyarlı canlılar olarak bilinmektedirler. Broylerler, sayılan tūrlere gōre aflatoksine daha dirençli olmasına karşın, yumurtacı tavuklardan daha duyarlıdırlar (11).

Aflatoksinlerin yūksək dozlarda alınmaları neticesinde hayvanların çođunda gōzlenen akut aflatoksikozisin klinik bulguları; iřtah azalması, ađırlık kaybı, solunum gūçlūđū, burun akıntısı, durgunluk, bitkinlik, uyku hali (*letarji*), kansızlık, ōksūrūk, kanlı ishal, nōrolojik anormallikler, mukoz membranlarda sarılık, kapillar damar dayanıklılıđının azalması sonucu

doku ve organlarda kanama, vücut boşluklarında sıvı birikimi, kasılma ve en sonunda birkaç saat ile birkaç gün içinde meydana gelen ölümdür. Karaciğerde rengin açılması veya tamamen renksizleşme ve yağ infiltrasyonu belirgin olarak görülür (11). Kronik zehirlenmeler, hayvanlarda özellikle bağışıklık sisteminin baskı altına alınmasına ve kazanılmış direncin kırılmasına yol açarak, birçok hastalığın ön plana çıkmasına sebep olabildiğinden, çoğu kez gözden kaçabilmektedir. Kronik zehirlenme; iştahın azalması, büyüme hızı, yem tüketimi ve yemden yararlanmanın azalması, kıl örtüsünün bozulması, kansızlık, 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. Büyüme hızı ve canlı ağırlık artışının azalması, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasında meydana gelen karışıklığa bağlanmaktadır (11,19,30).

Tablo 2.2.Bazı mikotoksinlerin çeşitli etkileri ve neden oldukları hastalıklar (30).

Mikotoksin	Üreten Cins	Oluşturduğu Etki	Neden Olduğu Saptanan Hastalıklar
Aflatoksin B ₁	<i>Aspergillus</i>	Karsinojenite Teratojenite	İnsan: primer karaciğer kanseri Hindi:Turkey-X disease
Sitrinin	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	Nefrotoksisite	
α -Siklopiyazonik asit	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	Nörotoksisite	
Ergotoksinler (ergotamin)	<i>Claviceps</i>	Vazokonstrüksiyon Nörotoksisite	Ergotizm İnsanda St. Anthony Ateşi
Fumonisin B ₁	<i>Fusarium</i>	Karsinojenite Nörotoksisite	Atlarda Ensefalomalazi Domuzlarda Pulmoner Ödem
Okratoksin A	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Karsinojenite Nefrotoksisite	Domuzlarda ve Kümes Hayvanlarında Nefropati
Patulin	<i>Penicillium</i>	Mutajenite Antibakteriyal	Domuzlarda ve Kümes Hayvanlarında Nefropati
Penitrem A	<i>Penicillium</i>	Nörotoksisite	
Fomopsin A	<i>Phomopsis</i>	Hepatotoksisite	Koyunlarda lupinozis
Sporidesmin A	<i>Pithomyces</i>	Hepatotoksisite Fotosensitivite	Koyunlarda lupinozis
Trikotesenler (T-2 toksin)	<i>Fusarium</i>	Dermatoksisite Hematopoetik Etki	Alimentary toxic aleukia (ATA)
Zearalenon	<i>Fusarium</i>	Östrojenizm Üreme Bozuklukları	Domuzlarda hiperöstrojenizm, Vulvovajinit ve düşükler

2.3.3. Aflatoksinle Kontamine Gıdalar

Aflatoksin en fazla bitkisel ürünlerde görülür. Yer fıstığı, fındık, Antep fıstığı, badem, çam fıstığı arasında yer fıstığı ve mamulleri en riskli gıdalardır. Tahıl ürünlerinden özellikle buğday, mısır, çavdar, arpa, yulaf, pirinç aflatoksinle bulaşık olabilir ve bu ürünler insan ve hayvanlar için potansiyel kontaminasyon kaynağı olabilir (26,40-42). Baklagiller içerisinde en fazla riskli besin soya fasulyesidir. Bununla birlikte, fasulye, bezelye, börülce, mercimekte de görülebilir. Baharatlardan özellikle kırmızı toz biber, pul biber, karabiber ve kuru meyvelerden incir, aflatoksin açısından önde gelen riskli ürünlerdir. 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. Genel olarak süt, süt tozu ve peynir aflatoksikozis için önemli bir bulaşma kaynağıdır. Ayrıca kakao, kahve, bira, şarap gibi ürünlerde de aflatoksine rastlanır (2,40-42). Aflatoksinler ürünleri, tarlada ekili oldukları zamandan başlayarak büyüme, hasat, nakliyat, depolama, işleme ve hatta ürünlerin raflarda muhafazası esnasında, kısacası ekimden tüketime kadar her aşamada kontamine edebilirler (25,40,43). Tablo 2.3'te Türk Gıda Kodeksi'ne göre gıda maddelerindeki aflatoksinlere ait yasal limit değerler belirtilmiştir (44).

Tablo 2.3. Türk Gıda Kodeksine göre gıdalarda aflatoksinlere ait yasal limit değerler (44).

Gıda	Maksimum Limit (µg/kg)		
	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
AFLATOKSİN			
Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar (Doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç	8,0	15,0	—
Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (Doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	12,0	15,0	—
Fındık ve Brezilya fıındığı (Doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	8,0	15,0	—
Sert kabuklu meyveler (Doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	—
Yerfıstığı, diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri (Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	5,0	10,0	—
Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
Fındık ve Brezilya fıındığı (Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	5,0	10,0	—
Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0	10,0	—

Kurutulmuş meyveler (Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	2,0	4,0	—
Mısır ve pirinç (Doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	—
Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber (<i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) — Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) — Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) — Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5,0	10,0	—
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	—	—
Bebek formülleri ve devam formülleri (Bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	—	0,025

2.3.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin

Aflatoksin B₁ ile kontamine yemlerin tüketmesi sonucu bu toksinin metabolize olması ile oluşan derivatların sütte salgılanması ile süt toksini olan Aflatoksin M₁ ortaya çıkar (2, 14, 20,45).

Aflatoksinin süte geçişi, hayvandan hayvana, mevsimsel değişikliklere, günden güne ve bir sağımdan diğerine göre değişiklik gösterir. Laktasyonun ilk dönemlerinde aflatoksin geçişi, son dönemindekine göre yüksektir. Yaz aylarında sütteki Aflatoksin M₁ seviyesi kış aylarına

göre daha düşüktür. Söz konusu bu etki yaz aylarında otlama sırasında ineklerin daha az yoğun yem ile beslenmesinden kaynaklanmaktadır (20, 21, 46).

Toksinle kontamine olmuş sütlerin işlenmeleri esnasında ısıtma işlemi, fermentasyon ve kurutma gibi normal muamelelerin toksini destabilize etmediğinin belirlenmesi, AFM₁'in süt ve süt ürünlerinde uzaklaştırılması için özel yöntemler kullanılmaya çalışılmıştır (14,31,32,40). Bu işlemler toksinin fiziksel yollarla uzaklaştırılmasını veya birtakım kimyasal yöntemlerle parçalanmasını kapsamaktadır. Bu konuda daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır (20, 22, 40, 47). Peynirler küf üremesi için çok uygun ortam oluşturmaları. Kontaminasyon genellikle hava veya diğer ekipmanlarla doğal olarak olabilmektedir. Sporları rüzgarla yayılır ve ahırlar, süt sağım makineleri ve diğer aletler üzerine küf sporları yerleşebilir. Çiğ süt için hayvan yemi ve dışkısı sürekli kontaminasyon kaynağıdır. Süt ve süt ürünlerinde *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsleri yaygın olarak görünmektedir ve birçok türü mikotoksin üretebilmektedir (32,40,43, 48,49).

2.3.5. Mikotoksinlerin Belirlenmesi

Mikotoksinlerin gıda ve yemlerde belirlenmesi için günümüzde hassas ve güvenli birçok yöntem bulunmaktadır. Mikotoksinler içinde en önemli konumda olan aflatoksinlerin belirlenmesinde; ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemlerinden ve tekniğe bağlı olarak Mass spektrometreden yararlanılır (17,43,50).

Süt ve süt ürünlerinde AFM₁'in tespitinde kullanılan analitik metotlardan başlıcaları; 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 Mass spektrofotometresi olarak sınıflandırılabilir. Tüm bu teknikler içerisinde en yaygın ve pratik kullanım alanına sahip olan yöntem ELISA'dır (21,26,42,51-54).

Immunolojik yöntemlerden olan enzim immunoassay yöntemi (EIA), antijen antikor reaksiyonlarının direkt olarak saptandığı primer bir reaksiyondur. Bu tip primer reaksiyonlarda, antikorum antijene bağlanıp bağlanmadığı direkt olarak saptanmaktadır.

EIA 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 (26,42,51-54).

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 işaretlemeye 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 (42,55-58).

2.3.6. Mikotoksinlerin Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması

Mikotoksin oluşumunun önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması için öncelikle toksinin fungal kaynağı bilinmelidir. Toksin oluşturan küfler, hammaddeleri hasat öncesi, sonrası ve hasat esnasında kontamine edebilmektedir (2,8,9). Bu sebeple hayvansal yemlerin üretiminde, işlenmesinde ve depolanmasında mikotoksin oluşumunu önlemek önemli bir görevdir (17,18,19).

Öncelikle yemlerin küflerle kontaminasyonu gerçekleşmeden önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu sebeple küf gelişimine dirençli yem bitkilerinin seçimi, tarlalarda küf enfeksiyonlarının kontrolü, hasat dönemi, hasat öncesi ve hasat sonrası takviminin uygun şekilde hazırlanması, bitki tohumlarının nem içeriğinin hasat sonrası ve depolama dönemlerinde düşük tutulması, ürünlerin düşük sıcaklıkta depolanması, fungal büyümeyi önlemek amacıyla fungusid ve çeşitli koruyucuların kullanılması küf gelişimi ve mikotoksin üremesinin engellenmesi için alınacak önlemler arasında sayılabilir (1,2,8,9,17,18,19).

Küf gelişimi tespit edildiğinde ise mikotoksin kontaminasyonunun artmasını önlemek amacıyla tespit edilen toksijenik küfler elimine edilmeli veya büyümeleri durdurulmalıdır. Bu amaçla ürünlerin nem oranının düşürülmesi, kontamine tohumların ortamdaki uzaklaştırılması gibi bitkilerin fungal büyümeyi teşvik edici koşullardan korunması önerilen yöntemlerden bazılarıdır (9,17,18).

Mikotoksin ayrıca küflerle bulaşmış süt mamullerinin, saklanması sırasında da oluşmaktadır. Süt üretimimizin yaklaşık önemli bir kısmı yoğurt yapımında kullanılmakta, toksik karakterli küfler nedeniyle sağlık açısından riskler meydana gelmektedir. Yoğurtlarda aflatoksin varlığının önlenmesi sütlerin aflatoksince ari olması oldukça önemlidir (1,61).

.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Numuneler

Bu çalışmada, Kayseri ili ve çevresindeki açık pazarlardan Kasım 2012 ve Ocak 2013 tarihleri arasında iki haftalık periyodik aralıklarla temin edilen toplam 100 adet manda yoğurdu numune olarak kullanıldı. Steril kavanozlara 250'şer g olarak alınan manda yoğurdu örnekleri soğuk zincir altında laboratuara getirilerek analiz edildi.

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Araç Gereç, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Aflatoxin M₁ Analizi Test Kiti (Helica, Catalog No: 961AFLM01M-96, USA): Çalışmada toplanan manda yoğurdu numunelerinde AFM₁ seviyesinin belirlenmesi amacıyla Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tekniği kullanıldı.

Kit İçeriği:

1. 1 x mikrotiter pleyt (8 ayrılabilir kuyulu 12 strip)
(96 kuyu AFM₁'e karşı oluşmuş antikorlarla kaplanmıştır.)

2. 6 x Aflatoksin standart solüsyonları, her biri 3 ml

Standart 1 : 0 ppt

Standart 2 : 5 ppt

Standart 3 : 10 ppt

Standart 4 : 25 ppt

Standart 5 : 50 ppt

Standart 6 : 100 ppt

3. 1 x Konjugat (Aflatoxin HRP konjugat), 12 ml (peroksidaz konjugatlı AFM₁, konsantre)
4. 1 x Substrat, 12 ml (Üre peroksidaz içerir.)
5. 1 x Stop reaktifi, 12 ml asidik solüsyon
6. 1 x Yıkama Solusyonu, % 0,05'lik tween 20'li PBS (1 litre distile suda çözdürmeye hazır)
7. 1 şişe M₁ içermeyen süt tozu, 12 ml (Peynir ekstratının hazırlanması için)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Manda Yoğurdu Numunelerinden AFM₁ Ekstraksiyonu

Çalışmada AFM₁ ekstraksiyonu amacı ile 250 ml'lik steril cam şişelere 10'ar gr manda yoğurdu numuneleri tartılarak 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda (Nüve[®], BM402) 3 dakika bekletilerek pastörize edildi. Daha sonra bu numuneler oda ısısında soğuyana kadar bekletildi. Bu süre sonunda her bir numune 100 ml PBS (pH 7.2, 0.55 g NaH₂PO₄·xH₂O+2.85 g Na₂HPO₄·x2H₂O+9 g NaCl; 1000 ml suya tamamlanır) tampon çözeltisi ile sulandırıldı (1:10). Elde edilen karışım steril filtreli poşetlere aktararak Stomacher Lab-Blender'de (Interscience BagMixer[®], 400P) 2 dakika süre ile homojenize edildi. Bu karışımdan 100 µl alınarak direkt olarak ELISA testinde kullanıldı (46).

3.2.2. Enzim İmmunoassay (ELISA) Prosedürü

ELISA Uygulamasında Dikkat Edilen Hususlar

1. Kullanmadan önce bütün reaktifler oda ısısına getirildi.
2. Kullandıktan sonra kitin içeriğindeki bütün reaktifler derhal +2-8 °C'ye kaldırıldı.
3. Test prosedürünün basamakları arasında mikro kuyucukların kurumamasına dikkat edildi.
4. Herhangi bir EIA'nın sonuçlarının doğruluğu büyük ölçüde mikro kuyucukların yıkanmasındaki tutarlılığa bağlı olduğundan, yıkama işlemlerinde EIA prosedüründe belirtilen yıkama talimatlarına dikkatlice uyuldu. Bu amaçla EL_X 50 ELISA otomatik strip yıkayıcı (BioTek Instruments, Inc) kullanıldı.
5. Tüm inkübasyonlar sırasında direkt güneş ışığı ile temastan kaçınıldı.
6. İnkübasyonlar sırasında mikrotiter pleytin üzeri örtüldü.

3.2.3. Test Prosedürü:

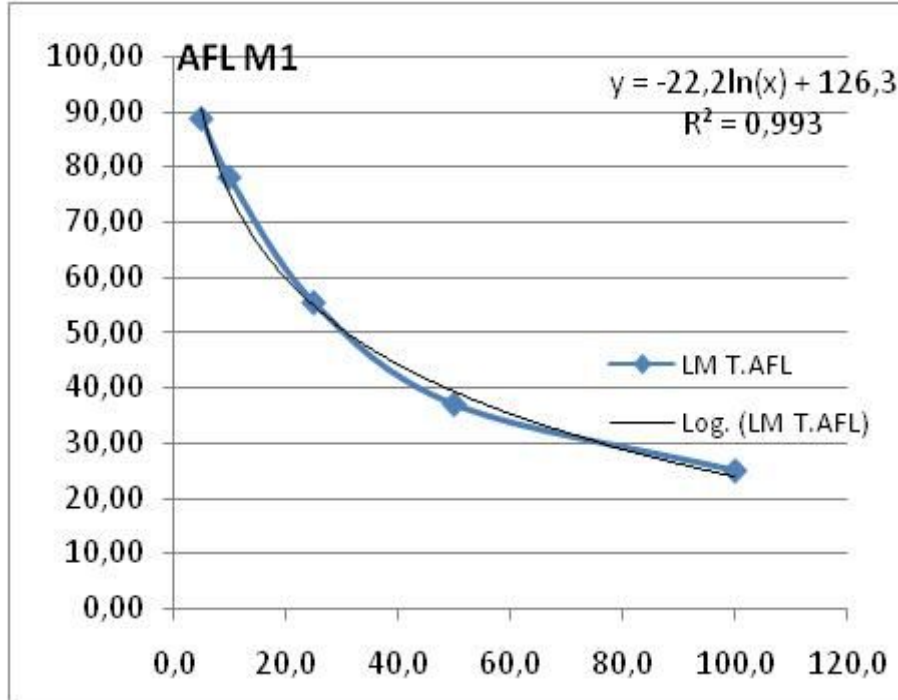
Standartlar ve örnekler için yeterli sayıda mikrotiter kuyucuk pleyte yerleştirildi. Standart solüsyonlarından ve hazırlanmış örneklerden 200'er µl alınarak kuyucuklara ilave edildi ve oda ısısında karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi. Mikrotiter kuyucuklar inkübasyon sonunda ELISA otomatik strip yıkayıcıda (EL_x 50, Bio-Tek Instruments, USA) 3 kez %0,05'lik tween 20 içeren PBS ile yıkatıldı. Her bir kuyucuğa 100'er µl enzim konjugat ilave edilerek tekrar oda ısısında karanlık ortamda 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikrotiter kuyucuklar ELISA otomatik strip yıkayıcıda 3 kez %0,05'lik tween 20 içeren PBS ile yıkatıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl substrat ilave edildi ve iyice karıştırılarak oda ısısında karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu koyularak kuyucuklardaki reaksiyonun durması sağlandı. Pleyt, elle hafif şiddette vurmak suretiyle iyice karıştırıldı. ELISA otomatik okuyucuda (Thermo, Finland) 450 nm dalga boyunda hava körüne karşı ölçüldü (59).

3.2.4. Sonuçların Değerlendirilmesi:

ELISA testi sonuçlarının değerlendirilmesinde; standartlar ve örnekler için bulunan absorbans değerlerinin ortalama değerleri, birinci standartın (0 ppt standardı) absorbans değerine bölündü ve 100 ile çarpıldı. Böylece 0 standardı % 100'e eşit hale getirildi ve absorbans değerleri yüzde olarak bulundu. Standartlar için hesaplanan değerler, semilogaritmik grafik kağıdı üzerine ng/L (ppt) cinsinden aflatoksin M₁ konsantrasyonuna karşı koordinatlar sistemine girildi. Her örneğin aflatoksin M₁ konsantrasyonu eğri üzerinden ng/L cinsinden okundu. Sonuçlar hesaplanırken kalibrasyon eğrisi üzerinden elde edilen konsantrasyonlar yoğurt örnekleri için 10 olarak belirlenen dilusyon faktörü ile çarpıldı (59).

4. BULGULAR

Bu çalışmada Kasım 2012 ve Ocak 2013 ayları arasında Kayseri ili ve çevre ilçelerinden iki haftalık periyodik aralıklarla temin edilen manda yoğurtları, AFM₁'in varlığı yönünden incelendi. Çalışmada, yoğurtlarda AFM₁ düzeylerinin belirlenmesi amacı ile kullanılan standartların ELISA'da 450 nm dalga boyunda okutulması sonucunda elde edilen veriler ve standartların absorbens değerlerine (Tablo 4.1.) göre kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.1.) elde edildi. İncelenen manda yoğurdu numunelerin 450 nm'de okunan absorbens değerleri dikkate alınarak, kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüle göre AFM₁ konsantrasyonları ng/kg olarak değerlendirildi.



Şekil 4.1. Çalışmada standartların absorbens değerlerine göre elde edilen konsantrasyon eğrisi

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan standartların 450 nm de okunan absorbanslarına göre elde edilen referans aralıklar

Standart	Standartların konsantrasyonlar (ng/L)	Standartların Ortalama Absorbans değeri	% Standart Sapma (SS)	% CV	% B/B0
1	0	1,41	0,007	0,4	100,00
2	5	1,25	0,007	0,5	88,65
3	10	1,10	0,007	0,6	78,01
4	25	0,78	0,003	0,4	55,32
5	50	0,52	0,002	0,4	36,88
6	100	0,35	0,001	0,4	24,82

Çalışmada incelenen manda yoğurdu örneğinin tamamının (% 100) AFM₁ ile kontamine olduğu belirlendi. Çalışmada incelenen yoğurt numunelerinde belirlenen AFM₁ düzeyleri 2,70-79,27 ng/kg aralıklarında idi.

İncelenen 100 yoğurt örneğinin 7'sinde (%7) belirlenen AFM₁ düzeyleri Türk Gıda Kodeksi gıda maddelerinde belirli bulaşanların maksimum seviyelerinin belirlenmesi hakkında tebliğinde; ısıtılmış işlem görmüş süt ve süt ürünlerinde belirtilen limitin (50 ng/kg) üzerinde olduğu 36'sının (% 36) 2,7- 10 ng/kg, 14'ünün (% 14) 10-25 ng/kg arasında, 43'ünün ise 25-50 ng/kg aralığında AFM₁ içerdiği belirlendi.

Manda yoğurdu örneklerinin, ortalama değerleri Tablo 4.2'de çalışmada incelenen yoğurt örneklerindeki AFM₁ değerleri, tablo 4.3'te yoğurt örneklerinde AFM₁ kontaminasyon aralıkları, Şekil 4.2'de çalışmada incelenen yoğurt örneklerinin AFM₁ miktarlarının Türk Gıda Kodeksi limit değerine göre kıyaslanması özetlenmiştir.

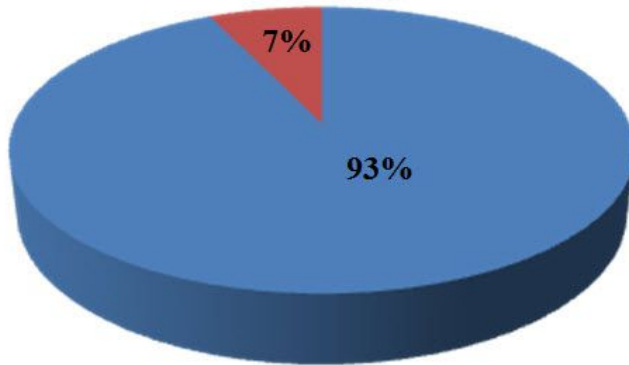
Tablo 4.2. Çalışmada incelenen manda yoğurdu örneklerinde ortalama AFM₁ düzeyleri

Numune	Numune Sayısı	Ortalama Değer	Standart Sapma (SD)	Minimum Değer	Maksimum Değer
Manda Yoğurdu	100	22,85	18,57	2,70	79,27

Tablo 4.3. Çalışmada incelenen yoğurt örneklerinin AFM₁ miktarları (ng/kg) ve yüzde oranları

	0 – 10	10 – 25	25 – 50	>50
Analiz Edilen Numune Sayısı	36	14	43	7
Yüzde Oranı (%)	36	14	43	7

- Türk Gıda Kodeksi limit değerinin (50ng/kg) altında
- Türk Gıda Kodeksi limit değerinin (50ng/kg) üzerinde

**Şekil 4.2.** Çalışmada incelenen yoğurt örneklerinin AFM₁ miktarlarının Türk Gıda Kodeksi limit değerine göre kıyaslanması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toplumumuzda bir çok kişinin, günlük yaşamda ve diyet uygulamalarında sıklıkla süt ve süt ürünlerini tercih etmeleri, aynı zamanda süt ve süt ürünlerinin bebekler ve çocuklar tarafından gelişimleri esnasında daha çok tüketilmesi ve bu yaş gruplarının mikotoksinlerin yan etkilerine karşı daha duyarlı olmalarından dolayı süt ve süt ürünlerinde bulunan AFM₁ düzeyinin tespiti, halk sağlığı açısından oldukça önem taşır.

Bu çalışmada incelenen yoğurt örneklerinin tamamında AFM₁ saptanmış; % 7'sinde ise AFM₁ düzeyleri Türk Gıda Kodeksi'nde süt ve süt ürünleri için belirtilen limitlerin üzerinde bulunmuştur. Çalışmada analizi yapılan manda yoğurdu numunelerinde AFM₁ konsantrasyonları 2,70-79,27 ng/kg aralığında bulundu.

Türkiye'de de süt ve süt ürünlerinde aflatoksin miktarının saptanmasına yönelik olarak son yıllar da gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışma ile konu önemli araştırma alanlarından birisi haline gelmiştir. Ancak Türkiye'de ve dünya genelinde insanlar tarafından hemen her öğünde tüketilen yoğurt ile ilgili olarak besleyici değerini olumsuz yönde etkileyen AFM₁ miktarlarını belirlemeye yönelik çalışmalar yetersizdir.

Bakırcı (61) Van ilinde bir yandan üretilen içme sütlerinin AFM₁ içeriklerini belirlemek, bir yandan da yoğurt, beyaz peynir, kaşar peyniri, peyniraltı suları ve krema üretimi esnasında AFM₁ stabilitesindeki değişimleri gözlemlemek için yapılan bir çalışmada, toplanan 90 adet süt örneğinden 79'unun AFM₁ içerdiği, bu örneklerden 35'inin de Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde belirtilen sınır değerini (0.05 µg/l AFM₁) aştığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada çiğ süte göre AFM₁ düzeyinin, beyaz ve kaşar peynirlerinde 3 kat, yoğurtlarda ise 13 daha

fazla bulunduğu bildirilmiştir. Bu oranın tank sütündeki AFM₁ düzeyinden yüksek olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak bir öneminin olmadığını bildirmişlerdir (61).

Ertaş ve ark. (62) Kayseri ilindeki süt, peynir, yoğurt ve sütlü tatlılardaki AFM₁ düzeylerini belirlemek amacı ile yaptıkları bir çalışmada 50 yoğurt numunesinin 28 (%56) 'inde 2,5-78 ng/kg arasında AFM₁ içerdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar inceledikleri yoğurt numunelerinin 7'sinin AFM₁ (% 14) Türk Gıda Kodeksi'nde Süt ve Süt ürünleri için belirtilen limitlerin üzerinde (50 ng/kg) olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma sonucu Ertaş ve ark.(62)'nın elde ettiğı verilerle uyumludur. Ertaş ve ark. (62) yaptıkları çalışmanın Kayseri ilinde aynı coğrafi şartlar altında gerçekleştirilmiş olması ve genel olarak hayvanların aynı beslenme koşullarında olması sonuçların benzerliklerinde etkili olabilir.

Atasever ve ark. (46) Erzurum ilinde satışa sunulan yoğurt ve ayran numunelerindeki AFM₁ konsantrasyonlarını incelemişlerdir. Araştırmacılar inceledikleri 80 adet yoğurt numunelerinin % 87,5'nin 10-75 ng/kg aralığında AFM₁ içerdiğini bildirmişlerdir. Atasever ve ark.(46)'nın elde ettiğı sonuçlar bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Akkaya ve ark. (63) Afyonkarahisar bölgesinde inceledikleri toplam 177 yoğurt örneğinin 68'inde (% 65,38) AFM₁ belirlemişlerdir. Araştırmacılar yoğurtların en yüksek 150 ng/kg düzeyinde AFM₁ içerdiğini bildirmişlerdir. Akkaya ve ark. (63) bu çalışmadakine oranla düşük (% 100) olmakla birlikte numunelerin çoğunda (% 65,3) AFM₁ tespit etmişlerdir. Ancak yoğurt numunelerindeki AFM₁ konsantrasyonu bu çalışmaya göre oldukça yüksektir.

Gürbay ve ark. (64) Ankara'da inceledikleri 40 yoğurt numunesinin 32'inde (%80) 61.61-365,64 ng/kg aralığında AFM₁ içerdiğini bildirmişlerdir.

Galvano ve ark. (65)'de İtalya'da inceledikleri 114 yoğurt numunesinin 91'inin (% 80)'inin 1-496.5 ng/l konsantrasyon aralığında AFM₁ içerdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacıları belirledikleri AFM₁ konsantrasyonların Avrupa'da kabul edilebilir legal limitin çok üstünde olduğunu bildirmişlerdir (50ng/l). Martin ve Martin (66), Portekiz'de inceledikleri 96 yoğurt numunesinin 18'inde (18.8%) 19-98 ng/kg konsantrasyon aralığında AFM₁ tespit etmişlerdir.

Gürbay ve ark. (64), Martin ve Martin (66), Galvano ve ark. (65) inceledikleri yoğurt numunelerindeki AFM₁ konsantrasyonları bu çalışmaya göre yüksektir (30).

Galvano ve ark. (67) İtalya'da 120 yoğurt örneğinde yaptıkları ikinci bir araştırmada bu sefer 73 (61%) yoğurt örneğinin 1-32,1 ng/kg konsantrasyonları aralığında AF₁ içerdiğini göstermişlerdir. Kim ve ark. (68) Kore'de inceledikleri yoğurt numunelerinin % 83'ünün

ortalama 29 ng/kg konsantrasyonunda AFM₁ içerdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacıların (67,68) sonuçları bu çalışmaya göre nispeten düşüktür.

Bu çalışma sonuçları ile yukarıda belirtilen (64,65,66,68) araştırma sonuçlarının arasındaki farklılıklarında ülkemizde yetiştirilen ve üretilen yem ve yem maddelerinin mikotoksinler (özellikle AFB₁) ile kirlendiğini ortaya koymakta olup bunun yanı sıra coğrafi bölge, ülke, mevsimin etkili olduğu akla getirmektedir. Yoğurtta AFM₁ tespit miktarlarının değişkenlik göstermesinde, sütün kalitesi, kontaminasyon miktarı, süt kazein miktarı, lipolitik etki, uygulanan ısı işlemleri, pH değişiklikleri gibi faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (69,70).

Barjesteh ve ark. (28) İran'da inceledikleri 40 pastörize yoğurt ve 10 lokal yoğurttan oluşan 50 yoğurt numunesinin tamamının (% 100) 2,1-61,7 ng/kg konsantrasyonlarında AFM₁ ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları ile Barjesteh ve ark. (28) paralellik göstermektedir.

Yoğurtta AFM₁ düzeylerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan diğer bazı çalışmalara bakıldığında bazı araştırmacılar inceledikleri bu çalışmanın aksine yoğurt numunelerinin hiç birinin AFM₁ içermediğini bildirmişlerdir (71-77). Bu araştırmacılara paralel olarak yoğurt ile yapılan deneysel çalışmalarda (69,70,79) sütün fermente bir ürünü olan yoğurtta düşük pH, enzimatik değişiklikler ve pH düşmesine bağlı oluşan laktik asit bakterilerinin etkisi ile AFM₁ salgılanmasının inhibe edildiği ya da AFM₁'in yıkımlanabildiği bildirilmiştir.

Govaris ve ark. (69) inek sütünü AFM₁ ile kontamine ettikten sonra sütü fermente ederek elde edilen yoğurttaki AFM₁ düzeylerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, AFM₁ düzeylerinin yoğurt formunda başlangıçtaki süte göre azaldığını belirtmişlerdir. Bunun nedeni olarak ta yoğurt oluşum esnasında, pH düşmesi, oluşan organik asitler, ve ortamda laktik asit bakterilerinin olmasının etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yine pH düşmesine bağlı olarak yoğurt oluşum süresince kazein proteinin oluşumu AFM₁ toksinin emilimini azalttığı bildirilmiştir (78). Rasic ve ark (79) asidik süt ve yoğurtlarda AFM₁ düzeylerinin oldukça azaldığını (97%'ye kadar) bildirmişlerdir. El Deeb ve ark. (70) manda sütlerinde yaptıkları bir deneysel çalışmada enzimatik mikrobiyal ve asidik koagülasyonun AFM₁ yıkımlanmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (79,80) AFM₁'in yoğurdun besleyici özellikleri üzerine negatif etkilerini araştırmışlardır.

Van Egmond ve ark. (81) yoğurdun 7° C’de 7 gün süre ile depolayarak soğuk muhafazanın AFM₁ üzerine etkinliğini araştırmışlar ve inceledikleri hiçbir numunede AFM₁ düzeylerinde azalma tespit etmemişlerdir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular Kayseri ili ve çevre ilçelerinde satışa sunulan yoğurt numunelerinin tamamının düşük konsantrasyonlardan AFM₁ içermesi ve incelenen numunelerin % 7’sinin Türk Gıda Kodeksi’ndeki limit değeri aşması ve çoğunluğunun 10-50 ng/kg konsantrasyonları aralığında göz ardı edilemeyecek kadar yüksek konsantrasyonlarda olması bakımından halk sağlığı için tehlike oluşturabileceği kanısına varılmıştır. Dolayısı ile ülkemizde peynir ve süte ilave olarak yoğurtların da aflatoksinlerle kirlenme durumu önemli bir sağlık sorunu olduğu düşünülmektedir. Bu sorunlar sütlerin düzenli olarak analiz edilmesi ve yoğurt üretimi esnasında gösterilecek özenle giderilebilir.

Sonuç olarak, üretim ve depolama esnasında şartlar uygun olduğu takdirde gıdalarda başta toksijenik aflatoksin ve diğer çevresel kontaminantların bulaşma riski her zaman göz önünde tutulmalıdır. Üretimden tüketime kadar tüm işlemler küf gelişimini en aza indirecek şekilde gerçekleştirilmelidir. Bu amaçla modern üretim teknikleri uygulanmalı, gıda ve yem maddeleri uygun biçimde depolanmalı ve sürekli olarak kontrol edilmelidir. Gıda maddeleri her aşamada aflatoksin yönünden analiz edilmeli, tolerans limitleri ülkemiz için kabul edilen sınırların üzerinde olanların tüketimine izin verilmemelidir. Ayrıca yem ve besinlerde mantar infestasyonunu ve dolayısıyla aflatoksin oluşumunu önlemek için etkili, ekonomik ve uygulanabilir kimyasal maddelerin araştırılması ve bunların uygulanması gibi saha çalışmaları yapılmalıdır.

6.KAYNAKLAR

1. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mycotoxins: Toxic effects, degradations, prevention of the occurrence, and decreasing of the harmful effects. Hacettepe Üniv Ecz Fak Derg 2008;28(1):63-92.
2. 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:s.2145-76.
3. Şireli T, Özdemir H. Ankara’da tüketime sunulan meyveli yoğurtların mikrobiyolojik kalitesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1998;45: 287- 93.
4. Elmalı M, Yaman H.. Microbiological quality of yoghurt consumed in Kars. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 2005;31(1):19- 24.
5. Herdem A. Farklı yörelerden toplanan geleneksel yöntemle üretilen yoğurt örneklerinin bazı niteliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya. 2006.
6. Akgün A, Yazıcı F. Geleneksel Bafra manda (Kömüş) yoğurdu. Samsun Sempozyumu. 13- 16 Ekim, Samsun-Türkiye. 2011.
7. Sarıözkan S. Türkiye’de manda yetiştiriciliğinin önemi. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2011; 17(1):163-6.
8. Bennett JW and Klich. M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 2003;16:497-516.
9. Bankole AS, Adebajo A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. African Journal of Biotechnology 2003; 2 (9):254-63
10. D’Mello JPF, McDonald AMC, Postel D, Dijksma WTP, Dujardin A, Placinta CM. Pesticide use and mycotoxin production in Fusarium and Aspergillus phytopathogenes. Eur J Plant Pathol 1998;104:741-51.

11. Whitlow LW, Hagler Jr WM. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* 2002; 74(28):1-10.
12. Wogan NG, Hecht SS, Felton S.J, Conney HA, Loeb AL. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 2004; 14: 473-86
13. Mathur CF, Smith RC, Hawkins GE. Growth and morphology of *Streptococcus bovis* and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B₁, in vitro. *J Dairy Sci* 1976; 59:455-8.
14. Bata A, Lasztity R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci Tech* 1999; 10: 223-8
15. Vanderzant C and 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: s. 239-45.
16. 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):127-36
17. Tunail, N. Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar, 3. Bölüm, 81-184 s. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Ankara. Genişletilmiş 2. baskı, 2000; s 522.
18. Semple RL, Frio AS, Hicks PA and Lozare JV. Mycotoxin prevention and control in foodgrains. A collaborative publication of the UNDP/FAO Regional Network Inter-Country Cooperation on Preharvest Technology and Quality Control of Foodgrains (REGNET) and the ASEAN Grain Postharvest Programme, Thailand Bangkok. 1989.
19. D'Mello JPF, Macdonald AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology* 1997; 69:155-66
20. Siddappa V, Nanjagowda DK, Viswanath P. Occurrence of aflatoxin M₁ in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food Chem Toxicol* 2012;50(11):4158-62.
21. 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):752-77
22. Van Egmond HP. Mycotoxins in dairy products. *Food Chem* 1983; 11:289-307.
23. Moss MO. Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 1998; 84:62-76

24. Henry S.H, Whitaker T, Rabbani I, Bowers J, Park D, et al. Aflatoxin M₁. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Report TRS 906-JECFA 56/8.2001
25. Dini A, Khazaeli P, Roohbakhsh A et al. Aflatoxin contamination level in Iran's pistachio nut during years 2009-2011. Food Control 2013; 30: 540-4.
26. 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.
27. Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the World Health Organization 1999; 77(9):754-66.
28. Barjesteh MH, Azizi G, Noshfar E. Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurized and local yogurt in Mazandaran province (Northern Iran) using ELISA. Global Veterinaria 2010; 4: 459-62.
29. 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;55:653-8
30. Sidhu OP, Chandra H, Behl HM. Occurrence of aflatoxins in mahua (*Madhuca indica* Gmel.) seeds: synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. Food and Chem Toxicol 2009; 47, 774-7.
31. Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE, Marth EH. Physical, Chemical and Biological Degradation of Mycotoxins in Foods and Agricultural Commodities. J Food Protect 1982; 45(10):964-71.
32. Galvano F, Galofaro V, Galvano G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: a worldwide review. J Food Protect, 1996;59:1079-90.
33. Coulombe AR. Biological action of mycotoxins. J Dairy Sci 1993; 76:880-91.
34. International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Vol 56, World Health Organisation, Lyon, 1993.
35. Caloni F, Stamatii A, Friggè, Angelis ID. Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. Toxicon 2006; 47:409-15
36. Goldman R, Shields PG. Food Mutagens. J Nutr 2003;133(3): 965-73.
37. Beasley V. Mycotoxins that Affect the Liver, In: Veterinary Toxicology, International Veterinary Information Service, Ithaca NY. 1999.

38. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1106-122.
39. Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Responses of Dairy Cows to Dietary Aflatoxin: Feed Intake and Yield, Toxin Content, and Quality of Milk Cows Treated with Pure and Impure Aflatoxin. *J Dairy Sci* 1982; 65:1503-08.
40. Fallah AA. Assessment of aflatoxin M₁ contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chem Toxicol*, 2010;48:988-91.
41. Sassahara M, Netto DP, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the north of Parana state. *Food and Chem Toxicol*,2005;43: 981-4
42. 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. *JAVA* 2010; 9(15):2035-7.
43. 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; 16:257-61.
44. Anonim. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ (2002/63)
45. Sidhu OP, Chandra H, Behl HM. Occurrence of aflatoxins in mahua (*Madhuca indica* Gmel.) seeds: synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Food and Chem Toxicol*,2009; 47:774-7.
46. Atasever MA., Atasever A, Ozturan K. Aflatoxin M₁ levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2011;35(1):59-62.
47. Özsunar A. Trakya bölgesi'nde üretilen inek sütlerinde aflatoksin M₁ varlığı. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Edirne. 2005.
48. Özgüç Demirtaş N. Yöresel peynirlerde aflatoksin M₁ düzeylerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle belirlenmesi. A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2006.
49. Dashti B, Al-Hamli S, Alomirah H, Al-Zenki S, Bu Abbas A, Sawaya W. Levels of aflatoxin M₁ in milk and cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control*, 2009; 20: 686-90.

50. Trucksess MW. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In: de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. Wageningen: Ponsen & Looyen, 2001: s.29-40.
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):90-5.
52. Duncan HE, Hagler WM. Aflatoxins and other mycotoxins. *National Corn Handbook*; 1989:s.2105-6.
53. Stubblefield RD. Determination of Aflatoxin M₁ in Dairy Products. *J Am Oil Chem Soc* 1979; 56:800-2
54. Trucksess MW. Committee on natural toxins, mycotoxins. *J AOAC Int* 1999; 82(2):488-95
55. Ünlütürk A ve Turantaş F. *Gıda Mikrobiyolojisi (Birinci Baskı)*, Mengi Tan Basımevi. İzmir, 1998:s 573-8.
56. Trucksess MW, Page SW. Examination of imported cheeses for aflatoxin M₁. *J Food Protect* 1986; 49(8):632-3.
57. Finoli C, Vecchio A. Occurrence of aflatoxins in feedstuff, sheep milk and dairy products in Western Sicily. *Ital J Anim Sci* 2003; 2:191-6
58. Pietri A, Bertuzzi T, Bertuzzi P, Piva G. Aflatoxin M₁ occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Addit Contam* 1997; 14 (4):341-4.
59. Helica Biosystems Inc. Aflatoxin M₁ Assay. For the quantitative determination of Aflatoxin Concentration in milk. Catalog No:961AFLM01M-96. 1527 W Alton Ave. Santa Ana, CA, 92704, USA, 2013.
60. Elgerbi MA, Aidoo EK, Candlish GA, Tester FR. Occurrence of aflatoxin M₁ in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit Contam* 2004; 21 (6):592-7.
61. Bakırcı I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province in Turkey. *Food Control*, 2001;12:47-51.
62. Ertaş N, Gönülalan Z, Yıldırım Y, Karadal F, A Survey of Concentration of Aflatoxin M₁ In Dairy Products Marketed In Turkey. *Food Control* 2011;22:1956-9
63. Akkaya L, Birdane,YO, Oguz H, Cemek M. Occurrence of Aflatoxin M₁ in yoghurt samples from Afyonkarahisar, Turkey. *Veterinary Institute in Pulawy* 2006;50:517-9.

64. Gurbay AS, Engin AB, Çağlayan A, Sahin G. Aflatoxin M₁ levels in commonly consumed cheese and yoghurt samples in Ankara, Turkey. *Ecol Food Nutr* 2006; 45:449-59.
65. Galvano F, Galofaro V, De Angelis A, Galvano M, Bognanno M, Galvano G.. Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. *J Food Protect* 1998; 61(6):738-41.
66. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M₁ in yoghurts in Portugal. *Int J Food Microbiol* 2004; 91:315-7.
67. Galvano F, Galofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G. Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Addit Contam* 2001;18(7): 644-6.
68. Kim EK, Shon DH, Ryu D, Park, JW, Hwang HJ, Kim YB. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit Contam* 2000;17(1):59-64.
69. Govaris A; Roussi V, Koudis PA, Botsoglou NA. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. *Food Addit Contam* 2002;11:1043-50.
70. El Deeb, SA, Zaki N, Shoukry YMR, Kheadr EE. Effect of some technological processes on stability and distribution of aflatoxin M₁ in milk. *Egyptian Journal of Food Science*, 1992; 20: 29-42.
71. Blanco JL; Carrion BA; Liria N, Diaz S; Garcia ME, Domingues L, Suarez G.. Behavior of aflatoxin during manufacture and storage yogurt. *Milchwissenschaft*, 1993; 48:385-7.
72. Stoloff L. Aflatoxin M₁ in perspective. *J Food Protect* 1980;43;. 226-30.
73. Stoloff L; Wood G; Carter G. Aflatoxin M₁ in manufactured dairy products produced in the United States in 1979. *J Dairy Sci* 1981;64;:2426-30.
74. Van Egmond HP. Mycotoxins in dairy products. *Food Chem* 1983;11: 289-30.
75. Van Egmond HP, Paulsch WE. Mycotoxins in milk and milk products. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 1986;40:175-88.
76. Sylos CM, Rodriguez-Amaya DB, Carvalho PRN. . Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas. *Food Addit Contam* 1996;13(2):169-172.
77. Sarimehmetoglou B, Kuplulu O, Celik H. . Detection of Aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control* 2004; 15: 45-9.

78. Brackett RE, Marth EH. Association of aflatoxin M₁ with casein. Zeitschrift fur Lebensmittel untersuchung und forschung 1982;174:439-41.
79. Rasic JL; Skrinjar M, Markov S. Decrease of aflatoxin M₁ in yogurt and acidified milks. Mycopathologia, 1991;113:117-9.
80. El Deeb SA. Interaction of aflatoxin M₁ on the physiological and morphological properties of Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus. Alexandria Journal of Agriculture Research 198;34;61-72.
81. Van Egmond HP, Paulsch WE, Veringa HA, Schuller PE.. The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. Archive Institue, Pasteur Tunis, 1977;54: 381-90.

ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Okan KAYALAP
2. Doğum Tarihi : 25.07.1982
3. Doğum Yeri : Kayseri
4. Unvanı : Veteriner Hekim
5. Medeni Durumu : Bekar
6. İş Tecrübesi : Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2011-
7. Yabancı Dil : İngilizce

1. Öğrenim Durumu:

Derece	Üniversite	Fakülte	Yıl
Lisans	Erciyes	Veteriner	2002-2008
Y. Lisans	Erciyes	Sağlık Bilim. Enst.Veteriner Gıda Hij. Ve Tek.	2010-

Adres : Gültepe Mh. Köşk Cd. Bahçekent Sitesi 39/41 Melikgazi, KAYSERİ

Tel : 05325207511

E-mail : okankayaalp@msn.com