

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEVAM SÜTLERİNDE AFLATOKSİN M1'İN ARAŞTIRILMASI

MELTEM KAYA TUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. AHMET ASAN

Yrd. Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. SUZAN ÖKTEN

EDİRNE-2016

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ASAN
Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN

Tez Danışmanı
II. Danışman

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Ahmet ASAN
Prof. Dr. Figen ERTAN
Doç. Dr. Burhan ŞEN
Doç. Dr. Ilgaz AKATA
Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN


Tarih:03/11/2016

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

03/11/2016

MELTEM KAYA TUZ



Yüksek Lisans Tezi

DEVAM SÜTLERİNDE AFLATOKSİN M₁ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Devam sütlerine geçtiği bilinen kimyasal kontaminantlardan biri mikotoksinlerdir. Küfler tarafından üretilen ve devam sütlerine geçebilen mikotoksinler bebekte sağlık riski oluşturabilir. Mikotoksinlerin toksik etkilerinin önlenmesi için bebeğin normal büyüme ve gelişimi için en önemli besinlerden biri olan devam sütündeki aflatoksin M₁ düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Süt kontaminantı olarak aflatoksinlerin kontrolü ile ilgili sosyal koruma projelerinin ve devam sütleri ile ilgili farkındalığın artırılması halk sağlığı korunması açısından önem arz eder.

Bu amaçla, 7 farklı firmadan, farklı seri numaralarına sahip süt örneklerini içeren 60 adet devam sütü toplanmıştır. Çalışmamızda Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak devam sütlerinde aflatoksin M₁ miktarları araştırılmıştır. Avrupa Birliğine uyum çerçevesinde hazırlanmış olan 2008/26 sayılı gıda maddelerindeki kontaminasyonların maksimum limitleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde; çiğ süt, UHT süt ve süt içeren ürünlerin yapımında kullanılan sütlerde maksimum AFM₁ miktarının 0.05 µg/kg (ppb) olması gerektiği belirtilmiştir. AFM₁ konsantrasyonları hesaplandığında; <0.05 ppb konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 37 örnek, >0.05 ppb konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 23 örnek tespit edilmiştir.

Sonuç olarak TGK limit değerini aşan 23 örnek halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Beslenmede devam sütünün çok fazla sıklıkta tüketildiği ve önemli bir rol oynadığı bebek yaş grubunda, bu ürünler piyasaya çıkmadan önce AFM₁ varlığının saptandığı daha kapsamlı araştırmaların yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Yıl : 2016

Sayfa Sayısı : 45

Anahtar Kelimeler : Aflatoksin, Devam sütü, Mikotoksin, ELISA, Aflatoksin M₁

Master's Thesis

Determination of aflatoxin M₁ on follow-on milk

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

SUMMARY

Milk, which is an important source of nutrition is used for infant feeding and consumed widely all over the World. Mycotoxins are chemical contaminants that are known to pass through milk. They are produced by molds and pass through milk, and so may cause health problems in infants. To avoid the toxic effects of mycotoxins; determining the AFM₁ levels in follow-on milks which is one of the most important nutrients for healthy grown babies is an important concern. Raising awareness about follow-on milks and social protection studies that control aflatoxins as milk contaminants is very important in order to protect public health.

In our study, investigation of Aflatoxin M₁ in follow-on milks; a product that newborns take in their diet, and to evaluate the results in terms of public health.

For this purpose, milk samples from 7 firms containing 60 samples from firms with different serial numbers were collected. AFM₁ concentrations were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Our data revealed that 37 of the samples detected to contain <0.05 ppb AFM₁ concentrations, while 23 of the samples exceed this concentration limit. Though, in Turkish Food Codex, 0.05 µg/kg (ppb) concentration of AFM₁ level is allowed, 23 of our follow-on milk samples exceeded the legal values and may cause public health problems.

Year : 2016

Number of Pages : 45

Keywords : Aflatoxin, Follow-on milk, Mycotoxin, ELISA, Aflatoxin M₁

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, dünyadaki tüm bilimsel gelişmelerden bizleri haberdar eden, çalışmış olduğum tezimin yürütücülüğünü üstlenen, her zaman öğrencilerini destekleyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN'a (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Çalışmalarım süresince, gerek laboratuvarında gerekse laboratuvar dışında beni yalnız bırakmayan, bana sürekli destek olan, karşılaştığım problemlerde her zaman beni motive eden ve çalışmış olduğum tezimin yardımcı danışmanlığını üstlenen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'e (Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ecz. Teknolojisi Bölümü),

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince benden desteğini ve güvenini hiç esirgemeyen, her konuda yardım etmeye çalışan, çalışmalarımızda hep güler yüzünü gösteren, samimiyetini ve bilgilerini paylaşmaktan vazgeçmeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Burhan ŞEN'e (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Yüksek lisans tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, her zaman güler yüzünü ve samimiyetini gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ'a (Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ecz. Teknolojisi Bölümü)

Laboratuvar çalışmalarımda benimle birlikte çalışan ve bana yardımcı olan arkadaşlarım Uğur KAYIŞ ve Eda Gizem AYAN'a,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEME ve biricik hayat arkadaşım EŞİME,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

MELTEM KAYA TUZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ.....	VI
BÖLÜM 1: GİRİŞ	1
BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Funguslar	4
2.1.2. Fungusların Karakteristik Özellikleri.....	4
2.1.3. Fungusların Canlılar Arasındaki Yeri	5
2.2. Mikotoksinler	6
2.2. AFLATOKSİNLER.....	7
2.2.1. Aflatoksinlerin Özellikleri.....	7
2.2.2. Aflatoksinlerin Toksikitesi ve Sağlığa Etkileri	11
2.2.3. Aflatoksinlerin Biotransformasyonu.....	13
2.2.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksinler	13
BÖLÜM 3: MATERİYAL VE METOD	15
3.1. Devam Sütü Örneklerinin Toplanması.....	15
3.1. Devam Sütü Örneklerinin Ekstraksiyonu	15
3.2. AFM ₁ Varlığının Gösterilmesi	16
3.2.1. Enzim Immunoassay Prosedürü.....	16
3.2.3. ELISA Yöntemi ile Aflatoksin M ₁ Analizi	16
3.2.4. Deneyde Kullanılan Kit ve Devam Sütü Örneklerinin Fotoğrafları	18
BÖLÜM 4: SONUÇLAR	19
4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi	19
BÖLÜM 5: TARTIŞMA.....	28
KAYNAKLAR.....	33

ÖZGEÇMİŞ	45
-----------------------	-----------

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFB1	: Aflatoksin B1
AFB2	: Aflatoksin B2
AFG1	: Aflatoksin G1
AFG2	: Aflatoksin G2
AFM1	: Aflatoksin M1
AFM2	: Aflatoksin M2
A. B. D.	: Amerika Birleşik Devletleri
°C	: Santigrat derece
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HPLC	: High Performance Liquid Chromotography (Yüksek basınçlı sıvı kromotografi)
IARC	: Uluslar arası Kanser Araştırma Örgütü
kg	: Kilogram
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
ppm	: <i>Parts per million</i>
ppt	: Parts per trillion
ppb	: Parts per billion
rpm	: Revolutions per minute (Dakıkada devir sayısı)
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TLC	: Thin Layer Chromotography (İnce tabaka kromotografi)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. <i>Aspergillus parasiticus</i> ' un elektron mikroskopundaki görüntüsü.....	8
Şekil 2. 2. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	10
Şekil 3. 1. Örneklerin Elisa Prosedüründe Kullanılan Plaktaki Görünümü.....	18
Şekil 3. 2. Örneklerin Elisa Prosedüründe Kullanılan Plaktaki Görünümü.....	18
Şekil 3. 3. Örneklerin Elisa Prosedüründe Kullanılan Plaktaki Görünümü.....	18
Şekil 4. 1. Süt örneklerinin AFM ₁ düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği-1.....	20
Şekil 4. 2. Süt örneklerinin AFM ₁ düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği-2.....	21
Şekil 4. 3. Süt Örneklerinde Saptanan Aflatoksin M ₁ Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Çubuk Modeli.....	23
Şekil 4. 4. Süt örneklerinde Saptanan Aflatoksin M ₁ Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Pasta Modeli.....	24
Şekil 4. 5. Süt Örneklerinde <0.05 ppb Saptanan Aflatoksin M ₁ Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Pasta Modeli.....	25
Şekil 4. 6. Süt Örneklerinde >0.05 ppb Saptanan Aflatoksin M ₁ Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Pasta Modeli.....	26

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Aflatoksinler ve bunları sentezleyen fungus türleri.....	9
Tablo 2. 2. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	10
Tablo 4. 1. Kalibrasyon grafiği-1 ile AFM ₁ varlığı pozitif olarak tespit edilen numunelerde AFM ₁ konsantrasyonu.....	21
Tablo 4. 2. Kalibrasyon grafiği-2 ile AFM ₁ varlığı pozitif olarak tespit edilen numunelerde AFM ₁ konsantrasyonu.....	22
Tablo 4. 3. Firmalara ait devam sütü örneklerinin AFM ₁ konsantrasyonları.....	23

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Süt; toplum beslenmesinde ve sağlığının korunmasında çok önemli yeri olan bir besindir. Önem arz etmesinin nedeni, onun her yeni doğan yavrunun ilk ve temel besini olmasından kaynaklanır. Süt; dünyaya geldiğimiz ilk andan hayatımızın sonuna kadar vücudun gelişmesi, kuvvetlenmesi ve sağlığın devamlılığının sağlanması için gerekli olan besin maddelerini içerisinde barındırmaktadır. İnsanın hayatının her aşamasında ihtiyaç duyduğu süt, C vitamini ve demir gibi maddeleri içeren en iyi kaynaktır. Bilhassa bebeklikte kas ve kemik sağlığı için mühim bir hammadde olan süt, büyüme ve gelişmede, immün sisteminin kuvvetlenmesinde, kan basıncı değerlerinin düzenlenmesinde ve bazı kanser hastalıklarının azaltılmasında koruyucudur.

Bebeklerin sağlıklı büyümesi ve gelişmesi için ilk 6 ay boyunca en sağlıklı besin anne sütüdür. Anne sütünün gerek bebek gerekse anne açısından göz ardı edilemeyecek benzersiz yararları olduğu artık bilinmektedir. Anne sütü, yeni doğanın optimum büyüme ve gelişmesi için ihtiyacı olan sıvı, enerji ve besin maddelerini sağlayan, biyoyararlılığı fazla, hazmı basit, doğal bir besin kaynağıdır [1]. Ana sütü yetersizliği durumunda, vitamin - mineral içeriği ve protein yapısı büyüyen bebeklerin ihtiyaçlarına göre hazırlanmış devam sütleri tercih edilir [2].

Gelişimin bu erken döneminde sadece inek sütündeki vitamin ve mineraller, bebeklerin besin ihtiyacını karşılamaya yetmez. Devam sütleri; inek sütünün faydaları ile biberon mamalarının sunduğu besinleri birleştirir. Erken dönemde bebeklerin doğru beslenmesi, uzun dönemde büyüme ve gelişmesi için kritik öneme sahiptir.

Bunun yanı sıra devam sütlerine geçen kimyasal kontaminatlar bebek sağlığını tehdit etmektedir. Devam sütlerine geçtiği bilinen kimyasal kontaminantlardan biri mikotoksinlerdir [3]. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. oryzae* gibi küf mantarları tarafından oluşturulan aflotoksinler en çok bilinen ve en çok karşılaşılan mikotoksinlerdendir. Günümüzde aflotoksin oluşumuna neden olan bu mantarlar, doğada yaygın olarak bulunurlar ve uygun olmayan koşullarda depolanan ürünlerde kolayca gelişebilirler [4]. Gerek sahada ve gerekse harmanlanma, depolanma, taşınma ve hazırlanma safhalarında, bilhassa ısının ve nemin olduğu durumlar fungusların gelişmesine müsait olduğunda yem ve besinler küflerin istilasına uğrayarak mikotoksinlerle kirlenebilirler [5,6,7].

Küfler için uygun durumlarda ikincil yıkım ürünü olarak meydana getirilen mikotoksinler insan ve hayvanlarda kansere, mutasyona, gelişim bozukluklarına, hormonal bozukluklara, gen bozukluklarına ve sinirsel bozukluklara neden olurlar [8, 9, 10].

Süt ve süt bazlı besin ürünlerinin bilhassa bebekler ve yetişme çağındaki çocukların çok miktarda tüketmesi ile bu sorun önemini daha da arttırmaktadır. Birçok ülke tarafından bu soruna, gerek halk sağlığı gerekse ekonomik açıdan verdiği zararlardan dolayı, gün geçtikçe daha fazla önem verilmektedir. Süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin M₁'in meydana gelmesi çevre koşullarına bağlı olduğundan şartların düzeltilmesi problemin daha basit ve ucuz yollardan ortadan kaldırılmasını sağlayacaktır [9, 11, 12, 13, 14, 15]. Yetişkinlere göre daha fazla süt tüketmek zorunda olan bebek ve çocukların biyotransformasyon kapasitelerinin daha düşük olması nedeniyle aflatoksin M₁'e yetişkin insanlara göre daha duyarlı olması da yine bu toksinin sağlık açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bütün bu bulgular gıda ve yemlerin aflatoksinlerle kontaminasyonunun potansiyel bir halk sağlığı problemi olduğunu göstermektedir [8, 9, 10, 16]. Birçok ülkede yoğun önlemler alınmasına karşın, aflatoksin bulundurmayan süt imali genellikle olası olmamaktadır. İşlenmiş süt ve ürünlerinde yüksek AFM₁ miktarlarının seyrek olarak rastlanmasına karşın, fazla hacimdeki sütün, bir litre bulaşık sütle bile kolayca kontamine olması nedeniyle, piyasa sütlerinde AFM₁'in var olma olasılığı çiğ sütlere oranla daha çoktur. Ek olarak, günümüzde kullanılan çağdaş analitik yöntemler ile sütte bulunan düşük

AFM₁ miktarları bile tespit edilebilmekte ve neticesinde pozitif örneklerin yüzdesi artmaktadır [17].

Bu araştırmanın amacı; kuvvetli toksin özellik gösteren aflatoksin M₁'in devam sütündeki miktarlarını belirleyerek, bebeklerin maruz kalacağı riskleri ve olası sağlık etkilerini yorumlamak, bu riskleri ortadan kaldırmaya yönelik gerekli önlemlerin alınması için önerilerde bulunmaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Funguslar

Fungi (mantarlar), özellikle organik maddelerin biyodegradasyonu olmak üzere çevresel faaliyetlerde önemli rol oynayan, fotosentetik olmayan ve geniş dağılımı olan eukaryotik canlılardır [18].

Fungi, heterotroflar içerisinde çeşitlilik gösteren ve oldukça geniş bir yer kaplayan, ağırlıklı olarak absorpsiyon yöntemiyle beslenen bir gruptur. Mantar türleri çoğunlukla multinükleer hif üretirler ve hücre duvarlarında hem β -glucan hem de kitin maddelerini içerirler [19].

2.1.2. Fungusların Karakteristik Özellikleri

Tüm mantarlar eukaryotiktir. Başka bir ifadeyle, mantar hücreleri birkaç kromozom içeren membran zarıyla çevrili nükleusa ve membran zarıyla çevrili sitoplazmik organelere (vakuol, mitokondri vs.) sahiptirler.

Funguslar tipik olarak uç kısımlarından uzama gösteren **hif** denilen filamentöz yapı sayesinde gelişirler. Fungal hiflerin defalarca uç kısımlarından birbirleri ile birleşerek oluşturduğu ağsı yapıya ise **misel** adı verilir [20]. Fakat *Saccharomyces cerevisiae*'de olduğu gibi bazı fungus türleri (mayalar) tek hücreli olarak gelişir.

Funguslar heterotrof canlılardır. Hücre sentezi için karbon iskeletini ve enerji ihtiyaçlarını önceden oluşturulmuş olan karbon kaynaklarından karşılarlar. Fungusların

hücre duvarı fagositoz yoluyla besinlerin hücre içine alınmasını engeller. Bu nedenle funguslar sadece basit absorpsiyon yoluyla hücre duvarı ve hücre zarında çözünebilir maddeleri doğrudan alır. Çoğu durumda hiflerde üretilen salgı enzimleriyle depolimerizasyonu gerçekleştirerek kompleks moleküllerin daha basit moleküllere dönüşmesini sağlar.

Mantarlar genellikle hücre duvarında glukan (ağırlıklı olarak β -1,3 ve β -1,6 bağlarıyla oluşan glikoz polimeri) ve kitin maddelerini içerir. Bazı mantarların hücre duvarında kısa uzunluklarda selülozun varlığı da tespit edilmiştir. Mantarların hücre duvarı selülozca zengin değildir. Bu durum mantarları bitkilerden ayırt edilmesini sağlar.

Mantarlar karakteristik ölçüde çözülebilir karbonhidratlar ve depolanabilir bileşikler olarak trehalose, mannitol ve glikojene sahiptirler. Bu bileşikler özellikle arthropodlarda olmak üzere bazı hayvanlarda ayırdır fakat bitkilerde farklıdır.

Mantarları hemen hemen tüm diğer eukaryotik canlılardan farklı yapan en önemli özellik, mantarların genellikle haploid nükleusa sahip olmalarıdır. Bazı tomurcuklanmayla çoğalan mayalar diploid nükleusa sahiptirler.

Mantarlar hem eşeyli hem de eşeysiz çoğalabilirler ancak çoğunlukla spor üreterek çoğalırlar. Fungal sporlar şekil, büyüklük ve diğer özellikler bakımından büyük ölçüde farklılık gösterirler [21].

2.1.3. Fungusların Canlılar Arasındaki Yeri

Yaklaşık olarak 1,5 milyon fungus türünün varlığı düşünülmesine rağmen, sadece 80.000 ile 120.000 arasında fungus türü tanımlanabilmiştir [19, 22]. 1960' lı yılların sonuna kadar funguslar bitkiler adı altında sınıflandırılmıştır. Ancak sonradan yapılan laboratuvar çalışmalarında fungusları bitkilerden ayıran en az 4 farklı özellik olduğu tespit edilmiştir:

- Bitkiler klorofil pigmentine sahip olmasına rağmen, funguslar ise bu pigmente sahip değildir.
- Fungusların hücre duvarı özellikle kitin adı verilen karbonhidrat maddesi varken, bitki hücre duvarında ise selüloz adı verilen karbonhidrat maddesi bulunur.
- Fungusların büyük bir kısmı bitkilerde olduğu gibi çok hücreli değil, tek hücrelidir.

- Funguslar heterotrofik canlılar olmasına rağmen bitkiler ototroftirler.

Bu sebeplere dayanarak, funguslar soy ağacındaki *Eukarya* domaini içinde yer alan ve “Fungi” olarak adlandırılan kendilerine ait farklı bir aleme yerleştirilmiştir [23].

2.2. Mikotoksinler

Mantarlar tarafından oluşturularak; bitki, hayvan, insan ve mikroorganizmalara karşı zehirleyici, kanser yapıcı, mutasyona sebep olan tedavide kullanılabilen ve bağışıklık bozucu etkiler yapan maddelere mikotoksin denir [4]. Mikotoksinlerin pek çok farklı türü bulunmakla birlikte bunlardan yaklaşık 20 tanesinin bitkisel ya da hayvansal besin yolu ile hayvanlara geçtiği söylenmektedir [24].

Mikotoksinlerin tarihi oldukça eski yıllara dayanmaktadır. Mikotoksin zehirlenmelerinin kayıtlara geçen ilk örneğini, ergotizm oluşturmaktadır. Ortaçağda çavdar mahmuzuyla kirlenmiş unlardan hazırlanan ekmekleri yiyen insanlarda karıncalanma ve sinirsel belirtiler gözlenmiştir. Bu hastalık belirtileri ortaçağda “Aziz Antonius hastalığı” olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan 1890’lı yıllarda *Penicillium* cinsi mantarlarla kirlenmiş pirinçleri tüketen insanların sağlığının bozulduğu Japon patoloğlar tarafından ortaya konmuştur [25, 26, 27, 28, 29, 30].

Türkiye’nin geçmişinde aflatoksin problemi ilkin, 1967 senesinde Kanada’ya satılan fındıklardan 10 tonluk miktarının iade edilmesiyle vuku bulmuştur. 1972-1974 senelerinde ise ABD’ye satılan fıstıklarda aflatoksin bulunması nedeniyle fıstıklar iade edilmiştir. Kuru inciri dış ülkelere sattığımızda da, 1972 senesinde Danimarka, 1973 ve 1974 senelerinde ABD ile sıkıntı ortaya çıkmış, 1986, 1987 ve 1988 senelerine bakıldığında da tüm satın alımların alıcı taraf tarafından durdurulmasına rastlanılmıştır. 1995 senesinde İsviçre ve Almanya’ya satılan kırmızı biberlerin piyasadan elde edilen numunelerinde aflatoksin varlığı saptanmış fakat biberler iade edilmemiştir [14, 31].

Küflü gıdaların tüketilmesinin hastalık oluşturduğunun anlaşılması, küf mantarlarının önemini ortaya koymuş ve üzerinde çok sayıda araştırmalar yapılmasına neden olmuştur. Hayvan ve insanlara zehirli ve kanser yapıcı etkisi nedeniyle olumsuz yönde etkileyen mikotoksinlerle yapılmış araştırmaların çoğunluğunu aflatoksinler meydana getirmektedir. Aflatoksin dışında hububatlarda bulunan okratoksin A, trikotesenler, patulin ve fumonisin canlıların sağlığını tehdit etmektedir [6, 32, 33, 34].

Mikotoksinlerin vücuda alınan miktarı ve bu durumun süresine bakıldığında, canlılarda bazı sorunlar yaratabileceği ve bundan dolayı emniyetli kabul edilebilir düzeyin minimum olması, yani mikotoksin varlığının tespit edilmemesi gereklidir. Ancak minimum düzeyden kasıt sıfır olması olduğundan gerçekte bu durum mümkün değildir. Bu nedenle saptanacak maksimum kabul edilebilir değerler kriter olarak kullanılmaktadır [32].

2. 2. AFLATOKSİNLER

Aflatoksin terimi *Aspergillus*'un A ve *flavus*'un fla harflerinin birleştirilip toksin kelimesinin ilavesiyle oluşturulmuştur [35,36].

Aflatoksinler hayvanlar ve insan için toksik olmaları, besin maddelerinde kirlenmeye neden olmaları, canlılarda kanser yapıcı etkilerinin görülmeleri, kontamine yem tüketen hayvanların ürünlerinde izlerine rastlanmalarıyla, üstünde durularak araştırma yapılan mikotoksin sınıfını oluşturmaktadırlar [37].

2.2.1. Aflatoksinlerin Özellikleri

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* (Şekil 2. 1), *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* ve bazı *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri tarafından uygun sıcaklık ve rutubet koşullarında sentezlenen toksik, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik fungal metabolitlerdir [17, 38, 39,40](Steyn, 1995

Son yıllarda yapılan çalışmalarla *Aspergillus pseudotamarii* [36], *Aspergillus bombycis* [43] ve *Aspergillus ochraceoroseus*'un da [44] aflatoksin sentezledikleri bildirilmiştir. Aflatoksinler ve bunları sentezleyen fungus türleri Tablo 2. 1'de sunulmuştur [45].



Şekil 2.1. *Aspergillus parasiticus*' un elektron mikroskobundaki görüntüsü [46].

Aflatoksinlerle ilk karşılaşma 1960 yılında görülmektedir. İngiltere’de, Güney Amerika ve Afrika’dan alınan yerfıstığıyla beslenen 100.000 hindi yavrusunun telef olmasıyla araştırılan yemlerde *Aspergillus flavus* bulunmuş ve *Aspergillus flavus* tarafından üretilen toksine de aflatoksin (*Aspergillus flavus* Toxin – A-fla-toxin) adı verilmiştir. Meydana gelen toksik bileşiklerin yapısından elde edilen araştırmalar sonucunda 4 farklı bileşik (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) belirlenmiştir [47, 48, 49].

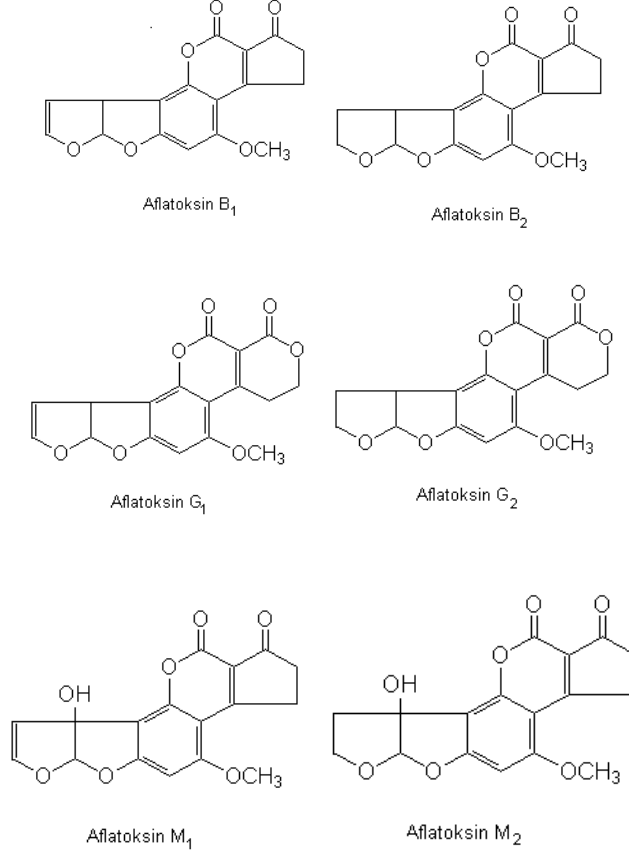
Tablo 2.1. Aflatoksinler ve bunları sentezleyen fungus türleri [45].

Fungus türleri	Aflatoksinler			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+
<i>A.flavus var. columnaris</i>		+		
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+		
<i>Asergillus parasiticus</i>	+	+	+	+
<i>A.parasiticus var. globosus</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+			
<i>Aspergillus wentii</i>	+			
<i>Aspergillus ruber</i>	+			
<i>Aspergillus ostianus</i>	+	+		
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+			
<i>Penicillium variabile</i> (<i>Talaromyces variabilis</i>)	+			
<i>Penicillium puberulum</i> (<i>Penicillium aurantiogriseum</i>)	+	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+			
<i>Penicillium frequentans</i>	+			

Aflatoksinlerin aldıkları bu harfler ultraviole ışığı altında verdikleri renklere göre yapılmıştır. İlk olarak, Ultraviole ışığı (UV) altında mavi renkli floresan veren bileşenler, aflatoksin B₁ (AFB₁) ve aflatoksin B₂ (AFB₂) olarak isimlendirilmiştir. Yeşil sarı renkte floresan gösteren bileşenler de G₁ ve G₂ olarak isimlendirilmiştir.

İlerleyen dönemlerde aflatoksinli yemleri tüketen laktasyon dönemindeki çiftlik hayvanlarının sütünde bu toksinin bir benzerinin varlığı saptanmıştır. Sütte saptanması nedeniyle toksine “süt toksini” (milk toxin) manasında aflatoksin M denilmiştir. Aflatoksin M’ nin saptanmasının ardından yapılan çalışmalar bu metabolitin B₁ ve B₂’nin türevleri olduğu belirlenmiş ve aflatoksin M₁ (AFM₁) ve M₂ adlı iki ayrı bileşik olarak izole edilmiştir. Toksinlere verilen sayılar zehirlilik düzeyini göstermektedir. “1” ile gösterilenler yüksek, “2” ile gösterilenler düşük zehirlilik oranını ifade etmektedir [50, 51, 52].

Aflatoksin B₂, aflatoksin B₁'in, aflatoksin G₂ ise aflatoksin G₁'in türevidir. İn vivo şartlarda metabolik olarak B₁ ve G₁'e dönüşmedikleri sürece aktif değildirler. Aflatoksin M₁ ve M₂, aflatoksin B₁ ve B₂'nin türevidir (Şekil 2. 2 ve Tablo 2. 2) [53].



Şekil 2. 2 Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları [53].

Tablo 2. 2 Aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri [53].

Aflatoksin	Molekül formülü	Molekül ağırlığı	Kaynama noktası	Ultraviyole absorpsiyonu	Floresans emisyonu
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	21,800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	23,400	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	16,100	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	21,000	450
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	19,000	425
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	-----	-----

Normal çevresel koşullarda oldukça dayanıklı olan aflatoksinler ancak 300°C üzerinde 25 dakika süreyle pişirilen ekmek veya benzeri koşullar uygulanan karma yemlerin aflatoksin içeriği ancak %60 dolayında azalabilmektedirler [30]. Toksine maruz kalmış sütlerin işlemleri sırasında ısı işlem, fermantasyon ve kurutma gibi sütün mamul maddeye çevrilmesinde kullanılan yöntemlerin toksini destabilize etmediğinin anlaşılması, AFM₁'in süt ve süt ürünlerinden uzaklaştırılmasında özel yöntemlerin kullanılması gerekliliğini ortaya çıkartmıştır [54].

2.2.2. Aflatoksinlerin Toksikitesi ve Sağlığa Etkileri

Aflatoksinler, besinlerle birlikte alınan mikotoksin kirliliklerinin insanlara yönelik akut ve kronik toksisite riski yaratma olasılıkları yönünden en fazla incelenen çeşitleridir. İnsan ve bütün hayvan türlerinde çok yaygın ve toplu zehirlenmeler neden olan aflatoksinlerin bilinen en güçlü doğal karsinojen olduğu anlaşılmıştır [30].

Aflatoksinler, maruz kalınan düzeyine ve süresine göre insan ve hayvanlarda zehirlenmelere yol açabilmektedirler. Vücuda alınan aflatoksinin neden olduğu mikotoksikozise *aflatoksikozis* adı verilmektedir. Aflatoksikozis, bireysel olmaktan ziyade toplumu ve sürüyü ilgilendiren bir problemdir [33,55, 56].

Herhangi bir vakada nedenin saptanamaması, durumun belirtilerinin belirli besinlerle ilişkilenebilmesi, bazı ilaçlarla tedaviye verilen cevabın yeterli olmaması gibi durumlarda aflatoksine maruz kalındığından kuşulanılmalıdır [57].

Aflatoksinle kontamine yemleri yiyen süt sığırlarında, süt üretiminde azalma olabilmektedir [59]. İnsanlarda kayıtlı akut aflatoksikozis olgularından belki de en önemlisi, 1967'de Tayland'da iki çiftlik kuruluşunda çalışan 26 kişinin açık yiyecek zehirlenmesine maruz kalması ve bunlardan 3'ünün ölmesi şeklinde rapor edilmiştir. Konu ile ilgili çalışmalar ve otopsi sonuçları zehirlenmeye işçilerin tükettikleri aflatoksinle kontamine (200µg/kg) pirincin neden olduğunu göstermiştir. Diğer bir aflatoksikozis olgusu da 1974 yılında Hindistanda şekillenen ve 400 kişiyi etkileyen, etkilenenlerden 100 tanesinin öldüğü aflatoksin ilişkili hepatitis olgusudur [58, 60].

Aflatoksinlerin halk sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin ortaya çıkmasıyla, 19 Haziran 1993'de Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu, AFB₁ 'i birinci dereceden, AFM₂ 'yi ise ikinci dereceden karsinojen sınıfına almıştır.

Küflü tahılların yenilmesiyle Hindistan ve Afrika'da karaciğer kanseri görölme olasılığının yüksek olduğu belirtilmiştir [61, 62].

Devlet İstatistik Enstitüsü kayıtlarına göre 1999 yılı itibariyle Türkiye'de toplam süt üretimi 10.082.010 tondur [63]. Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü, aflatoksinleri Grup I karsinojenler olarak açıklamıştır [64].

Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerine zararlı etkilerinin ortaya konmasından sonra Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu 19 Haziran 1993 tarihinde Aflatoksin B₁ 'i 1. sınıf, Aflatoksin M₁ 'i de 2. sınıf karsinojenler içerisine dahil etmişlerdir [65].

Böyle ürünleri tüketen insanlarda kronik zehirlenmeler, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler görülebilir. Bazı çalışmalarda aflatoksinle kontamine olmuş besinlerin hem hayvanlar hem de insanlarda karaciğer kanseri ve immün sistem baskılanması gibi toksik etkilere neden olduğu bildirilmektedir [66, 67].

Bu toksik etkilerin ise maruz kalınan miktara ve süreye bağlı olarak değişiklik gösterdiği vurgulanmaktadır.

Aflatoksinlerin neden olduğu toksik etkilerden en çok etkileneceklerin başında, toplumun risk gruplarından birisi olan çocuklar gelmektedir. Özellikle bebekler düşük vücut ağırlıkları, yüksek metabolik hızları, yeterli detoksifikasyon yapamamaları, organların ve dokuların tam olarak gelişmemiş olması gibi nedenlerle yetişkinlere göre daha fazla risk taşımaktadırlar [11, 68, 69].

Karsinojenlerin biyotransformasyon kapasitesi bebeklerde yetişkinlere göre daha düşük olduğundan, daha uzun süre vücutta kalabilmektedirler.

Temel gıda maddesi olan süt, insan beslenmesi açısından büyük öneme sahiptir. Özellikle bebek ve çocukların beslenmesinde gıda maddesi olan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin M₁ içeriğinin tespiti önem arz etmektedir. Bu nedenle insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan besinlerdeki miktarlarının tespiti büyük bir önem arz etmektedir. Bebek ve çocukların beslenmesinde sütün büyük rol oynadığı ve bünyelerinin yetişkinlere oranla daha duyarlı olduğu düşünülürse, süt ve süt ürünlerinde

bulunan aflatoksin M₁'in kontrol altına alınmasının halk sağlığı açısından ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır.

2.2.3. Aflatoksinlerin Biotransformasyonu

Vücuda alınan aflatoksinler sınırlı ölçüde absorbe edilirler. Dolaşıma katılan toksinler plazmadan ayrılır, karaciğer ve kaslara giderler. Vücutta bulunan AFB₁'in %85 ile %90'ı ilk 24 saatte dışkı (%75), idrar (%15-20) ve süt ile değişime uğramamış metabolitleri şeklinde atılır. AFB₁ vücutta çeşitli metabolik değişikliklere maruz kalarak AFM₁'e dönüşür [5].

Aflatoksinlerin, toksik ve karsinojenik olabilmeleri için oksidatif metabolizmaya uğramaları gereklidir [70, 71]. Deneysel olarak aflatoksin biyosentezinin toksijenik mantarlarca asetattan başlayarak polihidroksi antrakinin üzerinden dekaketidler, norsobrinik asit, averantin, averufin versikonol asetat, versikolorin A, sterigmatosistin ve aflatoksin B₁ verecek şekilde gerçekleştiği anlaşılmıştır [30].

Aflatoksin B₁'in süte biyotransformasyonla geçiş yaptığı gibi sütte kısmen oluşabilmektedir. AFM₁, AFB₁'in, AFM₂ de AFB₂'nin hepatic biyotransformasyonun bir sonucudur. AFB₁'in yemle alınması durumunda sütteki AFM₁ kontaminasyonu hesaplanabilmektedir.

2.2.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksinler

Bitkisel ürünlere göre bulunma sıklığı ve miktarı az olmakla birlikte hayvansal ürünler içinde aflatoksine en fazla süt ve sütlü ürünlerde rastlanmaktadır. Süt ve sütlü ürünlerde aflatoksin kontaminasyonu iki kaynaktan köken alır. Bunlardan birincisi laktasyon dönemindeki hayvanların yedikleri yemler ile aldıkları aflatoksin B₁ ve B₂'in süte aflatoksin M₁ ve M₂ şeklinde geçmesidir. İkinci kaynak ise sağımdan sonraki taşıma, işleme ve depolama işlemleri sırasında süt ve süt ürünlerine aflatoksin sentezleyen küflerin bulaşması ve aflatoksin üretmeleriyle olmaktadır [73,74, 75, 76, 77].

Süt veren hayvanlarda aldıkları AFB₁'in hangi miktarda AFM₁'e dönüştüğünü belirlemek için bazı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar farklı sonuçları işaret

etmekle birlikte genel bir yargı olarak, tüketilen yemdeki AFB₁'in %1-3 arasında değişen oranlarda süte geçtiğini bildirilmektedirler [33, 78]. Pittet ise bu oranın %6'ya kadar çıkabileceğini rapor etmiştir [79].

AFB₁'in AFM₁'e dönüşüm oranının; günden güne, hayvanın bir süt verme döneminden diğer süt verme dönemine, sağım zamanı ve sağım sıklığına, hayvandan hayvana ve hayvanın süt verim düzeyine bağlı olarak değişebildiğini bildirilmektedir [78,80].

Süt ürünleri ise AFM₁ ile kontamine süttten yapılmaları ve süt ürünlerinde aflatoksin üreten küflerin üremesine bağlı olarak birkaç aflatoksin çeşidi ile kontamine olabilmektedirler [80].

Süt ve ürünlerindeki aflatoksinin miktarları coğrafî bölgelere, ülkelere ve mevsimlere göre farklılıklar gösterdiği, bahar ve yaz mevsiminde kış mevsimine oranla sütlerde daha az miktarlarda AFM₁ bulunduğu, dolayısıyla bu mevsimlerde yapılan süt ürünlerinde de AFM₁ miktarının önemsenmeyecek düzeylerde görülebileceğini bildirilmiştir [81, 82, 83].

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Devam Sütü Örneklerinin Toplanması

Çalışmada 7 farklı firmaya ait devam sütü örnekleri toplanmıştır. Örnekler Eylül 2014 - Şubat 2015 tarihleri arasında toplanmıştır. Örneklerin deney aşamaları Şubat 2015 – Haziran 2015 tarihleri arasında tamamlanmıştır.

3. 1. Devam Sütü Örneklerinin Ekstraksiyonu

Numune buzdolabı sıcaklığında soğutulup 2-8 °C’de 3000xg’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ile süttten yağ tabakası ayrılıp yağsız kısım direkt olarak analize alınmıştır. 25-1250 ppt ölçüm aralığında en etkili aflatoksin M₁ konsantrasyonunu elde etmek için örnek 5 kez dilüe edilmiştir (100 µl örnek + 400 µl örnek diluenti).

3. 2. AFM₁ Varlığının Gösterilmesi

3. 2. 1. Enzim Immunoassay Prosedürü

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodu ve M₁ ELISA test kiti kullanıldı. Örneklerin ekstraksiyonundan sonra analiz prosedürü, üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3. 2. 3. ELISA Yöntemi ile Aflatoksin M₁ Analizi

Çalışmada Ridascreen Aflatoksin M₁ ELISA kiti kullanıldı. -20⁰C'de saklanmış olan süt örnekleri, oda sıcaklığında çözdürüldü. 10 dakika 3500g'de 10⁰C'de santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası üstteki kremamsı yağlı kısım alındı. Yağsız kısım analize alındı.

Aflatoksin M₁ ELISA kiti oda sıcaklığına getirildi.

Konsantre halde bulunan Aflatoksin M₁ Enzim Konjugatı, 400µL konjugat +4mL tampon çözelti kullanılarak 1:11 oranında dilüe edildi (1+10).

Konsantre halde bulunan Antiaflatoksin M₁ antikor solüsyonu tampon çözelti kullanılarak 1:11 oranında dilüe edildi (1+10).

Tampon çözeltisi olarak kitin içerisinde yer alan PBS Tween Tampon Tuzu kullanıldı.

Tuz, 1 L distile su içerisinde çözümlenerek hazırlandı.

1. Mikrolakalar üzerinde tüm örneklerin ve standartların 2 paralel çalışılabileceği şekilde yerleştirme planlandı ve not edildi.

2. Dilüe edilmiş Ab solüsyonundan her kuyucuğa 100 µL eklendi. Elle çok yavaş karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

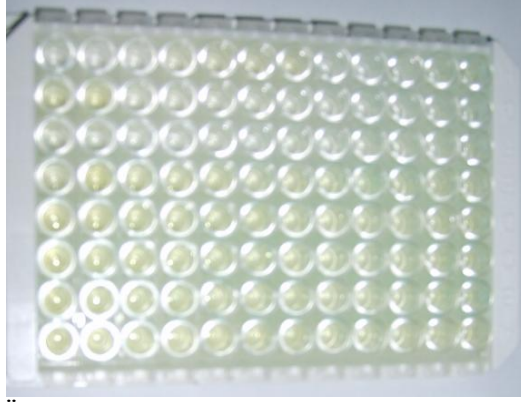
3. Kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı. Mikrolaka, kurutma kağıdının üzerine hafifçe vurularak sıvının tamamen uzaklaştırılması sağlandı.

4. Tüm kuyucuklar 250 µL yıkama tamponu ile dolduruldu ve içerik tekrar boşaltıldı. Aynı işlem 2 kez tekrarlandı.

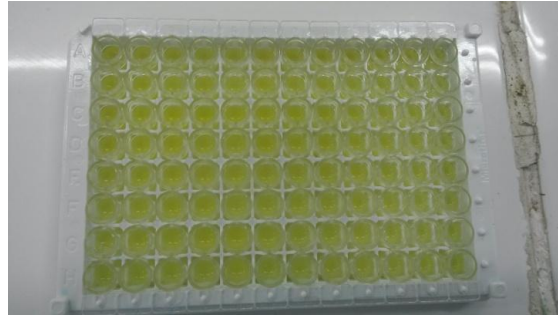
5. 100 µL standart solüsyonlar ve hazırlanan örneklerden 2 paralel olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Elle çok yavaş karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

6. Kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı. Mikropılaka, kurutma kağıdının üzerine hafifçe vurularak sıvının tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
7. Tüm kuyucuklar 250 µL yıkama tamponu ile dolduruldu ve içerik tekrar boşaltıldı. Aynı işlem 2 kez tekrarlandı.
8. Tüm kuyucuklara 100 µL dilüe edilmiş enzim konjugatı eklendi. Elle çok yavaş karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
9. Kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı. Mikropılaka, kurutma kağıdının üzerine hafifçe vurularak sıvının tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
10. Tüm kuyucuklar 250 µL yıkama tamponu ile dolduruldu ve içerik tekrar boşaltıldı. Aynı işlem 2 kez tekrarlandı.
11. Tüm kuyucuklara 100 µL substrat eklendi. Elle çok yavaş karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
12. Tüm kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklendi. Elle çok yavaş karıştırıldı ve 15 dakika içerisinde 450nm'de okundu.
13. Sonuçlar RIDA®SOFT Win (Art.No.Z9999) Softyware ile değerlendirildi. Hesaplamalar aşağıda verilen formülle yapıldı.
Hesaplama= $\frac{\text{Örneğin absorbansı}}{\text{Maksimum bağlanma}} \times 100$

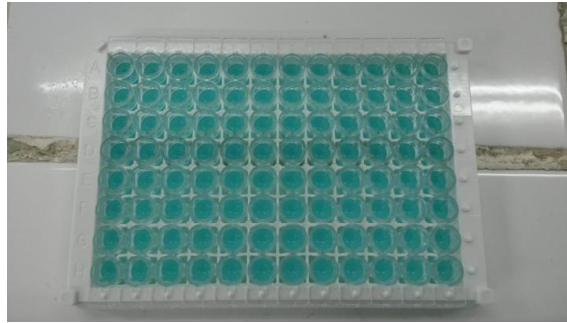
3. 2. 4. Deneyde Kullanılan Kit ve Devam Sütü Örneklerinin Fotoğrafları



Şekil 3. 1. Örneklerin Elisa Prosedüründe Kullanılan Plaktaki Görünümü



Şekil 3. 2. Örneklerin Elisa Prosedüründe Kullanılan Plaktaki Görünümü



Şekil 3. 3. Örneklerin Elisa Prosedüründe Kullanılan Plaktaki Görünümü

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR

4. 1. Sonuçların Değerlendirilmesi

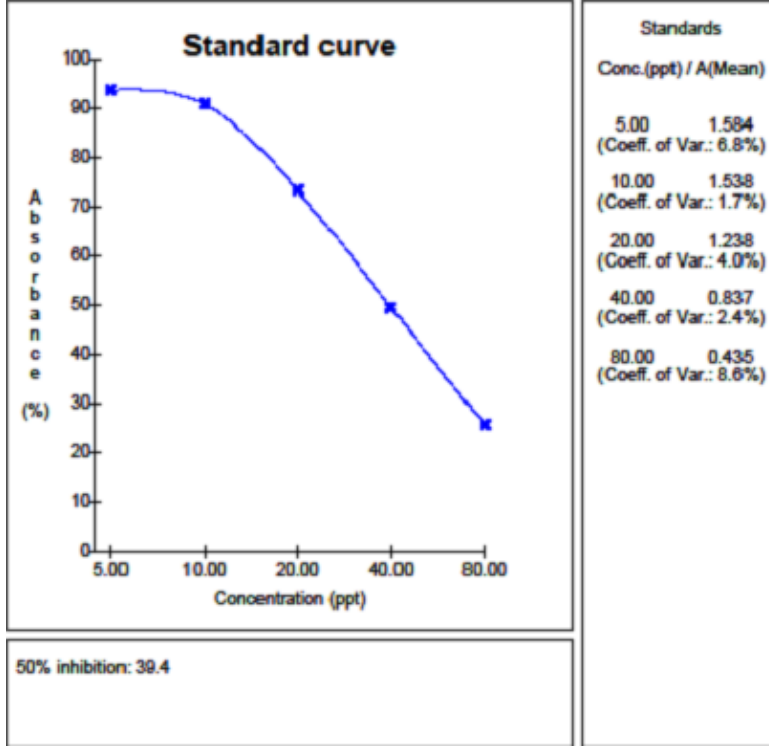
AFM₁ konsantrasyonları hesaplandığında; <0.05 ppb (parts per billion) konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 37 örnek, >0.05 ppb konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 23 örnek tespit edilmiştir.

AFM₁ varlığı tespit edilen 23 devam sütü örneğinden; 0.06-0.07 ppb konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 3 örnek, 0.07-0.08 ppb konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 1 örnek, 0.08-0.09 ppb aralığında 1 örnek, 0.09-0.10 ppb aralığında 1 örnek, 0.10-0.11 ppb aralığında 2 örnek, 0.11-0.12 ppb aralığında 3 örnek, 0.12-0.13 ppb aralığında 3 örnek, 0.13-0.14 ppb aralığında 1 örnek, 0.14-0.16 ppb aralığında 1 örnek, 0.16-0.17 ppb aralığında 1 örnek, 0.17-0.18 ppb aralığında 1 örnek, 0.18-0.19 ppb aralığında 1 örnek, 0.19-0.20 ppb aralığında 1 örnek, 0.20-0.23 ppb aralığında 1 örnek ve 0.23-0.34 ppb aralığında ise 2 örnek olduğu görülmektedir.

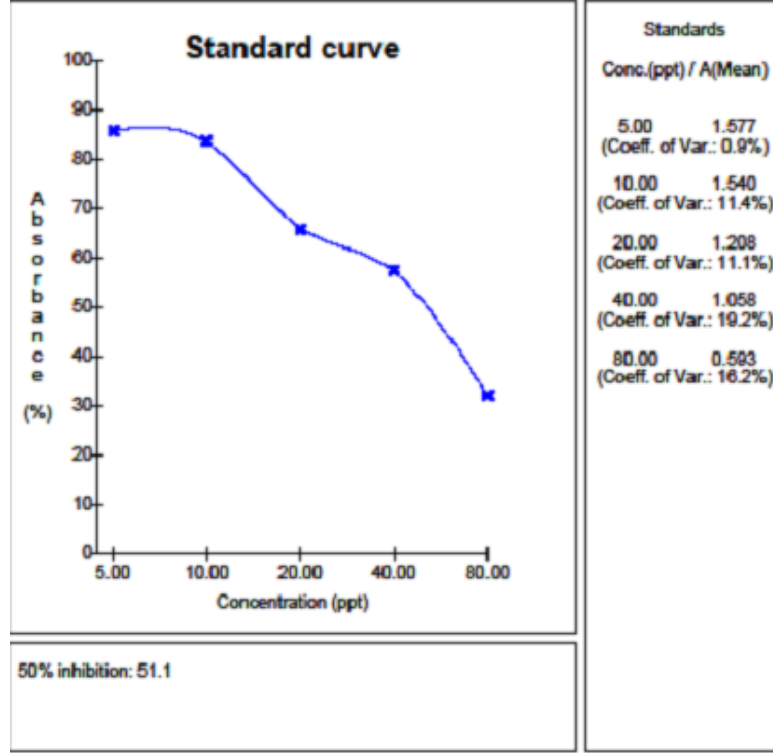
Avrupa Birliğine uyum çerçevesinde hazırlanmış olan 2008/26 sayılı gıda maddelerindeki kontaminasyonların maksimum düzeyleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde; çiğ süt, UHT süt ve süt kökenli maddelerin üretiminde kullanılan sütlerde maksimum AFM₁ miktarının 0.05 µg/kg (ppb) olması gerektiği bildirilmiştir.

Yukarıda belirtilen veriler doğrultusunda, 37 devam sütü örneğinde, Türk Gıda Kodeksi limit değerini aşan AFM₁ konsantrasyonu tespit edilmemiştir.

ELISA yöntemiyle devam sütü örneklerinin AFM₁ düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafikleri Şekil 4. 1 ve Şekil 4. 2'de, tespit edilen AFM₁ konsantrasyonları Tablo 4. 1 ve Tablo 4. 2'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Süt örneklerinin AFM₁ düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği-1



Şekil 4. 2. Süt örneklerinin AFM₁ düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği-2

Tablo 4. 1. Kalibrasyon grafiği-1 ile AFM₁ varlığı pozitif olarak tespit edilen numunelerde AFM₁ konsantrasyonu

Örnek Numarası	Ortalama Absorbans	Hesaplanan ppt	ppb
3	1.580	6.65	0.0665
10	1.550	8.45	0.0845
11	1.573	7.1	0.0710
20	1.587	6.25	0.0625
26	1.471	13.1	0.1310
28	1.394	17.65	0.1765
36	1.475	12.8	0.1280
38	1.582	6.6	0.0660
41	1.493	11.75	0.1175

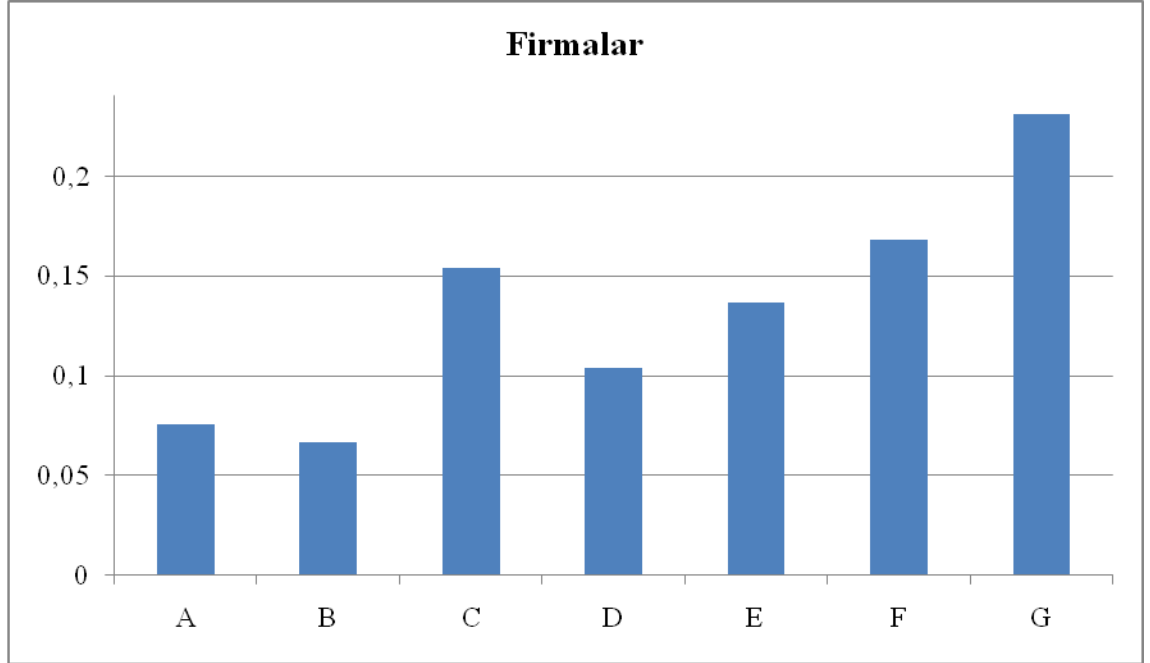
Tablo 4. 2. Kalibrasyon grafiği-2 ile AFM₁ varlığı pozitif olarak tespit edilen numunelerde AFM₁ konsantrasyonu

Örnek Numarası	Ortalama Absorbans	Hesaplanan ppt	ppb
44	1.176	23.12	0.2312
45	1.487	11.31	0.1131
46	1.535	9.97	0.0997
47	1.208	20.49	0.2049
49	1.505	10.83	0.1083
50	1.359	14.63	0.1463
51	1.236	18.94	0.1894
59	1.486	11.33	0.1133
60	1.101	34.19	0.3419
61	1.439	12.53	0.1253
62	1.224	19.55	0.1955
63	1.432	12.70	0.1270
72	1.312	16.03	0.1603
73	1.519	10.45	0.1045

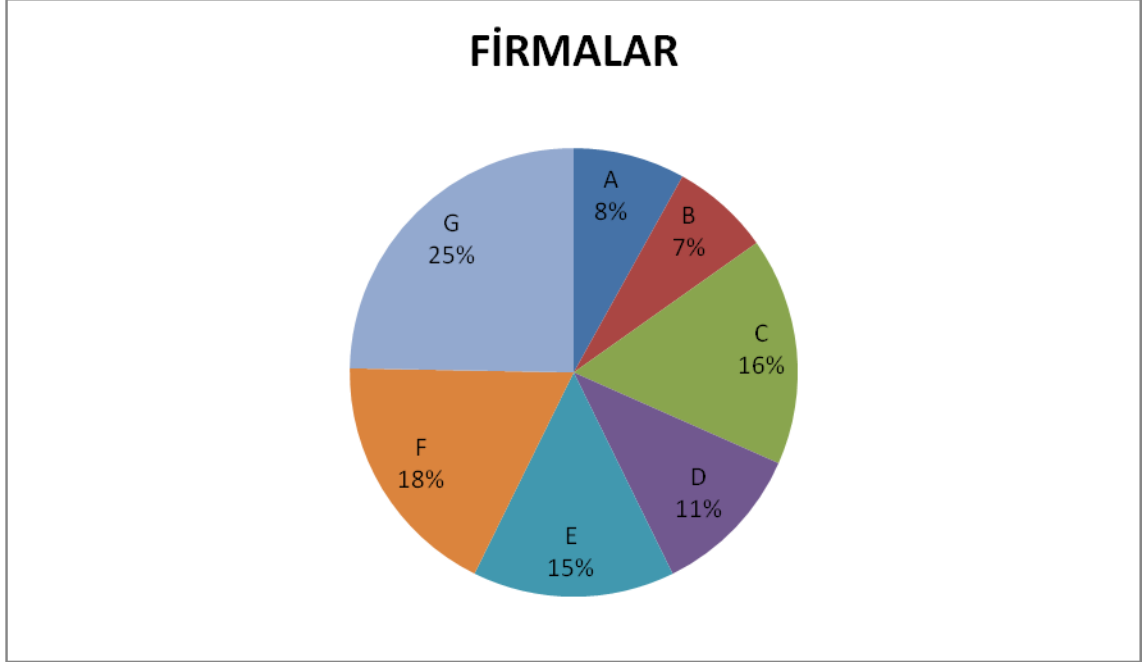
Tablo 4. 1'e ve Tablo 4. 2'ye bakıldığında devam sütü örneklerine ait AFM₁ bulguları için analiz sonucuna göre firmalar arası (A, B, C, D, E, F, G) ortalama değerler standart değerden yüksektir fakat fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ayrıca Tablo 4. 3'de firmalara ait tespit edilen AFM₁ değerleri verilmiştir. Şekil 4. 3 ve Şekil 4. 4'de firmalara (A, B, C, D, E, F, G) ait ortalama değerler çubuk ve pasta dilimi grafikleri şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 4. 3. Firmalara ait devam sütü örneklerinin AFM₁ konsantrasyonları

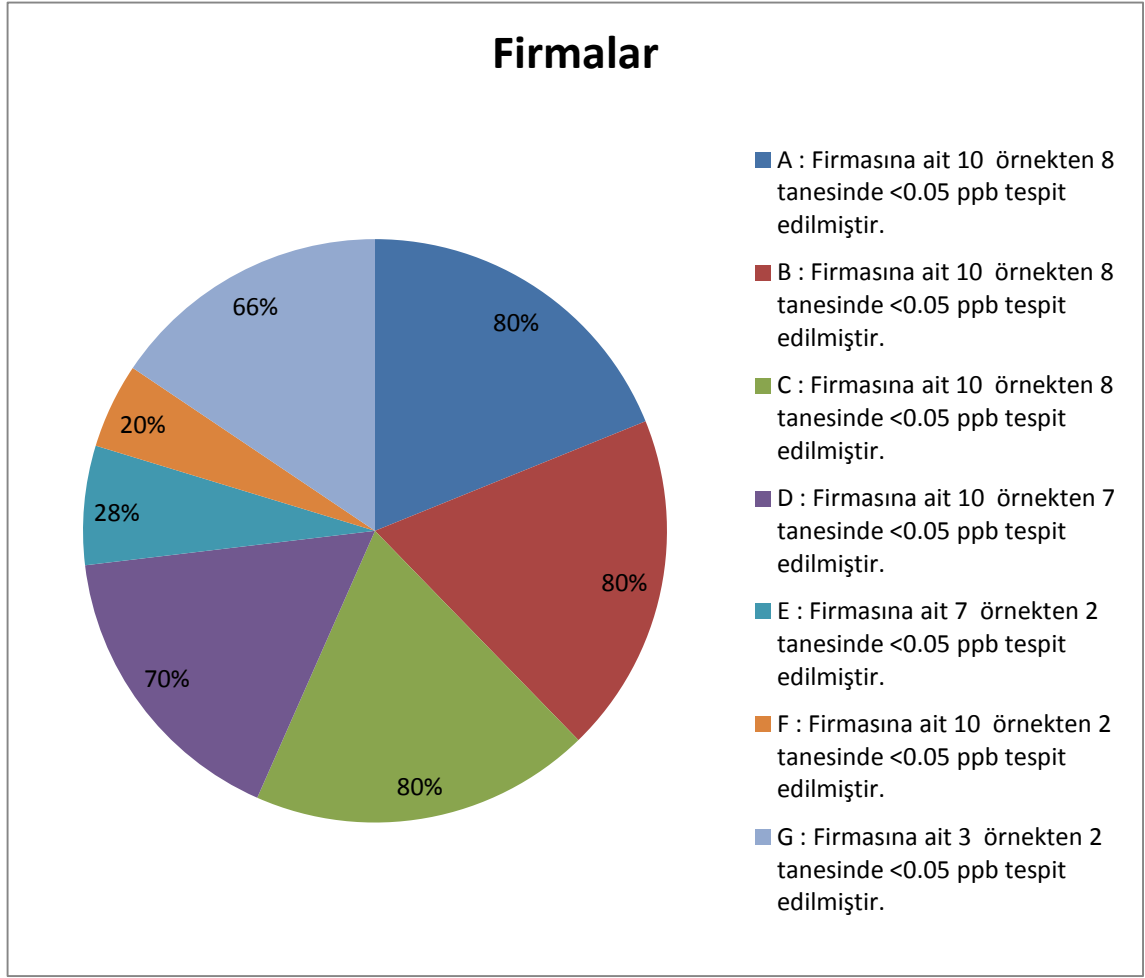
Örnek No	Firmalar						
	A	B	C	D	E	F	G
1	<0,05	0,0710	<0,05	<0,05	0,1131	<0,05	<0,05
2	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,0997	0,1083	<0,05
3	0,0665	<0,05	<0,05	<0,05	0,2049	0,1463	0,2312
4	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,1894	
5	<0,05	<0,05	<0,05	0,1280	0,1603	<0,05	
6	<0,05	<0,05	0,1310	<0,05	0,1045	0,1133	
7	<0,05	<0,05	<0,05	0,0660	<0,05	0,3419	
8	<0,05	<0,05	0,1765	<0,05		0,1253	
9	<0,05	0,0625	<0,05	<0,05		0,1955	
10	0,0845	<0,05	<0,05	0,1175		0,1270	



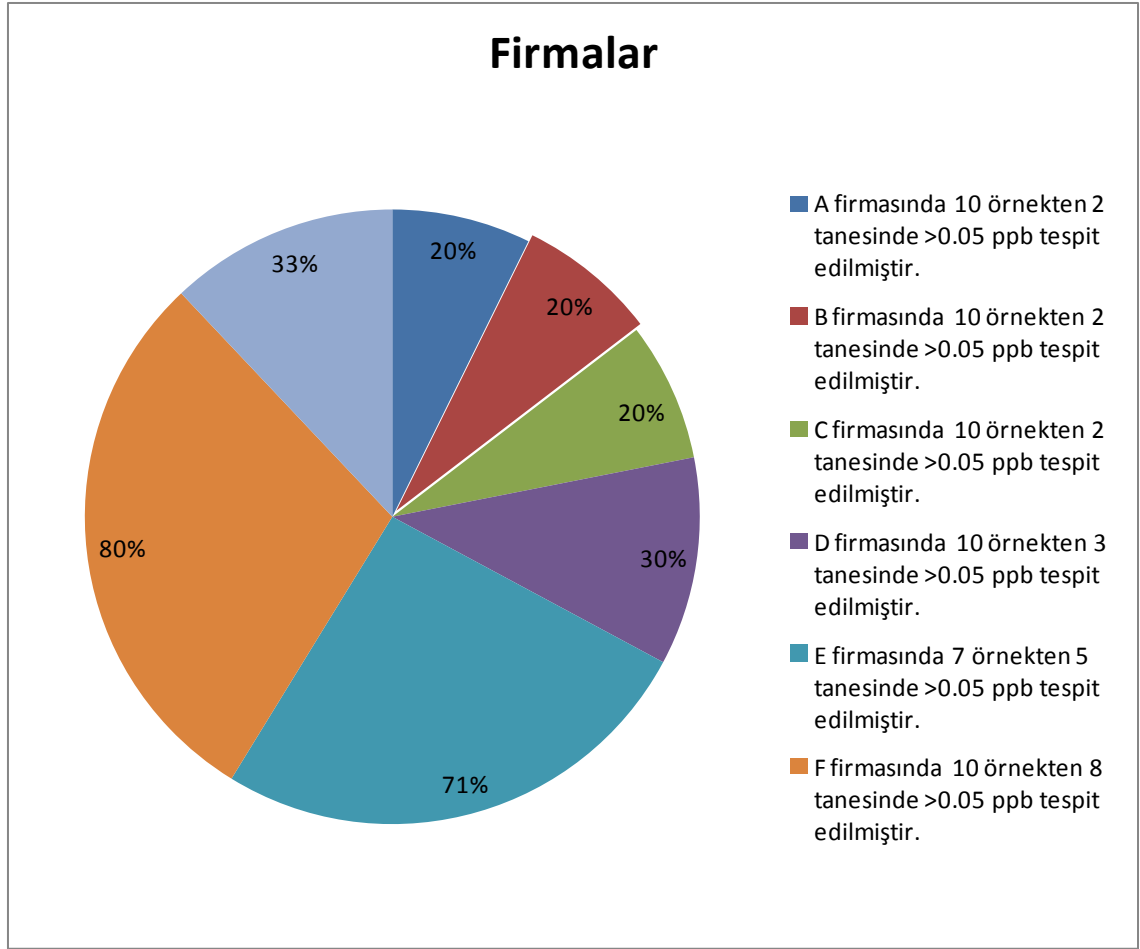
Şekil 4. 3. Süt Örneklerinde Saptanan Aflatoxin M₁ Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Çubuk Modeli.



Şekil 4. 4. Süt Örneklerinde Saptanan Aflatoksin M_1 Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Pasta Modeli



Şekil 4. 5. Süt Örneklerinde <0.05 ppb Saptanan Aflatoksin M₁ Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Pasta Modeli



Şekil 4. 6. Süt Örneklerinde >0.05 ppb Saptanan Aflatoksin M₁ Miktarlarının Firmalara Göre Dağılımı Pasta Modeli

Çalışmamızda piyasadan sağlanan yedi farklı firmaya ait (A, B, C, D, E, F, G) 60 adet devam sütü materyal olarak kullanılmıştır. Toplanan örneklerin ELISA testi ile AFM₁ düzeyleri araştırılmıştır.

Sonuçlara göre Tablo 4. 3 incelendiğinde A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait en düşük ve en yüksek değerler bakımından AFM₁ değerleri sırasıyla (ppb) 0.0625, 0.0660, 0.0665, 0.0710, 0.0843, 0.1175, 0.1280, 0.1313 ve 0.1765 sınırları içerisinde olduğu görülmüştür.

Tablo 4. 4 incelendiğinde A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait en düşük ve en yüksek değerler bakımından AFM₁ değerleri sırasıyla (ppb) 0.0997, 0.1045, 0.1083,

0.1131, 0.1133, 0.1253, 0.1270, 0.1463, 0.1603, 0.1894, 0.1955, 0.2049, 0.2312 ve 0.3419 olarak bulunmuştur.

Şekil 4. 5 incelendiğinde A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait ortalama değerler küçük değerden büyük değere göre sırasıyla A firması % 7, B firması % 8, D firması % 11, E firması % 15, C firması % 16, F firması % 18 ve G firması % 25 olarak belirlenmiştir.

A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait devam sütü örneklerinin <0.05 ppb değerinin altında kalan 37 örneğin ortalamaları ise Şekil 10' da verilmiştir.

A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait devam sütü örneklerinin >0.05 ppb değerinin altında kalan 23 örneğin ortalamaları ise Şekil 4. 6' da verilmiştir.

BÖLÜM 5

5. TARTIŞMA

Kuvvetli toksin özellik gösteren aflatoksin M₁'in devam sütündeki miktarlarını belirlemek, bebeklerin maruz kalacağı riskleri ve olası sağlık etkilerini yorumlamak, bu riskleri ortadan kaldırmaya yönelik gerekli önlemlerin alınmasında önerilerde bulunmak amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Örnekler Eylül 2014 – Mart 2015 tarihlerinde toplanmıştır. Alınan örnekler ELISA yöntemiyle okunmuştur.

Çalışma sonucunda, incelenen toplam 60 devam sütü örneğinin hepsinde AFM₁ saptanmış olup, 37 örnekte ise Türk Gıda Kodeks'ine göre kabul edilebilir sınırlar içerisinde AFM₁ bulunmuştur (Tablo 5). Türk Gıda Kodeks'ine göre 23 örnekte sınırları aşan devam sütü örneği tespit edilmiştir (Tablo 3 ve Tablo 4). Süt örneklerine ait Aflatoksin M₁ (AFM₁) bulguları için yapılan varyans analizi sonucuna göre firmalar arası fark önemli bulunmuştur.

A, B, C, D, G firmalarının ortalama AFM₁ değerleri Türk Gıda Kodeksinde (TGK) belirtilen maksimum bulaşan değerinden (0.05 ppb) daha büyüktür. A, B, C, D, G firmalarına ait ortalama değerler standart değerden yüksektir fakat fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. E ve F firmalarına ait ortalama değerler ise standart değerden yüksektir ve fark önemli bulunmuştur.

Devam sütlerinde sağlık açısından risk oluşturacak aflatoksin düzeyleri Türk Gıda Kodeks'ine göre değerlendirilmiştir; söz konusu değerler sütte; 0.05µg/kg, süt tozunda (dry milk); 0.5µg/kg, peynirlerde; 0.25µg/kg, bebek mama ve devam formüllerinde; 0.020µg/kg olarak bildirilmektedir.

Çalışmada örneklerin 23'ünde AFM₁ miktarının Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğu belirlenmiştir (Tablo 3 ve Tablo 4).

A, B, C, D, E, F, G Firmalarına ait devam sütü örneklerine ait ortalama değerler standart değerden yüksektir. Fark istatistiksel olarak önemlidir. Bu nedenle devam sütlerinde AFM₁ varlığının bulunması önemli bir risk oluşturduğunu düşünerek çalışmamızda Türkiye'de yaygın olarak tüketilen devam sütü ürünlerinde AFM₁ miktarları araştırılmıştır.

İnek, manda, koyun ve keçi gibi bazı hayvanların yemlerle vücutlarına aldığı ve yüksek kanserojen etki gösteren aflatoksin B₁ sindirim sistemlerinde metabolize olarak sütlerine aflatoksin M₁ (AFM₁) olarak geçmektedir [84, 85, 86]. Kontamine olan süt ve süt ürünlerini tüketen insanların, özellikle de bebek ve çocukların sütte bulunan AFM₁ toksinine maruz kalma olasılığının yüksek olduğu tahmin edilmektedir [84, 85, 86].

Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin miktarının belirlenmesi için ince tabaka kromatografisi (thin layer chromatography=TLC), ELISA ve yüksek performans sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography) kullanılmaktadır. Ancak ELISA yönteminin, duyarlılığının yüksek olması ve de kullanımının basit olması nedeniyle süt ürünlerinde AFM₁ analizinde en sık kullanılan yöntem olduğu bilinmektedir [87, 88].

Bu çalışmada da, ELISA yöntemi kullanılmıştır. Birçok ülkede ve ülkemizde yapılan birçok çalışmada süt ve süt ürünlerinde AFM₁ düzeyini belirlemek için analiz yapılmıştır [89, 88, 90].

Yapılan araştırmaların bulgularına bakılırsa, AFM₁'in süt ve süt ürünlerindeki düzeylerinde ülkelere ve ülkelerin coğrafi konumlarına göre büyük farklılıklar gözlenebilmektedir.

Raza, Pakistan'da UHT ve çiğ sütlerde AFM₁ düzeyini araştırmıştır; UHT sütlerde %11.25 (29.3-102.8 ng/L), çiğ sütlerde % 33 (39.2-342.6 ng/L) oranında AFM₁ tespit etmiştir [91].

Ankara'da ise 2014 yılında yapılan bir çalışmada 84 bebek devam sütünden 32'sinde (% 38,1), peynir örneklerinde 0.0055-0.0201 µg/kg arasında değişen AFM₁ konsantrasyonları tespit edilmiştir [105].

Küba'da aflatoksinle bulaşık olduğu sanılan yemlerin hayvanlar tarafından yenilip, sindirildikten sonra hayvanların sütlerinde yapılan ölçümlerde, örneklerin

%63'ünün kabul edilebilir AFM₁ düzeyini aştığı bildirilmektedir [92]. Brezilya'da, 100 adet süt örneğinden yapılan bir araştırmada [93], sadece bir örnekte AFM₁ (200ng/l) tespit edilirken, iki çiftlikten alınan 50 süt örneğinin 9'unda, 100-1680 ng/l arasında AFM₁ tespit edilmiştir [94].

Mısır, El-Giza' da, 1996 yılında süt örneklerinde tespit edilen en yüksek AFM₁ miktarının 3.72 µg/l olduğu bildirilmiştir [95]. Portekiz'de, 1999 yılında, çiftliklerden alınan 31 çiğ sütte AFM₁ miktarı %80.6 iken ve süpermarketlerden alınan ticari 70 UHT sütte AFM₁ miktarı %84.2 olarak tespit edilmiştir [96].

İtalya'da, marketlerde satılan ticari süt, süt tozu ve yoğurt gibi ürünlerden toplam 360 örnekte yapılan analizlerde, sütlerin %86'sında, süt tozlarının %84'ünde, yoğurtların ise %80'inde AFM₁ düzeyi saptanmıştır [88].

İngiltere'de, yaz mevsiminde tahlil edilen tam yağlı ticari sütlerde, AFM₁ rastlanma düzeyi %44, kış mevsiminde tahlil edilen ticari sütlerde ise % 66 olarak tespit edilmiştir.

Trucsess [97,98], Arjantin, Brezilya, Kıbrıs, Mısır, Almanya, Hindistan, İtalya ve İspanya'dan elde ettiği süt örneklerinin analizi sonucunda, en düşük miktara Almanya'dan alınan örneklerde ulaşmıştır. Bu konuda kaydedilen yakın çalışmalarda, Avrupa'daki süt ve süt ürünlerinde AFM₁ düzeyinin epeyce düşük olduğunu bildirilmektedir.

Ülkemizde İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) kullanılan çalışmalarda Demirer [85], süt, peynir, süt tozu, tereyağı, yoğurt ve ayran olmak üzere toplam 334 örneği, Çoksöyler ve Köşker [99], 101 adet çiğ süt örneğini, Kardeş [100], 123 adet farklı peyniri, Gürbüz ve arkadaşları [91], Konya'da, 240 peynir örneğini analiz etmişler ve bu çalışmalar sonunda örneklerinde AFM₁ tespit edememişlerdir.

TLC kullanılan diğer çalışmalarda ise, Kaya [90], Ankara'da, çiğ süt örneklerinin %5.7'sinde ortalama 0.4 ppb AFM₁ tespit etmiştir.

Bakırcı [101], Van'da 90 adet çiğ süt örneğinden 79 tanesinde %87.77 AFM₁ belirlemiş, pozitif örneklerden 35 tanesinde ise %44.30 AFM₁ miktarlarının 0.05µg/L'yi aştığını belirtmiştir.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile yapılan çalışmalarda, Van'daki çiğ süt örneklerinde AFM₁ mevcudiyeti araştırılmış ve 90 adet örneğin

%87.7'de yüksek oranda AFM₁ olduğu bildirilmiştir [19]. Erzurum yöresinde, 500 adet süt ve süt örneğinde %77.6 oranda AFM₁ miktarı tespit edilmiştir.

Sarımehmetoğlu ve arkadaşları [102], Ankara'da, farklı ticari firmalara ait 85 adet pastörize süt örneğinin %63.86'sında tespit edilen AFM₁'in, Türk Gıda Kodeksi'nce ifade edilen kabul edilebilir düzeylerini aştığını bildirmiştir. Oruç ve Sonal [103], Bursa'da, 10 süt örneğinde AFM₁'in %10 olduğunu bildirmiştir.

Yüksek basınçlı likid kromatografi (HPLC) kullanılan çalışma sayısı daha az olmakla birlikte, Özkaya ve arkadaşları [104], Türkiye'de, 25 adet farklı ilden aldıkları süt örneklerinde yaptıkları bir çalışmada, 360 örnekten 159 adetinde %44.3 AFM₁ miktarı belirtmişler ve 48 adetinde ise %13.3 0.05µg/L'yi aştığını tespit etmişlerdir.

AFM₁ varlığının insan sağlığı üzerindeki toksik etkisinin önlenmesi ve kontrol edilmesi amacıyla, AFM₁'in süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek düzeylerine, bazı ülkeler ve ilgili kuruluşlar tarafından sınırlamalar getirilmiştir. Fakat AFM₁'in süt ve ürünlerindeki kabul edilebilir düzeyleri ülkeler ve kurumlar arasında değişiklik gösterebilmektedir. Polonya'da süt ve süt ürünlerinde AFM₁ varlığının bulunmasına izin verilmemektedir [86].

AFM₁ varlığının süt ve süt ürünlerinde rastlanmasını, insan ve hayvan sağlığı açısından risk taşımamasını engellemek ve zararlı etkilerinden korunmak için, ilk öncelikle yem ve gıda maddelerinde fungus üremesinin ve toksin (AFB₁) oluşumunun önlenmesi, AFB₁ oluşmuş ise, kontamine olan yemler ile gıdaların insan ve hayvanlar tarafından alınmasının engellenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, Türkiye'de süt ve süt ürünlerinde AFM₁'in bulunma oranının yüksek olduğu, süt ve süt ürünlerinin halk sağlığını tehdit edebilecek düzeylerde AFM₁ içerebildiği; Avrupa Birliği ülkeleri gibi gelişmişlik düzeyi ülkemizden yüksek ülkelerin süt ve süt ürünlerinde AFM₁ varlığı tespit edilmesine rağmen, bu miktarların halk sağlığını tehdit etmeyecek düzeylerde olduğu görülmektedir.

Devam sütlerinde AFM₁ varlığı özellikle bebek ve çocuk sağlığı açısından büyük bir risktir. Devam sütleri bebek ve çocuklar için kullanılan önemli bir besin kaynağıdır. Bebek ve çocukların beslenmesinde sütün büyük rol oynadığı ve bünyelerinin yetişkinlere oranla daha duyarlı olduğu düşünülürse, süt ve süt ürünlerinde bulunan aflatoksin M₁'in kontrol altına alınmasının halk sağlığı açısından ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır.

Bu nedenle, hayvan yemlerinde *Aspergillus* türleri gibi küf mantarlarının üremesinin ve aflatoksin oluşumunun önlenmesi çok önemlidir. Bunu önlemek amacıyla ülkemizde yem, süt ve süt ürünleri konusunda faaliyet gösteren kişi ve kuruluşların, yem ve ham maddelerinde AFB₁, süt ve süt ürünlerinde AFM₁ varlığının önemi ve AFM₁'den korunma yolları konusunda, bilgilendirerek bilinçlendirilmelerinin sağlanması, yemlerde AFB₁, süt ve ürünlerinde AFM₁ kontrollerinin düzenli olarak yapılması gerekmektedir. Ayrıca, süt ve süt ürünlerindeki AFM₁ miktarının en düşük seviyede tutulabilmesi için, modern üretim tekniklerinden yararlanılmalı, süt hayvanlarına verilen yemlerin depolanma koşulları uygun hale getirilmeli ve gerekli kontroller düzenli olarak yapılmalı, süt ve süt ürünleri üreticileri bu konu hakkında bilinçlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Atıcı, A. , Polat S. , and Turhan A. , H. , *Anne Sütü ile Beslenme, Türkiye Klinikleri Journal of Pediatric Science*, 2007.
- [2] Samur, G. , *Anne Sütü Beslenme Birliği Serisi I*, Ankara Sağlık Bakanlığı Yayınları, 2008.
- [3] Mead, M. , *Contaminants in Human Milk Weighing the Risks against the Benefits of Breastfeeding, Enviromental Health Perspectives*, 2010.
- [4] Sümer, S. , *Genel Mikoloji*, 1. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006.
- [5] Kaya, S. , Pirinçci, İ. , Bilgili, A. , *Mikotoksinler, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, Medisan Yayınevi, Ankara, 2001.
- [6] Whitlow, L. W. , Hagler, W. M. , *Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment*, Proc. Southwest Nutr. Conf. , 2005.
- [7] Agag, B. I. , *Mycotoxins in foods and feeds*, Ass. Univ. Bull. Environ. Res. , 2004.
- [8] Bakırcı, İ. , *Sütlerde Aflatoksin M₁ Oluşumu ve Ürünlere Geçişi Üzerinde Bir Araştırma, Doktora Tezi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 1995.
- [9] Akdemir, Ç. , *Ankara'da işlenen sütlerde Aflatoksin M₁ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması, Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2001.

- [10] Yiannikouris, A. , Jouany, J. P. , *Mycotoxins in feeds and their fate in animals: areview*, Anim. Res. , 2002.
- [11] Galvano, F. , Galofaro, V. and Galvona, G. , *Occurrence and stability of aflaxoxin M₁ 'in milk and milk products: A worldwide Review*, Journal of Food Protection, 1996.
- [12] Franco, C. M. , Fente, C. A. , Vazquez, B. I. , Cepeda, A. , Mahuzier, G. , Prognan, P. , *Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q₁, M₁ and P₁ fluorescence and chromatographic studies*, J. Chrom. A.
- [13] Akdemir, Ç. , Altıntaş, A. , *Ankara'da işlenen sütlerde aflatoksin M₁ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması*, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, Ankara, 2004.
- [14] Özmenteşe, N. , *İstanbul piyasasından sağlanan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin B₁ ve M₁ içerikleri yönünden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması, Doktora Tezi*, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2002.
- [15] Van Egmond, H. P. , Jonker, M. A. , *Worldwide regulations on aflatoxins, The situation in 2002 (Absract)*, J. Toxicol. , 2004.
- [16] Oruç, H. , H. , *Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M₁ (AFM₁) ve Türkiye'deki durumu, Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, Bursa, 2003.
- [17] Govaris, A. , Roussi, V. , Koidis, P. A. , Botsoglou, N. A., *Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing, ripening and storage of Telemes cheese*, Food Addit. Contam. , 2001.
- [18] Hanson, J. R. , *The chemistry of Fungi, RSC Publishing, Cambridge CB4 0WF*, UK, 2008.

- [19] Kirk, P. M. , Canon, P. F. , David, J. C. , Stalpers, J. A. , *Ainsworths & Bisbys Dictionary of The Fungi, 9th Edition*.CABI Publishing, Wallingford, 2001.
- [20] Carlile, M. J. , *The success of hypha and mycelium, In: Gow, N. A. R. And Gadd, G. M., eds. , The Growing Fungus*. London: Chapman and Hall, 1995.
- [21] Dacon, J. W. , *Fungal Biology, 4th Edition*. Blackwell Publishing, Malden, Oxford, Australia, 2006.
- [22] Hawksworth, D. L. , *The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*, Mycological Research, 2001.
- [23] Pommerville, J. C. , *Alcarno's Fundamentals Of Microbiology, 9th Edition*. Jones And Bartlett Publishers, Baston, Toronto, London Singapore, 2011.
- [24] Tüzel Kışi, *Mycotoxins, Institute of Food Science and Technology Information Statement*, 2009.
- [25] Bash, G. , Rae, I.D. , *The structure and chemistry of aflatoxins, In Aflatoxin, ed. L. A. Goldblatt. Academic Press*, New york, 1969.
- [26] Davis, N. D. ve Diener, U. L. , *Mycotoxins, In Food and beverage Mycology, ed. L. R. Beuchat*, AVI Publishing Company, West port, 1979.
- [27] Sargeant, K. , Sheridan, A., O'Kelly, J. Carnaghan, R. B. A. , *Toxicity associated with certain samples of groundnut*, Nature, 1961.
- [28] Şanlı, Y. , Ceylan, S., Kaya, S. , *Tavuk yemlerinde ve yem ilkel maddelerinde Aflatoksinler*, Ankara Üni. Vet. Fak. Derg. , Ankara, 1982.
- [29] Şanlı, Y. , Kaya, S. , *Veteriner Klinik Toksikoloji*, Medisan Yayınevi, Ankara, 1994.

[30] Şanlı, Y. , Kaya, S. , Pirinçci, İ. , Yavuz, H. , Baydan, E. , Demet, Ö. , Bilgili, A. , *Veteriner Klinik Toksikoloji*, Medisan Yayınevi, Ankara, 1995.

[31] Ender G. , *Kaşar Peynirinin Olgunlaştırılması Aşamasında Aflatoksin M₁ Düzeyinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2001.

[32] Sonal S. , Oruç H. H. , *Bursa bölgesindeki tavuk çiftliklerinden sağlanan yemlerde mikotoksin düzeyleri*, Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg. , 11(2), 1-6, Van, 2000.

[33] Creppy E. E. , *Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe*, Toxicol. Lett., 127, 19-28, 2002.

[34] Gilbert J, Anklam E. , *Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs*, Trends Anal. Chem. , 21, 468-486, 2002.

[35] Gürbüz Ü, Nizamlioğlu M, Nizamlioğlu F, Dinç G. , Doğruer Y. , *Bazı et, süt ürünleri ile baharatlarda aflatoksin B₁ ve M₁ aranması*, Veterinarium, 10(1):34-41, 1999.

[36] Kabak, B. , *Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in baby formulae in Turkey; Occurrence and safety evaluation*, Food Contr. , 2012.

[37] R- Biopharm A. G. , *Ridascreen Aflatoxin M₁ Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁*, Art. No. R1121. R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany, 2012.

[38] D'Mello J.P.F and Macdonald A.M.C. , *Mycotoxins, Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166, 1997.

[39] Başkaya R. , Atasever M. , *Erzurum bölgesindeki civit peynirlerinde AFM₁*

düzeylerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma, II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, İTÜ, 128-133, İstanbul, 2005.

[40] Günşen U. , Büyükyörük İ. , *Piyasadan temin edilen taze kaşar peynirlerinin bakteriyolojik kaliteleri ile aflatoksin M₁ düzeylerinin belirlenmesi*, Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 27:821-825, 2003.

[41] Deveci, O., & Sezgin, E. , *Aflatoxin M₁ levels of skim milk powders produced in Turkey. Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 139–142, 2005.

[42] Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., Goto, T., *Aspergillus pseudotamarii, a new aflatoxin producing species in Aspergillus section flavi*, Mycol Res., 105, 233-239, 2001.

[43] Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T. , *Aspergillus bombycis, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, A. nomius*. Mycologia, 93, 689–703, 2001.

[44] Klich, M.A., Mullaney, E.J., Daly, C.B., Cary, J.W. , *Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by Aspergillus tamarii and Aspergillus ochraceoroseus*, Appl. Microbiol. Biotech., 53, 605-609, 2000.

[45] Ayçicek, H. , Yarsan, E. , Sarimehmetoğlu, B. , Çakmak, O. , *Aflatoxin M₁ in white cheese and butter consumed in Istanbul, Turkey*, Veterinary and Human Toxicology, İstanbul, 2002.

[46] Kılıç S. , *Süt Mikrobiyolojisi*, Sidas Medya, İzmir, 2010.

[47] Detroy RW, Lillehoj EB, Ciegler A. , *Aflatoxin and Related Compounds. In: Ciegler A, Kadis S, Ajl SJ, eds. Microbial Toxins*, Academic Press, New York, 1971.

- [48] Jay JM, *Modern Food Microbiology*, Chapman and Hall, London, 1992.
- [43] Karadeniz F, Ekşi A. , *Gıdalarda Mikotoksin oluşumu ve azaltılması*, Dünya Gıda, 7-8: 104-110, 2002.
- [49] Sert S. , *Gıda ve yem maddelerinde aflatoksinler*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 14:181-187, 1983.
- [50] Wood G. E. , *Aflatoxin M₁ in Mycotoxins and phytoalexins*, Sharma RP, Salunkhe DK. (Edit), Florida: CRC Pres. Inc. , 145-164, 1991.
- [51] Van Egmond HP. , *Aflatoxin in milk, The Toxicology of Aflatoxins: Human Health*, Vet. Agric. Sig. Acad. Pres. Inc. , 365-381, 1994.
- [52] Özkaya Ş. , Temiz A. , *Aflatoksinler: kimyasal yapıları, toksitöleri ve detoksifikasyonları*, Mikrobiyoloji Dergisi, 01, 01, 1-21, 2003.
- [53] Yousef AE, Marth EH. , *Stability and degradation of aflatoxin M₁*, In Van Egmond HP (Edit.), *Mycotoxins in Dairy Products*. London: Elsevier, 127-161, 1989.
- [54] Tunail N. , *Funguslar ve Mikotoksinler*, N. Medisan Yayınevi, 2000.
- [55] Çelik S. , *Karaciğer karsinojeni olan aflatoksinlerin biyokimyasal histolojik etkileri ve sağaltım seçenekleri*, J. Fac.Vet.Med. , 2001.
- [56] Busby W. , F. , Jr, Wogan G. N. , *Aflatoxins. In: Edwards F, ed. Chemical Carcinogens*, York: Maple Press Co, 1984.
- [57] Park, D. I, *Effect of processing on aflatoxin*, Adv Exp Med Biol, 2002.
- [58] Grigoriadou I. K, Eleftheriadou, Mouratidaou T. , Katikou P. , *Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and feta*

cheese Food Control, 16: 257-61, 2005 .

[59] Gürbay, A. , Aydın, S. , Girgin, G. , Engin A. B, Şahin, G. , *Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. Food Control*, Ankara, 2006.

[60] Afshar, P. , M. Shokrzadeh, S. Kalhori, Z. Babae, and S. S. Saeedi Saravi, *Occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M₁ in human breast milk in Sari, Iran. Food Contr.* , 2013.

[61] Omaye ST. , *Food and Nutritional Toxicology*, CRC Press, ISBN 1-58716-071-4, 308, 2004.

[62] Anonymous, Ridascreen, *Aflatoksin M₁ Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁*, r –Biopharm GmbH, Germany, 1999.

[63] Passone M., Resnik S.L., Etcheverry M.G., *In vitro effect of phenolic antioxidants on germination. growth and aflatoxin B accumulation by peanut aspergillus section*, Journal of Applied Microbiology, 99, 3, 682, 2005.

[64] Çoksöyler N. , *İçel yöresinde yetiştirilen yer fıstıklarında aflatoksin oluşumu nedenleri üzerine araştırmalar*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1984.

[65] Gourama H., and Bullerman L.B., *Aspergillus flavus: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds*, Journal of Food Protection, 58, 1995.

[66] Williams J., Philips T.D., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M., and Aggarwal D., *Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology exposure, potential health consequences and interventions*, American Journal of Clinical Nutrition, 80, 1106-1122, 2004.

- [67] Kalantari H., Kalannari G.H., and Khorasgani Z.N., *Evaluation of aflatoxins contamination in baby food supplements (Mamana and Ghoncheh)*, Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 6, 1, 42-50, 2011.
- [68] Galvano F., Pietri A., Bertuzzi T., Gagliardi L., Ciotti S., Luisi S., Bognanno M., Fauci L., Lacopino A.M., Nigro F., Volti G., Vanella L., Giammanco G., Tina G.L., and Gazzolo D., *Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk*, Molecular Nutrition and Food Research, 52, 496-501, 2008.
- [69] Stark A. A. , *Mechanisms of Action of Aflatoxin B1 at the Biochemical and Molecular Levels. (Edited by Charles L. Wilson and Samir Droby.)*, *Microbial Food Contamination*, CRC Press , ISBN 0-8493-2229-4, 81-94, 2001.
- [70] Groopman JD, Cain LG, Kensler TW. , *Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer*, Crit. Rev. Toxicol, 19:113-146, 1988.
- [71] Mace K. , *Aflatoxin B₁-induced DNA Adduct Formation and p53 Mutations in CYP-450- expressing Human Liver Cell Lines*, Carcinogenesis , 18:1291–1297, 1997.
- [72] Van Egmond H. P. , *Mycotoxin in dairy products. Food Chem.*, 11, 4, 289-307, 1983.
- [73] Blanco J. L, Carrion B. A, Liria N, Diaz S. , Garcia M. E, Dominguez L, Suarez G. , *Behavior of aflatoxins during manufacture and storage of Yoghurt*, Milchwiss 48, 7, 385–387, 1993.
- [74] Barrios M. J, Medina L.M, Cordoba M. G, Jordano R. , *Aflatoxin producing strains of Aspergillus flavus isolated cheese. J. Food Prot.* , 60 , 2, 192-194, 1997.
- [75] Nilüfer D. , Boyacıoğlu D. , *Süt ve süt ürünlerinde mikotoksin riski ve analizi*, Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu , İzmir, 2003.

- [76] Sarimehmetoglu B. , Kuplulu Ö. , Çelik T. H. , *Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA Food Cont*, 15, 45-49, 2004.
- [77] Veldman A. , *Effect of sorbentia on carry-over of aflatoxin from cow feed to milk*, *Milchwissenschaft* , 47, 2, 777-780, 1992.
- [78] Pittet A. , *Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update review*, *Rev Med Vet*, 149, 6, 479-492, 1998.
- [79] Van Egmond H. P. , *Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. Mycotoxins in Dairy Products. In H.P. Van Egmond (Ed.)*, New York: Elsevier Applied Science, 11-55, 1989.
- [80] Panariti E. , *Seasonal variations of aflatoxins M₁ in the farm milk in Albania*, *Arh. Hig. Rada Toksikol*, 52, 37-41, 2001.
- [81] Kamkar A. , *A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran*, *Food Cont*, A. Kamkar, *J.Vet. Res.* , 63, 2, 7-12, 2008.
- [82] Birdane Y. , Akaya L. , Baskaya R. , Cemek M. , Bulut S. , *Afyonkarahisar'da tüketime sunulan UHT sütler ile çiğ sütlerdeki AFM₁ miktarının belirlenmesi*, 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, İstanbul, 2006.
- [83] Gomez-Arranz, E. , and I. Navarro-Blasco, *Aflatoxin M₁ in Spanish infant formulae: Occurrence and dietary intake regarding type, protein-base and physical state*, *Food Addit. Contam. B*, 2010.
- [84] Başkaya R. , *Civil peynirinde ELISA yöntemiyle aflatoxin M₁ seviyesinin saptanması, Yüksek Lisans Tezi*, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Erzurum, 2004.

- [85] Creppy E. E. , *Update survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe*, Toxicology Letters, 127, 19-28, 2002.
- [86] Grigoriadou I. K, Eleftheriadou, Mouratidaou T. , Katikou P. , *Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and feta cheese*, Food Control, 16, 257-61, 2005.
- [87] Amra H. A. , *Survey of aflatoxin M₁ in Egyptian raw milk by ELISA*, Reveue de Medicina Veterinaria, 149, 695, 1998.
- [88] Sarımehmetoğlu B. , Küplülü Ö. , Çelik T. H. , *Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA*, Food Control , 15, 45-9, 2004.
- [89] Atasever M. , Nizamlıoğlu M. , Özturan K. , Karakaya Y. , Ünsal C. , *Erzurum bölgesinde tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin M₁ yönünden İncelenmesi*, II. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Bildiri Kitabı, İstanbul, 2006.
- [90] Bakırcı I. , *A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turke.*, Food Control , 12, 47-51, 2001.
- [91] Raza R. , *Occurrence of aflatoxin M₁ in the milk marketed in the city of Karachi, Pakistan*, Journal of the Chemical Society of Pakistan , 28, 155-7, 2006.
- [92] Margolles E. , Escobar A. , Acosta A. , *Aflatoxin B₁ residuality determination directly in milk by ELISA*, Revista-de-Salud-Animal, 12, 1-3, 35-38, 1990.
- [93] Sabino M. , Purchio A. , Zorzetto Map, *Variations in the levels of aflatoxin in cow's milk consumed in the city of Sao Paulo, Brazil*, Food Add. and Cont. , 6, 321-326, 1989.
- [94] De Sylos, C. M. , Rodriguez-Amaya D. B. , Carvalho P. R. N, *Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil*. Food Add. and Cont. , 13, 2, 169-172, 1996.

- [95] Amra, H. A. , Bars J le, Galtier, P. , Burgat, V. , Guerre, P. , *Survey of aflatoxin M₁ in Egyptian raw milk by enzyme-linked immunosorbent assay, Mycotoxins in food chain: processing and toxicological aspects*, Revue-de-Medicine-Veterinaire, 695, 1998.
- [96] Martins, M. L. , Martins, H. M. , *Aflatoxin M₁ in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal, Food Add and Cont. , 17, 10, 871-874, 2000.*
- [97] Trucksess, M. , V. , *Mycotoxins*, Journal of AOAC International, 81, 128-137,1998.
- [98] Trucksess, M. , V. , *Mycotoxins*, Journal of AOAC International, 82, 488-495, 1999.
- [99] Çoksöyler, N. , Köşker, Ö. , *Süt ve yemde aflatoksin oluşumu üzerine araştırmalar*, A.Ü. Zir. Fak., Y.O. , İhtisas Tez Özetleri, 1, 436-456, 1980.
- [100] Kardeş, E. , *Türk Silahlı Kuvvetlerine Bağlı Askeri Birliklere Alınan Peynirlerde Aflatoksin B₁ ve M₁ varlığının ve Seviyelerinin Saptanması, Doktora tezi*, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2000.
- [101] Bakırcı, İ. , *A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey, Food Control , 12, 47-51, 2001.*
- [102] Sarımehmetoğlu, B. , Çelik, T. , H. , Özdemir, H. , *Pastörize sütlerde Elisa yöntemiyle aflatoksin M₁ varlığının ve düzeylerinin saptanması*, IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitapçığı, Ankara, 2000.
- [103] Oruç, H. , H. , Sonal, S. , *Determination of Aflatoxin M₁ Levels in Cheese and Milk Consumed in Bursa, Turkey*, Vet. Hum. Toxicol, 43, 5, 292-293, 2001.

- [104] Özkaya, Ş. , Başaran, A. , Kaymak, T. , Dikmen, O. , Kocabey, M. , Demirkazık, G. , Altındış, N. , Ramis, R. , ***Türkiye'de üretilmekte olan süt ve peynirlerde aflatoksin M₁ aranması***, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıdalarda Katkı-Kalıntı ve Bulaşanlarının İzlenmesi II, Bursa, 2002.
- [105] Er, B. , Demirhan, B. , Yentür, G. , ***Investigation of aflatoxin M₁ levels in infant follow-on milks and infant formulas sold in the markets of Ankara Turkey***, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2014.

ÖZGEÇMİŞ

18. 07. 1991 tarihinde Fatih/İSTANBUL' da doğdum. 2005 yılında İstanbul Mehmet Akif İlköğretim Okulu'nda ilköğrenimimi, 2009 yılında ise İstanbul Fatih Davutpaşa Lisesi'nde orta öğrenimimi tamamladım. Lisans öğrenimimi 2013 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. 2013 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına başladım.