

DAMLA DÖNMEZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MARKETLERDEN TOPLANAN TEREYAĞLARINDAKİ
AFLATOKSİN M1 MİKTARININ MEVSİMSEL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

DAMLA DÖNMEZ

**DANIŞMAN
PROF.DR.MELTEM UZUN**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Damla DÖNMEZ

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konusunu seçmede bana yardımcı olan, araştırmalarımın yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Meltem UZUN'a çok teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimim boyunca büyük emeği olan, başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN olmak üzere, çok değerli hocalarım, Prof. Dr. Zayre ERTURAN, Prof. Dr. Betigül ÖNGEN'e, Prof. Dr. Özden BÜYÜKBABA BORAL'a, Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a, Prof. Dr. Gülseren AKTAŞ'a, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU'na, Doç. Dr. Lütfiye ÖKSÜZ'e, Doç. Dr. Hayriye KIRKOYUN UYSAL'a, Doç. Dr. Sevim MEŞE'ye ve Dr. Öğretim Üyesi Mustafa ÖNEL'e,

Ayrıca yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim süresinde benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, sorularıma ve sorunlarıma çözüm arayan Doç. Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ'e tüm teşekkürlerimi sunuyorum.

Başta, Dilan Çin ve Şeyma Efe olmak üzere birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum dostlukları için minnettar olduğum yüksek lisans arkadaşlarıma, Laborant Zeynep DEMİR'e ve sevgili Muazzez UYAR'a,

Hayatım boyunca karşılıksız olarak beni her zaman destekleyen üzerimdeki emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim ve hep minnettar olduğum canım aileme; sevgili annem, babam ve kardeşime bu süreçte gösterdikleri sabırdan ve anlayıştan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:38296

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi	4
2.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	5
2.2.1. Fiziksel Faktörler.....	5
2.2.1.1. Nem	5
2.2.1.2. Sıcaklık	6
2.2.1.3. Su aktivesi (a_w)	6
2.2.1.4. Oksijen ve Karbondioksit Konsantrasyonu	7
2.2.1.5. pH.....	7
2.2.1.6. Mekanik Hasarlar.....	8
2.2.1.7. Zaman	8
2.2.1.8. Mevsimsel Değişiklikler	9
2.2.1.9. Diğer Faktörler.....	9
2.2.2. Kimyasal Faktörler	9

2.2.3. Biyolojik Faktörler	9
2.3. Mikotoksinlerin Sınıflandırılması	10
2.3.1. Aflatoksinler	11
2.3.1.2. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri	12
2.3.1.3. Aflatoksinlerin Sağlık Üzerindeki Etkileri	13
2.3.1.4. Süt ve Sütten Elde Edilen Ürünlerindeki Aflatoksin Varlığı.....	14
2.3.2. Okratoksinler	15
2.3.3. Patulin.....	15
2.3.4. Zearalenone	16
2.4. Mikotoksinlerin Tanı Yöntemleri	16
2.4.1.Fiziksel yöntemler	16
2.4.2.Kimyasal yöntemler.....	167
2.4.3.Biyolojik yöntemler.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Tereyağı Örneklerinin Toplanması	18
3.2. Kit İçeriği	18
3.3. Analizde Kullanılan Araç, Gereçler ve Cihazlar.....	19
3.4. Tereyağlarının Analize Hazırlanması	19
3.5. Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması.....	20
3.6. Testin Uygulanması	20
4. BULGULAR.....	22
5.TARTIŞMA	27
KAYNAKLAR	33

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1 <i>Aspergillus</i> spp. mikotoksin oluşturma için optimum koşullar	7
Tablo 2. 2 Bazı mantar türlerinin, mikotoksin ürettikleri kaynaklar ve toksik etkileri	10
Tablo 2. 3 Farklı ülkeler için süt ve süttten elde edilen ürünlerde izin verilen yasal AFM1 sınır değerleri (µg/kg)	14
Tablo 4. 1 Kış mevsiminde farklı lot numarasına sahip tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeyleri (ng/L).....	22
Tablo 4. 2 İlkbahar mevsiminde farklı lot numarasına sahip tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeyleri (ng/L).....	23
Tablo 4. 3 Kış aylarında toplanan tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı	24
Tablo 4. 4 İlkbahar aylarında toplanan tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı.....	24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1 Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları	12
Şekil 2. 2 Aflatoksin B1'in (AFB1) karaciğerde aflatoksin M1'e (AFM1) metabolize oluşu	13
Şekil 3. 1 Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 test kiti (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121)	18
Şekil 3. 2 Kullanılan tereyağı örneklerinin analize hazırlanması	20
Şekil 4. 1 Kış Mevsimi Standart Eğrisi.....	255
Şekil 4. 2 İlkbahar Mevsimi Standart Eğrisi.....	266

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg/kg: Mikrogram/kilogram

µl: Mikrolitre

AB: Avrupa Birliği

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AF: Aflatoksin

AFB1: Aflatoksin B1

AFB2: Aflatoksin B2

AFG1: Aflatoksin G1

AFG2: Aflatoksin G2

AFM1: Aflatoksin M1

ATA: Sindirimle ilişkili zehirli aleukia (Alimentary toxic aleukia)

Aw: Su aktivitesi

BEN: Balkan endemik nefropatisi

°C: Santigrat derece

CO₂: Karbondioksit

DON: Deoksinivalenol

EDI: Tahmini günlük alım (Estimated daily intake)

ELISA: Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant yöntemi (Enzyme linked immunosorbent assay)

EMIT: Enzim Aktivitesine Bağlı Olan İmmunoteknik (Enzyme Multiplied Immunotechnique/EMIT)

FAO: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)

g: Gram

FB1: Fumonisin B1

FB2: Fumonisin B2

GC/MS: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi

HCC: Hepatoselüler karsinom (Hepatocellular carcinoma)

HI: Tehlike indeksi (Hazard index)

HPLC:Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)

IARC:Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (The International Agency for Research on Cancer)

ITK: İnce Tabaka Kromatografisi

L: Litre

LC-MS: Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (Liquid chromatography mass spectroscopy)

ml: Mililitre

ng/kg: Nanogram/kilogram

ng/l: Nanogram/litre

OTA: Okratoksin A

pg/ml: Pikogram/mililitre

ppb: Milyarda bir (parts per billion)

TDI: Tolere edilen günlük tüketim miktarı (Tolerable daily intake)

TGK: Türk Gıda Kodeksi

TLC: İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography)

UV: Ultraviyole

ZEN: Zearalenone

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organ

ÖZET

Dönmez D. Marketlerden Toplanan Tereyağlarındaki Aflatoksin M1 Miktarının Mevsimsel Olarak Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2023.

Mikotoksinler tarladan tüketime tüm aşamalarda, nem ve sıcaklığa bağlı olarak oluşan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* cinsi bazı küfler tarafından oluşturulan sekonder metabolitleridir. Aflatoksin M1 (AFM1); aflatoksin B1 (AFB1)'le kontamine olan yemle beslenen hayvanların sütlerinde bulunan hepatokarsinogenik bir metabolit olup; pastörizasyona ve sterilizasyona direçlidir, bu sebeple AFM1 bulunan sütlerden elde edilen süt ürünlerinin tümü toksin içerir. Bunun yanında, bu ürünlerde AFM1 düzeyleri mevsimsel değişiklikler de gösterir. Bu sebeple yapılan bu çalışmada Türkiye'deki yasal toksin sınırı (50 ng/L) temel alınarak çeşitli marketlerden 42'si kış ve 42'si ilkbahar mevsiminde toplanan 84 tereyağı örneğinde AFM1 düzeyleri belirlenmiştir. İncelenen 84 tereyağı örneğinin 79' unda (%94) farklı düzeylerde AFM1 varlığı saptanırken, bu örneklerinin 67'sinde (%79,7) yasal sınırın aşıldığı belirlenmiş ve beş (%5,9) örnekte toksine rastlanmamıştır. Sonuçlar mevsimsel açıdan değerlendirildiğinde, kış mevsimine ait 42 tereyağı örneğinin 37'sinin (%88,1) saptanabilir düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiş ve örneklerin 32'sinde (%76) sınır değerin (0,05ng/L) aşıldığı görülmüştür. Beş örnekte ise sınır değerinin altında AFM1 saptanırken (%12), beş örnekte (%12) toksine rastlanmamıştır. İlkbahar mevsiminde toplanan tereyağı örnekleri değerlendirildiğinde, 42 tereyağı örneğinin tümünde (%100) çeşitli düzeylerde AFM1 belirlenmiştir. Otuz beş örnekte sınır değerinin aşıldığı (%83.3) saptanırken, örneklerin 10'unda (%23,8) çok yüksek düzeyde (>100,00) toksin belirlenmiştir. Yedi (%16.6) örnekte sınırın altında AFM1 saptanmıştır. Çalışma sonucunda, tereyağlarında belirlenen AFM1 düzeylerinin ciddi halk sağlığı sorunu oluşturabileceği, bu duruma sebep olabilecek hayvan yemlerinin AFB1 düzeylerinin ve bu yemlerin saklandığı depo koşullarının düzenli kontrolünün sağlanması gerektiği düşünülmüştür. İlkbaharda toksin düzeylerinin kış mevsimine göre daha yüksek olması, hava koşulları nedeniyle hayvanların meraya çıkamadığı ve hala depo yemlerle beslenmiş olabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, *Aspergillus*, Mikotoksin, AFM1, Tereyağı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No:38296

ABSTRACT

Dönmez D. Seasonal Investigation of Aflatoxin M1 Amount in Butter Collected from Markets. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology. Master Thesis. Istanbul, 2023.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by some molds of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, which are formed in all stages from field to consumption, depending on humidity and temperature. Aflatoxin M1 (AFM1) is a kind of hepatocarcinogenic metabolite found in the milk of animals fed with feed contaminated with aflatoxin B1 (AFB1); resistant to pasteurization and sterilization, so all dairy products made from milk containing AFM1 also contain toxin. In addition, AFM1 levels in these products also show seasonal variations. Therefore, in this study, AFM1 levels were determined in 84 butter samples collected from various markets, 42 in winter and 42 in spring, based on the legal toxin level (50 ng/L) in Turkey. While different levels of AFM1 were detected in 79 (94%) of 84 butter samples examined, the legal limit was found to be exceeded in 67 (79.7%) of these samples, and no toxin was found in five (5.9%) samples. When the results were evaluated seasonally, it was determined that 37 (88.1%) of 42 butter samples collected in winter were contaminated with detectable levels of AFM1 and the legal limit value (0.05ng/L) was exceeded in 32 (76%) of the samples. While AFM1 was found below the cut-off value in five samples (12%), no toxin was found in five samples (12%). When butter samples collected in the spring were evaluated, various levels of AFM1 were determined in all 42 butter samples (100%). While it was determined that the legal limit value was exceeded in 35 samples (83.3%), very high levels of toxin (>100.00) were detected in 10 (23.8%) samples. In seven samples AFM1 was detected below the legal limit (16.6%). Consequently the study, it was observed that the AFM1 levels detected in butters could pose a serious public health problem and therefore, it was thought that AFB1 degrees in animal feeds also storage conditions of feed and products should be checked regularly. The fact that the toxin amounts were higher in the spring than in the winter was interpreted as the animals could not go out to the pasture due to weather conditions and they still may have been fed with stored feed.

Key Words: Aflatoxin, *Aspergillus*, Mycotoxin, AFM1, Butter

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.38296

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, özellikle tahıllarda filamenöz mantar türleri tarafından oluşturulan düşük molekül ağırlığına sahip ikincil metabolitlerdir. Bu bileşiklerle kontamine olmuş gıdalar ve yemler, insan ve hayvan sağlığına zararlıdır [1]. Yirminci yüzyılın ortalarına kadar, hayvan ve insanların tükettiği gıdalarda mantarların zararlı rolü üzerine çok fazla çalışma yapılmamıştır. *Aspergillus flavus* tarafından oluşturulan toksinin keşfedilmesine ve aflatoksin olarak isimlendirilmesine yol açan turkey X hastalığı (hindilerin X hastalığı) sebebiyle, İngiltere'de binlerce hindinin ölümü sonucunda 1960'lı yıllarda mikotoksin çalışmaları artmıştır [2]. O tarihten bu yana çok fazla mikotoksin türü keşfedilmiş ve günümüze kadar sayıları yaklaşık 500'ü bulmuştur [3]. Günümüzde yapılan çalışmalar incelendiğinde, küresel ısınma, daha yüksek sıcaklıklar, daha düşük yağış oranı, su kıtlığı, kuraklık, sel ve atmosferdeki daha yüksek karbondioksit miktarı sonucunda verimin düştüğü, mikotoksin kontaminasyon oranlarının arttığı ve oluşan hastalık sıklığında artış olduğu görülmektedir [4].

Aflatoksinler (AF), okratoksinler (OTA) ve fumonisinler halk sağlığını tehdit eden başlıca mikotoksinlerdir. En sık karşılaşılan mikotoksinler *Aspergillus* spp. tarafından oluşturulan aflatoksin, okratoksin A ve patulin, *Penicilium* spp. tarafından oluşturulan fumonisin, zearalenon (ZEN), T-2 ve HT-2 toksinleri gibi trikotesenler ve deoksinivalenol (DON) ile *Claviceps purpurea* tarafından oluşturulan ergot alkaloidleri (EA) dir. Mikotoksinler, maruz kalma derecesine ve klinik belirtilere bağlı olarak akut, subakut veya kronik olabilen mikotoksikoz oluştururlar. Aflatoksinlerin vücutta mutajenik, kanserojen, teratojenik ve immünosupresif yan etkileri vardır. AFB1, aflatoksinler içinde en toksik olandır ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yapılan sınıflandırmada Grup 1, AFM1 ise Grup 2 karsinojen olarak bildirilmiştir [5]. Bilhassa *A. flavus* ve *A. parasiticus* ve de nadiren *A. nomius*'un oluşturduğu aflatoksinleri AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 ve AFM2 olarak sınıflamak mümkündür [6].

Aflatoksin M1 (AFM1); aflatoksin B1 (AFB1) ile kontamine olan yemleri tüketmiş olan hayvanların sütlerinde görülen, hepatokarsinojenik etkisi bulunan bir metabolittir. AFM1, AFB1' in hidroksillenmiş ara ürünüdür. AFB1 ile kontamine olan yemlerle beslenen hayvanlarda AFB1 metabolize olarak, AFM1'e dönüşür. Besinle alınan AFB1'in yaklaşık %0,3- %6,2 'si sütlerde AFM1 olarak bulunur. AFM1,

sterilizasyona ve pastörizasyona dirençlidir, bundan dolayı AFM1 içeren sütlerden oluşan tüm ürünler bu toksini bulundurur. Bu nedenle özellikle süt ve süttten elde edilen ürünlerin AFM1 analizi ve incelenmesi günümüzde önem kazanmıştır [7].

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), dünyadaki mahsullerin takriben %25'inde mikotoksin bulaşının olduğunu belirtmiştir. Bu sebeple, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bulunan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Avrupa Birliği (AB) ve dünyadaki ülkelerin birçoğu, kontaminasyonu azaltmak ve önüne geçebilmek için gıdalardaki ve yemlerdeki mikotoksinler için bazı limitler belirlemiştir [8]. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde yayınlanan süt ürünlerinde AFM1 limit değeri; sütte ve süt bazlı ürünlerin üretimindeki sütte 0.05µg/kg, peynirlerde 0.25µg/kg, süt tozunda 0.5µg/kg, bebek maması ve devam sütlerinde 0.020µg/kg' dır [9].

Mevsimsel ve iklimsel değişiklikler, birincil üretimden tüketime kadar gıda zincirinin belirli aşamalarında gıda güvenliğinde tehlike oluşturabilir. Birçok bilim insanı, havanın ve mevsimlerin aflatoksin oluşumu üzerindeki etkisini kabul eder [10]. Uygun sıcaklık, nem ve su aktivitesi, mikotoksinlerin üretimi için büyük öneme sahiptir. Büyük çoğunlukla serin veya ılıman iklimlerde sıcaklık artarsa, aflatoksin bulaş olasılığı da artar. Mevsimsel değişikliklerin yem ve süt ürünlerindeki mikotoksin konsantrasyonuna etkisi üzerine yapılan birçok çalışma, mikotoksin konsantrasyonlarının kış mevsiminde arttığını ve yaz mevsiminde azaldığını ortaya koymuştur. Mera, ot, yabani ot ve yeşil yem gibi taze yemlerin varlığı nedeniyle, konsantre yemlemenin daha uygun olduğu kış mevsimine kıyasla yaz aylarında süt ürünlerindeki AFM 1 seviyeleri düşüktür [11]. Depolama tesislerinin kontrol edildiği alanlarda hasat sonrası kontaminasyon ihtimalinin önüne geçmek mümkündür [6]. Günümüzde, küresel ısınmanın etkileri ve çevresel değişiklikler, mahsul zararlıları ve patojenlerinin artışı ve dünyaya yayılımı endişeleri artırmış ve mikotoksinleri gıda ve yem güvenliğinde öncelikli risklerden biri haline getirmiştir [8].

Mikotoksinler kimyasal yapıları itibariyle farklı bileşik sınıflarına sahiptir, bu durum mikotoksinlerde bulaşın belirlenmesini güçleştirir. Ancak, gıda güvenliğinin korunması ve gıda kaynaklı zehirlenmelerin kontrol altında tutulması için mikotoksin teşhisi oldukça önemlidir. Bu nedenle farklı analizler geliştirilmiştir. Tanı amacıyla geliştirilen ve kullanılan yöntemlerden birkaçı; İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant

yöntemi (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay), Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS), Kolon Kromatografisi, Enzim Aktivitesine Bağlı Olan İmmunoteknik (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique/EMIT)’ dir. Mikotoksin türlerinin tamamı için uygulanabilecek tek bir analiz yöntemi bulunmamaktadır. Analiz çeşitleri mikotoksin türüne ve analiz edilecek besinin türüne göre değişiklik göstermektedir [12-14]. Ancak, yemlerde mikotoksinleri araştırmak için immün enzimatik ve kromatografik analiz gibi kalitatif ve kantitatif yöntemler kullanılmaktadır [15]. Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M1 miktarını belirlenmesi için ELISA yöntemi en çok tercih edilenidir; bu yöntem kolay uygulanabilir bir yöntemdir ve duyarlılığı yüksektir. Antikora bağlanmış enzim aktivitesinin araştırılması temeline dayanan kantitatif bir ölçümdür. Kompetatif ELISA yönteminde ise, yüzey yapısı araştırılan toksine özel antikorlarla kaplanmış özel plaklar kullanılır ve yöntemin çalışma metodu serbest antijenlerin ve işaretlenen antijenlerin antikorlara karşı yarışmasına dayanır. Sonuçlar standart gruplar ile karşılaştırılarak değerlendirilir [16].

Bu çalışmada 42’si kış mevsiminde (ocak-şubat) ve 42’si ilkbaharda (mayıs) olmak üzere marketlerden farklı lot numaralarına sahip 84 tereyağı örneği toplanmış ve örneklerdeki AFM1 düzeylerinin mevsimsel değişiklik gösterip göstermediği kompetatif ELISA yöntemiyle (Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121) araştırılmıştır. Mevcut yasal toksin düzeyleri göz önünde bulundurularak, beslenmemizde büyük öneme sahip tereyağlarında potansiyel bir risk olup olmadığı ve toksin miktarlarının mevsimlere göre değişkenliği gösterilmiş ve epidemiyolojik verilere fayda sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi

Mikotoksinler, toksijenik hiflerin çok düşük molekül ağırlığına sahip (<700) olan ikincil metabolitleridir. Gıdalar ve yemler hasat öncesi, sonrası ve depolanma aşamalarında kontaminasyona karşı oldukça hassastırlar. *Aspergillus* spp., *Claviceps* spp, *Fusarium* spp. ve *Penicillium* spp. gibi çeşitli fırsatçı patojen mantarlar, uygun çevre koşullarında gıda maddelerinde hızlıca üreyerek “mikotoksin” olarak adlandırılan metabolitleri üretirler. "Mikotoksin", "mantar" anlamına gelen "mukos" veya "mykes" ve "zehir" anlamında kullanılan toksikon olmak üzere iki Yunanca kelimenin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Bu toksinler yalnızca toksik değil, aynı zamanda teratojenik, mutajenik ve kanserojendir. Yirminci yüzyılın ilk yarısında yemlerde ve gıdalarda mantarların neden olduğu hastalıklara ilişkin birçok araştırma yapılmasına rağmen, mikotoksinlerin insan ve hayvan hastalıklarındaki önemi ancak daha yakın zamanlarda ortaya çıkmıştır. "Mikotoksikoz" kelimesi ilk kez 1952'de bir hayvan hastalığı çalışmasında geçmiştir [17]. İngiltere'de 1960 yılında 100.000 hindinin ölümünün ardından aflatoksinlerin keşfi, modern mikotoksin araştırmalarının miladı olmuştur. Aflatoksinler, 1960 yılında turkey X hastalığının (hepatik nekroz) nedeni olarak tanımlanmıştır [18]. İkinci Dünya Savaşı'nın (1940- 1950) ilk yıllarında, Rusya'da insanlarda ölümcül hastalıklar meydana gelmiş, bu özel durum nekrotizan, hemorajik ve merkezi sinir sistemi ile ilişkili olan “Sindirimle İlişkili Zehirli Aleukia” (ATA) olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları, bu ölümcül hastalığın, hasat edilen tahılların küf kontaminasyonu ile ilişkili olduğu ve ölümle sonuçlandığı anlaşılmıştır [19].

Türkiye aflatoksin sorunuyla ilk defa 1967 senesinde Kanada'ya ihracatı yapılan fındık içlerinin neredeyse 10 ton kadarının geri gönderilmesiyle tanışmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'ne ihracatı yapılan antep fıstıkları ile 1972, 1974 yıllarında, hem ABD hem de Danimarka'ya ihraç edilen kuru incirlerle 1973 ve 1974 yıllarında sorunlar yaşanmıştır. Yaşanan bu olumsuzluklar mikotoksikozun sağlığa zararlı etkilerinin yanında bir de ekonomik açıdan büyük öneme sahip olduğunu göstermiştir [20].

2.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksinler, küfler tarafından doğal olarak üretilen ve gıda ve yemleri kontamine eden ikincil metabolitlerdir. Kimyasal kontaminantlar arasında mikotoksinlerin önemli bir yeri bulunmaktadır [21]. Mikotoksinler arasında en toksik metabolik yan ürünler olan aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından oluştururlar [22]. Gıdalarda aflatoksin oluşumu kaçınılmazdır ve çevresel faktörlerden etkilenirler. Kontaminasyon derecesi tam olarak bilinemez ve hasat öncesi, depolama ve işleme aşamalarında tarımsal uygulamalara göre farklılık gösterebilir. *Aspergillus* spp. oldukça çeşitli substratları kullanarak çoğu gıda ve yem, üretim, işleme veya depolamanın rastgele bir aşamasında bu suşlarla kontamine olabilir. Bu yüzden aflatoksinler tahıllarda, tahıl yan ürünlerinde, yağlı tohumlarda, baharatlar, süt ve süt ürünleri gibi insan sağlığı için önemli birçok gıdada doğal kontaminantlar olarak bulunabilir [23]. Mikotoksin üretimi, mantarın türüne, üzerinde ürediği substrata ve çevresel koşullara bağlı olarak değişir [24]. Gıda ürünlerinin yıllık yaklaşık %25'inin mikotoksinlerden etkilendiği bildirilmektedir [11]. Küflerin mikotoksin oluşturmalarını etkileyen faktörleri, fiziksel faktörler, kimyasal ve biyolojik faktörler olarak üç başlıkta incelemek mümkündür.

2.2.1. Fiziksel Faktörler

Mantarların üremesi ve mikotoksin oluşturmaları üzerindeki en önemli iki çevresel faktör, su aktivitesi (a_w) ve sıcaklıktır [24]. Mikotoksin kontaminasyonu, temel belirleyiciler olan nem içeriği ve ortam sıcaklığı ile, tahıllardaki üretim, hasat öncesi veya sonrasındaki çevresel faktörlere büyük ölçüde bağlıdır [5]. Mikotoksin üretimini etkileyen diğer önemli faktörlerden bir diğeri de küfün türüne göre toksin üretilip üretilmediğidir. Bunun yanında, küfün ürüne bulaş miktarı, ürünün depodaki durumu, bileşimi, pH'ı, nem içeriği, ortam sıcaklığı ve nem içeriği ve O₂ miktarı toksin oluşumu üzerine etkili faktörlerdir [25].

2.2.1.1. Nem

Aflatoksinlerin oluşmasında nisbi nem önemli parametredir. Aflatoksin oluşması için %70'in üzerindeki nisbi nem optimaldir [26]. Ortamın bağıl nem yüzdesi fazlalaştıkça küflerin üremeleri kolaylamakta ve toksin oluşturmaktadır. Üreme gereksinimlerindeki çevresel faktörlerin farklılıkları nedeniyle, mantarların üremesi ve

mikotoksin oluşumu bir coğrafi bölgeden diğerine göre farklılık gösterir. Örneğin, hasattan önce, *Fusarium* spp. tarlada üremek için en az %90 bağıl neme ihtiyaç duyar. Hasattan sonra ise *Penicillium* spp. ve *Aspergillus* spp., sırasıyla %70 veya daha az ve %80 ila %90 bağıl nemde mikotoksin oluşturur [25].

2.2.1.2. Sıcaklık

Aflatoksin oluşturan mantarların üreme sıcaklıkları farklıdır. Örneğin, *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un üremesi için sıcaklık aralığı 15-44 °C, optimum 35-38 °C'dir ve bu aralıkta toksin üretebilirler [27]. En çok toksin oluşumu ise 25-30 °C' arasındadır. *Aspergillus* spp. içinde yalnızca *A. ochraceus* diğer türlerden daha düşük sıcaklık aralığında (12-37°C) üremektedir ve okratoksin A sentezlemektedir. *Penicillium expansum*'un oluşturduğu patulin için en uygun sıcaklık ise 20-25°C'dir [18, 20, 28].

Depolanan tahılda küf oluşumunu önlemek için kullanılan parametre sıcaklık kontrolüdür. İdeal olarak tahılların depo sıcaklığı 10 °C ile 15 °C arasında olmalıdır [29].

2.2.1.3. Su aktivitesi (a_w)

Her mantarın üremesi ve mikotoksin oluşturmaları için optimum bir sıcaklık ve su aktivite aralığı vardır. Bu nedenle, tek bir sıcaklık ve su aktivitesi aralığı, mantar aktivitesini indükleyen olarak tanımlanamaz. Örneğin, iklimin tropikal ve subtropikal olduğu bölgelerde aflatoksinlere daha sık rastlanır. 25–30°C sıcaklıklar, 0.78'in üzerinde su aktivitesi ve %88-95 bağıl nem, mantar üremesini ve mikotoksin üretimini destekleyen koşullardır [30].

Mikotoksin oluşturan *Aspergillus* türlerinin üremeleri ve mikotoksin oluşturmaları için optimum koşulları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 2. 1 *Aspergillus* spp. mikotoksin oluřturması için optimum koşullar [30]

Küfler	Üreme		Optimum üreme		Mikotoksin oluşması için ideal aralık	
	Sıcaklık	Su aktivitesi	Sıcaklık	Su aktivitesi	Sıcaklık	Su aktivitesi
<i>Aspergillus flavus/A.parasiticus</i>	15–44 °C	0,91-0,99	35 °C	0.95	33 °C	0.99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10–40 °C	0.80-0.98	24-31 °C	0,96-0,98	25–30 °C	0.98
<i>Aspergillus carbonarius</i>	8–40 °C	0.90–0.93	32–35 °C	0,94-0,99	30–35°C	0.98

2.2.1.4. Oksijen ve Karbondioksit Konsantrasyonu

Aspergillus ochraceus, *Penicillium verrucosum* ve *Aspergillus carbonarius* gibi bazı okratoksijenik türlerin üremesi %50 CO₂'e maruz kaldıklarında, doğal atmosfer koşullarına kıyasla yaklaşık olarak %50-70 oranında azalır. *A.flavus*'un üremesi esnasında oluşan artan konsantrasyonlardaki karbondioksit ve düşük oksijen seviyeleri, bu türün aflatoksin üretimini kısıtlar. Çalışmalarda, yüksek orandaki karbondioksitin *A. flavus*'un üremesi üzerinde baskılayıcı etki oluşturduğu belirlenmiştir. Örneğın, %25 CO₂ varlığında, *A.flavus*'un misel oluşumu önemli ölçüde önlenebilir, ancak aflatoksin oluşumunu inhibe etmek için en düşük karbondioksit oranı %50'dir. *Curvularia lunata*, *Cladosporium* spp. gibi mantarların üremesi %60-80 civarındaki CO₂ oranlarında yavaşlar. CO₂ konsantrasyonu %80 olduğuunda aflatoksin oluşumu kontrol edilebilir [31].

2.2.1.5. pH

Mantarların üreme ortamı ve ortamın pH değeri, mikotoksin üretiminde aktif rol oynar. Ortamdaki pH değeri veya hidrojen atomlarının doygunluğu, mantarların üremesini ya hücre yüzeyleri üzerine doğrudan etki yoluyla ya da besin mevcudiyeti üzerindeki dolaylı yoldan etkiler. Örneğın *Penicillium* spp. asitler veya alkaliler salgılayarak çevresel pH'ı kontrol etme yeteneğine sahiptir. *Aspergillus* spp. glukonik ve sitrik asitler salgılayarak çevreyi asitleştirebilir. pH'ı kontrol etme kapasitesi,

mantarların konak içinde daha iyi hayatta kalmasını sağlar. pH ise özellikle sporülasyon ile ilgili metabolik süreçleri etkilediği için su aktivitesi ve sıcaklık etkileşimlerini de etkileyebilir. pH'ın belirli mikotoksin türlerinin üretimi üzerindeki etkisi henüz her tür için ayrı olarak belirlenmemiştir, ancak asidik koşulların mikotoksin üretimini desteklediği bilinmektedir. Örneğin, aflatoksin üretiminin pH: 4.0'a ihtiyacı vardır ve bu durumda pH ne kadar düşerse aflatoksin sentezi o kadar yüksek olur [30].

2.2.1.6. Mekanik Hasarlar

Mikotoksin üretimini kontrol etmek için bir diğer kritik aşama, mahsullerin korunması için nemin en önemli rolü oynadığı hasat dönemidir. Hasat dönemi kuru hava koşullarında başlamalıdır. Hasat sırasında mekanik hasarı önlemek çok önemlidir. Ekinlerin yağışlı havalarda hasat edilmesi, mantarların üremesini ve ardından mikotoksin oluşumunu daha elverişli hale getirebilir; ayrıca ekinleri tarlada uzun süre tutmak mantar sporlarının, kuşlar, kemirgenler, haşereler ve böcekler aracılığıyla bulaşma riskini artırabilir ve bunların tümü mikotoksin oluşumuna katkıda bulunabilir [25]. Böcekler, mikotoksin üreten mantar sporlarını bir bitkiden diğerine aktarabilirler.

Ayırma teknikleri, mikotoksin bulaşını %80'den %40'a kadar düşürebilir. Renksiz veya küf içeren tanelerin elle toplanması veya otomatik bir şekilde ayıklanması, savurma, yıkama ve ezme yöntemleri ile mısır tanelerinin kabuklarından ayrılması, depolama öncesi mikotoksinlerin uzaklaştırılmasında önemlidir. Ayıklama işlemi tarladayken, kurutma esnasında veya tahıllar depolanırken yapılabilmektedir. Tanelerin yüzdürülmesi, mikotoksin bulaşını %95'e kadar azalabilmektedir [32].

2.2.1.7. Zaman

Hasat edilen tahıllardaki yüksek nem içeriği ve çevreleyen havanın yüksek bağıl nemi, mantar üremesi ve mikotoksin kontaminasyonu için kritik faktörlerdir. Tahılların hasattan hemen sonra hızla kurutulması ve kuru ortamda tutulması mikotoksin ile kontaminasyon riskini azaltır. Zamanında hasat ve hasattan sonra mümkün olan en kısa sürede mahsulün hızlı bir şekilde tamamen kurutulması önemlidir. Bulaş sonrasında 2 - 4 gün içerisinde mantarların üremesi ve mikotoksin oluşturmaları gerçekleşmektedir [33].

2.2.1.8. Mevsimsel Değişiklikler

Mevsim değişimleri süt ürünlerindeki mikotoksin seviyelerinde önemli değişiklikler göstermiştir. Aynı zamanda mevsimsel değişikliklerin yem ve süt ürünlerindeki mikotoksin konsantrasyonuna etkisi üzerine yapılan birçok çalışma, mikotoksin konsantrasyonlarının kış mevsiminde arttığını ve yaz mevsiminde azaldığını ortaya koymuştur [10, 11]. Belirli mevsimlerde emziren hayvanlar için mevcut olan besleme uygulamaları ve yemler, süt ürünlerindeki mikotoksin seviyelerini etkilemektedir. Mera, ot, yabancı ot ve yeşil yem gibi taze yemlerin varlığı nedeniyle, konsantre yemlemenin daha uygun olduğu kış mevsimine kıyasla yaz aylarında süt ürünlerindeki AFM 1 seviyeleri düşüktür [11]. Mevsimin süt ürünlerindeki mikotoksin kontaminasyonu üzerindeki etkisi, nem, sıcaklık ve yem mevcudiyetine bağlı olarak ülkeden ülkeye yıl içinde de değişebilmektedir [34].

2.2.1.9. Diğer Faktörler

Sıcak ve nemli iklime sahip olan ılıman bölgelerde, iklim koşulları küf üremesi ve mikotoksin oluşumu için uygun ortamı sağladığından, yemler, süt ürünlerine geçebilecek mikotoksinlerle kontaminasyona daha yatkındır. Aynı zamanda coğrafi alan içerisinde, yemlerdeki ve süt ürünlerinde mikotoksinler, besleme ve yönetim uygulamalarına bağlı olarak ülkeden ülkeye farklılık gösterebilir [34].

Yapılan bir çalışmada mavi dalga boylarının aflatoksin üretimini kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir [35].

2.2.2. Kimyasal Faktörler

Pestisit ve fungusitler, mantar kontaminasyonunu azaltmak amacıyla kullanılan kimyasalları içermektedir [18].

2.2.3. Biyolojik Faktörler

Mantar türleri toksisite açısından değişiklik gösterir ve mikotoksinlerin üretimi bir tür içindeki bazı suşlarla sınırlı olabilir. Mikotoksin üretimi suşun özgüllüğüne, varyasyonuna ve kararsızlığına bağlı olarak değişir. Aynı türdeki suşlar, üremeyi ve toksin üretimini arttırmak için gereken optimum koşullara göre farklılıklar gösterebilir. Aynı türden farklı suşlar farklı türlerde mikotoksin oluşturabilirler. Örneğin, *Aspergillus flavus*, 15-44 °C sıcaklık aralığında üreyebilir ve *Aspergillus carbonarius*'in aksine AFB1, 8-40 °C sıcaklık aralığında da okratoksin A oluşturabilir [30].

2.3. Mikotoksinlerin Sınıflandırılması

Mikotoksinler , küresel halk sağlığı açısından tehdit olarak kabul edilen; *Aspergillus* , *Penicillium* , *Fusarium* gibi belirli filamentöz mantar türlerinin oluşturduğu sekonder metabolitlerdir. Günümüze kadar dünya genelinde 500'den fazla mikotoksin raporlanmıştır. En önemli ve yaygın mikotoksinler; Aflatoksinler (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2), okratoksinA (OTA), zearalenon (ZEN), deoksinivalenol (DON), fumonisinler (FB1, FB2), patulin, trikotesenlerdir [36].

Tablo 2’de bazı mantar türlerinin kontamine ettiği (mikotoksin oluşturduğu) besinler ve toksik etkileri gösterilmiştir.

Tablo 2. 2 Bazı mantar türlerinin, mikotoksin ürettikleri kaynaklar ve toksik etkileri [37]

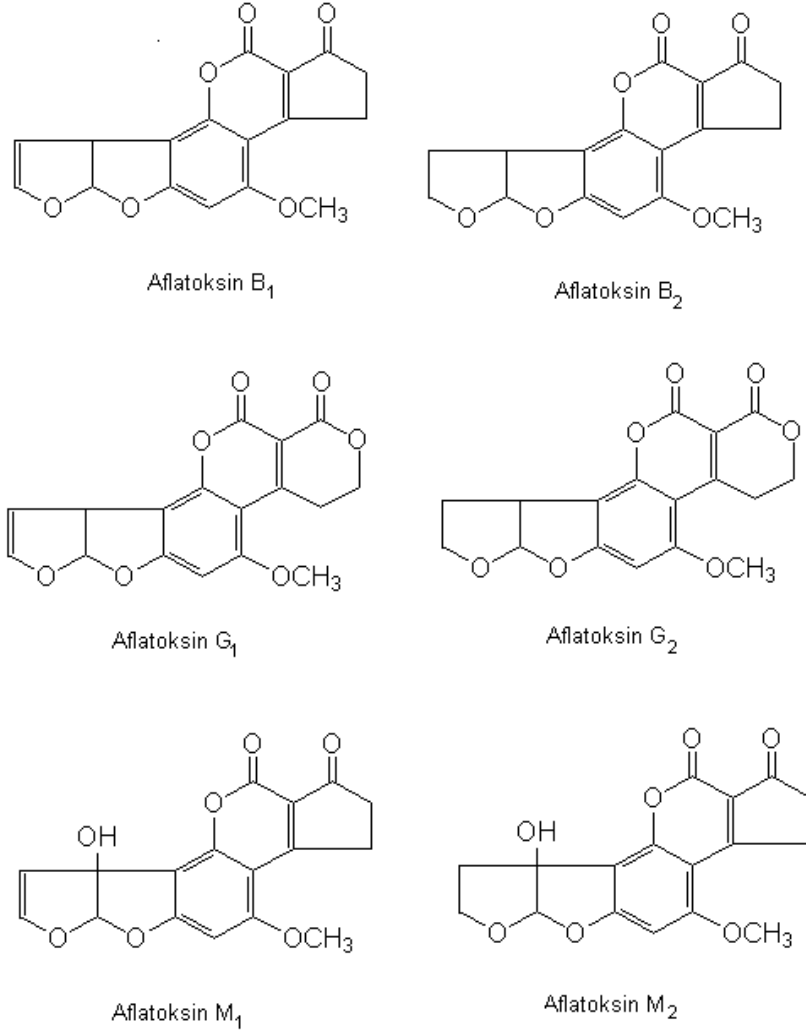
Mikotoksinler	Toksin üreten türler	En yaygın besin kaynakları	Başlıca toksik etkileri
Aflatoksinler	<i>Aspergillus flavus</i> (A. flavus) <i>A.parasiticus</i>	Fındık, mısır, incir	Genotoksik, kanserojen
Okratoksin A	<i>A. ochraceus</i> <i>A.carbonarius</i> <i>A.steynii</i> <i>A.westerdijkiae</i> <i>Penicilium verrucosum</i> <i>P.nordicum</i> <i>Petromyces alliaceus</i>	Tahıllar, kahve, kurutulmuş üzüksü meyveler, şarap, üzüm suyu	Kanserojen, nefrotoksik
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Tahıllar, özellikle mısır ve buğday	Hormonal etkiler
Deoksinivalenol	<i>F. graminearum</i>	Tahıllar ve mısır	Gastrointestinal hastalıklar, immünotoksikite

Fumonisin	<i>F. culmorum</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i>	Mısır	Kanserojen, nefrotoksik
Patulin	<i>Penicilium expansum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. carneum</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>	Elma, şeftali ve diğer meyve suları	Üremenin yavaşlaması, gastrointestinal rahatsızlıklar, nefrotoksik, kanserojen, sitotoksik, genotoksik
HT-2 ve T-2	<i>F. langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Tahıllar, özellikle yulaf	İmmünotoksite, hematoksite, gastrointestinal rahatsızlıklar

2.3.1. Aflatoksinler

Aflatoksinler, *A. parasiticus* ve *A. flavus* 'un tarlada, ürün hasatı zamanında, depolamada, tahılların işlenmesi esnasında, 24 ila 35 °C arasında bir sıcaklıkta ve %7 ve üzerindeki nem varlığında sentezlediği metabolik ürünleridir. Bilinen 18 aflatoksin vardır ve en önemlileri gıda / yemlerdeki aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve süt ve süttten elde edilen ürünlerdeki aflatoksin M1, M2'dir [38]. Bunlar arasında en toksik olan AFB1'dir (33). Aflatoksin B1, karaciğer kanserini de dahil olmak üzere birçok sağlık sorunuyla direkt bağlantılı en toksik ve güçlü kanserojendir. Sadece insanlar için değil, aynı zamanda bitkiler ve su hayvanları için de toksiktir (35). Aflatoksin M1, AFB1 detoksikasyonunun bir ürünüdür; pastörizasyona ve sterilizasyona dirençlidir, bu sebeple AFM1 içeren sütlerden yapılan tüm ürünler toksin bulundurur. İnsanlara bulaşta yemlerin kontamine olması birinci yoldur fakat, süt ve süttten yapılan ürünlerin bu küfler ile hasat sonrası kontamine olması sonucunda da insanlara aflatoksin bulaşmaktadır [39]. Aflatoksinlerle kontaminasyona uğramış gıdalarla beslenen memelilerin sütünde bulunduğundan, aflatoksin M, süt toksini (Milk toxin) olarak isimlendirilmiştir.

Yemlerdeki ana aflatoksin kaynakları yer fıstığı, tahıllar, mısır ve pamuk tohumu küspesidir (36). Aflatoksinlerin kimyasal bileşikleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

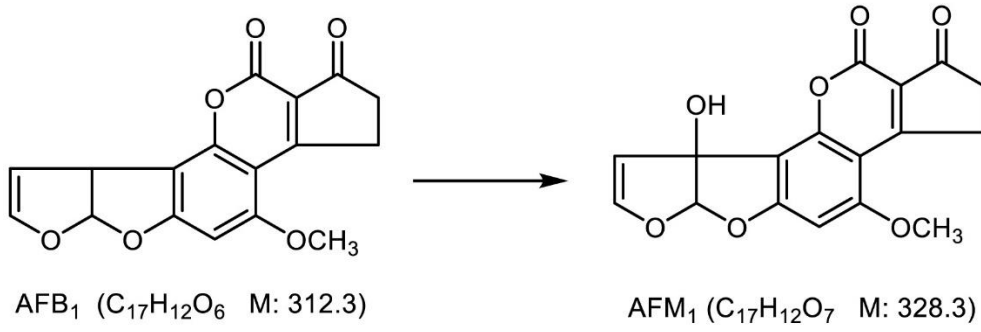


Şekil 2. 1 Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları [40]

2.3.1.2. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri

Aflatoksinler, ultraviyole altında yoğun olacak şekilde floresan ışık veren soluk sarı kristal maddelerdir ve AFB1 ve AFB2’nin mavi, AFG1 ve AFG2’nin sarı-yeşil ışık yaydığı belirlenmiştir [38].

Aflatoksin M1, aflatoksin B1 ve B2’nin yüksek düzeyde toksik 4-hidroksillenmiş metabolitidir [41]. Şekil 2-2’de aflatoksin B1’in (AFB1) karaciğerde aflatoksin M1’e (AFM1) metabolize oluşu gösterilmiştir.



Şekil 2. 2 Aflatoxin B1'in (AFB1) karaciğerde aflatoxin M1'e (AFM1) metabolize oluşu [42]

En güçlü hepatokarsinojenler, mutajenler, teratojenler ve immünosupresanlardan biridir. Bu nedenle, süt ve süt ürünlerindeki aflatoxin konsantrasyonunun tespiti ve kontrolü oldukça önemlidir [38].

2.3.1.3. Aflatoxinlerin Sağlık Üzerindeki Etkileri

Aflatoxinlere uzun süre düşük dozda maruz kalmak kronik toksisiteye veya kısa bir süre içinde yüksek dozda maruz kalmak akut toksisiteye ve ölüme neden olabilir [43]. Dünya Sağlık Örgütü(WHO), yüksek dozda maruz kalınan aflatoxinlerin, genellikle karaciğer hasarı yoluyla yaşamı tehdit eden aflatoksikoza yol açabileceğini; aflatoxinlerin genotoksik olduğunu ve bu nedenle hayvanlarda hücre DNA'sına hasar verebileceğini ve kansere neden olacağını belirtmiştir [41].

Aflatoxinlerin bir miktarının memeli dokusunda uzun süre kalabildiği ve tüm besin zincirini kontamine ettiği belirlenmiştir. Bu nedenle, aflatoxinler ağız yoluyla alınan kanserojenlerin temsilcisi olarak kabul edilmiştir ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC 1976) aflatoxinleri 1. Grup kanserojenler olarak sınıflandırılmıştır. AFB1'e uzun süre maruz kalmak hepatosellüler karsinomaya neden olmakla birlikte, aynı zamanda akciğer, safra kesesi ve kolon gibi diğer organ kanserlerine de neden olmaktadır [44].

İnsanlar tarafından en çok tüketilen et, yumurta, süt gibi ürünlerle az miktarda tüketilen AFB1 en başta karaciğer olmak üzere dokularda hasara sebep olabildiği ve DNA, RNA ve protein sentezi üzerine inhibe edici etkileri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [39, 45, 46]. Aflatoxinlerin karsinojenik potansiyelleri AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 şeklindedir [26]. Bu nedenle dünyanın değişen iklimi nedeniyle, aflatoxin oluşumu ve kontaminasyon riskindeki artışların sürekli olarak izlenmesi önemli bulunmuştur [43].

2.3.1.4. Süt ve Sütten Elde Edilen Ürünlerdeki Aflatoksin Varlığı

AFM 1'in süt ve sütte yapılan ürünlerde varlığı dünya çapında sık sık rapor edilmekte ve önemi vurgulanmaktadır. Süt, günlük olarak en çok tüketilen temel gıdalardan biridir ve süt ve süt ürünleri her yaşta tüketildiğinden, sütteki AFM1 varlığı büyük öneme sahiptir. Bu nedenle ülkeler, süt ve ürünlerindeki AFM1 düzeyini yasal limitler çerçevesinde kontrol etmekte ve yasal limitin üzerinde toksin bulunan süt ve bu sütlerden yapılan ürünlerin tüketimine izin verilmemektedir. Bu aflatoksinin sütteki ve ürünlerindeki yasal limitleri ülkelere göre değişmektedir [47]. Tablo 3'te farklı ülkelere ait yasal AFM1 limitleri ($\mu\text{g/kg}$) gösterilmiştir.

Tablo 2. 3 Farklı ülkeler için süt ve süt ürünlerindeki izin verilen AFM1 yasal sınır değerleri ($\mu\text{g/kg}$) [11, 48]

Ülke	Süt ($\mu\text{g/kg}$)	Süt ürünleri ($\mu\text{g/kg}$)
Amerika	0.50	0.50
Avrupa	0.05	0.05
Avusturya	0.05, 0.01(pastörize edilmiş devam sütü)	0.02 (tereyağı) 0.25 (peynir) 0.4 (süt tozu)
Fransa	0.05, 0.03 (3 yaşından küçük çocuklar için)	-
Bulgaristan	0.50	0.10 (süt tozu)
Brezilya	-	5.0 (süt tozu)
Çek Cumhuriyeti	0.05	-
Türkiye	0.05	0.25 (peynir) 0.5 (süt tozu) 0.05 (süt temelli bebek

		mamaları)
İran	0.50	-
Nijerya	1	-
Arjantin	0.05	0.50 (peynir)
Mısır	0	0
Romanya	0	0
İsviçre	0.05	0.025 (peynir altı suyu ve peynir altı suyu ürünleri) 0.25 (peynir) 0.02 (tereyağı)

2.3.2. Okratoksinler

Çoğunlukla *Aspergillus ochraceus* tarafından üretilen toksik metabolitlerdir. En toksik olan Okratoksin A (OTA) 1965'te izole edilmiş ve tür ve cinsiyet farklılıklarıyla beraber hayvanlarda nefrotoksik, nörotoksik, teratojenik, genotoksik, embriyotoksik, immünotoksik ve kanserojendir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, 1993 yılında OTA'yı potansiyel insan kanserojeni (kategori 2B) olarak belirlemiştir. Hayvanlarda ve insanlarda OTA maruziyeti, çeşitli sağlık problemlerine neden olabilir. Okratoksin A hem oksidatif stres hem de doğrudan genotoksik yollarla nefrotoksin ve ürotelyal kanserojen olarak işlev gösterir. İnsanlar genellikle OTA'ya, bu toksinle kontamine olmuş besin alımları ile maruz kalırlar [49].

2.3.3. Patulin

Patulin (PAT), gıda ve özellikle elme ve şeftali gibi meyvelerde ve bunların meyve sularında bulunan; özellikle *Penicillium expansum*, *Penicillium patulum* ve *Aspergillus clavatus* (*Clavati* grubu) tarafından üretilen bir metabolittir. Toksisitesi sebebiyle, mikotoksinler listesine eklenmiştir ve bazı ülkelerde gıdalardaki düzeyi sınırlandırılmıştır. Meyve sularında (50 µg/L), elma ürünlerinde (25 µg/L) , bebeklerin ve çocukların tükettiği gıdalarda izin verilen patulin miktarları belirlenmiştir [50].

2.3.4. Zearalenone

Zearalenone (ZEN), *Fusarium* cinsi mantarlar tarafından üretilen ikincil bir metabolittir ve gıdalarda yaygın görülen mikotoksinlerden biridir. ZEN sorgum, mısır, buğday, arpa ve yulaf gibi tahıl tanelerini kontamine eder ve makarna, kahvaltılık gevrek ve ekmek gibi gıdalarda yaygın olarak bulunur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda gıdalardaki ZEN miktarlarının Avrupa Birliği (AB) tarafından belirlenen maksimum bulaş sınırları işlenmemiş tahıllarda 100-200 µg/kg, işlenmiş tahıllarda ise 75 µg/kg olarak belirlenmiştir. Östrojenik etkiye sahip olması nedeniyle dişi hayvanlara uzun süre ZEN içeren yemlerin verilmesi, genişlemiş uterus ve uterus kanamasına, atrofik değişikliklere ve fetal ağırlığın azalmasına, yavru atma ve kısırlığa sebep olmuştur [51].

2.4. Mikotoksinlerin Tanı Yöntemleri

Mikotoksikozu kontrol etmek amacıyla gıdalarda bulunan mikotoksin düzeylerinin belirlenmesi çok önemlidir. Bu sebeple gıda ve yemlerde toksin varlığını belirleyen kesin sonuç veren, duyarlı yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bu yöntemleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç ana başlıkta toplamak mümkündür.

2.4.1. Fiziksel yöntemler

Mikotoksin oluşumunun engellenmesi için en etkili yöntemdir. Ham maddenin hasat zamanı ve sonrasında, uygun koşullarda taşınması, düşük sıcaklıkta depolanması, ürüne dönüştürülmesi aşamalarında küf bulaşı olmaması için önlem almak gerekmektedir. Tarlada bulaşı önlemek zor olsa da, sonraki aşamalarda hijyen ve sanitasyona öncelik verilerek uygun depolama yaparak (nem, oksijen konsantrasyonu, su aktivitesi), küf kontaminasyonu büyük ölçüde engellenebilir [52]. Bunun yanı sıra yemlerde ve gıdalarda fiziksel değişikliklerin gözlenmesi mikotoksin ile kontaminasyon hakkında fikir vermesi açısından önemlidir.

2.4.2. Kimyasal yöntemler

Mikotoksinlerin kimyasal analizinde kullanılan yöntemlerden bazıları; Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS), Kolon Kromatografisi, Enzim Aktivitesine Bağlı Olan İmmunoteknik (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique/EMIT), Enzim Bağlanmış İmmunosorbant Yöntemi (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) enzime bağlı aptamer

testleri, floresan polarizasyon immünolojik test dir. Mikotoksinlerin tanımlanmasında tek bir analiz yöntemi bulunamamıştır [12, 14, 53]. Mikotoksinlerin belirlenmesinde ELISA en sık kullanılan immunokimyasal yöntemdir. Yöntemde sıvı örnekler ile direkt olarak çalışılırken, katı örnekler ayrıştırma, saflaştırma işlemlerine tabi tutulur. ELISA yöntemi, antikora bağlanmış enzim aktivitesini araştıran kantitatif bir testtir. Kompetatif ELISA metodunda, yüzeye özgü toksine karşı spesifik antikorlarla kaplı plaklar kullanılır. Bu yöntemde serbest ve belirlenmiş antijenler antikorlara karşı yarışır. Sonuçları standart olan gruplarla karşılaştırılarak değerlendirmeye alınır [11, 20, 54].

2.4.3.Biyolojik yöntemler

Bazı bakteri, maya ve küfler aflatoksinleri parçalayabilir. Bu mikroorganizmalar bu işlemde, her bir mikotoksini veya mikotoksin sınıfını hassas bir şekilde toksik olmayan moleküllere parçalayan enzimleri kullanır. *Saccharomyces cerevisiae*, AFB1'e adere olmada en başarılı türlerden biridir. Bunun gibi AFB1'i %65-99 oranında değişen seviyelere de indirgediği gösterilen bazı mantar suşlarına *Mucor* spp., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma* spp. örnek verilebilir [5].

Bazı laktik asit bakterileri, küf oluşumunu önleyerek aflatoksinlerin etkilerini azaltabilir. Laktobasiller, özellikle aflatoksin B1'in adere olmasında gözle görülür azalmaya neden olur [55].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tereyağı Örneklerinin Toplanması

Yapılan bu çalışmada 42'si kış mevsiminde (ocak-şubat) ve 42'si ilkbaharda (mayıs) olmak üzere marketlerden farklı lot numaralarına sahip 84 tereyağı örneği toplanmış ve örneklerdeki AFM1 düzeylerinin mevsimsel değişiklik gösterip göstermediği kompetatif ELISA (Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121) yöntemi ile araştırılmıştır. Örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kit İçeriği

Analiz amacıyla Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 test kiti (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121) kullanılmış ve ölçümler yapılmıştır (Şekil 3-1). Kullanılan ELISA kitinin içeriğinde bulunan standart solüsyonları, substrat kromojen, yıkama solüsyonu konjugat, buffer 1, buffer 2, stop solüsyonu hazır olarak yer almıştır. Bir tane Ridascreen kitiyle standartlar dahil olmak üzere, toplamda 48 tereyağı örneğinde AFM1 düzeyi belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken 0,05 ng/L yasal sınır değer olarak kullanılmıştır.



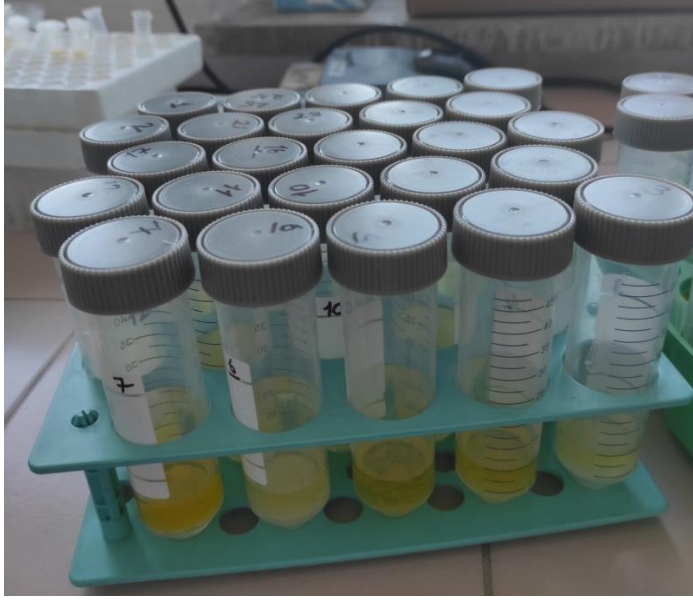
Şekil 3. 1 Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 test kiti (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121)

3.3. Analizlerde Kullanılan Araç, Gereçler ve Cihazlar,

- Biopharm Ridascreeen Aflatoxin M1 test kiti (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121)
- ELISA Yıkama cihazı (CIOM CA-200, China)
- Spektrofotometre (ELx800 BioTek Instruments Inc, USA)
- Santrifüj (Heraeus Megafuge 1.0, Germany)
- Vorteks
- Hassas tartı
- Su banyosu
- Tek kullanımlık 1,5 mL'lik Eppendorf tüpü
- Tek kullanımlık 50 mL'lik Falcon tüpü
- Steril sarı ve steril mavi pipet ucu (Eppendorf, Hamburg/Germany)
- Pastör pipeti (200 – 1000 µL, 20 – 200 µL)
- N-hekzan 500 ml
- Metanol 1L

3.4. Tereyağlarının Analize Hazırlanması

Tereyağı örnekleri hassas terazide 3 gram olacak şekilde tartılmış ve şekil 3-2'de görüldüğü gibi 50 mL'lik falcon tüplere alınarak, 40°C'lik su banyosunda eritilmiştir. Üzerine 3 ml n-hekzan ve 3 ml %70 distile su ile sulandırılmış metanol eklenmiştir. Kimyasallar eklendikten sonra örnekler vortekslenmiştir. Karıştırma işlemine tüp tersyüz edilerek 15 dakika daha devam edilmiştir. Yağ tabakalarından ayrılması için örnekler 10°C'de, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjde çevrilmiştir. Santrifüj sonrasında üstte ayrılan süpernatant (krema tabakası) Pastör pipetiyle tereyağı örneğinden ayrılmıştır. Örnekleri seyreltmek için kit içerisinde bulunan buffer solüsyonundan 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine 800 µL, yağı alınan tereyağı örneklerinden 50 µL aktarılmış ve vortekslenmiş, buffer 1 çözeltisi ile 1:17 oranında dilüe edilmiştir. Sonrasında hazırlanan tereyağı örnekleri için dilüsyon faktörü 20 olarak belirlenmiştir. Hazırlanan bu tereyağı örneklerinden mikrolaktaki her kuyucuğa 100 µL ilave edilmiştir.



Şekil 3. 2 Toplanan tereyağı örneklerinin analize hazırlanması

3.5. Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması

Kit içerisinde toz olarak hazır halde bulunan yıkama tozunun üzerine kullanım talimatı doğrultusunda 1 L distile su eklenerek homojen bir karışım elde edilmiştir. Bu karışım mikro plakların yıkanması sırasında kullanılmıştır.

3.6. Testin Uygulanması

Çalışılırken kit içerisinde bulunan tüm reaktifler ELISA aşamasından önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Test uygulanırken mikro kuyucukların tamamen kurumamasına dikkat edilmiştir. Testin doğru uygulandığı büyük oranda mikro kuyucukların yıkanma aşamasındaki hassasiyete bağlı olduğu için yıkama işlemlerinde prosedürde belirtilen yıkama aşamalarına dikkat edilmiştir ve plaklara reaktifleri ilave ettikten sonra inkübasyonları esnasında direkt güneş ışığına temasından kaçınılmıştır.

- Her kit için standartlar ve tereyağı örnekleri iki kez çalışılmıştır. Mikroplakların ilk 12 kuyusu altı standart için kullanılıp diğer kuyular da örnekler için kullanılmıştır.
- Her kuyuya 100 μ L antikor solüsyonu eklenip sonrasında plaklar yavaşça çalkalanmış ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında (25 °C) ışık görmeyecek şekilde inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuk 250 μ L yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve bu işlem üç kez tekrar edilmiştir.
- Her standarttan iki kez olacak şekilde, ilk 12 kuyucuğa 100 μ L standart solüsyonlarından eklenmiştir.
- Diğer kalan kuyucuklara tereyağı örneklerinden iki defa 100 μ L eklenmiştir.
- Plaklar hafif bir şekilde çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında (25 °C), karanlık ortamda, 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- Her kuyucuk 250 μ L yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve bu işlem üç kez tekrar edilmiştir.
- Her bir kuyucuğa 100 μ L konjugat solüsyonu eklenmiş, plaklar yavaşça çalkalanmış ve oda sıcaklığında (25 °C), karanlık ortamda, 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuk 250 μ L yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.
- Her bir kuyucuğa 100 μ L kromojen solüsyonu eklenmiş, plaklar yavaşça çalkalanıp oda sıcaklığında (25 °C), karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuğa 100 μ L stop solüsyonu eklenmiştir ve plaklar yavaşça çalkalanmış ve örnekler 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede analiz yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çeşitli marketlerden kış ve ilkbahar mevsimlerinde toplanan farklı lot numaralarına ait 84 tereyağı örneğinin; kış mevsiminde toplanan 42 örnekte belirlenen AFM1 düzeyleri Tablo 4-1 de, ilkbahar mevsiminde toplanan 42 örnekte belirlenen AFM1 düzeyleri Tablo 4-2 de gösterilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken 0,05 ng/L yasal sınır değeri olarak kullanılmıştır.

Tablo 4. 1 Kış mevsiminde farklı lot numarasına sahip tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeyleri (ng/L).

SMP1	55,31	SMP10	47,34	SMP19	0	SMP28	55,31	SMP37	53,79
SMP2	48,15	SMP11	0	SMP20	43,78	SMP29	57,07	SMP38	50,83
SMP3	70,95	SMP12	57,29	SMP21	53,37	SMP30	61,59	SMP39	64,63
SMP4	79,70	SMP13	48,97	SMP22	58,41	SMP31	59,76	SMP40	74,74
SMP5	95,39	SMP14	52,30	SMP23	64,40	SMP32	70,45	SMP41	65,58
SMP6	74,48	SMP15	63,22	SMP24	55,09	SMP33	72,45	SMP42	52,51
SMP7	76,81	SMP16	53,79	SMP25	66,06	SMP34	57,07		
SMP8	76,29	SMP17	51,67	SMP26	47,95	SMP35	0		
SMP9	80,23	SMP18	0	SMP27	0	SMP36	58,86		

Sarı ile gösterilmiş olan örnekler kit içeriğinde bulunan 5. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 40,00-80,00 ng/L AFM1 saptanmış 35 örneği göstermektedir (%83,3). Mor ile boyanan örnekler kit içeriğinde 6. Standart solüsyonunun referans aralığı olarak belirlenen >80,00 ng/L AFM1 saptanmış iki örneği göstermektedir (%4,8). Mavi ile gösterilen örnekler kit içeriğinde standart solüsyonunun AFM1 saptanmamış beş örneği göstermektedir (%11,9). Bu örneklerde test kitindeki belirlenen referans aralıkları içerisinde belirli bir AFM1 aralığı saptanmamıştır.

Tablo 4. 2 İlkbahar mevsiminde farklı lot numaralarına sahip tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeyleri (ng/L)

SMP1	61,50	SMP10	64,58	SMP19	42,38	SMP28	90,05	SMP37	123,85
SMP2	45,35	SMP11	43,22	SMP20	57,77	SMP29	82,71	SMP38	121,99
SMP3	63,55	SMP12	60,25	SMP21	49,55	SMP30	91,95	SMP39	111,10
SMP4	72,08	SMP13	48,65	SMP22	52,53	SMP31	91,95	SMP40	134,54
SMP5	72,36	SMP14	45,57	SMP23	76,29	SMP32	117,94	SMP41	152,53
SMP6	55,83	SMP15	51,14	SMP24	50,68	SMP33	114,67	SMP42	116,12
SMP7	55,83	SMP16	49,77	SMP25	69,35	SMP34	95,14		
SMP8	68,01	SMP17	62,52	SMP26	70,98	SMP35	108,99		
SMP9	84,51	SMP18	78,88	SMP27	72,36	SMP36	123,48		

Sarı ile boyanan olan örnekler kit içeriğinde belirlenen 5. standart solüsyonunun referans aralığı olan 40,00-80,00 ng/L AFM1 saptanmış 26 örneği (%61,9), mor ile boyanmış örnekler ise kit içeriğinde 6. standart solüsyonunun belirlenen referans aralığı olan 80,00-100 ng/L AFM1 saptanmış 6 örneği (%14,3) göstermektedir. Kırmızı ile gösterilen 10 örnekte >100 ng/L AFM1 saptanmıştır. Kit 100 ng/L üzerindeki tespitlerde, referans aralığı olmaksızın kesin sonuç vermektedir (%23,8).

Tablo 4. 3 Kış aylarında toplanan tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı

Standartlara göre AFM1 düzeyi	Elde Edilen AFM1 düzeyi									Toplam Örnek sayısı
0	0	0	0	0	0					5
40,00-80,00	43,78	47,34	47,95	48,15	48,97	50,83	51,67	52,30	52,51	35
	53,37	53,79	55,09	55,31	55,31	57,07	57,07	57,29	58,41	
	58,86	59,76	61,59	63,22	64,40	64,63	65,58	66,06	70,45	
	70,95	72,45	74,48	74,74	76,29	76,81	79,70			
80,00-100	80,23	95,39								2

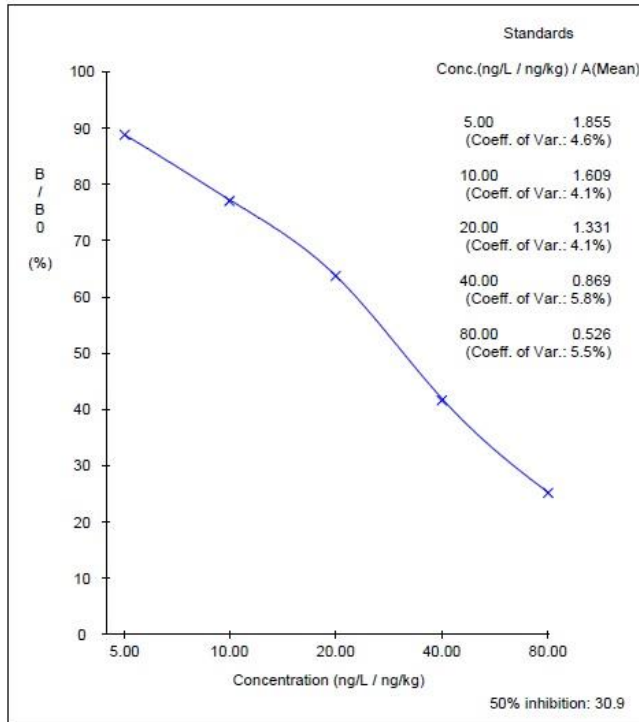
Tablo 4. 4 İlkbahar aylarında toplanan tereyağı örneklerinde belirlenmiş olan AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı

Standartlara göre AFM1 düzeyi	Elde Edilen AFM1 düzeyi									Toplam Örnek sayısı
40,00-80,00	42,38	43,22	45,35	45,57	48,65	49,55	49,77	50,68	51,14	26
	52,53	55,83	55,83	57,77	60,25	61,50	62,52	63,55	64,58	
	68,01	69,35	70,98	72,08	72,36	72,36	76,29	78,88		
80,00-100	82,71	84,51	90,05	91,95	91,95	95,14				6
>100,00	108,99	111,10	114,67	116,12	117,94	121,99	123,48	123,85	134,54	10
	152,53									

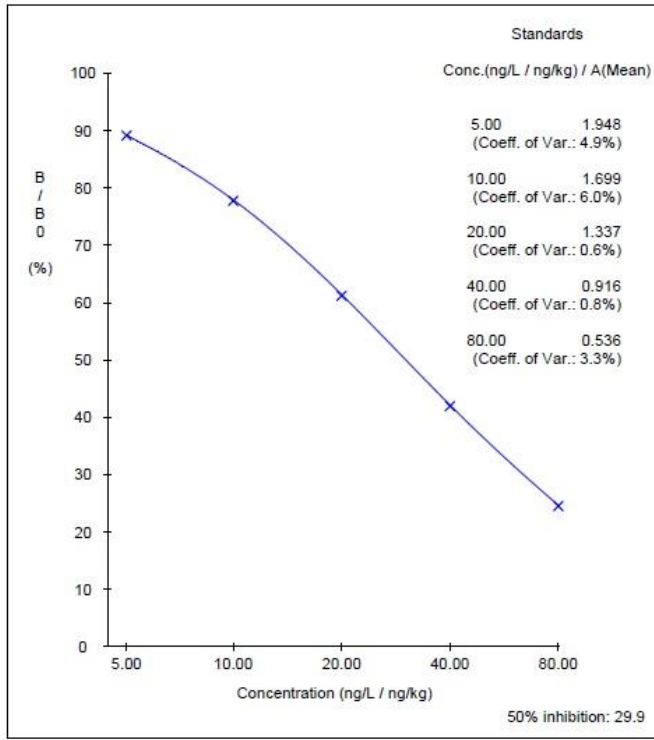
Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, 84 tereyağı örneğinin 79' unda (%94) farklı düzeylerde AFM1 miktarı saptanırken, bu tereyağı örneklerinin 67'sinde (%79,7) yasal sınırın aşıldığı belirlenmiş ve beş (%5,9) örnekte toksine rastlanmamıştır.

Kış mevsiminde, ocak-şubat aylarında toplanan tereyağı örnekleri AFM1 açısından değerlendirildiğinde, 42 tereyağı örneğinin 37'sinin (%88,1) saptanabilir düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğu saptanmış ve bu örneklerin 32'sinde (%76) sınır değerin (0,05ng/L) aşıldığı belirlenmiştir. Beş örnekte ise sınır değerinin altında AFM1 saptanırken (%12), beş örnekte (%12) toksine rastlanmamıştır (Tablo 4-3).

İlkbaharda, mayıs ayında toplanan tereyağı örnekleri AFM1 açısından değerlendirildiğinde, 42 tereyağı örneğinin tümünün (%100) çeşitli düzeylerde AFM1 içerdiği belirlenmiştir. Otuz beş örnekte 0,05ng/L olan sınır değerin aşıldığı (%83.3) saptanırken, bu örneklerin 10'unda (%23,8) çok yüksek düzeyde (>100,00) toksin belirlenmiştir. Yedi örnekte sınır değerin altında AFM1 (%16.6) saptanmıştır (Tablo 4-4). Kış mevsiminde toplanan tereyağı örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanılan kalibrasyon grafiği Şekil 4-1'de gösterilmiştir. İlkbahar mevsiminde toplanan tereyağı örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği Şekil 4-2'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1 Kış Mevsimi Standart Eğrisi



Şekil 4. 2 İlkbahar Mevsimi Standart Eğrisi

5.TARTIŞMA

Süt ve süt ürünleri beslenmemizde büyük öneme sahip temel besin kaynaklarındandır. Pastörizasyon ve sterilizasyon gibi yüksek ısı işlemlere dayanan AFM1, sütleri ve bu sütlerden üretilen tüm gıdaları kontamine etmektedir.

AFM1 insanlarda hepatotoksik, kanserojen, genotoksikdir ve immün sistemi baskılama yeteneğindedir, bu nedenle ülkelerde 0,03 ila 0,250 µg/kg arasında değişen yasal sınırlar içeren uluslararası düzenlemeler yapılmıştır [48]. Bu düzenlemeler ülkeden ülkeye değişmektedir. Türk Gıda Kodeksinin Bulaşanlar Tebliği'ne göre (45.madde) süt temelli ürünlerde belirlenen aflatoksin sınırı 0.05 ppb (µg/kg) (50 ng/L)'dir [56].

Dünya çapında, her yaşta tüketilen ve beslenmemizde önemli bir yeri olan süt ve bunun ürünü olan tereyağı gibi süt ürünlerinde AFM1 varlığıyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır.

Pakistan Lahor'da yapılan bir çalışmada süt ve süt ürünlerindeki AFM1 varlığı araştırılmıştır. Toplam 60 süt örneği ve 30 tereyağı, 30 peynir, 30 krema ve 30 yoğurt dahil olmak üzere 120 süt ürünü örneğinin incelendiği çalışmada, tereyağı örneklerinin **%16,7'sinde** AFM1 düzeyi sınırın üzerinde saptanmıştır [57].

Etiyopya'daki en önemli süt üretim yerlerinden birinde yapılan bir çalışmada toplanan süt ve süt ürünlerinde AFM1 miktarı araştırılmıştır. Hem endüstriyel hem de yerel üreticilerden 108 süt, 82 peynir, 93 yoğurt ve 82 tereyağı örneği toplanmıştır. Analiz edilen 365 örneğin 361'inde (%99) AFM1 saptanmıştır. En yüksek değer süzme peynirde $5,580 \pm 0,08$ µg/kg konsantrasyonla saptanırken ve en düşük değer ise tereyağı örneğinde bulunmuştur. Tereyağı örneklerinin **%5'inin** sınırın üzerinde AFM1 içerdiği saptanmıştır. Dört süt ürünü arasındaki ortalama AFM1 seviyesinin karşılaştırılması; süt > süzme peynir > tereyağı > yoğurt şeklindedir [58].

Katar'da yapılan bir başka çalışmada süt ve süt ürünlerinde AFM1 araştırılması amacıyla 72 süt, 21 yoğurt, 46 peynir, 18 tereyağı ve 25 laban örneği toplanmış ve AFM1 varlığı için önce (ELISA), ardından ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) ile doğrulama yapılmıştır. Süt, yoğurt, peynir, **tereyağı** ve laban örneklerinde sırasıyla %85, %76, %85, **%67**, %76 oranında AFM1 saptanmıştır.

Yapılan çalışmada, tuzsuz tereyağı örneklerinin, tuzlu tereyağı örneklerine oranla çok daha yüksek düzeyde AFM1 içerdiği saptanmıştır [59].

Hindistan Ludhiana'da yapılan bir çalışmada yedi tesisten 109 süt, 97 tereyağı, 99 peynir ve 103 lor olmak üzere toplam 408 örnek toplanmıştır. Örnekler ELISA yöntemiyle test edilmiştir. Süt ve süt ürünlerinin tümünde **(%100)** AFM1 saptanmıştır. Çalışmada tüketim miktarları sağlık riski değerlendirmesi yapılmıştır, çalışma alanındaki tüketicilerin, özellikle çocukların, düşük vücut ağırlıkları ve daha yüksek süt alımları nedeniyle AFM1 açısından daha yüksek sağlık riski altında olduğu gösterilmiştir [60].

Ülkemizde beş şehri içine alarak yapılan bir (İstanbul, Tekirdağ, İzmir, Konya ve Kayseri) çalışmada, 100 krem peynir ve 92 tereyağı numunesindeki AFM1 miktarları ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Tereyağı örneklerinin **%100'ünde** ve krem peynir örneklerinin %99'unda AFM1 saptanmıştır [61].

Kayseri'deki bir diğer çalışmada kaymak ve tereyağı örneklerinde AFM1 varlığı araştırılmıştır. Çalışmada rastgele toplanmış olan 100 örnekte (50 tereyağı ve 50 kaymak) ELISA tekniği kullanılmış, örneklerin tamamında AFM1 saptanmıştır. Yalnızca **bir (%2)** tereyağı örneğinde AFM1 konsantrasyonu Türk Gıda Kodeksinin belirlediği yasal sınırın üzerinde çıkmıştır [62].

Sakarya ilinde yapılan bir çalışmada süt, beyaz peynir, kaşar peyniri ve tereyağından oluşan 104 örnekte AFM1 düzeyleri incelenmiştir. İmmünoafinite kolonu (IAC) saflaştırmasının ardından numuneleri analiz etmek için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)-floresan saptama yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar, sütün %61,5'inin, beyaz peynirin %40'ının, kaşar peynirinin %65,4'ünün ve tereyağının **%29,6'sının** AFM1 içerdiğini göstermiştir. Örneklerin 53'ünde (%50,96) AFM1 saptanmamıştır [63].

Erzurum'da yapılan bir çalışmada 80 tereyağı örneğinde AFM1 seviyesi belirlenmiştir. Örnekler şehir merkezindeki marketlerden toplanmıştır. Örneklerdeki AFM1 düzeyi ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. 66 örnekteki AFM1 miktarları 10 ile 121 ng/kg arasında değişmekte olup ortalama 30.4 ± 23.9 ng/kg olarak bulunmuştur. 13 numunede **(16.3%)** belirlenmiş olan AFM1 düzeyinin Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC) tarafından belirlenmiş olan yasal limitlerin üzerinde olduğu belirlenmiştir [64].

Adana’da yapılan bir çalışmada 20 kaşar peyniri, 20 süt, 10 tereyağı ve 20 beyaz peynir örneğinden oluşan toplam 70 tane süt ürünüde ELISA ile AFM1 analizi yapılmıştır. Tespit limiti sütte 5 ng/L olarak ve tereyağı, beyaz peynir ve kaşar peynirinde ise 25 ng/kg olarak belirlenmiştir. Analiz edilen 70 süt ürününün 49’unda (%70) AFM 1 düzeyinin 10-388 ng/kg arasında olduğu bulunmuştur. Ayrıca üç süt , iki tereyağı (**% 2.85**) , bir beyaz peynir ve bir kaşar peyniri örneğinde AFM1 seviyeleri Türk Gıda kodeksi limitlerin üzerinde bulunmuştur [65].

Bu çalışmada İstanbul ilindeki marketlerden kış mevsiminde (ocak ve şubat aylarında) farklı lot numaralarına sahip 42 ve ilkbahar mevsiminde (mayıs ayında) 42 adet tereyağı olmak üzere 84 örnek toplanmış ve ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Seksen dört tereyağı örneğinin 79’ unda (%94) farklı düzeylerde AFM1 varlığı saptanırken, bu tereyağı örneklerinin 67’sinde (%79,7) yasal sınırın aşıldığı belirlenmiş ve beş (%5,9) örnekte toksine rastlanmamıştır.

Çalışmamızın sonuçları, Tadesse ve ark., Hassan ve ark. ve Kaur ve ark.’nın çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermiş ancak Gill ve ark., Tadessa ve ark., Atasever ve ark. ve Var ve ark.’nın çalışmalarına göre daha yüksek düzeyde AFM1 belirlenmiştir. Örneklerden de görüldüğü gibi AFM1 düzeyleri ülkeler arası farklılık göstermekte olup; bu farklılıklar örneklerin toplandığı mevsimlere, yem depolama koşullarına ve ülkelerdeki kontrol mekanizmalarının düzenli çalışıp çalışmadığına bağlanabilir. Çalışmamızın sonuçları tereyağı örneklerinin %94’ünün kontamine olduğunu ve %79’unda yasal sınırın aşıldığını göstermektedir. Bu durumda, süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin miktarlarının ve en başta yem depolama koşullarının iyileştirilmesi ve daha sıkı kontrol yöntemlerinin uygulanmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda mevsimsel değişikliklerin AFM1 düzeyinde etkili olduğu belirlenmiştir. Pakistan’da yapılan bir çalışmada, 2013-2014 yıllarında sonbahar, kış, ilkbahar ve yaz mevsimlerinde 520 süt örneğinde ELISA yöntemi kullanılarak AFM1 düzeyi ölçülmüştür. Süt örneklerinin %93’ünde AFM1 düzeyi 0,001–0,26 µg/l aralığında bulunurken, %53’ünün Avrupa Birliği AFM1 maksimum limitini (0,05 µg/l) aştığı saptanmıştır. AFM1’in mevsimsel yaygınlık düzeyi yüksekten düşüğe sıralandığında kış> ilkbahar> sonbahar > yaz şeklinde bulunmuştur [66].

Hırvatistan'daki bir çalışmada çiftliklerden ve pazarlardan Şubat-Temmuz 2013 tarihleri arasında toplanan çiğ süt (3716) ve UHT süt (706) örneklerinde AFM1 kontaminasyonu araştırılmıştır. Çiğ sütlerin toplam %27,8'inde ve UHT sütlerin %9,64'ünde yasal sınırı aşan AFM1 seviyeleri belirlenmiştir. Şubat, mart, mayıs ve haziran aylarında toplanan örneklerde, çiğ ve UHT süt örnekleri arasında ortalama AFM1 konsantrasyonlarında istatistiksel farklılıklar gözlenmiştir. Hem çiğ, hem de UHT süt örneklerinde, AFM1 konsantrasyonları mayıs ayından temmuz ayına kadar olan dönemde kademeli olarak azalmış, yaz döneminde daha düşük AFM1 konsantrasyonları saptanmıştır [67].

Çin'de çiğ sütün AFM1 ile kontamine olma sıklığını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, toplam 5650 çiğ süt örneğinden 267'sinde (%4,7) AFM1 kontaminasyonu tespit edilmiştir. Çiğ süt örneklerinin yalnızca %1,1'i Avrupa Birliği yasal sınırını (50 ng/L) aşmış ve örneklerin hiçbiri Çin ve Amerika Birleşik Devletleri yasal sınırını (500 ng/L) aşmamıştır. Çin'de çiğ süt numunelerinde AFM1 kontaminasyonu kış aylarında %10.2, ilkbahar, yaz ve sonbaharda sırasıyla %3.0, %2.1 ve %4.4 olarak çok daha düşük bulunmuştur [68].

İran'da yapılan bir çalışmada ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış aylarında geleneksel olarak toplanan 100 pastörize süt örneğinde AFM1 kontaminasyonu değerlendirilmiştir. Örnekler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ve florimetrik tespit ile değerlendirilmiştir. Sonuçta, kışın toplanan örneklerin yaklaşık %44'ünün ilkbaharda toplanan örneklerin %32'sinin, yazın toplanan örneklerin %24'ünün ve sonbaharda toplanan örneklerin yaklaşık %20'sinin İran standartları tarafından belirlenen 0,05 µg/l olan sınır değeri aştığı gösterilmiştir. İstatistiksel analize göre, farklı mevsimlerde AFM1 düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır [10].

Hırvatistan'ın batı, doğu ve diğer bölgeler olmak üzere üç bölgesinde dört mevsim boyunca toplam 3543 çiğ inek sütü örneği toplanmıştır. Örneklerin, AFM1 düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. AFM1'in yüksek seviyeleri (>50 ng/kg) üçlü dörtlü kütle spektrometrisi ile doğrulanmış, sıvı kromatografisi ile analiz edilmiştir (LC-MS/MS). Üç bölgede, dört sezon boyunca ölçülen ve yasal sınırı (50 ng/kg) aşan en yüksek AFM1 seviyeleri doğu bölgesinde sonbaharda (ekim-aralık) ölçülmüştür. Kış aylarında sınırı aşan sadece sekiz örnek bulunmuştur. En yüksek AFM1 seviyeleri aralıkta (764,4 ng/kg) ve ocakta (383,3 ng/kg) ölçülmüştür. Batı ve

diğer bölgelerden sadece dört örnekte ve doğu bölgesinde iki örnekte yaz aylarında yüksek AFM1 seviyeleri bulunmuştur [69].

İran’da yapılan bir çalışmada marketlerden toplanan 91 pastörize süt, 72 beyaz peynir, 68 yoğurt, 36 dondurma ve 31 tereyağından oluşan 298 örnek kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi tekniği ile AFM1 miktarı değerlendirilmiştir. Pastörize süt örneklerinin 66 (%72,5)’sında, 45 (%66,1) yoğurt örneğinde, 59 (%81,9) beyaz peynir örneği, 8 **(%25,8)** tereyağı örneği ve 25 (%69,4) dondurma örneğinde AFM1 varlığı tespit edilmiştir. İran Standartlar ve Endüstriyel Araştırmalar Enstitüsü (ISIRI, 2002), AFM için maksimum seviyeyi süt tozunda 1 – 0,5 µg/kg, tereyağı ve ayranı 0,020 µg/kg, peynirde 0,250 µg/kg ve 0,050 µg olarak kabul etmiştir. Bu sınırlara göre pastörize süt, yoğurt, beyaz peynir, tereyağı ve dondurma örneklerinin sırasıyla %36,2, %20,6, %30,5, **%9,6** ve %27,7’sinde AFM1 konsantrasyonu İran ulusal standart limitlerinden daha yüksek bulunmuştur. Kışın toplanan pastörize süt, yoğurt, tereyağı ve dondurma örneklerindeki AFM1 seviyelerinin, yaz aylarında toplananlardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur [70].

Pakistan’da yapılan bir çalışmada kış aylarında (Kasım 2011 ve Şubat 2012) toplam 221 ve yaz aylarında (Mayıs ve Ağustos 2012) 212 süt ve süttten elde edilen ürünler toplanmıştır. Örnekler HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir. Sonuçlarda kış mevsiminde süt ve süt ürünleri örneklerinin yaklaşık %45’inin AFM1 ile kontamine olduğu ortaya çıkmıştır, çiğ sütün %40’ı, UHT sütün %51’i, yoğurdun %37’si, tereyağının **%60’ı** yasal sınırın üzerinde AFM1 içermektedir. Ancak yaz sezonundan itibaren süt ve süt ürünleri örneklerinin %32’sinin kontamine olduğu bulunmuştur; yani çiğ sütün %36’sı, UHT sütün %31’i, yoğurdun %29’u, **tereyağının %40’ında** yasal sınırın üzerinde AFM1 bulunmuştur. Süt ve süt ürünlerindeki kontaminasyon seviyeleri kış mevsiminde yaz mevsimine göre daha yüksek bulunmuştur [11].

Sonuçlar mevsimsel açıdan değerlendirildiğinde, kış aylarında toplanan 42 tereyağı örneğinin 37’sinin (%88,1) saptanabilir düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiş ve bu örneklerin 32’sinde (%76) sınır değerin (0,05ng/L) aşıldığı görülmüştür. Beş örnekte ise sınır değerinin altında AFM1 saptanırken (%12), beş örnekte (%12) toksine rastlanmamıştır. İlkbaharda Mayıs ayında toplanan tereyağı örnekleri AFM1 açısından değerlendirildiğinde, 42 tereyağı örneğinin tümünün (%100) çeşitli düzeylerde AFM1 içerdiği belirlenmiştir. Otuz beş örnekte 0,05 ng/L olan sınır

değerin aşıldığı (%83.3) saptanırken, bu örneklerin 10'unda (%23,8) çok yüksek düzeyde (>100,00) toksin belirlenmiştir. Yedi örnekte sınır değerin altında AFM1 (%16.6) saptanmıştır.

Çalışmamızdaki sonuçlara göre mevsimsel değerlendirme yapılan Ismail ve ark., Li ve ark. ve Ankari ve ark.'nın çalışmalarının aksine ilkbahar mevsimindeki tereyağı örneklerinde saptanan AFM1 düzeyleri, kış aylarında toplanan örneklerdekinden daha yüksek bulunmuştur. İlkbaharda toksin düzeylerinin kış mevsimine göre daha yüksek olması, hava koşulları nedeniyle hayvanların meraya çıkamadığı ve hala depo yemlerle beslenmiş olabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışma sonucunda, tereyağlarında belirlenen AFM1 düzeylerinin ciddi halk sağlığı sorunu oluşturabileceği, bu duruma sebep olabilecek hayvan yemlerinde bulunan AFB1 miktarlarının düzeylerinin ve bu yemlerin depo koşullarının düzenli olarak kontrol edilmesi ve denetlenmesi gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Cimbalo, A., ve ark., *Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review*. Food and Chemical Toxicology, 2020. 137: s. 111161.
2. Yang, C., G. Song, ve W. Lim, *Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals*. Journal of Hazardous Materials, 2020. 389: s. 122087.
3. Buszewska-Forajta, M., *Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals*. Toxicon, 2020. 182: s. 34-53.
4. Sujayasree, O., ve ark., *Ozone: An advanced oxidation technology to enhance sustainable food consumption through mycotoxin degradation*. Ozone: Science & Engineering, 2022. 44(1): s. 17-37.
5. Waithaka Ng'ang'a, Z. ve E. Niyonshuti, *Animal Feeds Mycotoxins and Risk Management*, in *Mycotoxins and Food Safety-Recent Advances*. 2022, IntechOpen.
6. Ekici, H., E. Yildirim, ve E. Yarsan, *The effect of seasonal variations on the occurrence of certain mycotoxins in concentrate feeds for cattle collected from some provinces in Turkey*. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 2016. 40(3): s. 298-303.
7. Becker-Algeri, T.A., ve ark., *Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review*. Journal of food science, 2016. 81(3): s. R544-R552.
8. Aranega, J.P. ve C.A. Oliveira, *Occurrence of mycotoxins in pastures: A systematic review*. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2022. 14(3): s. 135-144.
9. *Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Gıdalardaki bulaşanların maksimum limitleri.* 2011; <https://resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8-1.pdf>.
10. Ansari, F., H. Pourjafar, ve L. Christensen, *A study on the aflatoxin M1 rate and seasonal variation in pasteurized cow milk from northwestern Iran*. Environmental monitoring and assessment, 2019. 191: s. 1-6.
11. Iqbal, S.Z., M.R. Asi, ve S. Jinap, *Variation of aflatoxin M1 contamination in milk and milk products collected during winter and summer seasons*. Food control, 2013. 34(2): s. 714-718.
12. Bennett, J., Klich. M. *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Reviews, 2003. 16(3): s. 497-516.

13. Sargeant, K., ve ark., *Toxicity associated with certain samples of groundnuts*. Nature, 1961. 192(4807): s. 1096-1097.
14. Saleeb, P.G., ve ark., *Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry*. Journal of clinical microbiology, 2011. 49(5): s. 1790-1794.
15. Buslyk, T., V. Rosalovsky, ve Y. Salyha, *PCR-Based Detection and Quantification of Mycotoxin-Producing Fungi*. Cytology and Genetics, 2022. 56(1): s. 16-30.
16. Merve, A. ve Ö.Ö. Ocak, *Gıdalarda aflatoksin düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemleri*. Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2019. 4(2): s. 168-181.
17. Pitt, J.I., *Mycotoxins*, in *Foodborne Infections and Intoxications*. 2013. s. 409-418.
18. Hussein, H.S. ve J.M. Brasel, *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology, 2001. 167(2): s. 101-134.
19. Richard, J.L., *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview*. International journal of food microbiology, 2007. 119(1-2): s. 3-10.
20. Büchi, G. ve I.D. Rae, *The structure and chemistry of the aflatoxins*, in *Aflatoxin*. 1969, Elsevier. s. 55-75.
21. Vaz, A., ve ark., *Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products*. Microorganisms, 2020. 8(2): s. 246.
22. Maqbool, U., Anwar-Ul-Haq, ve M. Ahmad, *ELISA determination of aflatoxin M1 in milk and dairy products in Pakistan*. Toxicological & Environ Chemistry, 2009. 91(2): s. 241-249.
23. Goncalves, B.L., ve ark., *Aflatoxin M 1: biological decontamination methods in milk and cheese*. Food Science and Technology, 2020.
24. Pose, G., ve ark., *Water activity and temperature effects on mycotoxin production by Alternaria alternata on a synthetic tomato medium*. International Journal of Food Microbiology, 2010. 142(3): s. 348-353.
25. Awuchi, C.G., ve ark., *Fungal Growth and Mycotoxins Production: Types, Toxicities, Control Strategies, and Detoxification*. 2021.
26. Yentür, G. ve B. Er, *Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi*. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2011. 69(1): s. 41-52.

27. Bhat, R., R.V. Rai, ve A.A. Karim, *Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns*. Comprehensive reviews in food science and food safety, 2010. 9(1): s. 57-81.
28. Betina, V., *Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects*. 1989: Elsevier.
29. Neme, K. ve A. Mohammed, *Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review*. Food Control, 2017. 78: s. 412-425.
30. Daou, R., ve ark., *Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies*. AIMS Agriculture and Food, 2021. 6(1): s. 416-447.
31. Mahbobinejhad, Z., ve ark., *Reduction of aflatoxin production by exposing Aspergillus flavus to CO2*. Journal of Crop Protection, 2019. 8(4): s. 441-448.
32. Nji, Q.N., ve ark., *Six Main Contributing Factors to High Levels of Mycotoxin Contamination in African Foods*. Toxins, 2022. 14(5): s. 318.
33. Matumba, L., ve ark., *Five keys to prevention and control of mycotoxins in grains: A proposal*. Global Food Security, 2021. 30: s. 100562.
34. Benkerroum, N., *Mycotoxins in dairy products: A review*. International dairy journal, 2016. 62: s. 63-75.
35. Yu, J., ve ark., *Fungal and mycotoxin occurrence, affecting factors, and prevention in herbal medicines: a review*. Toxin Reviews, 2021: s. 1-19.
36. Ji, X., ve ark., *Mycotoxins in cereal-based infant foods marketed in China: Occurrence and risk assessment*. Food Control, 2022. 138: s. 108998.
37. ÜRKEK, B. ve M. ŞENGÜL, *Organik gıdalarda problem: Mikotoksinler*. ATA-Gıda Dergisi, 2022. 1(1 (Ocak)).
38. Kesić, A., ve ark., *Comparative Analysis of Milk Samples from Bosnia and Herzegovina Contaminated with Aflatoxin M1*. European Journal of Food Science and Technology, 2021. 9(3): s. 1-15.
39. Kamkar, A., ve ark., *Aflatoxin M1 in raw cow and buffalo milk in Shush city of Iran*. Food Additives & Contaminants: Part B, 2014. 7(1): s. 21-24.
40. Özkaya, Ş. ve A. Temiz, *Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları*. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2003. 1(01): s. 1-21.

41. Awuchi, C.G., ve ark., *Mycotoxins' toxicological mechanisms involving humans, livestock and their associated health concerns: a review*. Toxins, 2022. 14(3): s. 167.
42. Topi, D., ve ark., *Two-year survey of aflatoxin M1 in milk marketed in Albania, and human exposure assessment*. Food Control, 2022. 136: s. 108831.
43. Almaghrabi, M.A., *The Occurrence of Aflatoxins in Date Palm (Phoenix dactylifera L.) Worldwide*. Journal of Food Quality, 2022. 2022.
44. Dey, D.K., ve ark., *Mycotoxins in food and feed: toxicity, preventive challenges, and advanced detection techniques for associated diseases*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022: s. 1-22.
45. Omar, S.S., *Incidence of aflatoxin M1 in human and animal milk in Jordan*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2012. 75(22-23): s. 1404-1409.
46. Montagna, M.T., ve ark., *Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in southern Italy*. International Journal of Molecular Sciences, 2008. 9(12): s. 2614-2621.
47. Malissiova, E., ve ark., *Exposure assessment on aflatoxin M1 from milk and dairy products-relation to public health*. Clinical Nutrition ESPEN, 2022. 47: s. 189-193.
48. Arciniega, A.M., ve ark., *Pathologies associated to the consumption of aflatoxin M1 in dairy products*. Mexican Journal of Medical Research ICSA, 2022. 10(20): s. 7-15.
49. El-Sayed, R.A., ve ark., *An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis*. Journal of Future Foods, 2022. 2(2): s. 91-102.
50. Navale, V., ve ark., *Aspergillus derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity*. Toxicology reports, 2021. 8: s. 1008-1030.
51. Kinkade, C.W., ve ark., *Impact of fusarium-derived mycoestrogens on female reproduction: A systematic review*. Toxins, 2021. 13(6): s. 373.
52. Selvaraj, J.N., ve ark., *Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: a review*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2015. 32(4): s. 440-452.

53. Santos Pereira, C., S. C. Cunha, ve J.O. Fernandes, *Prevalent mycotoxins in animal feed: Occurrence and analytical methods*. Toxins, 2019. 11(5): s. 290.
54. Thirumala-Devi, K., ve ark., *Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in Indian poultry feeds*. Journal of Food Protection, 2002. 65(8): s. 1338-1340.
55. Ahlberg, S.H., V. Joutsjoki, ve H.J. Korhonen, *Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation*. International journal of food microbiology, 2015. 207: s. 87-102.
56. Erkan, S., *Elazığ'da satışa sunulan şavak tulum peynirlerinin aflatoksin M 1 (AFM1) ve bazı kimyasal parametreler bakımından incelenmesi/Investigation of savak tulumu cheese sold in elazig for aflatoxin M1 (AFM1) and for some chemical parameteres*. 2017.
57. Gill, U.A., A.Z. Durrani, ve M. Usman, *An Assessment and Control of AFM 1 in Milk and Main Dairy Products in Lahore, Pakistan*, in *Bovine Science-Challenges and Advances*. 2022, IntechOpen.
58. Tadesse, S., T. Berhanu, ve A.Z. Woldegiorgis, *Aflatoxin M1 in milk and milk products marketed by local and industrial producers in Bishoftu town of Ethiopia*. Food control, 2020. 118: s. 107386.
59. Hassan, Z.U., ve ark., *Evidence of low levels of aflatoxin M1 in milk and dairy products marketed in Qatar*. Food control, 2018. 92: s. 25-29.
60. Kaur, S., ve ark., *Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin M1 through consumption of market milk and milk products in Ludhiana, Punjab*. Food Control, 2021. 126: s. 107991.
61. Karaoğlu, H., E.D. Yanik, Ve T. Nermin, *Ülkemizde ve dünyada süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M1 varlığı*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2022. 53(1): s. 81-87.
62. ÖZKAN, N.A. Ve N.E. ONMAZ, *Perakende Olarak Satışa Sunulan Kaymak ve Tereyağlarda Aflatoksin M1 Varlığı*. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2019. 16(3): s. 213-217.
63. Öztürk Yılmaz, S. Ve A. Altinci, *Incidence of aflatoxin M1 contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey*. Food science and technology, 2018. 39: s. 190-194.

64. Atasever, M., K. Ozturan, Ve S. Urcar, *Determination of aflatoxin M1 level in butter samples consumed in Erzurum, Turkey*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2010. 16(1).
65. Var, I. ve B. Kabak, *Detection of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Adana, Turkey*. International Journal of Dairy Technology, 2009. 62(1): s. 15-18.
66. Ismail, A., ve ark., *Seasonal prevalence level of aflatoxin M1 and its estimated daily intake in Pakistan*. Food Control, 2016. 60: s. 461-465.
67. Bilandžić, N., ve ark., *Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia*. Food control, 2014. 40: s. 260-264.
68. Li, S., ve ark., *Aflatoxin M1 contamination in raw milk from major milk-producing areas of China during four seasons of 2016*. Food Control, 2017. 82: s. 121-125.
69. Bilandžić, N., ve ark., *Monitoring of aflatoxin M1 in raw milk during four seasons in Croatia*. Food Control, 2015. 54: s. 331-337.
70. Fallah, A.A., *Aflatoxin M1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer*. Food control, 2010. 21(11): s. 1478-1481.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MARKETLERDEN TOPLANAN TEREYAĞLARINDAKİ AFLATOKSİN
M1 MİKTARININ MEVSİMSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% **17**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **17**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**
YAYINLAR

% **3**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 12
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	dergiler.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	vetdergi.kafkas.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1