

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÖRESEL PEYNİRLERDE AFLATOKSİN M1
DÜZEYLERİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Nergiz ÖZGÜÇ DEMİRTAŞ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ TIP ANABİLİM DALI
ADLİ BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Engin TURAN**

2006-ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller ve Tablolar Dizin	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikotoksinler	1
1.2. Aflatoksinler ve Kimyasal Yapıları	4
1.3. Peynirlerin Aflatoksinle Kontaminasyonu	10
1.4. Mikotoksinlerin toksik etkileri	12
1.5. Gıdalarda Aflatoksin Limit Değerleri	15
1.6. Uygulanan Yöntemler	17
1.7. Amaç	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Gereç	20
2.1.1. Örnekler	20
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
2.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	20
2.2. Yöntem	21
2.2.1. Ekstraksiyon	21
2.2.2. Standartların Hazırlanması	22
2.2.2.1. Çalışma Standardının Hazırlanması	22
2.2.2.2. Standart Katma Yöntemiyle Hazırlanan Örnekler	22
2.2.3. Kalibrasyon	23
2.2.4. HPLC Koşulları	24
2.2.5. Tekrarlanabilirlik	25
2.2.6. Verim (Geri Kazanılabilirlik)	26
3. BULGULAR	28
4. TARTIŞMA	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33

ÖZET	34
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	42

ÖNSÖZ

Bu çalışmada ülkemiz gıda sorunlarından biri olan Aflatoksin kirliliğine dikkat çekilmiştir. Çanakkale ve başta Ezine ilçesi olmak üzere çevresinde üretilen yöresel peynirler, belli oranlarda inek, koyun ve keçi sütünün karışımıyla üretilmektedir. Mahalli peynir çeşitlerimizden olan bu yörenin beyaz peyniri, ülkemizde yaygın olarak tüketilmekte ve yurtdışına ihraç edilmektedir.

Çalışmada bu yörede üretilen peynirlerde AFM1 düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışma sorunun çözümlenmesi için yapılacak ileri çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Bu tezin yazılmasında her konuda bana yol gösteren Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na, danışmanım Prof. Dr. Engin TURAN'a, çalışmanın yürütülmesinde sağladıkları katkılardan dolayı veteriner hekim Habibe BAĞCI 'ya, kimyager Ali BİLİCİ'ye, Tekniker Celal OCAKBAŞI'ya ve Çanakkale İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne, maddi ve manevi desteklerinden dolayı eşim Utku DEMİRTAŞ'a ve aileme teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AFB1 : Aflatoksin B1

AFB2 : Aflatoksin B2

AFG1 : Aflatoksin G1

AFG2 : Aflatoksin G2

AFM1 : Aflatoksin M1

AFM2 : Aflatoksin M2

AFM4 : Aflatoksin M4

IARC : International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü)

TLC : İnce Tabaka Kromatografisi

ppb : Parts per billion (1/Milyar)

HPLC : Yüksek Performans Likit Kromatografisi

ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1: Bazı mikotoksinler (Egmond 1983)	2
Şekil 2: Aflatoksinler (Holcomb ve ark.1992)	6
Şekil 3: AFM1	7
Şekil 4: AFM2	7
Şekil 5: Aflatoksin metebolizması	14
Şekil 6: 1 numaralı standart	24
Şekil 7: AFM1 2 numaralı standart	24
Şekil 8: 1 numaralı peynir numunesi	28
Şekil 9: 6 numaralı peynir numunesi	29
Tablo 1: Mikotoksin üreten türler ve toksinler	3
Tablo 2: Aflatoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (Bullerman, 1979)	8
Tablo 3: Türkiye deki limit değerler (Türk Gıda Kodeksi Tebliğ, 2002)	16
Tablo 4: Dünyada AFM1 in limit değerleri	16
Tablo 5: Standart hazırlama tablosu	23
Tablo 6: Tekrarlanabilirlik performansı	26
Tablo 7: Tavsiye edilen geri kazanabilirlik yüzde değerleri (Türk Gıda Kodeksi Tebliğno:2002/25)	26
Tablo 8: Elde edilen değerler (Ortalama: 0,10 ppb, std sapma: 0,09)	29

1.GİRİŞ

Küfler, tarımsal ürünlerin üretimi, işlenmesi, depolanması ve tüketimi sırasında ürünleri kontamine ederek bozulmalarına neden olurlar. Üzerlerinde üredikleri gıda maddelerinde kalite düşüklüğüne sebep olmanın yanı sıra ürettikleri bazı toksik metabolitleri de bulaştırarak tüketilmelerini sakıncalı hale getirmektedirler. Küflerin ürettiği bu toksik maddelere mikotoksin denilmektedir (Filtenborg, 1996, Lafont 1973).

1. 1. Mikotoksinler

Mikotoksin organizmada toksik veya diğer biyolojik etkiler gösteren bileşikler veya metabolitlerin açıklanmasında kullanılan genel bir terimdir. Grekçe mantar “mykes” ve zehir “toxikon” isimlerinin birleşmesiyle oluşmuş ve mantar zehir’i, mantar toksini olarak kabul görmüştür (Holcomb ve ark.1992, Eaten ve Groopman 1994).

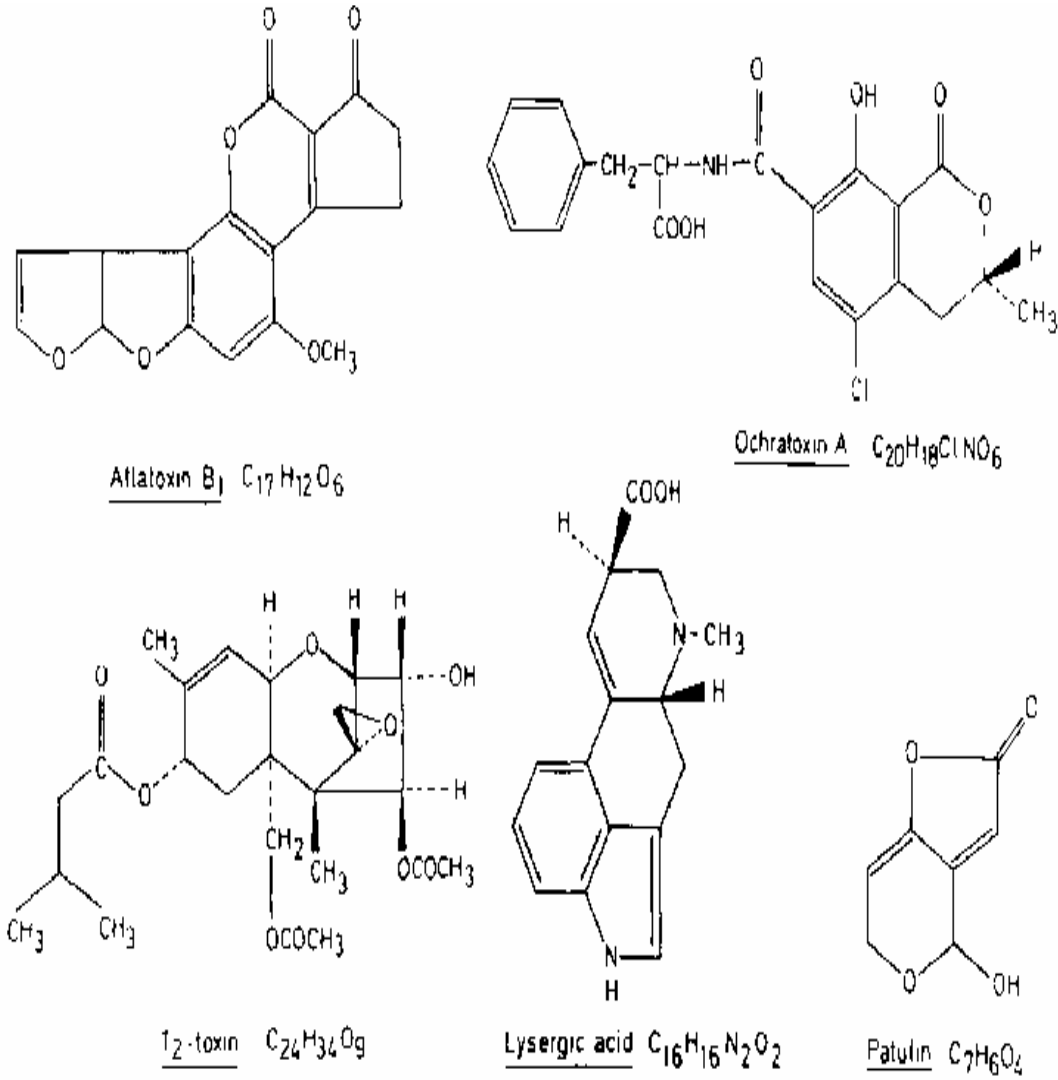
Bazı küf mantarları (fungus) tarımsal ürünlerin üretimi, işlenmesi, depolanması ve tüketimi sırasında ürünleri kontamine etmektedirler. Özellikle hububatın funguslarla hasattan önce tarlada veya hasat zamanı yağışlı mevsimlerde ve sıcaklığın uygun olduğu ortamlarda enfekte olduğu, taşıma ve depolama sırasında da bozulmanın arttığı bildirilmektedir (Mello and Mcdonald, 1997, Özmenteşe, 2002).

Bu küfler uygun ortam koşullarında gıdaların üzerinde gelişerek bozulmalarına ve hatta bazı toksik küf metabolitlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Northolt ve Bullerman 1982, Gürses ve ark. 2004).

Küf mantarları, doğada çok yaygın olarak bulunmakta olup, toprak ve hava başta olmak üzere her yerde bulunurlar. Milyarlarca sporu oluşturmaları ve bu sporların da etrafa kolayca uçuşması, gıda maddelerinin küflerle kontamine olmasında önemli bir etmendir. Küflenme tamamen mantar sporlarının hava ve su ile yayılması ile ilgilidir. Mantar sporları çoğalmaları için uygun olmayan şartlarda yıllarca canlı kalabilirken, elverişli bir ortamda ise hızlı bir şekilde üreyebilirler (Britton ve Whatt 1979, Brown ve ark. 1976).

Gıdaların hijyen şartlarına dikkat edilmeyen ortamlarda üretilmesi halinde küfler kolayca gıdalara bulaşır ve ürerler. Küflerin gıdalarda çoğalması, o gıdanın özelliklerinde değişiklikler oluştururken, salgıladığı toksinlerle de halk sağlığını tehdit etmektedir (Lafont 1973).

Mikotoksinler, insan ve hayvan sağlığına etkileriyle ve kullanılmaz hale getirdikleri tarım ürünleriyle dünya çapında her yıl milyonlarca dolar maddi kayba neden olmaktadır. Mikotoksinlerin üremelerinde çevreyle ilgili ve çevresel faktörlerin ardında en önemli neden insan faktörüdür (Hüsein ve Brasel 2001).



Şekil 1: Bazı mikotoksinler (Egmond 1983)

Mikotoksin ürettiği bilinen mantar sayısı yaklaşık 150 kadardır. Bunlardan iyi bilinen bazı türler Tablo 1’de gösterilmiştir (Krogh 1987, Mello ve Mcdonald, 1997, Concon 1998).

TÜR	TOKSİN
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksin
<i>A. paraticus</i>	Aflatoksin
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatoksin,okratoksin
<i>A. nidulans</i>	Sterigmatoksin
<i>A. ochraceus</i>	Okratoksin, penisillik asit
<i>A. fumigatus</i>	Gliotoksin
<i>A.clavatus</i>	Patulin, Cytochalasine E
<i>A .oryzea</i>	B- Nitropropionic acid
<i>Fusarium reseum</i>	Zearalenon
<i>Fusarium tricinctum</i>	Trikotisens
<i>Penicillium verricosum</i>	Okratoksin

Tablo 1: Mikotoksin üreten türler ve toksinleri (Mello ve Mcdonald, 1997)

Besinlerde küf oluşumu ve buna bağlı mikotoksin üretiminde nem ve sıcaklık çok önemli etkisi olan iki faktördür. Genellikle küf gelişimi, yüksek sıcaklık ve yüksek nem koşullarında gerçekleşmektedir. *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* ve *Helminthosporium* gibi tarla küfleri ve ileri derece çürümelerde gelişen küfler için %20–25 oranında yüksek nem gerekmektedir. *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi depo küfleri için %13–18 düzeyinde nem yeterli olabilmektedir (Bullerman ve ark., 1984).

Gıdanın içerisinde bulunduğu ortamın bağıl nemi o gıdanın su aktivitesinin dengesi ve yüzey mikroorganizmalarının gelişmesi açısından çok önemlidir. Su aktivitesi gıdada bulunan bağlanmamış su miktarıdır. Bir gıdanın su aktivitesi (a_w =bağıl nem/100), bulunduğu ortamın bağıl nemi ile dengelenmiş olmalıdır. Buna “Eşdeğer Bağıl Nem” denir. Bağıl nem yüksek olduğu takdirde gıda maddesi çevreden nem almaya başlar ve su aktivitesi denge oluncaya kadar artar. Böylece gıda üzerinde

mikroorganizma aktivitesi artar. Gıdada ki su aktivitesi (aw) küf için bir gelişme faktörüdür. Belirli bir aw değerinin altında mikotoksin üretilmez. Toksin üretimi için optimum aw değeri 0,99 iken çoğalma için gereken aw değeri 0,95'dir. Tarım ürünlerindeki su aktivitesini 0.65'altına düşürmek suretiyle kurutmak ve bu seviyeyi korumak küf gelişimini önler. Küf gelişimi ve toksin oluşumunu önlemek için depolamada yeterli havalandırma ve sirkülasyonun sağlanması ve ani ısı değişikliklerinden korunması gerekir (Northolt ve Bullerman 1982).

Aflatoksin sentezleyen *Aspergillus* türleri, ortam sıcaklığının 25°C civarında, aw değerinin 0.80 ve üzerinde olduğu bütün tarımsal ürünlerde ve gıdalarda üreyebilirler. *Aspergillus* türü küfler 10–45 °C sıcaklıklarda ve 1,6–11,1 gibi geniş bir pH aralığında üreyebilmektedirler.

Aspergillus flavus ve *A. paraticus* türleri, 33 °C, 0.99 aw değeri ve pH 5 olan ortamlarda optimum gelişme gösterir (Jay 1992, Barnett ve Hunter 1998).

Hayvansal ürünlerde aflatoksin üretme çalışmalarında maksimum toksin oluşumunun 25 °C'de ve ilk 20–25 gün içinde olduğu ve 25 günden sonra toksin miktarında azalma olduğunu gösterilmiştir. Hayvansal ürünler genelde 1–2 ay sürede tüketildiği için insan sağlığı açısından bu azalmanın fazla bir yararı olmayacağı görülmüştür (Consumption Food Mikrobiology, 1987).

Mikotoksin oluşumunda iklim önemli bir faktördür. Çünkü mikotoksin türlerinin nem sıcaklık istekleri farklılık göstermektedir. Aflatoksin üreten küfler dünyada yaygın olarak bulunmasına rağmen, sıcak bölgelerde toksin oluşumuna daha sık rastlanmaktadır. Penicillium küfleri ılıman, fusarium küfleri ise soğuk iklimlerde daha çok görülmektedir (Krogh 1987).

Mikotoksinler arasında en önemli grubu aflatoksinler oluşturur. Genellikle gıda ve yemlerdeki mikotoksin türü aflatoksindir.

1. 2.Aflatoksinler ve Kimyasal Yapıları

Küf mantarlarının uygun ortam koşullarında gıdaların üzerinde gelişerek oluşturduğu mikotoksinler, hayvan ve insanlar üzerinde çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına yol

açarlar. Bunlar içinde en önemli olanları bazı küf türlerinin sekonder metaboliti olan aflatoksinlerdir (Harvey ve ark. 1991, Steyn 1998).

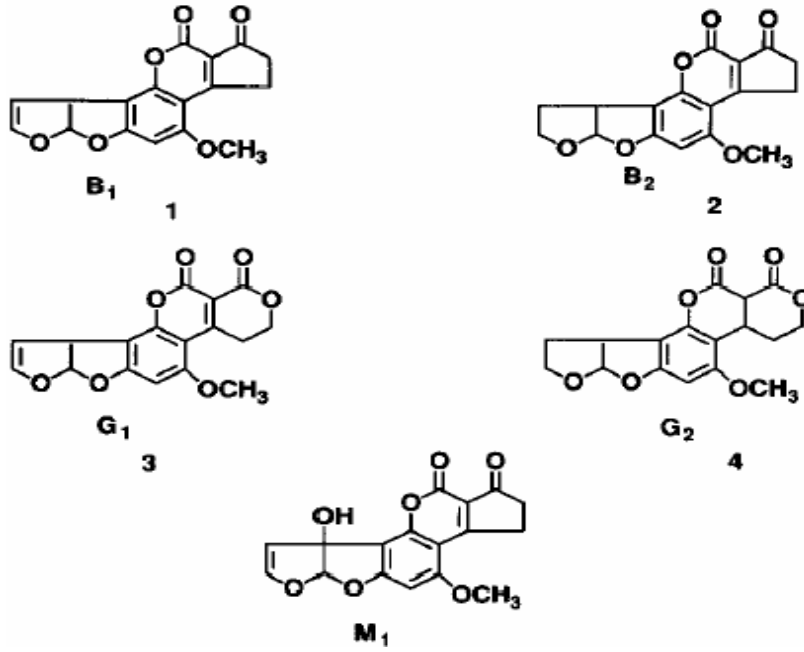
Aflatoksinler, genellikle *Aspergillus* cinsinin üç türü; *A. flavus*, *A. parasiticus* ve nadiren *A. nomius* ve bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri tarafından üretilmektedir. *A. flavus* sadece Aflatoksin B üretirken diğer iki tür B ve G aflatoksin üretebilmektedir (Peraica 1999). Aflatoksin sentezleyen *Aspergillus* türleri tüm dünyada yaygın olarak bulunur. Bu küfler, uygun sıcaklık ve nem koşullarında bazı yiyecek ve yem maddelerinde, bitki ve ürünlerinde ürer ve aflatoksin oluşmasına neden olurlar (Jay 1992, Creppy 2002, Kaniou-Grigoriadou ve Ark. 2005, Kaya 1982, 1996).

A. flavus, karbonhidratlarca zengin ürünler üzerinde ve geniş bir sıcaklık aralığında aflatoksin oluşturmaktadır. Mısır, arpa, buğday, fasulye, pirinç, yerfıstığı, pamuk, fındık, ceviz, baharatlar, zeytin, ayçiçeği gibi hububat ve yağlı tohumlar ile kurutulmuş meyveler (incir, kayısı, üzüm) aflatoksin oluşumu için uygun gıdalardır (Krogh 1987).

İngiltere’de 1960 yılında “Turkey X Disease” adı verilen zehirlenme olayında yüz bin civarında hindi ölümü meydana gelmiş ve araştırmalar sonucu küflenmiş yerfıstığı katılan yemlerin bu olaya sebep olduğu anlaşılmıştır. Yapılan araştırmada zehirlenmeye neden olan toksinin *Aspergillus flavus* ve *A. paraticus* tarafından sentezlendiği ortaya çıkmıştır. Aflatoksin terimi *Aspergillus flavus*’un “A” ve “fla” harflerine zehir anlamına gelen “toksin” eki getirilmesi ile oluşturulmuştur (Sarımehmetoğlu ve ark. 2004, Shreeve ve Patterson 1975, Hamilton 1982, Holcomb 1992).

Aflatoksinler, kimyasal yapı olarak bifuran halkası ve lakton bağı içeren kumarin türevi doymamış bileşiklerdir. Çekirdeğin bir yanında bifuran halkası ve diğer yanında da ya pentanon (aflatoksin B de) ya da lakton (aflatoksin G de) halkası bulunur .

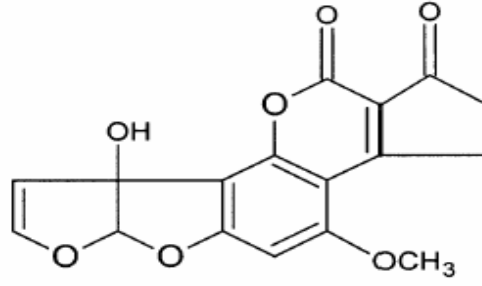
Birçok aflatoksin tipi tanımlanmış olup B1, B2, G1, G2 ve M1 en yaygın olanlarıdır.



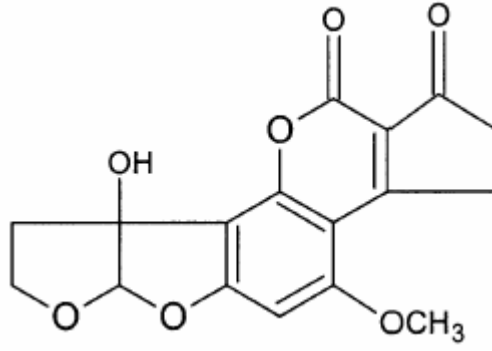
Şekil 2: Aflatoksinler (Holcomb ve ark.1992)

Aflatoksin M₁ (AFM₁) 328 Da molekül ağırlığında bir bileşiktir ve moleküler formülü C₁₇H₁₂O₇ dir. AFM₁ ve M₂, Aflatoksin B₁ (AFB₁) ve B₂ toksinlerinin hidroksilleşmesi sonucu oluşan metabolik ürünleridir. AFM₁ AFB₁'in 4 hidroksil türevidir (Kaniou-Grigoriadou ve ark. 2005, H. Ayçiçek ve ark. 2005, Sarımeahmetoğlu ve ark 2004).

M₁ ve M₂ aflatoksinleri B₁ ve B₂ aflatoksinlerinin hidroksillenmesi sonucu oluşan metabolit ürünleridir. AFM₁ ve AFM₂ küfle kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanların karaciğerinde oluşur ve süt salgısıyla birlikte salgılanır. AFM süttten izole edildiği için "milk toksin" süt toksini olarak isimlendirilmiştir. Vücutta süttten başka idrar, dışkı ve safra salgısında da bulunmaktadır (Bullerman 1979, Bailey 1984, Holcomb ve ark. 1992, Cathey ve ark.1994, Ryser 1998, Pittet 1998,).



Şekil 3: AFM1



Şekil4: AFM2

Aflatoksinler, ultraviyole ışık altında gösterdikleri floresans özelliklerine göre mavi (Blue) floresans verenler ve yeşil (Green) floresans verenler olarak ikiye ayrılırlar. Mavi floresans verenler aflatoksin B, yeşil floresans verenler ise aflatoksin G olarak isimlendirilmiştir. Toksinlere verilen rakamlar ise toksisite derecesini göstermekte, küçük rakam daha yüksek toksin özelliği ifade etmektedir.

Aflatoksinler, metanol, kloroform ve asetonda çözünürken su ve petrol eter de çözünmezler. Sodyum hipoklorit, amonyak ve potasyum permanganatta parçalanırlar. Işıktan etkilenirler.

Aflatoksinler, sıcaklığa karşı dayanıklıdırlar, tamamen parçalanmaları için 300°C nin üzerinde sıcaklığa ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle sütün pastörizasyonu, yoğurt veya peynir yapımı sırasındaki sıcaklık AFM1'i parçalamak için yeterli değildir (Bullerman 1979, Doyle ve ark.1982, Scott 1984, Barbieri ve ark. 1994).

Aflatoksin Türü	Molekül Formülü	Kaynama Noktası	Maksimum Floresans (nm)	Floresans renk (UV 365 nm)
B₁	C₁₇H₁₂O₆	268–269	425	Mavi
B₂	C₁₇H₁₄O₆	286–289	425	Mavi
G₁	C₁₇H₁₂O₇	244–246	450	Yeşil
G₂	C₁₇H₁₄O₇	237–240	450	Yeşil
M₁	C₁₇H₁₂O₇	299	425	Mavi
M₂	C₁₇H₁₄O₇	292	425	Mavi

Tablo 2: Aflatoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (Bullerman, 1979).

Aflatoksin bulaştırılmış yiyeceklerde pişirmenin etkisi araştırılmış ve Aflatoksinlerin %60 oranında bozulmamış olduğu saptanmıştır (Abbas ve ark 1988).

Toprak mahsulleri ve tahılların mikotoksinler ile kontamine olması, gıda güvenliği açısından büyük risk taşımaktadır. Mikotoksinlerle kontamine olmuş yiyecekler ve hayvan yemleri direkt ölümcül akut hastalıklara yol açabildiği gibi kanser riskini de arttırmaktadır (Dohlman 1997, Peraica ve ark.1999).

Aflatoksinler, insanlarda karaciğer kanserine yol açarlar. Aflatoksinler akut toksik, immun supresif, mutajen, teratojen ve karsinojen bileşiklerdir. Kanserojen ve toksik etkisini öncelikli olarak karaciğerde göstermektedir. (Kaninou-Grigoriadou ve ark 2004, Ayçiçek ve ark.2005).

Dünya sağlık örgütünün uluslararası kanser araştırma enstitüsüne (IARC) göre AFB1 en etkili karaciğer kanserojenleri arasında gösterilmektedir. AFM1 ise AFB1'in yaklaşık onda biri kadar etkili bir bileşiktir. Tüketilen gıdalarla sıkça alınması durumunda karaciğerde birikerek benzer etkiler oluşturmaktadır (Bakırcı, 2001, Lopez, 2001).

Küflerin, gıda maddelerinde meydana getirdiği tehlikeye bütün dünya gittikçe artan bir dikkatle eğilmektedir. Memleketimizde aflatoksinle ilgili çalışmalar, 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen fındıkların aflatoksin içermeleri nedeniyle iade edilmesinden sonra başlamıştır. Aynı problemle A.B.D.'ne ihraç edilen fıstıkların iade edilmesiyle, 1994 yılında Almanya'ya ihraç edilen kırmızıbiberlerin aflatoksin içermeleri nedeniyle karşılaşmıştır. Yine son günlerin aktüel konularından biri olmaya devam etmektedir (Özmenteşe, 2002).

Süt ve süt ürünlerinde sıkça görülen AFM1; besi hayvanının çürümüş, küflü ot, genellikle mısır ve pamuk tohumlu kontamine yemleri yemesi sonucu aldığı AFB1'in hayvanın karaciğerinde değişikliğe uğrayarak sütüne geçmesi ile oluşur. Aflatoksinler aynı zamanda kötü şartlarda depolanmış süt ve süt ürünlerinde, özellikle peynirlerde de oluşabilir (Brackett ve ark.1982, Gürses ve ark. 2004).

Birçok araştırma sütteki AFM1 miktarının yemlerdeki AFB1 miktarı ile orantılı olduğunu göstermiştir (Bakırcı, 2001).

Aflatoksinler peynir yapım aşamalarında kaybolmadığından, aflatoksinli sütlerden yapılan peynirlerde de aflatoksin görülebilir (Creppy, 2002).

1.3. Peynirlerin Aflatoksinle Kontaminasyonu

Temel bir gıda maddesi olan süt, insan beslenmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bununla birlikte, dayanıklı bir ürün olmadığı için doğrudan tüketimi yanında muhafaza süresi daha uzun olan değişik lezzet ve aromada olan birçok ürüne dönüştürülmek suretiyle de yaygın bir Şekilde tüketilmektedir. Bu rnler içerisinde yer alan peynir, çeşitlilik ve tüketim açısından ilk sırada yer almaktadır.

Dünyada, peynir yapımında farklı tür hayvan sütlerinden değişik üretim metotlarıyla çok sayıda peynir üretilmektedir. Bunlar içinde küflerle üretilen Rokfor ve kamembert en tanınmış olanlardır. Ülkemizde de çok çeşitli peynirler yapılmakta ve bunlar arasında en çok tercih edilen grubu beyaz peynir oluşturmaktadır. Beyaz peynir çoğunlukla inek, koyun ve keçi sütünden yapılmaktadır. Peynirdeki sütün kaynağı o yörede yaygın olan hayvancılık türüne göre değişmektedir. Bazı yörelerde bu sütlerin belli oranda karışımıyla da değişik çeşit peynirler üretilmektedir.

Süt ve süt ürünlerine mikotoksin bulaşması iki yolla olmaktadır; birincisi, süte uygulanan işlemler veya saklanma aşamasında direkt kf kontaminasyonu ile ikincisi ise indirekt olarak hayvanların kontamine olmuş yemleri tüketmesiyle olmaktadır (Egmond, 1983).

Genellikle katı, yarı katı veya yumuşak süt ürünlerinde özellikle peynirde küflenme sık olarak görülür. İçme sütü, sıvı süt ürünleri, kefir ve sıvı yoğurt çok kısa depolama süreleri nedeniyle ve daha önce ısıyla muamele edildiğinden (pastörizasyon, sterilizasyon ve UHT) kf üremesi için uygun değildirler. Fakat buna karşın yumuşak, toz halindeki ve katı süt ürünleri küflerin gelişmesi için gerekli protein, Őeker, katı yağ, mineral ve vitaminleri genellikle yüksek konsantrasyonlarda ihtiva eder. Süt tozlarında, tereyağı, çökelek ve peynirlerde yanlış depolama Őartları yüzünden küfler gelişir ve toksin üretebilirler. Kf üremesi zararlı etkisinin yanında lezzet oluşumunu da engellemektedir (Kaya 1996, Filtenborg 1996).

Peynirler kf üremesi için çok uygun ortam oluştururlar. Kontaminasyon genellikle hava veya diğer ekipmanlarla doğal olarak olabilmektedir. Sporları rzgrla yayılır ve inek ahırları, süt sağma makineleri ve diğer aletler üzerine kf sporları

yerleşebilir. Ham süt için hayvan yemi ve dışkısı sürekli kontaminasyon kaynağıdır. Büyük baş hayvanların dışkısından yapılan bir çalışmada çok sayıda küf izole etmiş ve bunların % 40'ı *Aspergillus* cinsine ait olduğu bildirilmiştir. Süt ürünlerinin üretim aşamasında üretim bantlarının, tankların ve paketlenme makinelerinin küf sporlarından arındırılmış olması gerekir. Süt ve süt ürünlerinde *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsleri yaygın olarak görünmektedir ve birçok türü mikotoksin üretebilmektedir (Frisvad, 1988, Lopez, 1996).

Kontamine olmuş bir süt peynir haline gelene kadar geçirdiği işlemler sırasında mekanik olarak küflerden arınmasına rağmen, bu işlemler küf sporlarına ve Aflatoksinlere çok fazla etkili olmamaktadır. Mikotoksin üreten *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsleri çedar, telem ve İsveç peynirlerinde izole edilmiştir. Uzun süre düşük sıcaklıkta depolanan bazı peynirlerde penisillik asit ve sterigmatoksin tespit edilmiştir (Aran ve Eke, 1987, Filtenborg, 1996).

Türkiye'de Marmara bölgesinde yapılan bir çalışmada Kaşar peynirlerinden izole edilen türler; *Aspergillus versicolor*, *Eurotium sp.*, *Geotrichum candidum*, *Mucor racemosus*, *Penicillium camembertii*, *P.canescens*, *P.chrysogenum*, *P.crustosum*, *P.echinulatum*, *P.expansum*, *P.griseofulvum*, *P.purpurogenum*, *P. Roquefortii*, *P. Simplicissimum*, *P. ver. var. cyclopium*, *P. ver. var. verrucosum*, *P.v iridicatum* 'dur. Peynirlerde tespit edilen en yaygın türler *penicillium* cinsine ait olup, rastlanan mantar türlerinin %90–94'ünü oluşturmaktadır (Aran ve Eke 1987).

Aflatoksin bileşikleri çeşitli gıda ve yemlerde farklı oranlarda bir arada bulunurlar. Keçi sütünde yapılan bir çalışmada, AFB1'in büyük metaboliti AFM1 ve daha az öneme sahip diğer metabolitleri ile birlikte bulundu. Süt ve süt ürünlerinde bulunabilen diğer mikotoksinler; AFB1, AFG1, AFM2, AFM4, sterigmatoksin, okratoksin, T2 ve fumarosinler çok az miktarlarda olsalar bile, hepsi birlikte AFM1 ile sinerji oluşturarak toksin, mutajen ve karsinogen etkileri arttırmaktadırlar (Lopez 2001, Kaninou-Grigoriadou ve ark 2005).

Yapılan çalışmalarda yemlerdeki AFB1 ile salgılanan sütteki AFM1 in doğru orantılı olduğu görülmüştür. AFB1'in AFM1'e dönüşme oranı %0,5- %5 arasında olduğu bazen bu değer %6'a çıktığı rapor edilmiştir. Burada genel kanı, hayvanların

yeminde bulunan AFB1'in yaklaşık olarak %1–3'ünün sütteki AFM1'e dönüştüğüdür. Fakat bu değişim hayvandan hayvana, günden güne ve ilk sağımdan diğerine farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda AFM1'in kışın en yüksek seviyede yazın ise en düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. Yazın hayvanlar konsantre yemden daha fazla, taze otlarla beslendikleri için sütlerindeki AFM1 düzeyi azalmaktadır (Pittet, 1998, Blanco ve ark. 1988, Kamkar, 2005, Sarımehtemoglu ve Ark.2004).

M1 in %84 yağı alınmış sütte, %16 kaymakta kalır. Tereyağı üretiminde M1'in bir kısmı kaymağa kalanı tereyağı ve süte dağılır. Tam yağlı sütteki toksinin %8–28 i tereyağına geçer (Kaninou-Grigoriadou ve ark 2005).

Sütteki Aflatoksin normal pastörizasyon işlemleri sırasında ve sonrasındaki depolama koşullarında büyük ölçüde stabildir. Sütteki AflaM1 içeriğini 62°C de 30 dk pastörizasyon işlemi yaklaşık %32 azaltmaktadır. Sütteki AFM1'in 0°C de 6 gün saklandığında %80'inin, 4 gün saklandığında %40'ının yok olduğu, bunun yanında 2 hafta 21°C de saklandığında da %34 arttığı gösterilmiştir (Creppy 2002).

1.4. Mikotoksinlerin toksik etkileri

Aflatoksinler akut toksik, bağışıklılığı baskılayıcı, mutajen, teratojen ve karsinojen etkili bileşiklerdir. Akut nekroz ve siroz'a neden olurlar. Toksik ve karsinojen etkilerini gösterdikleri başlıca hedef organ karaciğerdir. Hepatokarsinoma da hepatit B virüs enfeksiyonu gibi aflatoksinler de önemli bir risk oluşturmaktadır.

Aflatoksinlerle ilgili epidemiyolojik ve laboratuvar sonuçları 1987'de International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından değerlendirilmiştir. İnsanlarda doğal oluşan Aflatoksinlerin karsinojenite'si (AFM1 hariç) için yeterli veri olduğu kabul edilerek bu nedenle Grup 1 olarak sınıflandırılmıştır Aflatoksinlerin özellikle AFB1'in en potent kimyasal karsinojen olduğu kabul görmüştür (Peraica 1999, IARC 1993, Donma ve Donma 2005).

Aflatoksinler toksisiteleri bakımından; Yüksekten düşüğe doğru B1, M1, G1, B2, M2 ve G2 şeklinde sıralanmaktadır (Jay 1992).

Aflatoksinin insanda neden olduğu hastalıklar; Aflatoksikozis, Ensefalopati, karaciğerde yağ dejenerasyonu, karaciğer tümörü, bağışıklık sisteminin zayıflaması, Hindistan çocuk sirozu ve Rey's sendromu olarak sayılabilir (Pohland 1993).

Mikotoksinlerin neden olduğu akut ve kronik zehirlenmelerle meydana gelen hastalıklara mikotoksikozis denir (Lafont 1973, IARC 1993).

Bilinen ilk mikotoksikozis vakası, *Claviceps purpurea* dan meydana gelen ve bazı organlarda çeşitli nekrozlara ve kangrene sebep olan “ergotizm” zehirlenmesidir. *Claviceps purpurea* bulaşmış tahıl tanelerinin yenmesi sonucu bu hastalık ortaya çıkmış, orta çağ avrupalısında uzun yıllar “kutsal ateş” adıyla anılmıştır. (Whllie ve Morehouse 1978)

Mikotoksikozisin genel özellikleri aşağıda sıralanmıştır.

— Mikotoksikozis bulaşıcı değildir.

— Mikotoksikozis üzerine ilaç ve antibiyotik tedavisinin çok az etkisi vardır veya hiç etkisi yoktur.

— Mikotoksikozislerin yaygın görülmeleri genelde mevsime bağlıdır.

— Salgın şeklinde görülmeleri kontamine olmuş bir besin veya yemle ilişkilidir.

— Toksisitenin derece ve şiddetini sık olarak konakçının yaş, cins ve beslenme durumu etkilemektedir.

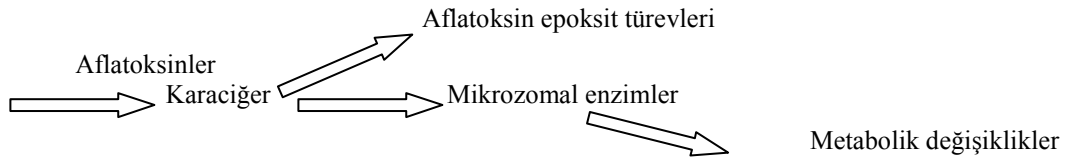
— Duyarlı besin veya yemin incelenmesi ile kütlerin bulunma durumu ve aktiviteleri açığa çıkarılabilir (Wilson 1984).

Mikotoksinler büyük bir çoğunlukla organizmaya sindirim sisteminden girerek etkili olurlar. Toksin içeren sporların inhalasyonla alınması sonucu organizmaya zarar vermesi çok nadirdir. Toksinler sindirim kanalına ulaşınca bağırsaktan emilerek kana geçer ve bu yolla bütün doku ve organlara yayılırlar (Shreeve 1975). Genellikle karaciğer ve kaslarda dağılım gösterirler (Jimenez 1991). Aflatoksinler karaciğerde yıkıma uğrar ve metabolik ürünler bütün hücrelere yayılır. Çok az bir kısmı idrar, dışkı ve sütle atılır.

Yapılan araştırmalarda, 300 den fazla mikotoksin türü izole edilmiş ve kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Bu mikotoksinlerin 100 den fazlasının toksijenik olduğu tespit edilmiştir. Birçok mikotoksin, insan veya hayvanlarda herhangi bir sağlık

problemiyle ilişkilendirilmemiştir. Karsinojenik etkisi olan mikotoksinlerin çoğu bu etkisini DNA hasarına yol açarak gösterirler. Büyük aflatoksinler, DNA üzerinde kritik onkogenler ve tümör supresör genlerdeki bazlarda değişiklikler oluşturarak kanser oluşumuna neden olurlar. Aflatoksinler için hedef organ karaciğer olmasına rağmen, akciğer, böbrek ve bağırsaklarda da tümör oluşturduğu bulunmuştur (Wang ve Groopman 1999, Hüsesein ve Brasel 2001).

Aflatoksinlerin kendileri vücutta doğrudan etkili değildir, karaciğerde sitozolik ve mikrozomal enzimler aracılığıyla uğradıkları metabolik değişiklikler sonucu oluşturdukları epoksit türevleri (AFB1 2–3 epoksit vb) ile etkili olurlar.



Şekil 5: Aflatoksin metabolizması

Klinik olarak toksik ve karsinojenik etkileri tamamen oluşan bu türevler ile ilgilidir. Aflatoksin epoksit türevleri, karaciğer hücrelerinde değişik reaksiyonlara girer, stoplazmada endoplazmik steroidal bağlanma noktalarına bağlanarak, ribozomlarda bozukluğa yol açarlar. DNA ve RNA polimerazlar inhibe olurlar ve özellikle RNA sentezindeki değişikliklerden etkilenen protein sentezi önemli derecede bozulur (Karapınar 1984, Kiesling 1986).

AFB1 in mutajenik etkisi; Kromozomal anomaliler, Mikronüklei, Kardeş kromatit karşılıklı yer değiştirmesi, Programsız DNA sentezi, Kromozom ipliklerinin kırılması gibi birkaç modelle açıklanmaktadır. DNA'ya bağlanan AFB1, DNA polimeraz enziminin DNA çift sarmalına bağlanmasını engelleyerek mRNA sentezini yavaşlatır. Sonuç olarak protein sentezi engellenir ve mitoz safhasına geçemeyen hücre ölmeye başlar (Lafont 1973–1979, Wang ve Groopman 1999).

Birleşik arap emirliklerinde yapılan bir çalışmada kordon kanından aflatoksin ölçümü yapılan örneklerin %50 sinden fazlasında aflatoksin belirlenmiştir. Bu çalışmada aflatoksin miktarıyla doğum ağırlığı arasında negatif bir uyum olduğu görülmüştür.

Aflatoksin varlığı doğum ağırlığının azalması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle iyi bir sağlık politikasıyla aflatoksinlerin gıdalara bulaşması engellenmeli ve özellikle hamileler ve çocuklar korunmalıdır (Donma ve Donma 2005).

Aflatoksinlerin toksisitesini anlamamız için vücuttaki metabolizmalarının ve hayvan türünün savunma mekanizmasının iyi bilinmesi gerekir. Bu mekanizmaların farklılığı aflatoksinlerin izlenmesinde geviş getiren hayvanlarla getirmeyen hayvanlar arasında farklılık gözlenmektedir. Geviş getirenler mikotoksinlerin etkilerine karşı genellikle daha dayanıklıdırlar. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda bakterilerin mikotoksinleri ayrıştırabilme özelliği olduğu gösterilmiştir. Mikotoksinlerin detoksifikasyonu için bu metabolik yol araştırılmaktadır (Hüsein ve Brasel 2001).

1.3.Gıdalarda Aflatoksin Limit Değerleri

Süt ve süt ürünleri, insanlar için, özellikle çocuklar için önemli bir besin kaynağıdır. Bu besin kaynağının AFM1 ile kontamine olması insan sağlığı için büyük risktir. Bu riski azaltmak için birçok ülkede yemlerdeki AFB1 ve dolayısıyla AFM1 miktarı belli limitler içinde kontrol altına alınmıştır (Sarımehmetoglu ve ark. 2004).

Gıdalarda belirli miktarlara kadar Aflatoksin'e izin verilmektedir. Fakat Aflatoksinin düşük olması tehlikeyi azaltan bir faktör değildir. Tüketilen gıdalarla sıkça alınması durumunda karaciğerde birikerek benzer etkiler oluşturmaktadır.

Alınan toksin miktarının vücut ağırlığına oranının artması, karsinojen etkiyi arttırmaktadır. Özellikle süt ve süt ürünleriyle beslenen küçük çocuklar daha fazla risk altındadır (Creppy 2002, European Commission Regulation 466/2001).

Avrupa Birliği ve Türk Hükümeti, izin verilen total Aflatoksin ve AFB1 limitlerini; yerfıstığı, fıstık ,fındık, kuru meyve ve benzeri ürünler için yaptığı düzenlemede; bu ürünlerden tüketime hazır olanlar için total Aflatoksin ;4µg/kg , AFB1 ;2µg/kg dır. Tüketim öncesi bazı işlemler görenler için, total Aflatoksin; 10 µg/kg , AFB1 ; 5 µg/kg dır. (European Commission Regulation, 2001, Turk Gıda Kodeksi Teblig, 2002).

Türkiye’de süt ve süt ürünleri için düzenlenmiş olan AFM1 limit değerleri Tablo 3’de gösterilmektedir.

Aflatoksin M1 Türk Gıda Kodeksi Limitleri	
Süt	0,05 µg/kg (ppb)
Süt tozu	0,5 µg/kg (ppb)
Peynir	0,25 µg/kg (ppb)
Bebek mamaları ve devam formülleri (süt bazlı)	0,05 µg/kg (ppb)

Tablo 3: Türkiye deki limit değerler (Türk Gıda Kodeksi Tebliğ, 2002).

Birçok gelişmiş ülkede AFM1 için izin verilen maksimum limitler düzenlenmiştir. Bu limitler ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Ülkelerin bu limitleri belirlemede gelişmişliğin derecesi ve ülkenin ekonomik gereksinimleri etkili olmaktadır. Çizelge 4 de süt ve süt ürünlerinde AFM1 ‘in dünya çapındaki limit değerleri gösterilmektedir (Kaninou-Grigoriadou, 2005).

Ülke	Çiğ süt (µg/kg) ppb	Süt ürünleri (µg/kg)
Avrupa birliği	0.05	0.05
Avusturya	0.05, 0.01 (pastörize bebek sütü)	0.02 (yağ), 0.25 (peynir), 0.4 (süt tozu)
Fransa	0.05, 0.03 (çocuklar için<3yaş)	-
İsviçre	0.05	0.025 (peynir suyu ve süt ürünleri), 0.25 (peynir), 0.02 (yağ)
Bulgaristan	0.50	0.10 (süt tozu)
Romanya	0	0
Çekcumhuriyeti	0.50	-
ABD		0.50
Brezilya		0.50 (süt), 5.0 (süt tozu)
Arjantin	0.05	0.50 (süt ürünleri)
Hollanda	0.05	0.25 (peynir)
Nijerya	1	-
Mısır	0	0
Türkiye	0.05	0.25 (peynir)

Tablo 4: Dünyada AFM1 in limit değerleri (Kaninou-Grigoriadou, 2005)

1.4. Uygulanan Yöntemler

Aflatoksinlerin varlığı çok küçük miktarlarda araştırıldığı için seçici, duyarlı ve etkili bir yöntem kullanılmak zorundadır. Rutin analizlerde genellikle İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Yüksek Performans Likit Kromatografisi (HPLC),

Fluorimetrik Yöntemler veya Enzim-Linked İmmunosorbent (ELISA) Tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniklerin uygulanması kapsamlı bir hazırlama aşaması ve eğitimli personeli gerektirmektedir. Bunun yanında kullanılan malzemeler ve cihazlar oldukça pahalıdır (Badea ve ark. 2004).

Bu üç yöntem karşılaştırıldığında, ELISA tekniği; ancak 0.25ppb üzerinde AFM1'i tespit edebilmekte, TLC ve HPLC tekniği; piko gram seviyesi kadar düşük miktarları da tespit edebilmektedir (Diaz ve ark. 1993).

Süt ve süt ürünlerinde AFM1 in geleneksel immunoaffinity kolon clean- up ile ekstraksiyon ve HPLC ile okutulması iyi performans göstermektedir. Affinity kolon metodu Avrupa Birliği limit değerlerine göre kabul görmüş hassasiyeti yüksek bir metottur (Dragacci,1995, Gilbert ve Anklam 2002).

İmmunuaaffinity kolonları ile çalışmanın avantajları, Kromatogramda analiz edilecek maddenin dışında herhangi girişim yapan bir pikin görülmemesidir. Bu durum nitel ve nicel analizlerde kolaylık sağlamaktadır. İmmunoaffinity kolon ile çalışmada AFM1 türevlendirilmeden HPLC cihazına verilmektedir.

1.5. Amaç

İnsan diyetine geçen süt, yetişkinlere oranla bebekler ve çocuklar için temel gıda olması nedeniyle sütlerin aflatoksin ile kontaminasyonu büyük risk oluşturmaktadır. Gerek anne sütü, gerekse ticari olarak satılan süt ve süt ürünlerinde AFM1 in bulunması insan sağlığı için önem oluşturmaktadır. Özellikle hemen her gün belli miktarda tükettiğimiz

peynirlerde AFM1'in varlığının araştırmasının, halk sağlığı açısından gerekli önlemlerin alınmasına ve ileri araştırmaların yapılmasına katkıda bulunacağına inanmaktayız.

5237 sayılı TCK'nun üçüncü bölümü kamu sağlığına karşı suçlarla ilişkilidir. İçecek sulara, yenilecek, kullanılacak tüketilecek besinlere TCK.'nu 185'e göre cezalandırılır. Bozulmuş ve değiştirilmiş gıda veya ilaçların ticaretini yapanlar ise TCK.'nu 186'a göre cezalandırılır(BİLGE, 2005).

Günümüzde; gıda endüstrisinde kalite güvenliğinin sağlanmasında ISO (dünya standartlar örgütü) ve HACCP (tehlike analizleri ve kritik kontrol noktaları) sistemlerinden yararlanılmaktadır. HACCP sistemi ile bir gıda zincirinde hammaddeden başlayarak tüketim aşamasına kadar her bir aşama veya noktada tehlike analizleri yapılarak kritik kontrol noktaları belirlenir ve problemin henüz daha olmadan önlenmesi sağlanır. HACCP şu anda tüm dünyada her boyuttaki gıda işinde uygulanılabilen gıda güvenlik yönetimi için uluslar arası kabul görmüş bir sistemdir. Avrupa ve diğer birçok gelişmiş ülkede gıdalar bu sistemlerle etkili bir şekilde kontrol edilmektedir. Türkiye'de TS (Türk standartları) ve Türk gıda kodeksleri kontrol sistemini oluşturmaktadır. 30 mart 2005 tarihinde resmi gazetede yayınlanan; Gıda ve gıda ile temasta olan madde ve malzemelerin piyasa gözetimi, kontrolü ve denetimi ile işyeri sorumluluklarına dair yönetmeliğinde bildirildiği gibi;

Geçici madde 1 - Et, süt ve su ürünleri, hazır yemek fabrikaları, düşük asitli konserve gıdaları üreten işyerleri;

a) 60 Beygir Gücü ve üzerinde motor gücü bulunan veya en az on işçi çalıştıran işyerleri bu yönetmeliğin yayımı tarihinden itibaren en geç bir yıl içerisinde,

b) 60 Beygir Gücü altında motor gücü bulunan işyerleri veya en çok dokuz işçi çalıştıran işyerleri bu yönetmeliğin yayımı tarihinden itibaren en geç iki yıl içerisinde, iyi hijyen uygulamalarının takip edilmesiyle birlikte, HACCP ilkelerine dayanan prosedürleri uygulamak ve sürdürmekle yükümlüdür (Türk gıda kodeksi, 2005).

Yeni çıkan bu kanun ile işyeri sahiplerine verilen süre henüz dolmadığından cezai yaptırım uygulanamamaktadır. HACCP uygulamaları henüz düzene girmediğinden sistem yetersiz kalmaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada Çanakkale ve çevresini kapsayan bölgede, özellikle mandıraların yoğun olarak bulunduğu Ezine ilçesinde üretilen peynirlerden AFM1 analizi hedeflenmiştir. Bu bölgeden temin edilen 25 Adet peynir numunesinde AFM1 miktarlarının yasal değerler içinde olup olmadığının saptanması amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

Toplam 25 adet yöresel beyaz peynirde immunoaffinity kolon ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ile AFM1 analizi yapılmıştır.

2.1.1. Örnekler

Bu çalışmada kullanılan peynir örnekleri 25 farklı mandıradan 1'er adet olmak üzere alınmıştır. Mandıraların satış noktalarından temin edilen numuneler, analiz edilene kadar 2-8 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

— Asetonitril	MERCK
— Metanol	MERCK
— Kloroform	MERCK
— n-Hegzan	MERCK
— NaCl	MERCK
— Celite 545	MERCK
— Aflatoksin M1 standart çözeltisi	R-Biofarm
— İmmunoaffinity kolon	R-Biofarm
— Whatman No:113 filtre kâğıdı	Whatman

2.1.3 Kullanılan Araç ve Gereçler

— Yüksek basınçlı sıvı kromatograf	HP AGILENT 1100	-
— Elektrikli hassas terazi	SCHIMADZU LIBROR	

— Vorteks karıştırıcı	NÜVE, NM 110
— Otomatik pipet ve uçları	GILSON ve RAININ
— Rotary evaporatör	HYCROM
— Yüksek hızlı çırpıcı	WARING
— Ultrasonic banyo	TRANSONİC 460/H
— Ultrapur saf su cihazı	MILLIPORE
— Plastik enjektör	
— Cam malzemeler	

2.2.Yöntem

Ekstraksiyon, standartların hazırlanması, kalibrasyon, HPLC koşulları, tekrarlanabilirlik, verim.

2.2.1 Ekstraksiyon

Bu çalışmada; peynirden Aflatoksin ekstaksiyonu için, Sharman, Patey ve Gilbert (1989) yöntemi kullanılmıştır.

- Numuneyi temsilen 20gr peynir örneği alındı,
- 75ml kloroform, 1ml doymuş NaCl çözeltisi ve 5gr celite 545 (diyatome toprağı) ilave edildi.
- Parçalayıcıda yüksek hızda 2–3 dk. homojenize edildikten sonra whatman no: 113 filtre kâğıdından süzöldü.
- 50 ml kloroformla filtre kâğıdı yıkandı ve süzöntünün tamamı evaporatörde 30 °C‘de kuruluğa kadar uçuruldu.
- Uçurulan numune 1ml metanolde çözüldü, üzerine 30 ml saf su ve 50 ml hekzan ilave edildi.
- Karışım yavaşça döndürölerek ayırma hunisine aktarıldı ve çalkalandı.
- Fazlar birbirinden ayrılınca, alt faz mezürde biriktirildi.
- İkinci yıkama olarak ayırma hunisinden iki kez 10 ml saf su ilave edilerek 10-20 sn çalkalandı ve alt faz aynı mezüre alındı (yaklaşık 50ml kadar).

— İmmunoaffinity kolon (Rhone 1999), oda sıcaklığına gelince mezürdeki alt faz kolondan geçirildi (3ml/sn). Alt fazın (yaklaşık 50 ml) 25 ml'si kolondan geçirildi bu sebeple dilisyon faktörü 2 dir.

— Kolondan 20 ml saf su geçirilerek kolon yıkandı (5 ml/sn).

— 1 ml asetonitril kolondan geçirilerek ekstrakt vialine alındı.

— 1 ml saf su kolondan geçirilerek aynı vialine alındı.

— 100µl HPLC'ye enjekte edildi.

—Çıkan sonuç dilisyon faktörü ile çarpılarak değerlendirildi.

2.2.2. Standartların Hazırlanması:

Çalışma standardının hazırlanması ve standart katma yöntemi ile yapılan örnekler.

2.2.2.1. Çalışma Standardının Hazırlanması

6.1ml asetonitril de çözülerek hazırlanmış, 3.05µg AFM1 den oluşan, stok standardının konsantrasyonu; 500ng/ml idi.

Çalışma standardını hazırlamak için; stok standart solüsyonundan 80 µl alınarak 1 ml ye mobil faz ile tamamlandı. (mobil faz; 50:30:20, su: asetonitril:metanol). Çalışma standardının konsantrasyonu 40 ng/ml oldu.

2.2.2.2. Standart Katma Yöntemi İle Hazırlanan Örnekler

Hazırlanan 40ng/ml çalışma standardı, ve stok standart çözeltisinden 200µl alınarak hazırlanan 100ng AFM1 içeren standartlar katma yönteminin uygulanması için kullanıldı. Aflatoksin içermeyen peynir numunelerine standart ilavesi yapıldıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.

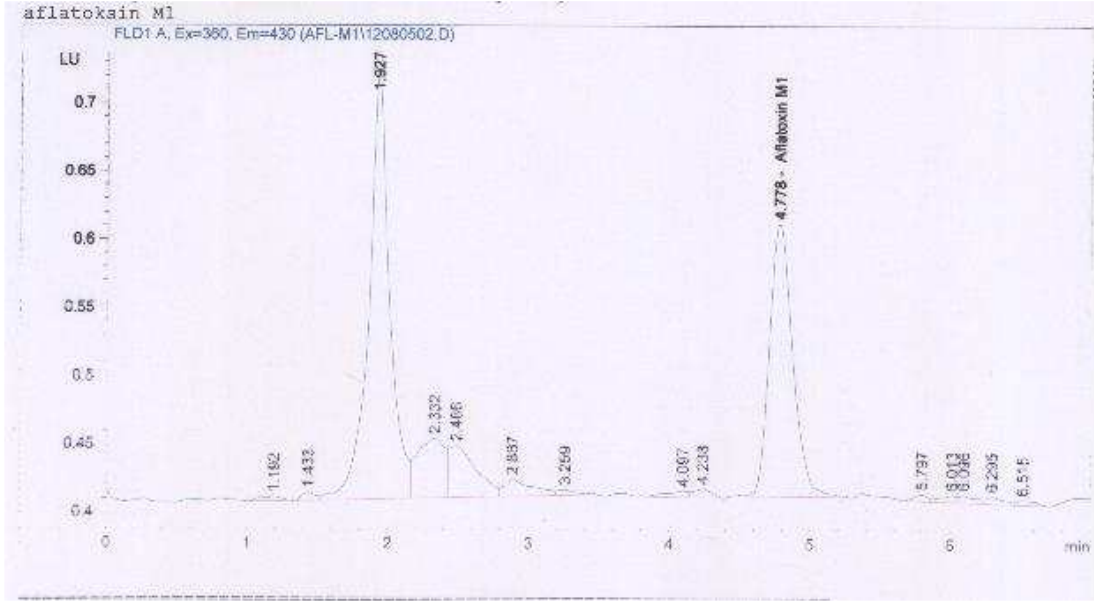
2.2.3. Kalibrasyon:

Hazırlanan çalışma standardından, Türk gıda kodeksi limitleri göz önünde bulundurularak 0,03 – 0,3 ng/ml aralığında standart solüsyonları hazırlandı.

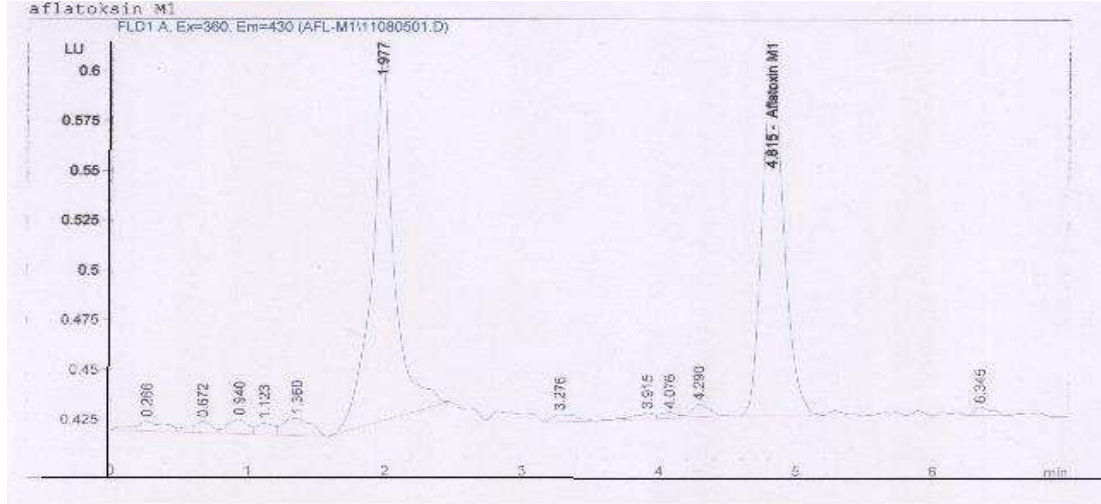
Hazırlanan standartların her biri 5'er kez 100 µl olarak HPLC cihazına enjekte edildi. Okunan değerler ile 6 noktalı kalibrasyon eğrisi çizildi. Belirlenen aralıkta doğrusallık sağlandı. Korelasyon katsayısı 0,99972 bulundu. (Tespit limiti 0,01 ng/ml)

Standart hazırlama tablosu					
Standart Solüsyon No	Çalışma Standardından Alınacak Miktar	Eklenecek Mobil Faz Miktarı	Standartın son hacmi	Standartın konsantrasyonu	100µl 'de HPLC konsantrasyonu
1.standart	75 µl	925 µl	1 ml	3 ng/ml	0,3 ppb
2.standart	62,5 µl	937,5 µl	1ml	2,5 ng/ml	0,25 ppb
3.standart	50 µl	950 µl	1ml	2 ng/ml	0,2 ppb
4.standart	25 µl	925 µl	1ml	1 ng/ml	0,1 ppb
5.standart	12,5 µl	987,5 µl	1ml	0,5 ng/ml	0,05 ppb
6.standart	15 µl	1985 µl	2ml	0,3 ng/ml	0,03 ppb

Tablo 5: Standart hazırlama tablosu



Şekil 6: 1 numaralı standart



Şekil 7: AFM1 2 numaralı standart

2.2.4. HPLC Koşulları:

HPLC analizinde kullanılan tüm çözeltiler HPLC saflığında temin edilmiştir. Faz ve kolon temizliği için metanol ve asetonitril filtre edildikten sonra ultrasonik banyoda havası alınmıştır. Bu şekilde sabit bir basınç ve tekrar elde edilebilir sonuçlar almak mümkün olmaktadır. Tüm aşamalarda kullanılan su, ultra pür saf su kalitesindedir.

Mobil faz hazırlanışı; 30ml asetonitril, 20ml metanol ve 50ml ultra pür saf su süzildükten sonra ultrasonik banyoda havası alınır.

Analize başlamadan önce cihaz mobil fazda iken 1 saat şartlandırıldı. Her analiz yapıldığında standart verilerek Aflatoksin çıkış zamanları kontrol edildi.

Taşıyıcı faz	: Su:asetonitril:metanol (50:30:20)
Pompa akış hızı	: 1 ml/dak.
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dedektör	: UV dedektör
UV dalga boyu	: Excitation; 360 nm , Emission; 430 nm
HPLC kolon	: HICHROM Waters Spherisorb S50DS2

2.2.5. Tekrarlanabilirlik:

Aynı numune, aynı uygulayıcı, aynı cihaz, aynı laboratuvar ve kısa zaman aralığı gibi tekrarlanabilir koşullar altında, elde edilen iki ayrı test sonucu arasındaki mutlak farkın altındaki değer, yaklaşık değeri % 95 olan spesifik olasılıklar içinde yer alması beklenebilir.

RSDr: Tekrarlanabilir koşullar altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma.

Bu amaçla; aflatoksinin bir düşük bir orta ve bir yüksek konsantrasyondaki 0,3ng/ml, 1ng/ml, ve 3ng/ml olarak hazırlanan standart çözeltileri, her bir konsantrasyon 5 defa analiz edilmek suretiyle, tekrarlanabilirlikleri % değişim katsayısı (%CV), standart sapmaları (SD) ve RSD (rölatif standart sapmaları) hesaplanarak değerlendirilmiştir.

1.standart	0,269698	4.standart	0,100104	6.standart	0,034564
1.standart	0,297079	4.standart	0,106979	6.standart	0,023734
1.standart	0,276319	4.standart	0,099094	6.standart	0,033113
1.standart	0,278007	4.standart	0,099795	6.standart	0,036959
1.standart	0,275329	4.standart	0,091062	6.standart	0,033496
TOPLAM	1,396432	TOPLAM	0,497033	TOPLAM	0,161865
ORT.	0,279286	ORT.	0,099407	ORT.	0,032373
SDsapma	0,010424	SDsapma	0,005651	SDsapma	0,005057
RSDr(%)	3,732276	RSDr(%)	5,68433	RSDr(%)	15,61999

Tablo 6: Tekrarlanabilirlik performansı

2.2.6. Verim (Geri kazanılabilirlik):

Standart katma yönteminin (spiked samples) uygulanması için aflatoksin belirlenmemiş peynir örnekleri seçildi. Bu amaçla, peynirlere aflatoksin ilavesinden sonra kalitatif ve kantitatif çalışmalar standardize edildi. Peynir içerisine ml konsantrasyonunda aflatoksin katılarak analiz edilip geri kazanılabilirlik (%) ortalamaları ve aralıkları hesaplandı.

Kriter	Konsantrasyon aralığı	Tavsiye edilen değer	Maksimum izin verilen değer
Geri alma	0.01 – 0.05 µg/kg	%60 - %120	0,25 µg/kg
Aflatoksin M1	> 0.05 µg/kg	%70 - %110	

Tablo 7: Tavsiye edilen değerler geri kazanılabilirlik yüzde değerleri (Türk gıda kodeksi tebliğ no:2002/25)

Standart katma yöntemiyle hazırlanan örnekler analiz metoduna göre ekstraksiyon işlemleri yapıldıktan sonra HPLC cihazına okutuldu. Sonuçlar aynı konsantrasyondaki standart solüsyonunun kalibrasyon kurvesiyle karşılaştırılarak linearite hesaplandı.

$$R = (S \times 100) / Se$$

S: Standart ilave edilen numuneden elde edilen pikin alanı

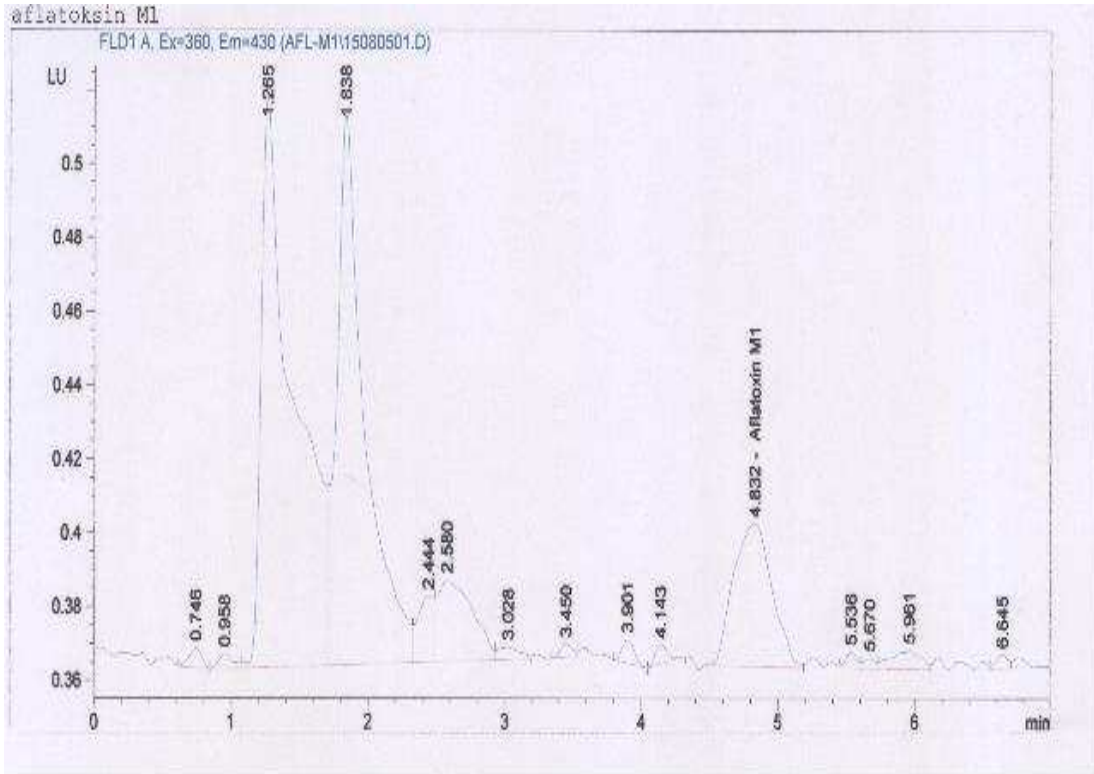
Se: Standart solüsyonundan elde edilen pikin alanı

Geri kazanım; 0,2ng da %75, 1ng da %97 olarak hesaplandı. Bulunan geri kazanılabilirlik yüzdeleri uygun değerlerde olduğu için çalışmalara devam edildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada; Çanakkale ve çevresinde üretilen toplam 25 adet beyaz peynir numunesinde AFM1 seviyeleri HPLC kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda 10 adet (%40) beyaz peynir numunesinde AFM1 tespit edilemedi. 2 adet (%8) beyaz peynir numunesinde Türk Gıda Kodeksi limit değeri (0,25 µg/kg) üzerinde AFM1 tespit edilmiş olup, 13 adet (%52) numunede limit değerler altında AFM1 varlığı tespit edilmiştir.

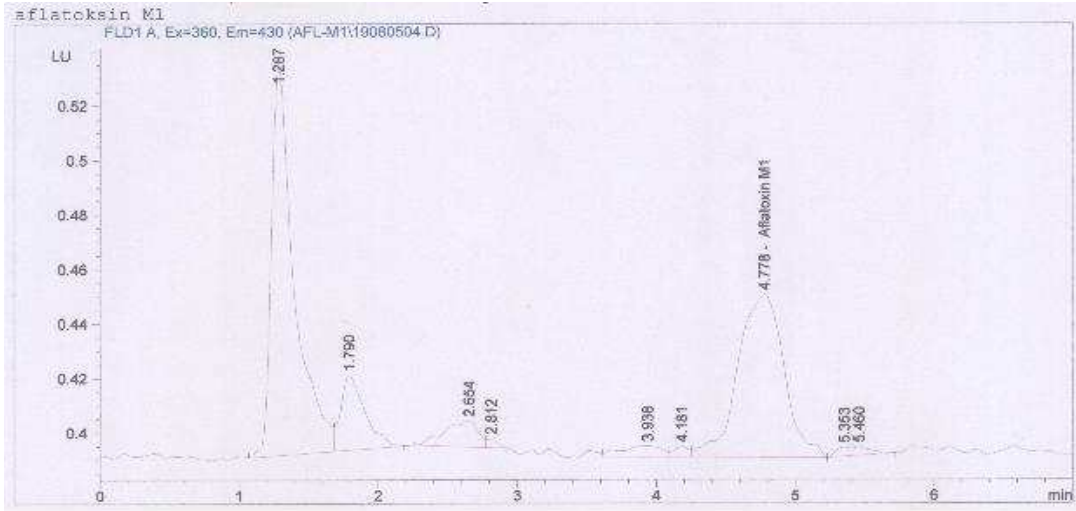
Pozitif sonuç veren peynirlerde 0,01- 0,032 µg/kg (ortalama 0,10 ±0,09µg/kg) arasında değişen miktarlarda AFM1 tespit edilmiştir. Peynir örneklerinde sadece iki örnekte limit değerlerin üstünde AFM1 bulunmuştur. Bu değerler; 0,32 µg/kg ve 0,26µg/kg olarak bulunmuştur.



Şekil 8: 1 numaralı peynir numunesi

Örnek numarası	AFM1 miktarı (µg/kg, ppb)	Örnek sayısı	Yüzde oranları
4. peynir	T.edilemedi	10	%40
8. peynir	T.edilemedi		
9. peynir	T.edilemedi		
11. peynir	T.edilemedi		
12. peynir	T.edilemedi		
16. peynir	T.edilemedi		
19. peynir	T.edilemedi		
20. peynir	T.edilemedi		
24. peynir	T.edilemedi		
25. peynir	T.edilemedi		
17. peynir	0,01	8	%32
5. peynir	0,02		
6. peynir	0,02		
14. peynir	0,02		
15. peynir	0,02		
13. peynir	0,04		
23. peynir	0,04		
18. peynir	0,08		
10. peynir	0,10	5	%20
2. peynir	0,14		
21. peynir	0,14		
3. peynir	0,16		
1. peynir	0,20		
22. peynir	0,26	2	%8
7. peynir	0,32		

Tablo 8: Elde edilen değerler (Ortalama: 0,10 ppb, std sapma: 0,09)



Şekil 9: 6 numaralı peynir numunesi

4. TARTIŞMA

Peynirde Aflatoksin varlığı üç şekilde; Aflatoksin içeren yemlerin tüketimi sonucu çiğ sütte toksin oluşması, peynirlerin yüzeyinde gelişen *A.flavus* ve *A.paraticus* türü küflerin toksin oluşturması, peynir ve yoğurt yapımı sırasında kullanılan katkı maddelerinin ve süt tozunda bulunan toksinlerin süt ürünlerine geçmesi şeklinde olmaktadır. AFM1 in sütte dağılımı homojen değildir ve %80'i süütün yağsız kısmında bulunmaktadır. Peynir imalatı sırasında toksin hidrofobik bağlanma nedeniyle kazein fraksiyonuna geçer bu nedenle süt ürünleri içinde en çok aflatoksin içeren ürün peynirdir (Trucksess and Page,1986). Aflatoksinin peynire hangi aşamada bulaştığını öğrenmek ve bunun engellenmesi sağlamak için üretim basamaklarının denetimi sağlanmalıdır. Bu amaçla biran önce HACCP uygulamalarına geçilmelidir.

Galvano ve ark.(1998) İtalya'da yaptıkları bir çalışmada, 159 süt örneği, 97 süt tozu örneği ve 114 yoğurt örneği olmak üzere toplam 360 numunede HPLC yöntemiyle AFM1 analizi yapılmış sonuçta 136 (%86) süt örneğinde, 81 (%84) süt tozunda, 91 (%80) yoğurtda, AFM1 saptanmıştır. Süt örneklerinde 1–108,5 ng /l (ortalama 10,19 ng/l), süt tozu örneklerinde 1–101,3 ng/kg (ortalama 21,77ng/kg), yoğurt örneklerinde 1–496,5 ng/l (ortalama 18,08 ng /l) düzeylerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Tekinşen ve Tekinşen (2005) Van otlı peynir ve salamura peynirlerde florimetrik yöntem kullanarak yaptıkları araştırmada, 60 adet Van otlı peynirinde %86,7, salamur peynirde % 62 oranında AFM1 tespit edilmiştir. Van otlı peynirinde AFM1 0.16 -7.26 µg/kg, Salamura beyaz peynirlerde 0.10 – 5.20 µg/kg olarak bulunmuştur. Pozitif sonuçlar içinde Van otlı peynirlerin %80'i, Salamura beyaz peynirlerin %40'ı limit değerler üzerinde bulunmuştur.

Amra (1998) yaptığı çalışmada, Mısırdaki 50 adet çiğ süt numunesini ELISA yöntemiyle aflatoksin yönünden analiz etmiş ve analiz sonucunda, 12 numunede 0,25–3,72 µg/l seviyesinde AFM1 bulmuştur.

Özmenteşe (2002) yaptığı çalışmada, İstanbul piyasasından sağlanan 87 süt, 15 yoğurt ve 15 peynir örneğinde AFM1 düzeyleri HPLC ile analiz edilmiş, sonuçta süt

örneklerinin %11,6'sı, yoğurt örneklerinin %93,3'ü ve peynir örneklerinin %13,3'ü Türk gıda kodeksi limit değerlerinin üzerinde bulunmuştu.

Kamkar (2005), İran'ın Sarap şehrinde yaptığı araştırmada 111 çiğ süt numunesinde AFM1 analizi yapmıştır. Numunelerin % 76,6'sinde 0,015–0,28 µg/l arasında AFM1 bulunmuştur. Sonuçların %40'ı birçok Avrupa ülkesince kabul edilen tolerans limitinden (0,05 µg/l) daha yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada Çiğ süt örneklerinde bulunan AFM1'in miktarının yaz aylarında kışa göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada Ankara piyasasından sağlanan 27 UHT ve Pastörize süt örneğinden AFM1 analizi yapılmış, bunlardan %59,3'ünde AFM1 tespit edilirken sadece bir örnekte limit değerler üzerinde AFM1 tespit edilmiştir (Gürbay ve ark. 2004).

Gerek Türkiye'de gerekse birçok yabancı ülkede, yapılan birçok çalışmada peynirlerde AFM1 varlığı bildirilmiştir.

Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda; Dadoğlu ve ark. 1995'de 75 adet beyaz ve otlu peynir örneklerinin %45'inde 60–510 ng/kg, Seyrek 2001'de 110 beyaz peynir örneğinin %91.81'inde 10–2000 ng/kg, Oruc ve Sonal 2001'de 57 peynir örneğinin % 89.47'sinde 40–810ng/kg, Günsen ve Büyükyörük 2002'de 130 peynir örneğinin %85.50'sinde 15-790ng/kg, Ayçiçek ve Ark. 2005'de 183 beyaz peynir örneğinin %65'inde 40-4890ng/kg, Özkaya ve Ark. 2002'de 49 beyaz peynir örneğinin %44'ünde 11-500ng/kg arasında AFM1 bulunmuştur.

Trucksess ve Page 1986'da Amerika'da 118 peynir örneğinin %6.80'inde 100-1000ng/kg arasında AFM1 bulunmuştur. Yine Amerika'da yöresel ev peynirlerinde yapılan bir araştırmada 209 örnek araştırılmış bunların %0,4'ünde AFM1'e rastlanmıştır (Feeding times, 1999). (Yasal limit:50ng/kg)

Japonya'da; Tabata ve ark. 1987'de yapılan çalışmada 303 peynir örneğinin %14.50'sinde 200-1200 ng/kg arasında AFM1 bulunurken 1993'de 37 örnekle yapılan çalışmada AFM1 tespit edilememiştir. Yine Japonya'da Taguchi ve ark. 1995'de 41 örnekte yaptığı çalışmada AFM1 tespit edilememiştir.

İtalya'da Cirilli ve Cirilli 1988'de 66 peynir ile yapılan çalışmada, %18.20 sinde 280–1300ng/kg arasında AFM1 tespit edilmiştir.

Brezilya'da Maria de Sylos ve ark. 1996'da, 36 peynir numunesinde yapılan çalışmada AFM1 tespit edilememiştir.

Bu çalışmada örneklerin % 64'ünde AFM1 in tespit edilmesi yapılan diğer çalışmalarda elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir. Sadece iki örnekte 0,25ppb in üzerinde AFM1'e rastlandı ve bulunan en yüksek değer 320 ng/kg diğer çalışmalarda bulunan en yüksek AFM1 değerlerinden düşüktü. Süt ve süt ürünlerinin Aflatoksin ile kirlenmeleri coğrafi bölgelere, ülkelere ve mevsimlere göre farklılık göstermektedir. Çalışmamız sadece bir bölgede üretilen peynirleri kapsadığından bu bölgenin hayvanlarının sütlerinin AFM1 bakımından durumlarını da yansıtmaktadır.

Denetimler sonucu limit değerlerinin üzerinde AFM1 içeren peynirler, tarım bakanlığı ve yetkili elemanları, o gıdanın piyasaya arzına sınırlamalar getirerek uygun önlemleri alır veya piyasadan geri toplatır (Kanun, 2004).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Çanakkale ve çevresinde kurulmuş olan mandıralardan sağlanan 25 adet yöresel beyaz peynir numunesinde AFM1 seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda 10 adet (%40) beyaz peynir numunesinde AFM1 tespit edilemedi. 2 adet (%8) beyaz peynir numunesinde Türk Gıda Kodeksi limit değeri (0,25 µg/kg) üzerinde AFM1 tespit edilmiş olup, 13 adet (%52) numunede limit değerler altında AFM1 varlığı tespit edilmiştir. Pozitif sonuç veren peynirlerde 0,01- 0,032 µg/kg (ortalama 0,10 ±0,09 ppb) arasında değişen miktarlarda AFM1 tespit edilmiştir.

Peynir örneklerinde sadece iki örnekte limit değerlerin üstünde AFM1 bulunmuştur. Bu değerler; 0,32µg/kg ve 0,26µg/kg olarak bulunmuştur. Bu gıdalar tüketicilerin sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle yüksek miktarda AFLM1 içeren bu peynirlerin tüketilmesi engellenmelidir.

Günümüzde; Avrupa ve diğer birçok gelişmiş ülkede, yemlerin, süt ve süt ürünlerin AFB1 ve AFM1 ile kontaminasyonu sistemli bir şekilde kontrol edilmektedir. Buna karşılık Türkiye’de yasal düzenlemelerin ve bunların uygulanmasındaki eksiklikler nedeniyle kontrol sistemi yeterli değildir. Küf mantarlarının üremesi için Türkiye iklimi ısı ve nem bakımından oldukça elverişlidir. Hayvan yemlerinin, süt ve süt ürünlerinin üretim, depolama ve tüketim sürecinde Aflatoksin bulaşmasının önlenmesi için üreticinin bilgilendirilmesi ve denetimlerin sıklaştırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak gerek ülkemizde gerekse dünyada kanserojen olduğu bilinen Aflatoksinlerin denetiminin halk sağlığı açısından çok önemli olduğu bir gerçektir. Bulgularımız iki örnek dışında limit değerlerin altında olmasına rağmen insan sağlığı açısından riskli gıdalar olarak değerlendirilmelidir. Ülkemizde daha sağlıklı ve kaliteli gıdalar üretilmesi amacıyla kodekste bildirilen Aflatoksin limit değerlerinin daha alt seviyelere çekilmesinin gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

YÖRESEL PEYNİRLERDE AFLATOKSİN M1 DÜZEYLERİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Küf mantarlarının ikincil metaboliti olan mikotoksinler insan ve hayvanlarda ciddi hastalıklara sebep olurlar. *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* bulaşmış yemlerde aflatoksinler oluşmaktadır. Bu aflatoksinlerden özellikle etkili bir kanserojen olan AFB1, yemleri yiyen hayvanların vücutlarında bir diğer potansiyel kanserojen olan AFM1'e dönüşerek süt ile salgılanırlar.

Bu çalışmada, Çanakkale ili ve çevresinde üretilmiş 25 yöresel peynir numunesinden flüoresan detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ve immunoaffinity kolon yöntemi ile AFM1 analizi yapılmıştır. Çalışma sonucunda 10 adet (%40) beyaz peynir numunesinde AFM1 tespit edilemezken, 15 adet (%60) numunede 0,01 – 0,32ppb arasında AFM1 varlığı tespit edilmiştir. Numuneler içinde 2 adet (%8) beyaz peynir numunesinde Türk gıda kodeksi limitleri (0,25 µg/kg) üzerinde AFM1 tespit edilmiş olup, Pozitif sonuç veren peynirlerde ortalama 0,10 ±0,09 µg/kg AFM1 tespit edilmiştir. Peynir örneklerinde AFM1'e rastlanma sıklığı ve bulunan değerler diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Sağlıklı süt ve süt ürünlerinin üretilmesi için yemlerin depolama aşamasında AFB1 kontaminasyonuna dikkat edilmelidir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin M1, Toksikolojik Analiz, Peynir, HPLC, gıda maddeleri tüzüğü.

SUMMARY

THE DETERMINATION OF AFLATOXIN M1 LEVELS VIA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD IN LOCAL CHEESE

Mycotoxins are those secondary metabolites of fungi which are associated with certain disorders in animals and humans. When feed become infected with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, these feeds are frequently contaminated with up to four aflatoxins, one of which (aflatoxin B1) is a carcinogen and may be converted into another potential carcinogen (aflatoxin M1) by lactating animals and secreted in milk.

In this study, 25 traditional cheese samples were collected from Çanakkale province of Turkey and analyzed AFM1 levels by high performance liquid chromatography (HPLC) with a fluorescence detector following sample clean-up using immunoaffinity columns. 10 samples of the 25 samples (%40) the presence of AFM1 levels were not detected. AFM1 contamination was detected ranging from 0,01 to 0,32 µg/kg in 15 samples (%60). AFM1 levels in 2 samples (%8) were higher than the maximum tolerance limit (0.25µg/kg) accepted by the Turkish Food Codex. The incidence and level of AFM1 were found similar to those reported in other studies. To produce quality milk or diary products, it is essential to avoid contamination by AFB1 feeds during storage.

Key words: Aflatoxin M1, Toxicological analysis, Cheese, HPLC, food material laws.

KAYNAKLAR

- ABBAS, H.K., MİROCHA, C.J., ROSİLES, R., CARVAJAL, M. (1988). Effect of Tortilla Preparation Process on Aflatoxins B₁ And B₂ İn Corn, *Mycotoxin Research*, 4, 33-36.
- ALPERDEN I., CERİTOĞLU, A., ARAN N., TORUN, Ö., TÜRKMEN, S. (1978). Hayvansal Ürünlerde Mikotoksin Araştırmaları ve Kalite Control Esasları, Tübitak-Mam Bilimsel End. Arast. Enst., 31, 129.
- AMRA, H.A., (1998), Survey Of Aflatoxin M₁ İn Egyptian Raw Milk By Enzyme-Linked İmmunosorbentassay, Review, *Medicine Veterinary*, 149 (6),695.
- ARAN, N. and EKE, D. (1987). Mould Mycoflora of Some Turkish Cereals and Cereal Proal Products, *Mircen Journal*, 3, 281-287.
- AYCICEK, H., AKSOY, A., SAYGI, S. (2005). Determination of Aflatoxin Levels in Some Dairy And Food Products Which Consumed In Ankara, Turkey A, *Food Control*, 16 263–266.
- BADEAA, M., VELASCO-GARCİAB, M., MOTTRAM, T., DANET,, A.F., PALLESCHİA G. (2004). Automated Flow Immunoassay System For Aflatoxin M₁ Determination In Raw Milk. From Concept To Prototype, IAEAC: The 6th Workshop on Biosensors and BioAnalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis ENEA, University of Rome “La Sapienza”, October 8-12, Rome, Italy.
- BAILEY, G.S., PRICE, R.L., PARK, D.L., HENDRICKS, J.D. (1984). Effect of Ammonianiation of Aflatoxin B₁ Contaminated Cottonseed Feedstock On The Aflatoxin M₁ Content of Cows’ Milk And Hepatocarcinogenicity In The Trout Bioassay, *Food Chemistry Toxicology*, 32 (8) 2:707-715.
- BAKIRCI, I., (2001). A Study on The Occurrence of Aflatoxin M₁ İn Milk and Milk Products Produced in Van Province of Turkey, *Food Control*, Vol.12, 1, 47-51.
- BARBIERI, G., BERGAMINI, C., ORI, E., RESCA, P. (1994). Aflatoxin M₁ in Parmesan Cheese: HPLC determination, *Journal Food Science*, 59 (6): 1313-1331.
- BARNETT, H.L., HUNTER, B.B. (1998). Factors Affecting Growth And Sporulation Of Imperfect Fungi, Physiology, Illustrated Genera Of Imperfect Fungi, 4 Th Editions, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 1-5.
- BİLGE, Y. (2005). Adli Tıp, Kamu Sağlığına Karşı Suçlar, Sayfa; 63, Üçbilek Matbaası, 1. Baskı 2005.
- BLANCO, J. L., DOMİNGUEZS, L., GOMEZ-LUCİA, E., GARAYZABAL, J. F. F., GARCİA, J. A., & SUAREZ, G. (1988). Presence of Aflatoxin M₁ İn Commercial Ultra-High Temperature Treated Milk, *Applied Environmental Microbiology*, 56, 1622–1623.
- BRACKETT, R.E., MARTH, E.H. (1982). Association of Aflatoxin M₁ with Casein. Z. Lebensm. Unters. For, 174: 439-441.
- BRITTON WM., WHATT R.D., (1979). Influenza of Vitamin D on Chick Aflatoxicosis, *poultry science*, 58:1039.

- BROWN MH., SZEZEEN G.M., PURMALIS BP. (1976). Teratogenic And Toxic Affects Of Ochratoxin A In Rats, *Toxicology Applied Pharmacology*, 37: 331-339.
- BULLERMAN, LB. (1979). Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health, *Journal food Science*, 42 (1): 65-86.
- BULLERMAN L.B., SCHOEDER, L.L., PARK, K.Y. (1984) "Formation and Control of Mycotoxins in Food, *J. of Food Prot.*, Vol 47, No: 8, 637-646.
- BULLERMAN, LB. (1986). Mycotoxins and Food Safety, *Food technology*, 40:59-66.
- CATHEY, C.G., NUANG, Z.G., SARR, A.B., CLEMENT, B. A., PHILILIPS, T. D. (1994). Development and Evaluation of a Minicolumn Assay For The Detection Of Aflatoxin M1 In Milk., *Journal of Dairy Science*, 77, 1223-1231.
- CİRİLLİ, G.A and CİRİLLİ, G.S. (1988). Contamination of Dairy Products By Hydroxy-Aflatoxins, *Microbiologie Aliments Nutrition*, 6; 217-219.
- CONCON, C.M., (1998). Contaminants and Additives, Food Toxicology Part B, Marcel Dekker Inc, New York, 667-743.
- Consumption Food Microbiology (1987). 4, 101-1 04, TUBITAK, Marmara Research Institute, Department of Nutrition and Food Technology, P.O. Box. 74, Gebze-Kocaeli, Turkey, 1987.
- CREPPY, E.E. (2002). *Toxicology Lett.* 127, p.19.
- DAGOGLU G., KELES, O. and YILDIRIM, M., (1995), Peynirlerde aflatoksin düzeylerinin ELISA ile araştırılması, *Istanbul Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 21 (2), 313-317.
- DÍAZ, S., MORENO, M.A., DOMÍNGUEZ, L., SUAREZ, G. and BLANCO, J.L., (1993), Application of a Diphasic Dialysis Technique to the Extraction of Aflatoxins in Dairy Products, *J. Dairy Sci*, 76: 1845-1849.
- DOHLMAN E., Impacts on Food and Animal Feed Crop Trade, Mycotoxin Hazards and Regulations, Chapter 6, International Trade and Food Safety, AER-828 97-108, 1997.
- DONMA, M.M. and DONMA, O., (2005), Phytonutrients and Children: The Other Side of the Medallion, *Food Research International*, 38, 681-692.
- DOYLE M.P., APPLEBAUM R.S., BRACKETT R.E., MARTH E.H., (1982). Physical and Biological Degradation of Mycotoxin in Food and Agricultural Commodities, *Journal Food Protection*, 45 (10): 946-971.
- DRAGACCI, S., GLEIZES, E., FREMY, J.M. and CANDLISH A.A.G. (1995). Use of Immunoaffinity Chromatography as a Purification Step for Determination of Aflatoxin M1 in Cheeses, Food Additives and contaminants, vol.12, no.1, 59-65.
- EATEN, D.L. and GROOPMAN, J.D., (1994). The Toxicology of Aflatoxins, Academic Pres, New York.
- EGMOND H. P. Van, (1983), Mycotoxins in Dairy Products Food Chemistry, 11, 289-307.
- European Commission, Commission Regulation 466/2001, Off. J of EC L77, p.7, 2001.
- Feeding Times, (1999). The Mycotoxin Factor in Human Health, 4(3), 20-21.
- FİLTENBORG O., FRİSVAD J.C., THRANE U., (1996), Moulds in food spoilage, *International Journal of Food Microbiology*, 33 85-102.
- FRİSVAD, J.C., (1988), Fungal Species and Their Specific Production of Mycotoxins. In: Samson R. and Van Reenen-Hoekstra E.S. (Eds.), Introduction To Foodborne

- Fungi, 3rd. Ed Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baam, The Netherlands, 239-249.
- GALVANO, F., GALOFARO, V., DE ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANNO, M., GALVANO, G., (1998), Survey of the Occurrence of Aflatoxin M₁ in Dairy Products Marketed In Italy. *Journal Food Protection*, 61 (6), 738-741.
- GILBERT, J., ANKLAM, E., (2002). Validation of Analytical Methods For Determining Mycotoxins in Foodstuffs, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, No: 6+7.
- GUNSEN, U. and BUYUKYORUK, I., (2002). Aflatoxins in Retail Food Products in Bursa, Turkey, *Veterinary and Human Toxicology*, 44 (5), 289–290.
- GÜRBAY, A., AYDIN, S., GİRGIN, G., ENGİN A.B. and ŞAHİN G. (2004). Assessment of Aflatoxin M₁ Levels in Milk in Ankara, Turkey, *Food Control*, In Press, Corrected Proof, Available online 28 September 2004. Abstract
- GÜRSES, M., ERDOĞAN, A., ÇETİN, B., (2004). Occurrence of Aflatoxin M₁ In Some Cheese Types Sold in Erzurum, Turkey, *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 28: 527-530.
- HAMILTON, P.B., (1982). Mycotoxin and Farm Animals, *Refu. Veterinary*, 39 (1-2): 17-40.
- HARVEY, R.B., PHILIPS, T.D., ELLIS JA., KUBENA, L.F., HUFF, W.E., PETERSON, H.D., (1991). Effects on Aflatoxin M₁ Residues in Milk by Addition of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Aflatoxin Contaminated Diets of Dairy Cows, *American Journal Veterinary*, 52 (9): 1556-1558.
- HOLCOMB, M., WILSON, D.M., TRUCKSESS, M.W., THOMPSON, H.C., (1992). Determination of aflatoxins in food products by chromatography, *Journal of Chromatography*, 624: 341-352. Review
- HUSSEİN H.S., BRASEL J.M., (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals, *Toxicology*, 167: 101–134 Review
- International Agency for Research into Cancer (IARC) (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 56: 245-395.
- JAY J.M., (1992). Other Proved and Suspected Food Borne Agents: Mycotoxins, *Modern Food Microbiology* 4th Addition, 641-651.
- JIMENEZ, M., MATEO, R., QUEROL, A., HUERTA, T., HEMANDEZ, E., (1991). Mycotoxins and Mycotoxigenic Moulds in Nuts and Sunflower Seeds for Human Consumption, *Mycopathologia*, Aug., 115 (2):121-128.
- KAMKAR, A., (2005). A Study On The Occurrence Of Aflatoxin M₁ in Raw Milk Produced in Sarab City of Iran, *Food Control*, 16, 593–599.
- KANIOU-GRIGORIADOU, I., ELEFTHERIADOU, A., MOURATIDOU T., KATIKOU P., (2005). Determination of Aflatoxin M₁ in Ewe's Milk Samples and The Produced Curd and Feta Cheese", *Food Control*, 16: 257–261.
- Kanun, (2004) 5179 Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değiştirilerek Kabulü Hakkında Kanun, Resmi gazete. 05.06 2004.

- KARAPINAR, M., (1984).Gıdalarda küf bozulmaları, *E.Ü. müh. Fak. Dergisi*, B(2),1: 27-29,
- KAYA S., (1982). Süt Yemi ve Çiğ Sütte Aflatoksin Kalıntılarının Kromotografik Yöntemle Araştırılması, *Veteriner Fak. Dergisi*, 29: 443-457.
- KAYA, S., (1996).VETERİNER KLİNİK TOKSİKOLOJİ, Bölüm2 /Özel Toksikoloji, Ankara üniversitesi yayınları.
- KIESLING, K.H., (1986) Biochemical Mechanism of Action of Mycotoxins, *Pure Appl. Chem.* 58: 327-338.
- KROGH, P., (1987). Mycotoxins In Food, Department Of Microbiology, Royal Dental College, Copenhagen, Denmark, Academic Press, 18-22,
- LAFONT, P., (1973). Pollution Des Aliments Par Les Mycotoxines at Mycotoxicoses Liees A La Consommation De Ces Produits. *Rev. Fran. Corps Gras* 21, Annee, 2 : 21 -28,
- LAFONT, P., SIRIWARDANA, M.G., COMBERNALE, I. and DAFONT, J., (1979). Mycophenolic Acid in Marketed Cheeses, *Fd. Cosmet Toksikol*, 17: 147-149.
- LOPEZ, C., RAMOS, L., RAMADAN, S., BULACIO, L., PEREZ, J., (2001). Distribution Of Aflatoxin M₁ In Cheese Obtained From Milk Artificially Contaminated, *International Journal Of Food Microbiology* 64: 211-215
- LOPEZ-DÍAZ T.M., ROMBN-BLANCO C., GARCÍA-ARÍAS M.T., GARCÍA-FERNBNDEZ M.C., GARCÍA-LOPEZ M.L, (1996). Communication Mycotoxins in Two Spanish Cheese Varieties, *International Journal of Food Microbiology*, 30: 391-395 Short Communication
- MELLO, J.P.F. and MACDONALD, A.M.C., (1997). Mycotoxins, *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- NORTHOLT, MD. and BULLERMAN, L.B., (1982). Prevention of Mold Growth and Toxin Production through Control of Environmental Conditions, *J. Food Protection* 45: 519-526.
- ORUC, H.H. and SONAL, S., (2001). Determination of aflatoxin M₁ levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey, *Veterinary and Human Toxicology* 43, (5): 292-293.
- OZKAYA S., BASARAN A., KAYMAK T., DİKMEN O., KOCABEY M., DEMİRKAZİK G., ALTINDİS N. AND RAMİS R., (2002). Türkiye’de Üretilmekte Olan Süt ve Peynirlerde Aflatoksin M₁ Aranması. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıdalarda Katkı Kalıntı ve Bulaşanlarının İzlenmesi II 0, Pp. 80-92.
- ÖZMENTEŞE, N., (2002). İstanbul Piyasasından Sağlanan Süt ve Süt Ürünlerinin Aflatoxin B₁ ve M₁ İçerikleri Yönünden HPLC Yöntemi ile Araştırılması, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- PERAICA M, RADIC B, LUDC A, PAVLOVIC M, (1999). Toxic Effects Mycotoxins in. Human, *Bulletin of the Health Organization*, 77(9): 754-766.
- PITTET, A., (1998). Natural Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds, an Updated Review, *Medicine Veterinary*, 149 (6): 479-492.
- POHLAND, A.E., (1993). Mycotoxins in Review, *Food Additives and Contaminants* 10, (1): 17-28.

- Rhone Diagnostics Technologies IAC –HPLC Ab Com. Merkez Araştırma Birimi. Ispra-Italy/1999.
- RYSER, E.T., (1998). Current Public Health Concern, Aflatoxin, *Applied Dairy Microbiology*, New York, 280-285,
- SARİMEHMETOĞLU B., KUPLULU Ö., CELİK T. H, (2004). Detection of Aflatoxin M1 In Cheese Samples By ELISA”, *Food Control*, 15: 45–49.
- SCOTT, P.M., (1984). Effects of Food Processing in Mycotoxins, *Journal food protection*, 47 (6): 489-499.
- SEYREK, K., (2001). Türk Silahlı Kuvvetleri’ne Bağlı Birliklerde Tüketilen Beyaz Peynirlerdeki Aflatoksin M1 Seviyesinin Elisa (enzyme-linked immunosorbent assay) Metodu ile Saptanması, *Veteriner Hekimleri Dernegi Dergisi* 72 (1–4): 55–58.
- SHARMAN, M., PATEY, A.L. and GILBERT, J. (1989). Application of an Immunoaffinity Column Sample Clean-Up To The Determination of Aflatoxin M1 in Cheese, *Journal of Chromatography*, 474, 457-461.
- SHREEVE, B.J. and PATTERSON, D.S.P., (1975). Mycotoxicosis, *Veterinary Rec.*, 97: 279-280.
- STEYN PS., (1998). The Biosynthesis of Mycotoxins, Review, *Medicine Veterinary*, 149 (6): 469-678.
- SYLOS C.M.D., RODRÍGUEZ-AMAYA D.B. and CARVALHO, P.R.N., (1996). Occurrence of Aflatoxin M1 in Milk and Dairy Products Commercialized in Campinas, Brazil, *Food Additives and Contaminants* 13, (2): 405–415.
- TABATA S., KAMİMURA H., TAMURA Y., YASUDA K., OSHİYAMA H., HASHİMOTO H., NİSHİSİMA M. AND NİSHİSİMA T., (1987), Aflatoxin Contamination in Foods and Foodstuffs, *Journal of Food Hygiene and Society Japanese* 28: 395–401
- TAGUCHİ, S., FUKUSHİMA, S., SUMUMOTA, T., YOSHİDA S. and NİSHİMUNE T., (1995), Aflatoxins in Food Collected in Osaka Japan From 1988 To 1992, *Journal of Association Official Analytical Chemistry International*, 78: 325–327.
- Tarım ve Köy işleri Bakanlığı ile Sağlık Bakanlığı: Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Seviyelerini Resmi Kontrolleri İçin Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği, Türk Gıda Kodeksi Tebliğ (2002). Tebliğ No: 2002/ 25, Resmi Gazete: 25.03.2002 Sayı: 24706, Ankara: Başbakanlık Basımevi.
- Tarım ve Köy işleri Bakanlığı: Mikrobiyal Toksinler (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (Ek-14). Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Türk Gıda Kodeksi Tebliğ. (2002). Resmi Gazete, 23.09.2002 Sayı: 24885, Ankara: Başbakanlık Basımevi.
- Tarım ve Köy işleri Bakanlığı: Gıda Ve Gıda İle Temasta Olan Madde Ve Malzemelerin Piyasa Gözetimi, Kontrolü Ve Denetimi İle İşyeri Sorumluluklarına Dair Yönetmelik, Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Türk Gıda Kodeksi Tebliğ, Resmi Gazete 30 Mart 2005.
- TEKİNŞEN K.K., TEKİNŞEN O.C., (2005). Aflatoxin M1 in White Pickle And Van Otlı (Herb) Cheeses Consumed in Southeastern Turkey, *Food Control* 16: 565–568.

- TRUCKSESS M.V. AND PAGE S.V., (1986), Examination of Imported Cheese for Aflatoxin M₁, *Journal of Food Protection* 49, 632–633.
- WANG, J.S., GROOPMAN, J.D., (1999) DNA Damage by Mycotoxins, *Mutation Research*, 424: 167–181.
- WHILLIE T.D., AND MOREHAUSE, I.G., *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins and Mycotoxicoses (an encyclopedic handbook)*, Vol 2, mycotoxicoses of domestic and laboratory animals, poultry and aquatic invertebrates and vertebrates) vol 3, (mycotoxicoses of man and plants: Mycotoxin control and regulatory aspects), Marcel Dekker inc. New York, 570, 202, 1978.
- WILSON (1984) B₁ Hazards of Mycotoxins to Public Health, *Journal of Food Protection*, 41: 375-384.

ÖZGEÇMİŞ

BİREYSEL BİLGİLER

Adı: Nergiz

Soyadı: ÖZGÜÇ DEMİRTAŞ

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 1981

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Nasuhakar Mah. 1.cad. 24. sok. 4/5 Balgat/Ank.

EGİTİMİ

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temmuz 2002 Ankara.

Lise: Ankara Anıttepe Lisesi, 1998 Ankara.

Ortaöğretim: Namık Kemal İlköretim Okulu, 1995 Ankara

Yabancı dili: İngilizce

ÜNVANLARI

Biyolog: 2002 Ankara.

MESLEKİ DENEYİMİ

Tarım Köyişleri Bakanlığı, Çanakkale İl Kontrol Lab. Müd. Mikrobiyoloji Lab. 2004-...

Zekayi Tarık Burak Eğ. ve Araş. Hastanesi, Genetik Lab. (staj), 2002

VERDİĞİ SEMİNERLER

Alzheimer Hastalığında Biyogöstergeler, Ankara Üni. Adli Tıp Enstitüsü, 2004 Ankara