

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

**KARS İLİNDEN TOPLANAN ÇİĞ SÜTLERDE**  
**AFLATOKSİN M1 MİKTARININ ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Gıda Mühendisi Efsun DELİGÖZ**  
**Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı**

**Danışman**

**Doç. Dr. Nebahat BİLGE**  
**GIDA HİJYENİ VE ÜRETİMİ ANABİLİM DALI**

**KARS 2017**

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

**KARS İLİNDEN TOPLANAN ÇİĞ SÜTLERDE**  
**AFLATOKSİN M1 MİKTARININ ARAŞTIRILMASI**

**Gıda Mühendisi Efsun DELİGÖZ**  
**Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman**

**Doç. Dr. Nebahat BİLGE**

**Bu tez, Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü tarafından 2016-  
TS-62 proje numarası ile desteklenmiştir.**

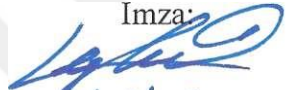

**2017-KARS**

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

Gıda Hijyeni ve Üretimi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Gıda Mühendisi Efsun DELİGÖZ tarafından hazırlanmış olan "Kars İlinden Toplanan Çiğ Sütlerde Aflatoksin Mİ Miktarının Araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.06.2017

Adı, Soyadı:  
Başkan: Prof. Dr. Leyla VATANSEVER  
Üye: Doç. Dr. Meryem AYDEMİR ATASEVER  
Üye: Doç. Dr. Nebahat BİLGE

İmza:  
  
U. Akın  
  
N. Bilge

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun. . . . / . . . . / . . . . Gün ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Başta çocuk gelişimi olmak üzere insan beslenmesinde önemli birer yer tutan süt ve süt ürünleri, halk sağlığını tehdit eden tehlikeleri de beraberinde getirmektedir. Karsinogenik etkileri ile bilinen ve özellikle hayvan yemlerinde bulunuşu ile dikkat çeken Aflatoksin B1 ve bunun canlı organizmadaki metabolizma ürünü olan Aflatoksin M1, karsinogenik, nörotoksik, nefrotoksik, hepatotoksik ve immunsupresif etkileri ile bu anlamda bilim çevrelerinde gündemde kalmaya devam etmektedir. AFM1' in başlıca atılım yolunun süt oluşu ve süte uygulanan pastörizasyon ve sterilizasyon gibi işlemlerden etkilenmeyişi, araştırmacıları detoksifikasyon konusunda yeni yollar aramaya teşvik etmektedir.

Sorunla mücadelede, hâlihazırda gıdalarda toksine yönelik olarak kullanılan zaman alıcı ve maliyetli saptama yöntemlerine alternatif geliştirmek ve böylece yasal düzenlemelerde belirtilen limitlere uygunluğunu titizlikle denetlemek, bunun yanında gıdayı toksin açısından daha güvenli hale getirmek anahtar rolü oynamaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinden bildirilen raporlar, hayvan yemlerindeki Aflatoksin B1 (AFB1) ile süt ve süt ürünlerindeki Aflatoksin M1(AFM1)sorununun günümüzde halen ciddiyetini koruduğuna işaret etmektedir ve ne yazık ki toksine maruz kalınması ile ilişkilendirilen her yıl onlarca hastalık vakası kayıtlara geçmeyi sürdürmektedir.

Bu tez kapsamında, Kars'taki çiftliklerde yetiştirilen ineklerden elde edilen çiğ sütlerde AFM1 seviyeleri ELISA yönteminden yararlanılarak belirlenmiştir. Bu sayede Türkiye'deki AFM1'e ilişkin bilgilere katkıda bulunulmuş ve Kars'taki yaygınlığının güncel durumuna ışık tutulmuştur.

Tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve gerçekleştirilmesinde her zaman engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nebahat BİLGE' ye ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana vermiş olduğu sonsuz destek, özveri ve anlayış için eşim Hakan DELİGÖZ'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
	<b>No</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>I</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>II</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>IV</b>
<b>RESİM LİSTESİ</b>	<b>V</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>VI</b>
<b>GRAFİK LİSTESİ</b>	<b>VII</b>
<b>ÖZET</b>	<b>VIII</b>
<b>SUNMARY</b>	<b>IX</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler	<b>2</b>
1.1.1. AFM1' in Biyosentezi ve Toksisitesi	<b>4</b>
1.1.2. Aflatoksin M1'in Gıdalarda Bulunuşu ve Yaygınlığı	<b>5</b>
1.1.3. Tayin Yöntemleri	<b>10</b>
1.1.3.1. Klasik Tayin Yöntemleri	<b>10</b>
1.1.3.1.a. İnce Tabaka Kromatografisi	<b>10</b>
1.1.3.1.b. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC–High Performance Liquid Chromatography)	<b>11</b>
1.1.3.1.c. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	<b>12</b>
1.1.3.1.d. Biyosensörler	<b>13</b>
1.1.3.1.e. Kütle Spektrometresi	<b>15</b>
1.1.3.2. Yeni Gelişmeler	<b>16</b>
1.1.4. AFM1'in Toksisitesi ve Oluşturduğu Hastalıklar	<b>21</b>
1.1.5. AFM1'in Stabilitesi ve Redüksiyonu	<b>22</b>
1.1.6. AFM1'e İlişkin Yasal Düzenlemeler	<b>23</b>
<b>2. MATERYAL ve METOT</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Materyal</b>	<b>24</b>
2.1.1. Süt Örnekleri	<b>24</b>

2.1.2. Aflatoksin Test Kiti	24
2.1.3. Aletler	24
2.1.4. Kit Haricinde Kullanılan Malzemeler	26
2.2. Metot	26
2.2.1. Yöntemin Uygulanışı	26
<b>3. BULGULAR</b>	<b>27</b>
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>30</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>35</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>40</b>



**ŞEKİL LİSTESİ**

	<b>Sayfa</b>
	<b>No</b>
<b>Şekil 1:</b> Aflatoksin B1'in vücuttaki metabolizması	<b>5</b>
<b>Şekil 2:</b> Bir biyosensörün genel şematik gösterimi	<b>15</b>
<b>Şekil 3:</b> Bir biyosensör sisteminin çalışma prensibi	<b>15</b>
<b>Şekil 4:</b> Kütle spektrometresinin bölümleri	<b>16</b>



**RESİM LİSTESİ**

	<b>Sayfa</b>
	<b>No</b>
<b>Resim 1:</b> Canlıların doğadaki olayları algılama yetenekleri	<b>14</b>





**TABLO LİSTESİ**

	<b>Sayfa</b>
	<b>No</b>
<b>Tablo 1:</b> Süt ve süt ürünlerinde AFM1'in maksimum limitleri	<b>23</b>
<b>Tablo 2:</b> ELISA test kitinde bulunan diğer materyaller	<b>24</b>
<b>Tablo 3:</b> ELISA AFM1 standartları ve verdikleri absorbans değerleri	<b>26</b>
<b>Tablo 4:</b> Çiğ süt örneklerinin ELISA'da verdikleri absorbans değerleri ve AFM1 konsantrasyonları	<b>27</b>
<b>Tablo 5:</b> Kars İline ait çiğ süt örneklerinde AFM1 düzeyleri	<b>28</b>
<b>Tablo 6:</b> Sütte 50 ng/l konsantrasyonda AFM1 geri kazanım oranları	<b>29</b>



## GRAFİK LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
	<b>No</b>
<b>Grafik 1:</b> Kalibrasyon Eğrisi	<b>26</b>



## ÖZET

Karsinogenik etkileri ile bilinen ve özellikle hayvan yemlerinde bulunuşu ile dikkat çeken Aflatoksin B1 (AFB1) ve bunun canlı organizmadaki metabolizma ürünü olan Aflatoksin M1 (AFM1), karsinogenik, nörotoksik, nefrotoksik, hepatotoksik ve immunsupresif etkileri ile bilim çevrelerinde gündemde kalmaya devam etmektedir.

Bu nedenle bu tez ile Kars'taki çiftliklerde yetiştirilen ineklerden elde edilen çiğ sütlerde ELISA yöntemiyle Aflatoksin M1 seviyelerini belirleyerek bölgedeki yaygınlığına ışık tutmak ve Türkiye'deki AFM1 ile ilgili bilgilere katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Çalışmada toplam 88 çiğ süt örneği ELISA tekniği kullanılarak incelenmiş ve %89 oranında AFM1 varlığına rastlanmıştır. Kantitatif değerlendirme yapıldığında örneklerin %33'ünün, Türk Gıda Kodeksi(TGK) ve Avrupa Birliği (AB) tarafından kabul edilen limitlerin üzerinde AFM1 içerdiği gözlenmiştir. Isıl işlem ile söz konusu mikotoksinin yıkımlanmadığı göz önüne alındığında, bölgede satışa sunulan çiğ sütlerin halk sağlığını tehdit eder durumda olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Aflatoksin, Aflatoksin M1, ELISA, Süt, Kars.

## SUMMARY

Milk toxin AFM1 is one of the most important public health hazards. This toxin is produced by animals after consuming contaminated feed with AFB1 which is known for its carcinogenic effects and then excreted in milk. Same as AFB1, AFM1 is also carcinogenic, neurotoxic, nephrotoxic, hepatotoxic and immunosuppressive for humans and it remains as a popular study subject among researchers.

In this study, it was aimed to determine the occurrence of Aflatoxin M1 (AFM1) in raw milk which was provided from farms in Kars. For that purpose, 88 milk samples were analyzed for the presence of AFM1 using ELISA. The toxin was detected in 89% of samples. According to quantitative evaluation 33% of total 88 samples had AFM1 above the legal limits of Turkey and EU regulations. Considering the impossibility of destruction of that mycotoxin by thermal process, detection of it in raw milk at that levels was evaluated as potential risk for the public health.

**Key Words:** Aflatoxin, Aflatoxin M1, ELISA, Milk, Kars.

## 1. GİRİŞ

İnsan yaşamının her evresinde gerekli olan süt, C vitamini ve demir dışında, özellikle bebeklik, çocukluk, gebelik-emzicilik ve yaşlılık dönemlerinde kemik sağlığı açısından son derece önemli olan makro ve mikro besin öğelerini içerir. Süt proteinleri, vücuttaki büyüme ve gelişmeye katkısı ve doku farklılaşmalarındaki fonksiyonlarının yanı sıra kalsiyum emilimi ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkilere sahiptir, ayrıca kan basıncını düşürdüğü, kanser riskini azalttığı, vücut ağırlığının kontrolünde rol aldığı ve diş çürüklerine karşı koruyucu etkinliğe sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte süt, tüm bu yararlı etkilerinin yanında kimi zaman halk sağlığını tehdit eden mikrobiyolojik ve kimyasal tehlikeler içerebilmektedir. Besin değerini korurken patojen mikroorganizmaları yok etmek, pastörizasyon ve UHT gibi uluslararası normlarda kabul gören ısı işlemler ile mümkün olabilmektedir (Besler ve Unal 2012). Ancak tek hücreli mantarlarca sentezlenen ve mikotoksin adı verilen doğal kirleticiler, uygulanan bu ısı işlemlerle yıkımlanamamaktadır (İşleyici ve ark. 2012). Söz konusu mikotoksinlerden biri olan Aflatoksin M1 (AFM1), başta *Aspergillus flavus* olmak üzere bazı *Aspergillus* türleri ile kontamine yemlerde üretilen Aflatoksin B1'in (AFB1), hayvan vücuduna alındıktan sonra hidrosillenmesi sonucunda oluşan bir metabolittir ve sonrasında süt ile vücuttan atıldığı için "Süt toksini" olarak da bilinir. (Delialioğlu ve ark. 2010).

Aflatoksinler gıdaları tarlada ekili oldukları zamandan başlayarak büyüme, hasat, nakliyat, uygun olmayan depolama şartları, üretim sırasındaki koşullar ve hatta hazır gıda olarak kullanılan ürünün raf ömrü esnasında, kısacası ekimden tüketime kadar her aşamada kontamine edebilmektedir (Girgin ve ark. 2001). İnsanlar aflatoksinlere doğrudan, mesleki maruziyet sonucu veya özellikle kontamine yemle beslenmiş hayvanlardan elde edilen ürünler vasıtasıyla maruz kalabilirler. İnsanlar tarafından en çok tüketilen kümes, küçük ve büyükbaş hayvanların et, süt, yumurta ve bazı organlarında yapılan saptamalar sonucu elde edilen veriler; çok az miktarda alınan AFB1'in bile başta karaciğer ve diğer dokular olmak üzere süt ve yumurtaya da geçebildiğini göstermektedir. Kontamine süttten yapılan peynirlerde, peynirin daha konsantre bir ürün olması nedeniyle yapıldığı süttten 3-3,5 kat daha fazla aflatoksin taşıdığı bilinmektedir. Yağlara ise yapıldığı süttün 0,5-0,7 katı kadar aflatoksin

geçmektedir (Girgin ve ark.2001). Bu durumda, insan beslenmesinde önemli bir yeri olan süt ve süt ürünlerinin AFM1 ile kontamine olması ciddi bir sağlık riski oluşturmaktadır. Sütün yeni doğmuş, gelişme çağındaki çocuklar gibi zayıf bağışıklık sistemine sahip kişiler tarafından yoğun miktarda tüketildiği göz önüne alındığında tehlikenin boyutları görülmektedir. Bu konuda bir önlem olarak, pek çok ülke gıda ve yem maddelerinde kabul edilebilir AFB1 miktarı ile süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek maksimum AFM1 miktarlarını yasalar ile güvence altına almıştır. (Kabak ve Var 2004). Ülkemizin gıda ve yem ile ilgili kanunlarında da söz konusu düzenlemeler yer almakla birlikte, süt ve süt ürünlerinde AFM1 varlığı ile ilgili yapılagelen çalışmalar, halk sağlığını tehdit edecek seviyelerde AFM1 varlığına işaret etmektedir (Oruç, 2003).

### **1.1. Genel Bilgiler**

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi mantar cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir (Girgin ve ark. 2001).

Mikotoksinleri üreten mantarların sporları, rüzgâr yoluyla, atmosferin çeşitli katmanları da dâhil çok uzak mesafelere taşınabilir ve çok geniş bir yelpazede gıda ve tarım ürününü kontamine edebilirler. Özellikle *Aspergillus* türleri farklı çevresel koşullar ve substratlarda rahatlıkla gelişebilme yeteneğine sahiptir. Bulaşma, üretim, işleme, taşınma ve depolamanın herhangi bir aşamasında meydana gelebilir. Mantarın gelişimi ve mikotoksin üretiminde nem, sıcaklık, substrat tipi ve besinsel faktörler, atmosfer oksijen ve karbondioksit düzeyleri, diğer mantar türlerinin varlığı, coğrafi konum ve genetik şartlar etkilidir (Girgin ve ark. 2001).

Mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yemlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan hastalıklar “mikotoksikozis” olarak isimlendirilir. Bu kapsamda karsinojenik, teratojenik, tremorgenik, hemorajik, dermal, hepatotoksik, nefrotoksik, nörotoksik etkiler meydana gelebilmektedir. Bunun yanı sıra ölüme sebep olabilen akut tablolar da kendini gösterebilmektedir (Bakırcı 2014).

İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde gcl toksik etkiler oluşturan bu metabolitlerin başlıcaları, aflatoksin, okratoksin, patulin, zeralenon, trikotesen ve fumonisinlerdir (Bakırcı 2014).

İngiltere’de, 1960 yılında yüz binden fazla hindi ve diğer çiftlik hayvanlarının ölümüyle sonuçlanan salgınlar sırasında “Turkey X” hastalığının etkeni olarak tanımlanan aflatoksinler, bilinen 400 mikotoksin arasında insan sağlığı açısından en tehlikelisi olarak kabul edilmektedir (Ergun ve ark. 2006). Çiftlik hayvanlarının beslenmesinde yararlanılan yemler yanında insanların diyetinde önemli bir yere sahip olan gıda maddelerinin aflatoksin ile kontaminasyonu, dünyanın çeşitli bölgelerinde sık karşılaşılan bir durumdur. Dolayısıyla bu kontaminasyonlar hem gıda güvenliğini etkileyerek halk sağlığı açısından risk oluşturmakta hem de tarım endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* küflerinin gıda ve yemlerdeki toksik metabolitleridir (Fink-Greerms 1999), oluşturdukları toksik etki gücüne göre AFB1>AFG1>AFB2>AFG2 şeklinde sıralanmaktadır (Yentür ve Er 2012).

AFM1, en toksik aflatoksin olan AFB1’in metabolik bir ürünüdür ve AFB1 ile kontamine yemleri tüketen hayvanların sütleri ile vücutlarından atılır. Süte uygulanan işlemlerden etkilenmediği için peynir, yoğurt, süt tozu ve tereyağı gibi süt ürünlerinde bulunabilir (Fink-Greerms 1999).

Başlıca, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* kfleri tarafından üretilen aflatoksinler (Yentür ve Er 2012), ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boylu UV ışığı altında verdikleri floresan renklere göre B1 ve B2 (Blue - Mavi) ile G1 ve G2 (Green - Yeşil) olarak isimlendirilip gruplandırılırlar (Ergun ve ark. 2006).

Aflatoksin B1, küflü yemlerle beslenen hayvanların sütüne geçerek kazeinle birleşir ve AFM1 adı verilen bir metabolit oluşturur (Ergun ve ark. 2006).

### 1.1.1. AFM1' in Biyosentezi ve Toksisitesi

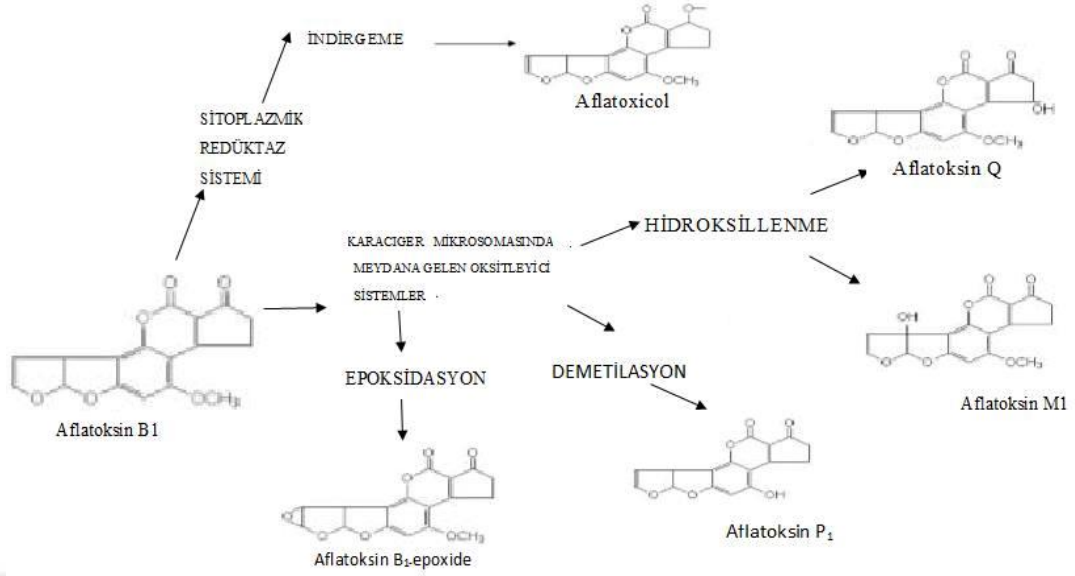
AFB1, asıl olarak karaciğerin mikrozomal çok fonksiyonlu oksidaz sistemi tarafından metabolize edilir. Ancak bunun yanında türlere göre değişen şekillerde farklı metabolik dönüşümlerden de geçebilir (Mohammadi 2011).

Yemlerle alınan AFB1 öncelikle enzimlerle düzenlenen hidroliz, redüksiyon ve oksidasyon reaksiyonlarını içeren “faz 1” metabolizmasına uğrar. Ardından konjugasyon basamağını kapsayan “faz 2” metabolizması gelir. AFB1'in faz 1 metabolizması çoğunlukla cytochrome P450 (CYP450) enzimleri tarafından katalize edilen oksidasyon reaksiyonlarından oluşur. CYP450'ler AFB1'den en az üç adet monohidroksile metabolit üretimine aracılık eder; bunlar AFM1, AFQ1 ve AFB2a'dır. AFM1 ilk kez, kontamine yem ile beslenen sığırların ve farelerin sütlerinden izole edildiği için “milk toxin” (Süt Toksini) teriminin ilk harfinden yola çıkılarak isimlendirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda AFM1'in yalnızca memelilere özgü bir metabolit olmadığı, pek çok memeli harici tür tarafından da karaciğer enzimleri tarafından üretildiği gözlenmiştir. Örneğin, 35 gün boyunca 2,057 ppb düzeyinde AFB1 içeren diyetle beslenen piliçlerin, başta karaciğer ve böbrekler olmak üzere pek çok vücut dokusunda AFB1'e rastlanmıştır (Diaz ve Murcia 2011).

Vücuda alınan AFB1 ortalama %1-2 oranında AFM1'e dönüşerek sütle dışarı atılır. Bu oran hayvandan hayvana, günden güne ve bir sağımdan diğerine değişir. AFM1, AFB1'in gıda ile alınımını takip eden ilk 12-24 saat içerisinde sütte saptanabilir ve birkaç gün içerisinde oldukça yüksek düzeylere ulaşabilir. AFB1 alımı son bulduğunda sütle atılan AFM1 konsantrasyonları giderek azalır ve 72 saat içerisinde saptama limitlerinin altına düşer. Vücuda alınan AFB1 miktarı ile sütle atılan AFM1 arasında doğru orantılı bir ilişki söz konusudur (Mohammadi 2011).

AFB1'in vücuttaki metabolizması Şekil 1'de sunulmuştur (Özkaya ve Temiz 2003).





Şekil 1. AFB1'in vücuttaki metabolizması (Özkaya ve Temiz 2013).

Aflatoxinler insanlar ve hayvanlarda immun sistemi zayıflatır ve başta karaciğerde olmak üzere kansere yol açar (Fink-Grenmels, 1999). Bunlar içinde AFM1, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı [International Agency For Research on Cancer (IARC)] tarafından AFB1 ile birlikte en güçlü karsinojenleri içeren Grup1 içerisinde değerlendirilir. Karsinojenik ve immunsupresif etkilerinin yanı sıra nörotoksik, nefrotoksik, hepatotoksik etkileri de bulunur. Ayrıca, süt ya da süt ürünleri yoluyla AFM1'e maruz kalan bebeklerde düşük vücut ağırlığı, gelişim bozukluğu, bazı yaşamsal organ ve dokuların özellikle merkezi sinir sistemi gelişiminin tamamlanamaması, enfeksiyon hastalıklarına duyarlılık ve metabolizma hızında artış kendini gösterebilir (IARC, 2002, Yentür ve Er 2012, Adejumo ve ark. 2013, Shuaib ve ark. 2010).

### 1.1.2. Aflatoxin M1'in Gıdalarda Bulunuşu ve Yaygınlığı

Toksijenik sporların inhalasyonu veya doğrudan deri ile temasın yanı sıra anneden fütüse kordon kanıyla ya da anneden bebeğe emzirme vasıtasıyla geçişler bildirilmiş olsa da mikotoksinlerin insanlara bulaşmasında en önemli yol, kontamine yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünler ve kontamine besinlerin tüketimidir. Az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde besinlerin yaklaşık %25'inin mikotoksinler ve metabolitleri ile kontamine olabileceği bildirilmektedir (Yentür ve Er 2012).

Bu alanda, dünyanın farklı bölgelerinde pek çok çalışma yapılarak, söz konusu bağlantı açıkça ortaya konulmuştur. Örneğin, Çin'in bir bölgesinde karaciğer kanseri oranının yüksek olmasından hareketle başlatılan bir araştırmada, yörede üretilen mısır ve fıstık yağlarının yüksek oranda AFB1 ile kontamine olduğu saptanmış, çalışmanın ilerleyen aşamalarında, bölgede yaşayan insanlardan alınan idrar örneklerinde AFM1 varlığını ortaya konularak kontamine gıda tüketimi ve kişilerin toksine maruz kalması arasındaki ilişkiye açıklık getirilmiştir (Zhu ve ark. 1987).

Yine Çin'de yürütülen bir başka çalışmada, Yangzte Nehri Delta bölgesinde yer alan 18 mandıradan sağlanan süt örnekleri incelenmiş ve %59,7 oranında AFM1 kontaminasyonu ile karşılaşılmıştır. Ayrıca kış mevsiminde Aflatoksin konsantrasyonunun daha yüksek oranlarda ölçüldüğü belirtilerek mevsimsel farklılığa dikkat çekilmiştir (Xiang ve ark. 2013).

Uzakdoğu'dan Ortadoğu'ya gelindiğinde de durum değişmemiş ve İran'ın merkez bölgesinde hiper marketlerden alınan örneklerden, pastörize sütlerin %71,5' i, UHT sütlerin ise %62,3'ünün AFM1 ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Fallah 2010). Ayrıca diğer bir çalışmada, yine İran'ın merkez bölgesinde büyük marketlerden alınan örneklerden, tereyağın %25,8'inin, yoğurdun %66,1'inin, beyaz peynirin %81,9'unun AFM1 taşıdığı belirtilmiştir (Fallah 2010).

Araştırmacılar yakın dönemde yaptıkları çalışmalarla, Pakistan'ın da süt ve ürünlerinde AFM1 sorunu ile karşı karşıya olduğuna işaret etmişlerdir. Örneğin Pencab şehrinde yürütülen bir çalışmada, incelenen süt örneklerinin %71'i, yoğurtların %61'i, beyaz peynirlerin %78'i, krem peynirlerin %59'u, tereyağların ise %45'inde AFM1 saptanmıştır (Zafar ve Rafique, 2013). Yine Güney Pencab'da 2013-2014 yılları arasında süt örnekleri toplanarak incelenmiş, bunlardan %53'ü AB yasal limitlerini aşmak üzere %93'ünün değişen oranlarda AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir (İsmail ve ark. 2016).

Pek çok Avrupa Ülkesinden de sorunun devam ettiğini gösteren raporlar gelmeyi sürdürmektedir. Örneğin, Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, gerek organik üretim yapan gerekse de geleneksel yöntemle yetiştiricilik yapan çiftliklerden 243 adet süt örneği toplanmış, bunlardan %1,7'sinin AB limitlerini aşan düzeylerde AFM1

taşıdığı belirlenmiştir. Organik örneklerde de toksin kontaminasyonuna rastlanması bu yöntemle yetiştiriciliğin güvenilirliğini tartışmalı hale getirmiştir (Malissiova ve ark. 2013). Yunanistan'da yürütülen bir diğer tarama çalışmasında ise 2009 Kasım'dan Haziran 2010'a kadar, organik sütler ve bebek devam sütleri de dâhil olmak üzere toplam 196 süt örneği toplanarak AFM1 yönünden analiz edilmiş ve %46,5 oranında pozitif sonuç ile karşılaşılmıştır. Her ne kadar sadece iki örnekteki düzey, AB yasal limitlerinin üzerine çıksa da kontaminasyonun yaygınlığı önemli bulunmuştur (Tsakaris ve ark. 2013).

Makedonya'dan bildirilen bir araştırmada, 2013 ile 2014 yılları arasında toplanan 3635 çiğ süt örneğinin %2,9'unun, yasal limitleri aşan düzeyde AFM1 ile kontamine olduğuna işaret edilmiştir. Çalışmada ayrıca yem örnekleri de incelenmiş ve %31,8 oranında AFB1 kontaminasyonu belirlenmiş, buradan hareketle yemden süte taşıma oranı %0,22 – 3,47 olarak hesaplanmıştır (Dimitrieska-Stojkovi ve ark. 2016).

Kosova'nın başkenti Piriştina'da yürütülen bir çalışmada ise 84 pastörize ve 94 UHT olmak üzere toplam 178 süt örneği incelenmiş ve pastörize örneklerin % 83,3'ünün, UHT örneklerin ise %78,7'sinin AFM1 içerdiği gözlenmiştir (Rama 2015).

Hırvatistan'da biraz daha kapsamlı bir araştırma yapılmış ve Haziran - Eylül 2013 dönemi süresince inek, keçi, koyun ve eşek sütleri taranmış, değişen oranlarda AFM1 değerleri ölçülmüştür. Özellikle inek ve keçi sütlerinde belirlenen seviyelerin yasal limitlerin üzerinde olması dikkat çekici bulunmuştur (Bilandžic ve ark. 2014).

Bir yıl sonrasında, Sırbistan'da 2013 ve 2014 boyunca yürütülen bir araştırmada ise 678 çiğ, 438 ısıyla muamele edilmiş süt ve 322 süt ürünü olmak üzere toplam 1438 örnek analiz edilmiş ve çiğ sütlerin % 56,3'ü, ısıyla muamele edilmiş sütlerin % 32,6'sı, süt ürünlerinin ise % 37,8'inin içerdiği AFM1 seviyelerinin, AB limitlerini aştığı ortaya konulmuştur (Tomasevic ve ark. 2015).

Portekiz'de yapılan bir çalışmada, ülkede pazarlanan pastörize ve UHT yarım yağlı süt markalarının tümünü temsil eder nitelikte 40 örnek incelemeye alınmış ve %27,5 oranında AFM1 ile kontaminasyonu ile karşılaşılmıştır (Duarte ve ark. 2013).

Taramalar Güney Amerika'nın da problemle yüz yüze olduğunu göstermiştir. Örneğin, Brezilya'da, Oliveria ve ark. (2013 ) tarafından 2009'un Temmuz ayından Kasım'a kadar yürütülen araştırmada, test edilen 75 UHT süt örneğinden %30,7'sinin AFM1 yönünden pozitif olduğu saptanmıştır. Takip eden yılda yapılan çalışmada ise incelenen çiğ ve konsantre süt örneklerinin yalnızca AFM1 içerdiğini ancak pastörize ve UHT sütlerin AFM1'in yanı sıra AFB1 ile de kontamine olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Buradan hareketle her iki toksinin birden varlığını saptayacak yöntemlerin üzerinde çalışılması gerektiğini savunmuşlardır (Scaglioni ve ark. 2014). Aynı ülkede yapılan bir diğer araştırmada da 152 UHT süt örneği analize alınmış ve bunlardan %87,5'inin AFM1 ile kontamine olduğu görülmüştür (Silva ve ark. 2015)

AFM1 kontaminasyonları Afrika Kıtası'ndan da bildirilmeye devam etmektedir. Bu raporlardan birinde araştırmacılar, Fas' ın Fez şehrinde Ekim 2019 ile Eylül 2010 arasında toplanan çiğ süt örneklerinden, %8'i AB limitlerinin üzerinde olmak üzere toplamda %27'sinin AFM1 yönünden pozitif olduğunu ifade etmişlerdir (Marnissi ve ark. 2012).

Bununla birlikte Adejumo ve ark. (2013), Nijerya'da süt ve süt ürünlerinde AFM1 varlığına ve maruziyet riskine ilişkin verilerin son derece sınırlı olduğuna dikkati çekmişlerdir. Araştırmacılar, ülkenin bazı bölgelerinden elde edilen süt örneklerinde toksinin saptanmadığını, bazılarında ise sütün yanı sıra yoğurt ve dondurma örneklerinde de değişen miktarlarda AFM1 kontaminasyonu bildirmişlerdir.

Kontamine sütlerden elde edilen ürünlerde de dikkati çeken düzeylerde AFM1 ile karşılaşılması, bu toksinden kaynaklanan probleme ayrı bir boyut kazandırmaktadır. Örneğin dondurma bileşimine kontamine süt veya süt tozu eklenmesi halinde, pastörizasyon ya da sterilizasyon gibi ısı uygulamalarından etkilenmeyen toksin, üründe de kendini göstermektedir (Ossa ve ark. 2015). Lee ve Lee (2015), Kore'de yürüttükleri bir araştırma ile kontamine materyalden ürüne taşınmaya örnek teşkil edecek sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmada, aromalı süt, içilebilir nitelikte yoğurt, süt tozu, dondurma ve şerbet örnekleri AFM1 varlığı açısından analize alınmış ve en yüksek AFM1 kontaminasyonun (% 74 ) süt tozunda olduğuna dikkat çekilmiştir. Bunu dondurma (% 36), yoğurt (%14), süt (%6) ve

şerbetin (%6) izlediğini bildirilmiş, ayrıca daha düşük oranlarda da olsa tüm örneklerde AFM2'ye rastlandığı ifade edilmiştir (Donghun ve Kwang-Geun 2015). Ayrıca, Arjantin ve Brezilya'da da süt tozu örneklerinin 0,1'den 0,92 µg/kg'a değişen düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Londoño ve ark. 2013).

Ne yazık ki ülkemizde de gerek süt gerekse süt ürünlerinde AFM1 varlığına ilişkin pek çok makale yayınlanmıştır. Bunlardan birinde Kabak ve Özbey (2012), inceledikleri 40 UHT süt örneğinin %70'inin AFM1 içerdiğini ve ikisindeki kontaminasyon düzeyinin AB yasal limiti olan 0,05µg/l'nin üzerinde olduğunu bildirmiştir.

Adana'da 2012 yılı süresince yürütülen bir araştırmada ise 176 çiğ süt örneği incelenmiş, bunlardan 30'u yasal limitlerin üzerinde olmak üzere 53'ünün ( %30,1) Aflatoksin M1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Golge 2014).

Tekinşen ve ark. (2008) yürüttükleri bir çalışmada beş büyük şehirden (İstanbul, İzmir, Kayseri, Konya, Tekirdağ) elde ettikleri 100 krem peynir örneğinin %99'unun ve 92 tereyağ örneğinin tamamının AFM1 ile kontamine olduğunu ve tereyağ örneklerinin %28'inin, krem peynir örneklerinin %18'inin içerdiği AFM1 seviyelerinin Türk Gıda Kodeksinde (TGK) izin verilen maksimum limitleri aştığını bulmuşlardır.

Yaroğlu ve ark. (2005), inceledikleri 600 peynir örneğinden (200 beyaz peynir, 200 kaşar peyniri, 200 işlenmiş peynir) %1'i TGK'de belirtilen yasal limiti aşmak üzere toplamda %5'inin AFM1 içerdiğini belirtmişlerdir.

Ayçiçek ve ark. (2005), Ankara'da satışa sunulan 223 süt örneğinin (49 peynir, 53 kaşar peyniri, 27 tereyağ) %90,58'inde AFM1 içeriğine rastlamışlar ve %8,52'sindeki AFM1 seviyesininTGK yasal limit değerinin üzerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Kamber (2005), Kars'ta yaptığı bir çalışmada, 30 kaşar ve 30 çeçil peynir örneğini incelemiş ve tamamında AFM1 varlığını tespit etmiştir. Kaşar peyniri örneklerinin%20'sinin ve çeçil peyniri örneklerinin %13'ünün TGK'deki limit değerlerini aştığını raporlamıştır.

Sezer ve ark. (2014) Kars'ta üretilip ambalajsız olarak satışa sunulan 50 adet dondurma örneğini incelemişler ve %100'ünde AFM1 olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte örneklerin %34'ünün TGK'de süt ve süt ürünleri için belirtilen AFM1 yasal limit seviyesini aştığını sunmuşlardır.

Yine Kabak (2012) tarafından yürütülen bir çalışmada, bu kez ülkemizdeki bebek formülasyonlarında saptanan AFM1'e dikkat çekilmiş, benzer tablonun İran, Hindistan, İspanya ve Mısır'daki bebek mamalarında da kendini gösterdiği, literatür ışığında ifade edilmiştir.

### **1.1.3. Tayin Yöntemleri**

#### **1.1.3.1. Klasik Tayin Yöntemleri**

##### **1.1.3.1.a. İnce Tabaka Kromatografisi**

Kromatografi, kimyasal yapıları birbirine yakın çok az miktardaki kimyasal madde veya karışımlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrılmasında kullanılan metodları içerir (Oruç 2005) ve ayrılacak bileşenlerin iki faz arasında dağıtılması prensibine dayanır. Bu fazlardan biri geniş bir yüzey alanına sahip sabit bir yatak oluştururken diğer faz hareketli olup sabit fazın üzerinden ilerler (Hışıl 2004). Cam bir levha üzerine ince bir tabaka halinde ve homojen olarak yayılan sabit (katı) faz için genellikle silikajel, selüloz ve türevleri, nişasta, poliamid ve alüminyum oksit gibi organik ve inorganik maddeler kullanılırken hareketli faz olarak aseton, metanol, hekzan gibi solventler kullanılmaktadır (Oruç 2005).

Kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Klasik ince tabaka kromatografisi ile yapılan mikotoksin analizlerinde analitik işlem basamakları; örnekleme, ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme, yoğunlaştırma, kromatografik separasyon, kalitatif ve kantitatif tayin ve doğrulama testleri şeklindedir.

Ekstraksiyon işleminde “Kloroform-su”, “Metanol-su “ ve “Asetonitril-su” olmak üzere 3 farklı yöntemden yararlanılır. Bu basamaktaki amaç mikotoksinin solventle karşı karşıya gelmesi ve bu maddelerin moleküler düzeyde çarpışmasının sağlanmasıdır. Solvent seçiminde analizi yapılacak mikotoksinin polarlık derecesi göz önünde tutulur. Bu sırada mutlaka solventle birlikte su ilave edilir. Böylece solventin ürün içine girmesi sağlanır. Yoğunlaştırma işlemi ise rotary evaporatörde yapılır. İşlem sonunda aflatoksine ait olan kalıntı, kloroformla yıkanarak vial alınır. Çeşitli

işlemlerden geçirildikten sonra kromatografi işlemine tabi tutuluncaya kadar buzdolabında bekletilir (Var ve ark. 2004).

#### **1.1.3.1.b. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC–High Performance Liquid Chromatography)**

HPLC, mikotoksinler ve mikotoksinler gibi düşük molekül ağırlığına sahip diğer bileşiklerin analizlerinde son yıllarda üzerinde en çok çalışılan yöntemlerden birisidir. HPLC cihazı temel olarak, hareketli faz, pompa, enjektör bloğu, kolon, dedektör kısımlarından oluşmaktadır (Var ve ark. 2004).

- **Hareketli Faz:** Kullanılan çözümler uygulanan kromatografi şekline bağlıdır. Solvent rezervuarının çalışma esnasında ağzının kapalı olmasına özel bir dikkat gösterilmelidir. Buharlaşmadan dolayı hareketli fazın kompozisyonu değişebilir (Hışıl 2004). Aflatoksin analizlerinde hareketli faz olarak genellikle Asetonitril+Su (28+72) kullanılmaktadır Floresan şiddeti, hareketli fazın kompozisyonuna göre değişebilir. Örneğin AFB'ler, kloroform hareketli faz çözeltisinde AFG'lerden daha az floresan verir (Var ve ark. 2004).
- **Kolon:** HPLC cihazında kullanılan kolonlar 4,5-5 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğuna sahiptir ve 5-10µm çaplı sabit faz partikülleri içerir. Paslanmaz çelikten oluşur (Hışıl 2004)
- **Kolon Dolgu Maddesi:** Dolgu maddesi seçiminde tanecik büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynar. Sabit faz olarak genellikle poröz maddeler kullanılmaktadır (Var ve ark. 2004). Kullanılan dolgu maddeleri silika ve alimüna esaslıdır ve şekil olarak gözenekli (poröz), küresel (spherical), düzensiz (irregular), pellicüler (pellicular) ve mikro tiplerindedir (Hışıl, 2004).
- **Dedektör:** HPLC için ideal bir dedektör, geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine ve yüksek seçiciliğe sahip olmalıdır. Aynı zamanda, kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akışındaki bileşiklere duyarlılık göstermelidir(Hışıl, 2004). Aflatoksinler hem normal hem de ters faz sistemlerde, UV absorpsiyon,

floresan ve MS (Mass Spectrometry) dedektörü ile HPLC'de analiz edilebilmektedir. Aflatoksinler yaklaşık 360 nm'de (metanol çözeltisinde) kuvvetli UV absorpsiyonu göstermektedir (Var ve ark. 2004).

Aflatoksinlerin HPLC ile analiz edilmesinde ilk aşama örneğe uygulanacak olan etkili bir ekstrakt temizleme işlemidir. Bu amaçla ekstraksiyonda çözücü olarak klorofomun kullanıldığı ve sadece yer fıstığı, yağlı tohumlar ve tahıl ürünlerinde uygulama imkânı bulan CB (Contamination Branch) ve ekstraksiyonda çözücü olarak metanol/hegzan karışımının kullanıldığı BF (Best Foods) (Mahindru 2009) yöntemleri ile son yıllarda daha popüler olan immunoaffinite kolon uygulamasından yararlanılır.

- Immunoaffinite kolonla örnek hazırlama: Ekstrakte edilen örnekten alınan 10 ml filtrat immunoaffinite kolona aktarılır. Kolonun çıkışına bir toplama kabı konulur. Kolonu yıkamak için 2 defa 10 ml distile su kolondan geçirilir. Son olarak aflatoksinleri kolondan almak için 1 ml metanol uygulanır ve aflatoksinler kolondan alınır. Mikroenjektör vasıtasıyla örnek cihaza enjekte edilir ve örneğe ait kromotogram alınır. İkinci olarak aflatoksin standartı enjekte edilir ve standartta ait kromotogram alınır. Kromotogramlardaki alıkonma zamanlarına bakılarak kalitatif ve kantitatif tayin yapılmaktadır.

Son yıllarda aflatoksin analizlerinde çok sık kullanılan HPLC cihazının bazı dezavantajları da bulunmaktadır:

- HPLC cihazının hassasiyetinin yüksek olmasından dolayı, örneklere etkili bir ekstrakt temizleme işleminin yapılması gerekir.
- Bir kerede sadece bir örnek analiz edilebildiğinden, otomatik enjeksiyon sistemi olsa bile çok sayıda örnek kısa sürede analiz edilemez.
- Cihazın pahalı olması ve kullanımı için iyi yetişmiş teknik elemana ihtiyaç duyulmaktadır (Var ve ark. 2004).

#### **1.1.3.1.c. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

ELISA, antijen-antikor reaksiyonlarının direkt olarak saptandığı bir enzim immunoassay yöntemidir (Var ve ark. 2004). Metotta katı yüzeylere bağlanmış az



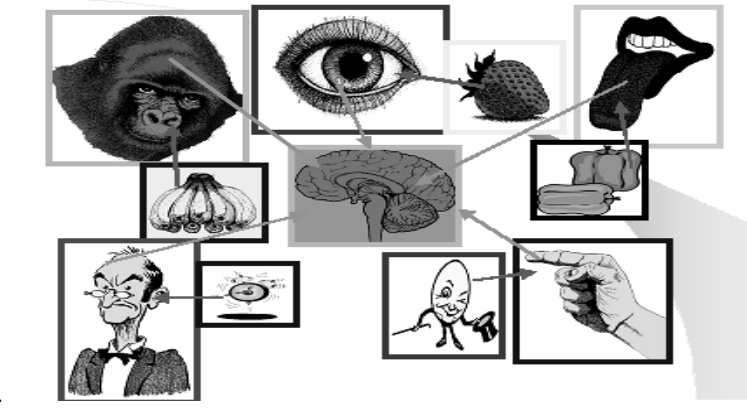
miktarda antikor ile örneklerde bulunan toksin ve toksin ile işaretlenmiş enzimlerin bağ oluşturma mücadelesi esas alınır (Oruç 2004). Mikotoksinler antijenik özellik göstermezler, onlara bu niteliği kazandırmak için bir protein veya polipeptid zincirine bağlanmaları gerekir. Bu amaçla protein olarak genellikle serum albumini, gamma globulin ve polilizin kullanılmaktadır. Aflatoksinler reaktif gruplara sahip değildirler ve bu nedenle reaktif karboksil veya başka bir grubun öncelikle toksin molekülüne bağlanması gerekmektedir.

Antijenler antikorlara hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve Vander Wals güçleri gibi kovalent olmayan bağlarla geri dönüşümlü olarak bağlanırlar.

Mikotoksin analizlerinde antijenlerin işaretlenmesinde genellikle peroksidaz ve alkalifosfotaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu enzimlerle reaksiyon veren birçok substrat reaksiyon sonucunda renkli maddeler oluşturarak reaksiyon sonucunun gözle saptanmasına olanak tanırırlar (Var ve ark. 2004). Kullanılan substratla etkileşim sonucu meydana gelen renkli madde miktarının toksin miktarı ile ters orantılı olması temel alınarak hesaplama yapılır (Oruç 2004).

#### **1.1.3.1.d. Biyosensörler**

Tüm canlılar, yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmaktadır. Canlılar, teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı göstermektedirler. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100 000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlarlar. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekül bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdırlar. Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri oluşturmaktadır (<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensorkav.html>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2016).

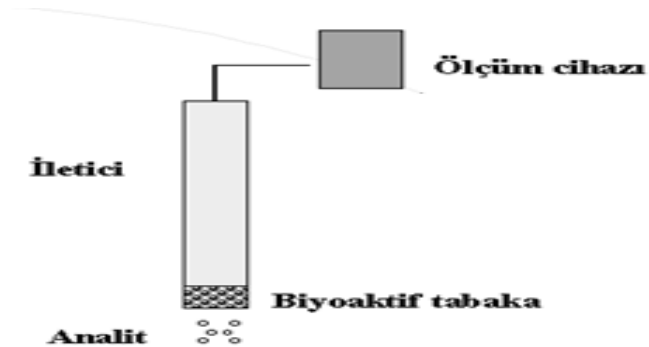


**Resim 1.** Canlıların doğadaki olayları algılama yetenekleri  
(<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensorkav.html>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2016)

Fiziksel bir özelliği belirleyerek kaydeden cihaza sensör, biyolojik sistemle kombine edilen sensörlere ise biyosensör ismi verilmektedir. Biyosensörler, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimlik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirildiği biyoanalitik cihazlardır.

Biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürüldüğü bu sistemler, Biyosensörler biyolojik (reseptör) ve fiziksel (transducer) olmak üzere iki komponentten oluşur.

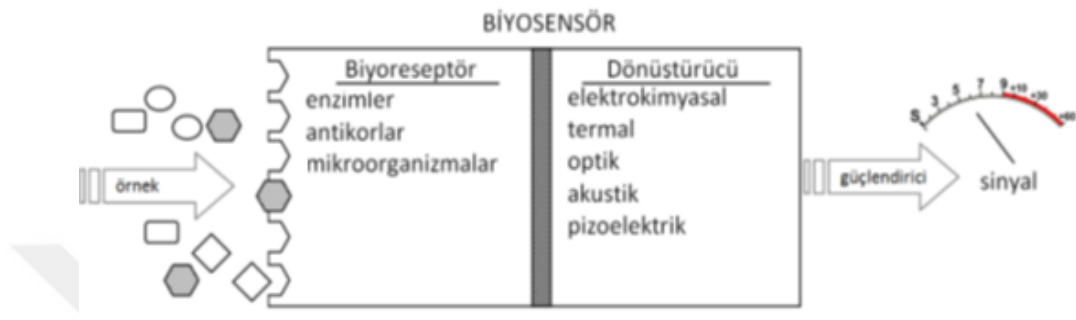
(<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensorkav.html>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2016)



**Şekil 2.** Bir biyosensörün genel şematik gösterimi  
(<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2016)

Biyosensörlerde analiz edilecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılmaktadır. Biyoreseptörler analiz edilecek maddeyi dönüşüme uğratar.

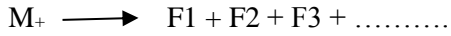
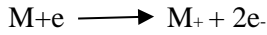
Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler (<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>, Erişim tarihi: 5 Şubat 2016).



Şekil 3. Bir biyosensör sisteminin çalışma prensibi (Chambers 2008)

### 1.1.3.1.e. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometreleri, yüklü partiküllerin manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken diğer yüklü partiküllerden kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre ayrılmaları prensibine göre çalışırlar. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler.

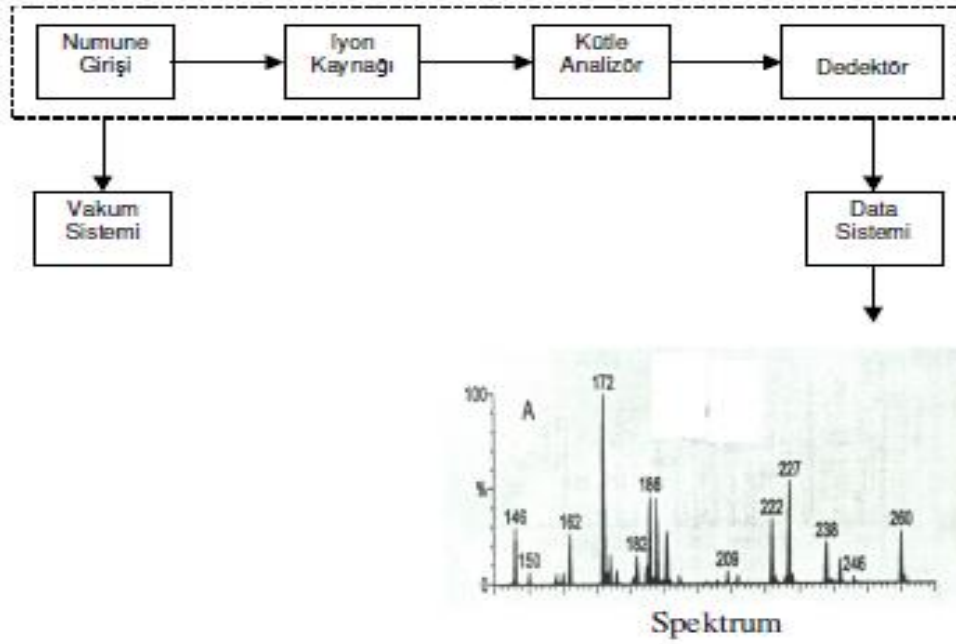


M: Molekül

$M^+$ : Moleküler iyon

F: Fragment

Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşimin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır (Biberoğlu 2003).



**Şekil 4.** Kütle spektrometresinin bölümleri (şematik olarak) (Biberoğlu 2003).

İnce tabaka kromatografisi ve HPLC yöntemleri, uzun zamana gereksinim duyulması, örneğin kapsamlı bir ekstrakt temizleme işlemini gerektirmesi ve çok fazla miktarda solventle çalışılması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. ELISA yönteminin ise basit olması, kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, fazla solventle çalışılmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Buna karşın, mikotoksinlerin ürüne homojen bir şekilde yayılmamasından dolayı, ELISA yönteminde az miktarda örnek kullanılması en önemli sorunu oluşturmaktadır.

Mikotoksinlerin doğru, hızlı, etkin ve pratik bir şekilde ölçümlerini sağlamak amacıyla yeni yöntem araştırmaları ya da var olan metotlarda modifikasyon çalışmaları devam etmektedir (Var ve ark. 2004).

### 1.1.3.2. Yeni Gelişmeler

AFM1'in saptanması amacıyla kullanılan yöntemlerde temizleme veya zenginleştirme tekniği, önemli bir basamak olarak görülmektedir. Bu doğrultuda çoklu fonksiyona sahip temizleme kolonları ve immunoaffinite kolonları (IAC) en çok tercih edilenler arasındadır. OASIS HLB kartuşları da bazı araştırmacılar tarafından HPLC ve MS'nin

kombine edildiği teknikler kapsamında sütteki mikotoksinlerin temizlenmesi amacıyla kullanılmış ve sonuçlar tartışmaya açılmıştır. Wang ve ark. (2012), bu çalışmaları takip ederek OASIS HLB kartuşlarını optimize ve valide etmeye yönelik bir araştırma yürütmüş ve bunun sonucunda OASIS HLB’de SPE (Solid Phase Extraction) ve FLD (Fluorescence Detector) ile birlikte HPLC kullanarak uygulaması kolay ve uygun maliyetli bir metod geliştirmişlerdir.

Bacher ve ark. (2012), sütte bulunan AFM1’in saptanabilmesi amacıyla gümüş kablo elektrotu temeline dayanan bir immunosensor sistemi geliştirmişler ve bu alanda kullanılan ELISA ve kromatografik analizlere yüksek duyarlılığı sayesinde iyi bir alternatif olarak sunduklarını ifade etmişlerdir.

Larou ve ark. (2013), AFM1’in saptanmasına yönelik olarak BERA (Bioelectric Recognition Assay) temeline dayanan hızlı ve yeni bir biyosensör sistemini geliştirmeyi amaçladıkları çalışmalarında, toksinin en düşük konsantrasyonlarında dahi üç dakika gibi çok hızlı bir zaman diliminde başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sonuç olarak yöntemin bugün için bilinen diğer biyosensör temelli yöntemlere göre daha duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Çeşitli gıda maddelerinde AFM1’in izlenmesi ve takibinin yapılması amacıyla kullanılan yöntemlerde basitlik, yüksek saptama duyarlılığı ve yüksek verimlilik aranan en önemli özelliklerdir. Floresan dedektörlerin kullanıldığı HPLC ve ELISA rutin analizlerde yararlanılan başlıca tekniklerdir. Ancak bilindiği üzere HPLC kompleks bir uygulamadır oldukça uzun bir zaman gerektirir. Çok fazla enstrümandan yararlanır ve maliyeti yüksektir. Bununla birlikte ELISA bu olumsuzluklardan hiçbirini taşımaz. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan standart yöntemdir. Pratik ELISA formatları arasında en yüksek duyarlılığa sahip olanı, ECR (Enhanced Chemiluminescent-CL) reaksiyonunda peroksidaz işaretli immün ayaçların enzim aktivitesinden yararlanan yöntemdir. Bu reaksiyonun prensibi; geliştiricilerin (enhancer) varlığında luminolun hidrojen peroksit tarafından oksidatif olarak katalize edilmesi temeline dayanır. Vdovenko ve ark. (2014), bu çerçevede CL-ELISA yönteminin AFM1 saptanmasındaki etkinliğini arttırmak amacıyla geliştirici olarak 3 - (10'- phenothiazinyl)-propane-1-sulfonate (SPTZ) ve 4-morpholinopyridine (MORPH) karışımından yararlanmışlar ve etkili sonuçlar elde etmişlerdir.

Taherimaslak ve ark. (2014), süt örneklerinde AFM1'in saptanması amacıyla geliştirdikleri yöntemde, adsorban olarak modifiye manyetik nanopartiküller kullanmış, floresan geliştirici olarak da  $\beta$ -Cyclodextrin'den yararlanmışlar. Araştırmacılar, SPE (solid phase extraction) ve spektrofometrinin bu yeni tekniğin, klasik SPE'de bir dezavantaj olarak görülen kolondan geçirerek separe etme süresini yaklaşık olarak 15 dakika kadar kısalttığını, uygulamasının kolay ve maliyetinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Mulunda ve Mike (2014), sütte AFM1'in daha etkin biçimde saptanabilmesi amacıyla IAC ile temizleme prosedürü uygulamışlar ve CoBrA cell ile birlikte sıvı kromatografisi kullanarak analiz gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, kullandıkları bu yeni yöntemin başarılı sonuç verdiğini ancak pahalı olduğunu belirtmişlerdir.

AFM1'in saptanması amacıyla kullanılan yöntemler arasında immunokromatografi, uygulama kolaylığı, hızı ve düşük maliyeti nedeniyle son zamanlarda daha fazla tercih edilir hale gelmiştir. İmmunomanyetik nanobilyeler ise (IMB), analizin duyarlılığını arttırmak üzere, zenginleştirme ve mıknatısla analitik ayırma basamakları sırasında kullanılan bir ön işlem materyalidir. IMB aynı zamanda immunokromatografide de işaretli materyal olarak kullanım alanına sahiptir. Huang ve ark. (2014), belirtilen tekniklerin literatürdeki uygulamaları ve elde edilen sonuçlardan hareketle, IMB temeline dayanan analiz metodu ile zenginleştirme ve immunokromatografiyi (IMB-EIC) bir araya getirerek yeni bir metot tasarlamışlardır. Öne sürülen bu yeni yöntemde, anti - aflatoxin M1 antikoruyla kaplı immunomanyetik nanobilyeler, EDC/NHS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimide/N-hydroxy-succinimide) metoduyla sentezlenmiş ve immunokromatografik strip, konjugat pedi, örnek pedi, adsorban ped ve nitroselüloz membran ile birleştirilmiştir. Nitroselüloz membran; test satırları için aflatoxin M1 – BSA, kontrol satırları için de eşek-anti fare antikorlarıyla spreylemiştir. Saptama işleminde, AFM1'in zenginleştirilmesi ve separe edilmesi amacıyla immunomanyetik nanobilyeler örnekle karıştırılmış, ardından zenginleştirme solüsyonu immunokromatografik strip ile incelenmiştir. Araştırmacılar, işlem sırasında diğer mikotoksinlerle çapraz reaksiyonların meydana gelmediği ve ELISA ile uyumlu bir

şekilde çalışma potansiyeline sahip olması nedeniyle, uyguladıkları bu yeni tekniği, sütte AFM1'in hızlı bir şekilde saptanmasında iyi bir yöntem olarak ileri sürmüşlerdir.

Huang ve ark. (2015), süt örneklerinden AFM1'in ekstraksiyonu ve saptanması amacıyla HF- LPME (Hollow Fiber – Liquid Phase Microextraction) ile LC-MS/MS (Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry) yöntemlerini birleştirerek kullanmışlar, ekstraksiyonun verimliliğini etkileyen parametreleri değerlendirmişler ve elde ettikleri bulgular ışığında, öne sürdükleri yöntemin AFM1 analizleri için yüksek derecede spesifik özellik gösterdiğini belirtmişlerdir.

AFM1'in saptanması amacıyla çok çeşitli tekniklerden yararlanılmakla birlikte HPLC ve bunu takip eden FL (Fluoremetry) veya MS (Mass Spectrocopy) altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu standart yöntemin çok zaman alması, maliyetinin yüksek olması ve laboratuvarlarda uygulama alanının sınırlı olması araştırmacıları yeni metodlar geliştirmeye teşvik etmektedir. Bununla birlikte yeni geliştirilecek olan yöntemin hızlı, güvenilir, doğru, kesin sonuçlar vermesi ve çok düşük miktarları dahi her zaman aynı doğrulukta saptayabilir olması çalışmaların önünde aşılması gereken engeller olarak varlığını sürdürmektedir. Kullanılan teknik her ne olursa olsun, düşük konsantrasyonlardaki Aflatoksinlerin çeşitli gıda ortamlarında saptanabilmesi için örneğin konsantre edilmesi bir gerekliliktir. Bugüne kadar Aflatoksinlerin çeşitli matrislerden ekstrakte ve konsantre edilmeleri amacıyla pek çok yöntem denenmiştir. DLLME (Dispersive Liquid Liquid Microextraction) bu doğrultuda değerlendirilen yollardan biridir ve ilk kez Rezaee ve ark. (2006), tarafından denenip önerilmiştir. Ancak yöntemin pek çok dezavantajı bulunmaktadır. Bu nedenle yeni bir çalışma tasarlanmış ve bu dezavantajlar ortadan kaldırılmıştır. LDS (Low-Density Solvent) – DLLME'yi takip eden VA-D-SPE (Vortex-Assisted-Dispersive Solid Phase Extraction) uygulamalarını içeren bu yeni yöntemle etkin, basit ve hızlı bir şekilde doğru sonuçlar elde edilmiştir (Amoli-Diva ve ark. 2015).

Günümüzde immunoaffinite kolonla temizleme yöntemiyle birlikte kullanılan HPLC seperasyonu ve floresanla saptama, AFM1'in rutin analizlerinde halen en sık kullanılan kantitatif yöntemlerden biridir. Mao ve ark. (2015), geleneksel HPLC'deki kromatografi kolonlarını 2,6 µm çaplı core-shell partiküllerle doldurup enstrumantal koşulları optimize ederek, tamamen poröz kolonların kullanıldığı geleneksel yöntemle

göre analiz performansını daha yüksek bir seviyeye çıkarmışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda, klasik yöntemdeki, ultra yüksek basıncı sağlayan enstrümanlardan kaynaklananyüksek maliyetin de önüne geçtiklerini belirtmişlerdir. Bu yeni deneme ile enstrüman duyarlılığının artırılmış olması, örnek hazırlamayı da daha basit hale getirmiştir.

Ossa ve Peñuela (2015), dondurma örneklerinde AFM1'in selektif olarak saptanabilmesi amacıyla UHPLC-MS/MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) tekniğini kullanarak duyarlılığı yüksek bir yöntem geliştirmişler ve bu sayede çalışılan örneklerdeki AFM1 düzeylerinin AB yasal düzenlemelerinde belirtilen seviyelerle doğru ve etkin biçimde karşılaştırma olanağı elde etmişlerdir.

Busman ve ark. (2015), süt örneklerinde AFM1'in kantitatif olarak saptanması amacıyla DART (Direct Analysis in Real Time) iyonizasyon tekniğini MS (High Resolution Mass Spectrometer) ile birleştirerek kullanmışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri bulgular ışığında, DART tekniğinin, kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanımının, süt gibi mikotoksinler açısından çalışması zor matrislerde duyarlı, güvenilir ve hızlı sonuçlar verdiğini ifade etmişlerdir.

Lee ve Lee (2015), çeşitli süt ürünlerinde AFM1 ve AFM2'nin varlığını ortaya koymak amacıyla HPLC – FD (High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence Detector) tekniğinden yararlandıkları çalışmalarında, örnek hazırlama aşamasında brominasyon ve trifloro asetik asit türevlendirme yöntemlerini karşılaştırmışlar ve brominasyon seçeneğinin daha etkin sonuç verdiğini bildirmişlerdir (Donghun ve Kwang-Geun 2015).

Peynirde aflatoksin M1 ekstraksiyonu genellikle klorlu organik çözücüler kullanılarak yapılır. Ancak, sert yapılı peynirler rendelenseler dahi klorlu çözücüler içerisinde tam olarak yapılarını kaybetmemekte hatta zaman zaman çalkalama sırasında küçük boyutlu çöküntüler oluşabilmektedir. Bu da AFM1 ekstraksiyonunda yöntemin güvenilirliğine gölge düşürmektedir. Bu sorunu gidermek amacıyla AFM1'in EA (Enzyme-Assisted) ekstraksiyonunu takiben IA kolonunu kullanarak ekstraktın temizlenmesi aşamalarını içeren ve devamında HPLC-FLD tekniğini



uygulandığı yeni bir yöntem denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Pietri ve ark. 2016).

Zhang ve ark. (2016), sütte AFM1 varlığını tespit etmek amacıyla FM – ICTS (Fluorescent Microsphere Immunochromatographic Test Strip) yöntemini geliştirmişler ve bu amaçla ultrasensitif anti-AFM1 monoklonal antikor (MAb) 1D3'ü hazırlayıp tanımlamışlardır. Monoklonal antikor karboksilat-modifiye floresan mikrosferlerle kovalent olarak konjuge edilmiş ve yarışmalı immunokromatografi analizinde işaretlemeye kullanılmıştır. Antijen kaplamada haptent-protein çifti oranının orta düzeyde tutulması immunoassay duyarlılığını arttırmıştır. Araştırmacılar sonuç olarak FM-ICTS tekniğinin sütte AFM1 varlığının saptanmasında uygulaması kolay, hızlı, yüksek duyarlılığa sahip ve spesifik olduğunu savunmuşlardır.

#### **1.1.4. AFM1'in Toksisitesi ve Oluşturduğu Hastalıklar**

AFB1, memeliler için bilinen en güçlü hepatokarsinojen olup, IARC tarafından 1A kategorisinde karsinojen olarak sınıflandırılmaya alınmıştır (IARC 2002). Aflatoksin B1'in metaboliti olan aflatoksin M1 ise insanlar için muhtemel karsinojen olarak gruplandırılmış ve Grup 2B sınıfında yer almıştır (IARC 1993). Daha sonra yapılan yeni bir sınıflandırma ile süt toksini olarak da isimlendirilen AFM1, en güçlü karsinojenleri içeren Grup 1 içerisinde yeniden değerlendirilmiştir (IARC 2002).

AFB1'in toksik ve karsinojenik etkileri için temelde hedef organlar karaciğer ve böbrek olmakla birlikte intestinal tümörlere de neden olabildiği bildirilmektedir. Farklı hayvan türlerinde yapılan deneysel çalışmalar, hepatotoksik, hepatokarsinojenik ve teratojenik etkileri açıkça ortaya koymuştur (Yentür ve Er 2012).

Genel olarak AFB1'in monohidroksile metabolitleri detoksifiye edilmiş olarak kabul edilir. Ancak AFM1 bu kapsamda değerlendirilemez. Yapılan deneysel çalışmalar AFM1'in sitotoksik ve karsinojenik etkilerinin yanı sıra karaciğer ve böbrek lezyonlarının, AFB1 ile benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Diaz ve Murcia 2011).

Bunun yanında, süt yoluyla AFM1 ya da yan ürünlerine maruz kalan bebeklerde düşük vücut ağırlığı, gelişim bozukluğu, bazı yaşamsal organ ve dokuların

özellikle merkezi sinir sistemi gelişiminin tamamlanamaması, enfeksiyon hastalıklarına duyarlılık ve metabolizma hızında artış kendini gösterebilmektedir (IARC, 2002, Adejumo ve ark. 2013, Shuaib ve ark. 2010).

#### 1.1.5. AFM1'in Stabilitesi ve Redüksiyonu

Süte uygulanan sıcaklık işlemlerinden etkilenmeyen ve bu özelliği ile halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturan AFM1'in yıkımlanabilmesi için çok sayıda araştırma yürütülmüştür. Bu kapsamda Kabak ve Ozbey (2012), probiyotik bakteriler (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species* 420, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* NFCM 150B, *Lactobacillus casei*, *Shirota*, *Lactobacillus rhamnosus*) varlığında AFM1 biyoerişebilirliğinin % 15,5 - 31,6 oranında azaldığını ortaya koymuştur.

Bir diğer çalışmada ise laktik asit bakterilerinin farklı suşlarının (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 20552, *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 541, *Lactobacillus plantarium*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*) ve bifidobakterilerin varlığında (*Bifidobacterium angulatum* DSMZ 20098), yoğurttan AFM1'in indirgenebilirliği incelenmiş, kontamine sütle üç farklı uygulama gerçekleştirilmiştir. Araştırmada en başarılı sonuç %50 yoğurt kültürü (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*) ve 50% *Lactobacillus plantarium* ile elde edilen yoğurtta görülmüştür (Elsanhoty ve ark. 2014).

Govaris ve ark. (2002), 0,05 ve 0,1 µg/l konsantrasyonlarında AFM1 inokule edilen yoğurtta 4 hafta boyunca 4°C'de pH 4 - 4,6 değerlerinde AFM1'in stabilitesini incelemişlerdir. pH 4,6'da AFM1 değerlerinin önemli ölçüde değişmediğini ancak pH 4,0'da depolamanın üçüncü ve dördüncü haftalarında AFM1'in her iki konsantrasyon seviyelerinde düşüş olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar AFM1 konsantrasyonlarındaki bu düşüşün düşük pH'dan, organik asitlerin oluşumundan ya da fermentasyonun diğer yan ürünlerinden hatta *Lactobacillus* türlerinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (Govaris ve ark. 2002).

Carraro ve ark. (2014), sığır sütlerinde AFM1 oranını azaltmak için kilden yararlanmayı denemişlerdir. Bu çalışmada, yemeklik yağlarda saflaştırma işleminde ağartıcı olarak ve bira, şarap, maden suyu, meyve suyu üretiminde berraklaştırıcı

olarak kullanılan bentonitin, sığır sütündeki AFM1 değerlerini (yaklaşık 80ng/l'ye kadar) güvenilir seviyeye kadar (yetişkinler için 50ng/l, süt emen çocukları için 0,25ng/l) düşürdüğünü tespit etmişler ve sütün besinsel değerlerinde önemsiz değişikliklere yol açtığını gözlemlemişlerdir (Carraro ve ark 2014; Kayır 2007).

Catteneo ve ark. (2013), Ricotta peyniri üretiminde açığa çıkan peynir altı suyunda ve proteinden arındırılmış peynir altı suyunda AFM1'in stabilitesini incelemişlerdir. Ricotta peyniri üretimi sırasında AFM1'in % 94'ü atık peynir altı suyuyla uzaklaştırılmış, sadece %6'sı pıhtıda kalmıştır. Daha sonra peynir altı sularına ultrafiltrasyon ve püskürtmeli kurutma işlemleri uygulanmış ve başarılı sonuç elde edilmiştir.

#### **1.1.6. AFM1'e İlişkin Yasal Düzenlemeler**

Ülkemizde ve bazı dünya ülkelerinde süt ve süt ürünlerinde AFM1'in maksimum limitleri Tablo 1'de sunulduğu gibidir.

**Tablo 1.** Süt ve süt ürünlerinde AFM1'in maksimum limitleri (Oliveria ve ark. 2013, Iqbal ve ark. 2015, Mohammadi 2011, T.C. Resmî Gazete, 29 Aralık 2011, sayı: 28157).

ÜLKE	SÜT ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	SÜT ÜRÜNLERİ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
<b>TÜRKİYE</b>	0,05 (Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt) 0,025 (Bebek sütleri ve devam sütleri)	-
<b>ABD</b>	0,50	0,50
<b>AB<sup>a</sup></b>	0,05	0,05
<b>AVUSTURYA</b>	0,05 ( 0,01-pastörize bebek sütü)	0,02 (Tereyağ) 0,25 (Peynir) 0,4 (Süt tozu)
<b>FRANSA</b>	0,05 (0,03-3 yaş altı çocuk için)	-
<b>İSVİÇRE</b>	0,05	0,025 (Peynir altı suyu ve ürünleri) 0,25 (Peynir) 0,02 (Tereyağ)
<b>BULGARİSTAN</b>	0,50	0,10 ( Süt tozu)
<b>BREZİLYA</b>	0,50	5,0 (Süt tozu )
<b>ÇEK CUMHURİYETİ</b>	0,05	-
<b>ROMANYA</b>	0	0
<b>ARJANTİN</b>	0,05	0,50 (Tüm süt ürünleri)
<b>HONDURAS</b>	0,05	0,25(Peynir)
<b>MISIR</b>	0	0
<b>NİJERYA</b>	1	-
<b>İRAN</b>	0,50	-
<b>KORE</b>	0,5 $\mu\text{g}/\text{l}$	-
<b>FAS</b>	0,05 0,03 (Üç yaşın altındaki çocuklarda)	0,05 0,5 (Süt tozu) 0,03 (Süt tozu – üç yaşın altındaki çocuklarda)
<b>AVUSTRALYA</b>	0,02 (Çocuk sütlerinde)	-

a: AB ülkeleri genel

Yukarıda sunulan literatür bilgisi ışığında hazırlanan bu tez çalışması ile, Kars ilinde yetiştirilen çiftliklerdeki ineklerden sağlanan çiğ sütlerde AFM1 seviyelerini belirlemek ve tüketici sağlığına hangi boyutlarda etki edebileceğini belirlemek amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Süt Örnekleri

Bu çalışmada Kars İlinin merkezine ve farklı ilçelerine bağlı köylerde yetiştiricilik yapan üreticilerden sağlanan 88 adet çiğ süt örneği araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Soğuk zincirle aseptik şartlarda laboratuvara getirilen örnekler, falkon tüplerine alınarak -18°C’de dondurulmuş ve muhafaza edilmiştir. Sütler, analizden önceki gün 4°C’ye alınarak çözündürme işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### 2.1.2. Aflatoksin Test Kiti

Sütlerde AFM1 varlığını kantitatif olarak test etmek amacıyla Helica marka (961AFLM01M-96) ELISA Test Kitinden yararlanılmıştır. Kit içeriği Tablo 2’de sunulduğu gibidir.

**Tablo 2.** ELISA Test Kitinde bulunan materyaller

Sayı	Bileşimler	Renk	Tanım
1 poşet	Antikorlu mikrokuyucuklu pleyt		96 kuyucuk
6 tüp	AFM1 standartları		Belirtilen konsantrasyonlarda Toplam 3.0 mL/tüp Aflatoksin M1: stabilize yağsız süt içerisinde 0.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 pg/ml (ppt)
1 şişe	Aflatoksin HRP konjugatı	Yeşil kapak	Koruyucusuyla birlikte tampon çözeltisinde yabanturpu peroksidaz enzimine bağlı 15 mL aflatoksin, <i>Kullanıma Hazır</i>
1 şişe	Substrat ajanı (reagent)	Mavi kapak	15 mL stabilize ure peroksit ve tetrametilbenzidin (TMB) – <i>Kullanıma Hazır</i>
1 şişe	Sonlandırma (durdurma) çözeltisi	Kırmızı kapak	15 mL Asit Çözeltisi, <i>Kullanıma Hazır</i>
1 poşet	Yıkama tamponu		PBS ile birlikte 0.05% Tween20® , saf su ekleyerek 1 l’ ye tamamla ve buzdolabında beklet
1 şişe	AFM1’den arındırılmış yağsız süt	Beyaz kapak	15 mL yağsız süt

#### 2.1.3. Aletler

- ✓ ELISA okuyucusu (BioTek - Epoch)
- ✓ Mikropleyt Yıkayıcısı (Thermo-Scientific)

#### 2.1.4. Kit Haricinde Kullanılan Malzemeler

- ✓ Falkon Tüpü
- ✓ Falkon Tüp Standı
- ✓ Mikropipetler ve uçları

#### 2.2. Metot

Çiğ süt örneklerinde AFM1 analizi Enzim Immünassay yöntemlerinden ELISA test tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem örneklerdeki AFM1 seviyelerinin kantitatif olarak ölçümünü sağlamaktadır. Testin ana prensibini antijen-antikor reaksiyonu oluşturmaktadır. Polistiren mikrokuyucuklarda AFM1'e yüksek eğilim (affinite) gösteren antikorlar bulunmaktadır.

##### 2.2.1. Yöntemin Uygulanışı

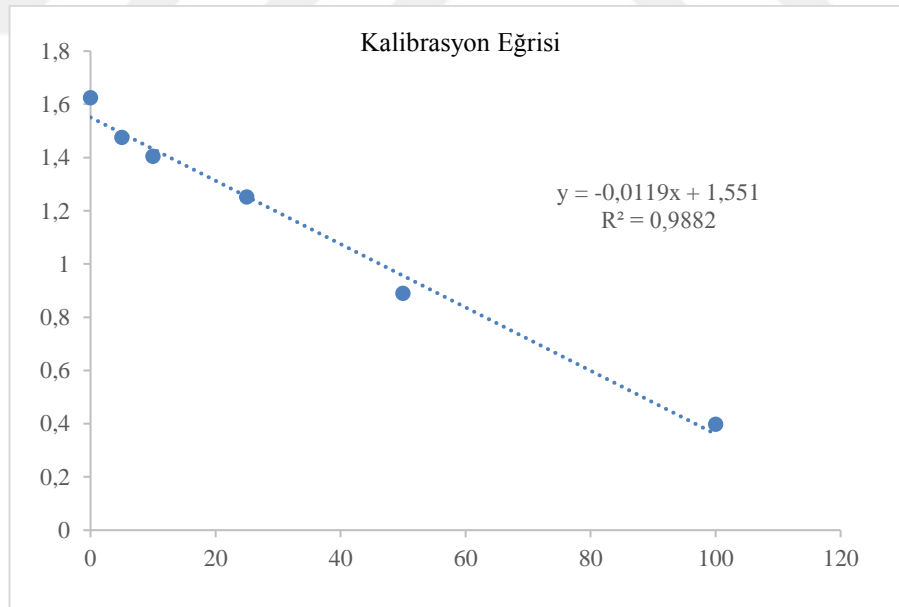
Çalışmada, kitin üretici firması tarafından gönderilen kitapçıkta belirtilen basamaklar izlenmiştir. Buna göre öncelikle standart ve örnekler, antikorla kaplı mikrokuyucuklara eklenmiş, ardından 2 saat oda sıcaklığında (19°C- 25°C) inkübe edilmiştir. Yöntemin işleyiş mekanizmasına göre bu süre zarfında standart ve örnekler içeriyorsa örneklerde bulunan AFM1'in, kuyucukların kaplı olduğu antikorlara bağlanması beklenmiştir. İnkübasyon bitiminde mikrokuyucuklar PBS ile yıkanmış ve Yabanturba peroksidaz enzimine (HRP) bağlı aflatoksin ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. İnkübasyon süresince, standart ve örnekte bulunan AFM1 tarafından bağlanmayan serbest antikorların, söz konusu enzimle etkileşime geçmesi beklenmiştir. Bu işlem sonunda kuyucuklar boşaltılıp PBS ile yıkanmış ve akabinde enzim varlığında mavi bir renk oluşturan HRP substratı eklenmiştir. Yöntemin mekanizması, oluşan mavi rengin yoğunluğunun, bağlı konjugatın miktarı ile doğru orantılı iken standart ve örnekteki AFM1'in miktarıyla ters orantılı olması, başka bir deyişle örnek ve standarttaki AFM1 konsantrasyonunun yükselmesi halinde, mavi rengin yoğunluğunun azalması temeline dayandığından, testin son aşamasında, asidik durdurma çözeltisi ilave edilmiş ve kromojenin renginin maviden sarı tona döndüğünün izlenmesini takiben, mikrokuyucuklar 450 nm'de okunmuştur. Numunelerden elde edilen absorbans değerleri kit standartlarıyla karşılaştırılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

### 3. BULGULAR

ELISA test kiti içeriğinde yer alan standartların uygulama sonucunda verdikleri absorbans değerleri Tablo 3'te, buna göre miktar hesaplamalarında kullanılmak üzere hazırlanan kalibrasyon eğrisi ise Grafik 1'de sunulmuştur

**Tablo 3.** ELISA AFM1 Standartları ve verdikleri absorbans değerleri.

Konsantrasyon (ppt (ng/l))	Absorbans
0	1,625
5	1,475
10	1,405
25	1,252
50	0,89
100	0,398



**Grafik 1.** Kalibrasyon eğrisi

Araştırma sırasında incelenen süt örneklerinin ELISA test sonuçları Tablo 4'te listelenmiştir.

**Tablo 4.** Çiğ süt örneklerinin ELISA’da verdikleri absorbands değerleri ve AFM1 Konsantrasyonları.

Örnek No	Absorbans	Konsantrasyon (ppt - ng/l)	Örnek No	Absorbans	Konsantrasyon (ppt - ng/l)
1	0,477	90,25	34	1,052	41,93
2	0,539	85,04	35	1,058	41,43
3	0,544	84,62	36	1,063	41,01
4	0,553	83,87	37	1,071	40,34
5	0,611	78,99	38	1,075	40
6	0,614	78,74	39	1,075	40
7	0,617	78,49	40	1,101	37,82
8	0,64	76,55	41	1,134	35,04
9	0,67	74,03	42	1,145	34,12
10	0,672	73,87	43	1,174	31,68
11	0,683	72,94	44	1,176	31,51
12	0,686	72,69	45	1,194	30
13	0,698	71,68	46	1,228	27,14
14	0,7	71,51	47	1,242	25,97
15	0,711	70,59	48	1,243	25,88
16	0,724	69,5	49	1,261	24,37
17	0,729	69,08	50	1,268	23,78
18	0,737	68,4	51	1,322	19,24
19	0,76	66,47	52	1,33	18,57
20	0,783	64,54	53	1,333	18,32
21	0,786	64,29	54	1,333	18,32
22	0,8	63,11	55	1,334	18,24
23	0,817	61,68	56	1,349	16,97
24	0,849	58,99	57	1,361	15,97
25	0,866	57,56	58	1,362	15,88
26	0,913	53,61	59	1,362	15,88
27	0,916	53,36	60	1,362	15,88
28	0,945	50,92	61	1,365	15,63
29	0,954	50,17	62	1,369	15,29
30	0,977	48,24	63	1,381	14,29
31	1,017	44,87	64	1,408	12,02
32	1,029	43,87	65	1,409	11,93
33	1,037	43,19	66	1,417	11,26



**Tablo 4 devam.** Çiğ süt örneklerinin ELISA’da verdikleri absorbands değerleri ve AFM1 Konsantrasyonları.

67	1,418	11,18	78	1,538	1,09
68	1,419	11,09	79	1,64	0
69	1,421	10,92	80	1,613	0
70	1,431	10,08	81	1,687	0
71	1,434	9,83	82	1,631	0
72	1,444	8,99	83	1,597	0
73	1,491	5,04	84	1,553	0
74	1,494	4,79	85	1,661	0
75	1,507	3,7	86	1,697	0
76	1,527	2,02	87	1,782	0
77	1,535	1,34	88	1,594	0

Tablo 4’teki sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, 88 örnekten 78’inin (%89) değişen miktarlarda AFM1 içerdiği görülmüştür. İncelenen sütlerin sahip oldukları toksin miktarı yönünden dağılıma bakıldığında ise Tablo 5’te detayları sunulan bulgular elde edilmiştir. AB ve TGK’nın belirlediği yasal limitin 50 ng/l olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bölgeden toplanıp teste tabi tutulan sütlerin 29’unun (%33), söz konusu limit değerlerin üzerinde toksin içerdiği, bu sayede halk sağlığı açısından önemli düzeyde tehdit oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

**Tablo 5.** Örneklerin sahip olduğu AFM1 düzeylerinin miktar olarak dağılımı

Toplam Örnek Sayısı (%100)	Negatif Örnek Sayısı (%11,36)	Örneklerdeki AFM1’in Miktar ve Yüzde Olarak Dağılımı (ng/l) (%89)					Max Miktar	Örneklerdeki AFM1 Pozitiflik Yüzdesi
		1-10 (%11,36)	11-25 (%25)	26-50 (%21,6)	51-80 (%26,1)	>80 (%4,55)		
88	10	10	22	19	23	4	90	89%

### Gerı Kazanım Oranları:

**Tablo 6.**Sütte 50 ng/l konsantrasyonda AFM1 gerı kazanım oranları

<i>Sütte 50ng/l konsantrasyonda AFM1 gerı kazanımı</i>		
	Gerı kazanım yüzdesi	Değişkenlik katsayısı
<b>Yağsız Süt</b>		
<b>50 ng/l</b>	100	4,2%
<b>%1 Yağlı Homojenize Süt</b>		
<b>50 ng/l</b>	93	4,4%
<b>Tam Yağlı Homojenize Süt</b>		
<b>50ng/l</b>	92	2%

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Başta süt besisi olmak üzere hayvan yetiştiriciliği, Kars İlinin en önemli geçim kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Çiğ sütün direkt satışının yanı sıra, çeşitli kapasitelerdeki süt işletmelerinde, farklı kategorilerde ürün elde edilmekte ve gerek il ve çevresinde gerekse ülkemizin diğer bölgelerinde satışa sunulmaktadır. Dolayısıyla yaygın bir tüketici kitlesine ulaşan söz konusu süt ürünlerinin sağlıklı bir şekilde üretilip piyasaya arz edilmesi, yetiştirici ve üretici açısından oldukça önemli bir sorumluluk durumundadır. Ancak ne yazık ki, önceki yıllarda yürütölmüş çalışmalar hem bölgede hem de ülke genelinde AFM1 sorununa işaret etmiştir. Bu kapsamda Kamber (2005), Kars'ta 60 peynir örneğini (30 kaşar ve 30 çeçil peyniri) inceleyerek tamamında AFM1 saptamış ve %16'sının TGK değerlerini aştığını raporlamıştır. Aynı şekilde Kireççi ve ark. (2007), Kars İlinin Sarıkamış İlçesinde analiz edilen toplam 80 süt ve peynir örneğinin (20 çiğ süt, 20 beyaz peynir, 20 kaşar peyniri ve 20 eritme peyniri) tamamının AFM1 yönünden pozitif olduğunu ve çiğ süt örneklerinin %90'ının 50ng/l'yi aşan miktarlarda toksin içerdiğini bildirmiştir. Keza Sezer ve arkadaşları da (2014) Kars'ta üretilip ambalajsız olarak satışa sunulan 50 adet dondurma örneğinin %34'ü TGK'de süt ve süt ürünleri için belirtilen AFM1 yasal limit seviyesini aşmak üzere tamamında toksin varlığını ortaya koymuştur.

Bu anlamda, geçen zaman içinde gereken tedbirlerin alınıp alınmadığı, süt ve ürünlerinin belirtilen toksin yönünden risk oluşturmaya devam edip etmediğinin, belirli aralıklarla yapılacak taramalarla takip edilmesi de son derece önemli hale gelmiştir. Buradan yola çıkılarak tasarlanan bu tarama temelli tez çalışması da %33'ü yasal limitlerin üzerinde olmak üzere toplam %89 gibi yüksek bir pozitiflik oranı ile problemin ciddi biçimde varlığını devam ettirdiğini ortaya koymuştur.

Ülkemizin farklı bölgelerinde, çeşitli zaman aralıklarında yapılan çiğ süt taramalarında yaygın olarak AFM1 saptanması, tehdidin sadece belirli bir alan ve zaman dilimi ile sınırlı olmadığına işaret etmektedir. Örneğin Adana'da 2012 yılı süresince yürütülen bir araştırmada 176 çiğ süt örneği incelenmiş, bunlardan 30'u yasal limitlerin üzerinde olmak üzere 53'ünün (%30,1) Aflatoksin M1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Golge 2014). Aynı şekilde Oruç ve ark. (2005), Bursa çevresinde 115 çiğ süt örneğini test etmiş ve örneklerin %60'ının içerdiği toksin miktarının AB ve TGK'nin yasal sınır değerini aştığını tespit etmişlerdir. Buldu ve ark. (2008) tarafından Kayseri'de yürütülen bir çalışmada da 90 adet çiğ süt örneği test edilmiş bunlardan %70'inde toksin konsantrasyonunun AB ve TGK limitlerinin üzerinde olduğu ortaya konmuştur. Benzer bulgular Mersin'den de bildirilmiştir. Araştırmada 39'u keçi, 53'ü inek olmak üzere toplam 92 çiğ süt örneği incelenmiş ve sırasıyla %10,2 ve %73,5'sinin yasal limitleri aşan miktarlarda AFM1 bulundurduğu rapor edilmiştir (Delialioğlu ve ark. 2010). Aynı şekilde Şanlıurfa'da yapılan bir araştırmaya konu edilen 38 çiğ süt örneğinin %55'inin yasal tolerans değerlerinin üstündeki miktarlarda toksin içerdiği literatüre geçmiştir (Temamoğulları ve Kanıcı, 2014). Bu sonuçlara benzer nitelikte bulgular elde eden İşleyici ve ark. (2015), Van merkezde 2014 yılının yaz aylarında piyasada satışa sunulan 100 adet çiğ süt örneğini aynı incelemişler, analize alınan süt örneklerinin 85 tanesinde AFM1 tespit etmişlerdir ve bunlardan 12'sinin sahip olduğu toksin miktarının yasal sınırı aştığını belirtmişlerdir.

Bununla birlikte Bursa'da yapılan bir diğer araştırmada ise analiz edilen 30 adet çiğ sütün tamamının AFM1 ile kontamine olduğu ancak miktarların ülkemiz ve AB yasal limitlerinin altında kaldığı bildirilmiştir (Oruç ve ark. 2011). Aksoy ve ark. (2010) da aynı sonuca ulaşmış ve Samsun'da satışa sunulan 36 çiğ süt örneğinin, yasal limitlerin aşmamakla birlikte tamamının kontamine olduğunu rapor etmiştir.

Toksinin ısıtıl işlem ile bertaraf edilemeyişi, tehdidi daha tehlikeli bir boyuta taşımaktadır. Erzurum'da 2005-2006 yılları arasında satışa sunulan 150 adet UHT süt numunesinin %59'unda AFM1 saptanması ve %10,7'sinde miktarların yasal tolerans limitlerini aşmış durumda olması buna iyi bir örnektir (Atasever ve ark. 2010). Keza İşleyici ve ark. (2012), Van'da yaptıkları çalışmada 50 UHT süt numunesini (25 tam yağlı, 25 yarım yağlı) AFM1 varlığı ve seviyesi yönünden incelemişler ve numunelerin tamamının pozitif sonuç verdiğini tespit ederek %16'sının 50ng/l'yi aştığını belirlemişlerdir. Delialioğlu ve ark. (2010) tarafından Mersin'deyürütülen taramanın verileri de önceki araştırmacıları desteklemiştir. Çalışmada teste tabi tutulan 45 adet UHT süt örneğinden %2,2'sinin AFM1 seviyelerinin TGK'nın belirlediği tolerans limitinin üzerinde olduğu ortaya çıkmıştır. Benzer durum İstanbul'da da dikkati çekmiştir. Bostan ve ark. (2005) tarafından 2001 yılında toplanarak incelenen 67 (21 pastörize, 46 UHT) içme sütü örneğinden 16'sında (%24) toksin miktarı yasal limitlerin üzerinde bulunmuştur.

Ancak Oruç ve ark. (2011), Bursa'da analiz ettikleri 50 UHT süt örneğinin tamamının kontamine olduğunu fakat miktarların limitlerin altında kaldığını ifade etmişlerdir. Aynı şekilde Sarıca ve ark. (2014) da Ankara'da yürüttükleri çalışmada 24 UHT süt örneğinden %83'ünün TGK ve AB tarafından belirlenen tolerans limit değerlerini aşmamakla birlikte AFM1 içerdiği bildirilmiştir.

AFM1 kontaminasyonları ile ilgili bir diğer ilginç durum ise sadece süte uygulanan ısıtıl işlemlerle yıkımlanmamakla kalmayıp ürünlerde de varlığını sürdürmesidir. Daha önce bahsi geçen Kireççi ve arkadaşlarının (2007) Kars'ın Sarıkamış İlçesinde analiz ettikleri 20 beyaz peynir, 20 kaşar peyniri ve 20 eritme peynirinin tamamının AFM1 yönünden pozitif olması bu anlamda önemli bir bulgudur. Keza Sarıca ve arkadaşları da (2014) bu sonucu destekler şekilde, Ankara piyasasından topladıkları 27 beyaz peynir örneğinden %92,6'sının ve 19 yoğurt numunesinden %89,5'inin toksin pozitif olduğunu saptamışlardır.

Sorun sadece ülkemizde değil dünyanın farklı bölgelerinde de varlığını sürdürmektedir. 2016 yılında Çin'in büyük süt üreticilerinin bulunduğu altı farklı şehirden toplam 5650 çiğ süt örneği toplanmış ve AFM1 seviyeleri yönünden incelenmiştir. Numunelerin %1.1'inin AB yasal limitini aştığı sonucuna varılmıştır (Li ve ark. 2017). Çin'de Zheng ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada 2013 -

2015 yılları içerisinde 4 mevsim boyunca toplam 1550 çiğ süt örneği AFM1 varlığı yönünden incelenmiş ve % 6.5'inin 50ng/l'yi aştığı tespit edilmiştir. İran'ın güney kesiminde 168 çiğ süt örneği toksin açısından araştırılmış ve numunelerin %30'unun yasal sınır seviyelerini aştığı sonucuna varılmıştır (Hashemi 2016). Ürdün'de inek, koyun, keçi ve deve sütü olmak üzere toplam 100 çiğ süt örneğinin tamamında AFM1 pozitif sonuç vermiş ve %66'sının AB tarafından belirlenen yasal değerleri aştığı gözlemlenmiştir (Omar 2016). Mısır'da Ghareeb ve ark. (2013) 48 çiğ süt örneğini test etmişler ve örneklerin %19'unun TGK limit değerini aştığını belirlemişlerdir. Makedonya'dan bildirilen bir araştırmada, 2013 ile 2014 yılları arasında toplanan 3635 çiğ süt örneğinin %2,9'unun, yasal limitleri aşan düzeyde AFM1 ile kontamine olduğuna işaret edilmiştir. Özellikle son on yıl içinde, farklı oranlar literatürde yerini almıştır. Bunlardan özellikle %30,7 düzeyinde pozitiflik oranı ile Oliveria ve ark. (2013), %87,5 ile Silva ve ark. (2015), %81 ile Rama (2015), %66 ile Omar (2016), %56,3 ile Tomasevic ve ark. (2015), %46,5 ile Tsakaris ve ark. (2013), %30 ile Hashemi (2016), %27,5 ile Duarte ve ark. (2013), %19 ile Ghareeb ve ark. (2013), %8 ile Marnissi ve ark. (2012), %6.5 ile Zheng ve ark. (2017), %2,9 ile Dimitrieska-Stojkovi ve ark. (2016) ve %1,7 ile Malissiova ve ark. (2013), %1.1 ile Li ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları araştırmalar ön plana çıkmaktadır.

Genel bir değerlendirme yapıldığında, çalışmadan çalışmaya hem AFM1'e rastlanma sıklığının hem de incelenen örneklerdeki toksin miktarının farklılık gösterdiği dikkati çekmektedir. Aflatoksin içeren yemlerin tüketimine bağlı olarak bu metabolitin üretildiği göz önünde tutulursa, hayvanların yetiştirilme koşulları, yemlerin elde edilme ve muhafaza şartları, coğrafi lokalizasyon ve iklimin bu farklılığa yol açabileceği görülecektir. Bunun yanı sıra örneklerin yılın hangi döneminde toplandığı ve hangi yöntemle incelendiği de sonuçlar üzerine etkili olabilmektedir (Oruç ve ark. 2005, İşleyici ve ark. 2012). Süt ve ürünlerinde AFM1'in belirlenmesinde İTK, HPLC ve ELISA, kullanılan klasik yöntemlerdir. Kromatografik metodlarla (İTK ve HPLC) daha hassas sonuçlar elde edilse de analizin uzun sürmesi, yüksek maliyetli oluşu ve teknik alt yapıya sahip personele ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bulunmaktadır. ELISA yöntemi ise basit, ekonomik, kısa zamanda çok fazla sayıda örneğin analiz edilmesine olanak sağlamakla beraber yüksek verimliliğe ve çok düşük değerleri ölçme yeteneğine sahip olduğundan, bu amaç kapsamında

yaygın olarak kullanılmaktadır (Stefanovic ve ark. 2015). Sözü edilen bilgiler ışığında bu tez çalışmasında ELISA yönteminden yararlanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, Kars'ta yapılan bu araştırmada incelenen çiğ süt örneklerinin, %33'ü Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği tolerans düzeylerinin üzerinde olmak üzere, %89'unun AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Durum onu göstermektedir ki, hayvan yemlerinin küflenmesinin önüne geçilmediği ve toksinli rasyonla beslemeye devam edildiği sürece, sütle AFM1 atılımı devam edecektir. Bugün için, alternatif yeni yöntemlerle çalışmalar sürüyor da olsa, pastörizasyon ya da sterilizasyon gibi ısı işlemlerle sütler bu anlamda güvenli hale getirilememektedir. Yemlerin küflenmesi ve toksin ile kontaminasyonunun nasıl önleneceği açıkça bilinmemektedir, konuya titizlikle yaklaşılması ve duyarlı olunması, sorunu en başında çözecektir. Eğer bu mümkün olamıyorsa, en azından daha hızlı ve daha uygun maliyetli yeni yöntemler geliştirip yaygınlaştırarak, kontamine gıdalar doğru ve etkin biçimde saptanmalı ve bunların sofralara ulaşması engellenmelidir. Bunun yanında, süt ve ürünlerindeki detoksifikasyon denemeleri de oldukça önemlidir. Ne yazık ki sözü edilen zincirin her aşamasında yer alan eksiklikler, AFM1 probleminin uzun bir süre gündemde kalacağını göstermektedir.

Öncelikle tarladan başlamak üzere Aflatoksin oluşumunu gerçekleştiren küflerin hayvan diyetinde yer alan yemlerde üremeleri ve AFB1 sentezlemeleri önlenmeli, yemler uygun koşullarda taşınmalı ve depolanmalıdır. Bu konuda çiftçilerden üreticilere, yem işlenmesinde çalışan personelden tüketiciye kadar halkın tamamının bilinçlendirilmesi gereklidir. AFB1 oluşumunun önüne geçilmelidir. Her ne kadar AFM1'in detoksifikasyonu için yoğurtta LAB ile yapılan çalışmalar pozitif sonuçlansa da ve sütte bentonit kullanımıyla indirgeme gerçekleştirilse de, bu iki yöntem henüz deneme aşamasındadır. Bu konuda bilimsel çalışmalar yürütülmeye devam edilmeli, yapılan incelemeler ileriki boyutlara taşınmalı, bilim adamlarınaher türlü teknik veekonomik güvence sağlanmalıdır.

## 5. KAYNAKLAR

Adejumo O, Atanda O, Raiola A, Somorin Y, Bandyopadhyay R, Ritieni A: Correlation between aflatoxin M1 content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B1 and socioeconomic status of lactating mothers in Ogun State, Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*, 56: 171 – 177, 2013.

Amoli - Diva M, Taherimaslak Z, Allahyari M, Purghazi K, Manafi MH: Application of dispersive liquid - liquid microextraction coupled with vortex - assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid - phase extraction for determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. *Talanta*, 134: 98-104, 2015.

Aksoy A, Yavuz O, Güvenç D, Das YD, Terzi G, Çelik S: Determination of Aflatoxin levels in raw milk, cheese and dehulled hazelnut samples consumed in Samsun province, Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergi*, 16 (Suppl-A): S13-S16, 2010.

Atasever MA, Adıgüzel G, Atasever M, Özlü H, Özturan K: Occurrence of Aflatoxin M1 in UHT milk in Erzurum-Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*, 16(Suppl A) : 119-122, 2010.

Aycicek H, Aksoy A, Saygı S: Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16 (3) : 263-266, 2005.

Bacher G, Pal S, Kanungo L, Bhand S: A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of aflatoxin M1 in milk. *Sensors and Actuators B*, 168 : 223-230, 2012.

Bakırcı TG: Tahıl ve tahıl ürünlerinin aflatoksin, okratoksin a, zearalenon, fumonisin ve deoksinivalenol mikotoksinleri yönünden incelenmesi. *Akademik Gıda* 12(2): 46-56, 2014

Besler T, Unal RN: Beslenmede Sütün Önemi, 2. Baskı. Reklam Kurdu Ajansı Org. Tan. Tas. Rek. San. Tic. Ltd. Şti. s.7, 2012.

Biberoğlu G: Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. *T Klin Tıp Bilimleri*, 23: 491-498, 2003.

Bilandžić N, Božić D, Dokić M, Sedak M, Kolanović BS, Varenina I, Cvetnić Z; Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food Control*, 43: 18-21, 2014.

Bostan K, Çetin Ö, Büyükkunal S.K, Ergün Ö: İstanbul'da Satışa Sunulan İçme Sütü Örneklerinde Aflatoksin M1 Düzeyleri Üzerine Bir Araştırma. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi*, 7 : 15-20, 2005.

Buldu HM, Koç NA, Uraz G: Aflatoxin M1 contamination in cow's milk in Kayseri (central Turkey). *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 35(2): 87-91, 2011.

Busman M, Bobell JR, Maragos CM: Determination of the aflatoxin M1 (AFM1) from milk by direct analysis in real time – mass spectrometry (DART – MS). *Food Control*, 17: 592-598, 2015.

Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ: Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol*, 10(1-2): 1-12, 2008.

Carraro A, Giacomo AD, Giannossi ML, Medici L, Muscarella M, Palazzo L, Quaranta A, Summa V, Tateo F: Clay minerals as adsorbents of Aflatoxin M1 from contaminated milk and effects on milk quality. *Applied Clay Science*, 88-89 : 92-99, 2014.

Cattaneo TMP, Marinoni L, Iametti S, Monti L: Behaviour of Aflatoxin M1 in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. *Food Control*, 32: 77-82.

Delialioğlu N, Otağ F, Öcal N.D, Aslan G, Emekdaş G: Mersin İlinde çiğ ve market sütlerinde Aflatoksin M1 düzeyinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bul*, 44: 87-91, 2010.

Diaz JG, Murcia WH: Biotransformation of Aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species, *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*, Dr. Ramon G. Guevera-Gonzalez(Ed), ISBN: 978-953-307-395-8, 2011. [oöç](#). *Erişim tarihi*: 5.02.2016.

Dimitrieska - Stojkovi E, Stojanovska-Dimzoska B, Ilievska G, Uzunov R, Stojkovi G, Hajrulai-Musliu Z, Jakuzi D: Assessment of aflatoxin contamination in raw milk and feed in Macedonia during 2013. *Food Control*, 59: 201-206, 2016.

Donghun L, Kwang – Geun L: Analysis of aflatoxin M1 ve M2'in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Control*, 50: 467- 471, 2015.

Duarte SC, Almedia AM, Teixeira AS, Pereira AL, Falcão AC, Pena A, Lino C

M: Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 30: 411-417, 2013.

Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF, Badr FH: Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control*, 43: 129-134, 2014.

Ergun B, Altıokka G, Atkoşar Z: Aflatoxinler : Tayin yöntemleri üzerine. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(1) : 75-81, 2006

Fallah AA: Aflatoxin M1 contaminantion in diary products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control*, 21 (11) : 1478-1481, 2010.

Fallah AA: Assessment of Aflatoxin M1 contaminantion in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 988 – 991, 2010.

Fink-Grenmels J: Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, 21(4): 115-120, 1999.

Ghareeb K, Emalt L.M, Awad W.A, Böhm J: Prevalence Of Aflatoxin M1 in Raw Milk Produced in Tropical State(Qena, Egypt) and Imported Milk Powder. *J.Vet.Animal Science*, 3 (1-2): 1-4, 2013.

Girgin G, Başaran N, Şahin G: Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 58(3): 97-118, 2001.

Golge Ö: A survey on the occurrence of aflatoxin m1 'in raw milk produced adana province of Turkey. *Food Control*, 45: 150 – 155, 2014.

Govaris A, Roussi V, Koidis PA, Botsoglou NA: Distribution and stability of Aflatoxin M1 during production and stability of yoghurt. *Food Additives and Contaminants*, 19(11): 1043-1050, 2002.

Hashemi M: A Survey of Aflatoxin M1in cow milk in Southern Iran. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4): 888-893, 2016.

Hışıl Y: Enstrümental Gıda Analizleri – I, 4. Baskı.s. 1, 36, 40-46,2004.

Huang S, Hu D, Wang Y, Zhu F, Jiang R, Ouyang G: Automated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography / tandem mass spectrometry for the analysis of aflatoxin M1 in milk. *Journal of Chromatography A*, 1416: 137-140, 2015.

IARC : Some naturally occurring substances – food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum*, Lyon, France, 56: 245-391, 1993. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/>. *Erişim tarihi*: 10.02.2016.



IARC : Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum, Lyon, France, volume 82, 2002. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/>. Erişim tarihi: 10.02.2016.

Ismail A, Rıza M, E. Levin R, Aktar S, Gong YY, Hameed A: Seasonal prevalence level of aflatoxin M1 and its estimated daily intake in Pakistan. Food Control, 60: 461-465, 2016.

İşleyici Ö, Morul F, Sancak YC: Van'da tüketime sunulan UHT sterilize inek sütlerinde Aflatoxin M1 düzeyinin araştırılması. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 23(2): 65-69, 2012.

İşleyici Ö, Sancak YC, Sancak H, Yücel UM: Determination of Aflatoxin M1 levels in unpackaged sold raw cow's milk. Van Vet J, 26(3): 151-155, 2015.

Kabak B, Ozbey F: Aflatoxin M1'in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. Food Control, 28: 338-344, 2012.

Kabak B, Var I: Süt ve süt ürünlerinde Aflatoxin M1 problemi. Gıda, 29(4): 275-279, 2004.

Kamber U: Aflatoxin M1 Contamination of Some Commercial Turkish Cheeses From Markets in Kars, Turkey. Fresenius Environmental Bulletin, 14: 11, 2005.

Kayır ZY: Kosgeb Sincan İşletme Geliştirme Merkezi Ankara, 2007.

Kireççi E, Savaşçı M, Ayyıldız A: Sarıkamış'ta tüketilen süt ve peynir ürünlerinde Aflatoxin M1 varlığının Belirlenmesi. İnfeksiyon Dergisi, 21(2): 93-96, 2007.

Larou E, Yikaoumettis I, Kaltsas G, Petropoulos A, Skandamis P, Kintzios S: High throughput cellular biosensor for the ultra-sensitive, ultra-rapid detection of Aflatoxin M1. Food Control, 29: 208-212, 2013.

Li S, Min L, Wang P, Zhang Y, Zheng N, Wang J: Aflatoxin M1 contamination in raw milk from major milk-producing areas of China during four seasons of 2016. Food Control, 82: 121-125, 2017.

Londoño VAG, Boasso A, Paula MCZ, Garcia LP, Scussel VM, Resnik S, Pacin A: Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. Food Control, 34: 752 – 755.

Malissiova E, Tsakalof A, Arvanitoyannis I.S, Katsafliaka A, Katsioulis A, Tserkezou P, Govaris A, Hadjichristodoulou C: Monitoring Aflatoxin m1 levels in ewe's and goat's milk in Thessaly, Greece; potential risk factors under organic and conventional production scheme's. Food Control, 34: 241- 248, 2013..

Mao J, Lei S, Liu Y, Xiao D, Fu C, Zhong L, Okuyan H: Quantification of aflatoxin M1 in raw milk by a core-shell column on a conventional HPLC with large volume injection and step gradient elution. Food Control 51 (2015) 156-162)

Marnissi EIB, Belkhou R, Morgavi DP, Benjamin L, Bora H: Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. Food and Chemical Toxicology, 50: 2819 – 2821, 2012.

Mahindru SN: Food Contaminants- Origin, Propagation and Analysis, A.P.H Publishing Corporation, New Delhi.p.235-236, 2009. <https://books.google.com.tr/books?id=yg4P9TUoz4C&pg=PA235&dq=Contamination+Branch+method&hl=tr&sa=X&ved=0ahUKEwim5baNnO7KAhVKExoKHOp6DqAQ6AEIGzAA#v=onepage&q=Contamination%20Branch%20method&f=false>. Erişim tarihi : 10.02.2016.

Mohammadi H: A Review of Aflatoxin M1, Milk, and Milk Products, Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology, Dr. Ramon G. Guevara-Gonzales (Eds), ISBN: 978-953-307-395-8, 2011. <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/a-review-of-aflatoxin-m1-milk-and-milk-products> . Erişim tarihi: 5.02.2016.

- Mulunda M, Mike D: Occurrence of Aflatoxin M1 from rural subsistence and commercial farms from select areas of South Africa. *Food Control*, 39: 92-96, 2014.
- Oliveria CP, Soares NFF, Oliveria TV, Júnior J.C.B, Silva, WA: Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fruit milk from Minas Gerais / Brazil. *Food Control*, 30: 90-92, 2013.
- Omar S.S: Aflatoxin M1 levels in Raw Milk, Pasteurised Milk and Infant Formula. *Ital J. Food Saf.* 5(3): 5788, 2016.
- Ossa DEH, Hincapié DA, Penuéla GA: Determination of Aflatoxin M1 in ice cream samples using immunoaffinity column and ultra-highperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control*, 56: 34- 40, 2015.
- Oruç HH, Kalkanlı O, Cengiz M, Sonal S: Aflatoxin M1 in raw milks collected from plain and mountain villages in Bursa, Turkey. *Milchwissenschaft*, 60(1): 71-72, 2005.
- Oruç HH: Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. *Uludağ Univ.J.Fac.Vet.Med*, 24, 1-2-3-4: 105 - 110, 2005.
- Oruç HH, Temelli S, Sorucu A: Bursa'da Çiğ Süt ve UHT Sütlerde Aflatoxin M1 Düzeyleri. *Uludağ Univ.J.Fac.Vet.Med*, 30,2: 1-4, 2011.
- Oruç HH: Süt ve süt ürünlerinde Aflatoxin M1 (AFM1) ve Türkiye'deki durumu. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med*, 22(1-2-3): 121-125, 2003.
- Ötleş S: Biosensors, <http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/sensorkav.html>. Erişim tarihi: 6 Şubat 2016a. Biosensors, <http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>. Erişim tarihi:6 Şubat 2016b.
- Özkaya Ş, Temiz A: Aflatoxinler : Kimyasal Yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi [Elektronik Dergi]*,1(1) : 1-21, 2013. [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030101](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030101). Erişim tarihi: 4.01.2016.
- Pietri A, Fortunati P, Mulazzi A, Bertuzzi T: A direct competitive chemiluminescent enzyme - linked immunosorbent assay (CL - ELISA) for detecting aflatoxin M1 was developed. *Food Chemistry*, 192: 235 – 241, 2016.
- Rama A, Latifi F, Bajraktari D, Ramadani N: Assessment of aflatoxin M1 levels in pasteurized and UHT milk consumed in Prishtina, Kosovo. *Food Control*, 57: 351- 354, 2015.
- Sarıca YD, Has O, Taşdelen S, Ezer Ü: Occurrence of Aflatoxin M1 in milk, white cheese and yoghurt from Ankara, Turkey Markets. *Biological and Chemical Research*, 2015: 36-49, 2014.
- Scaglioni PT, Becker - Algeri T, Drunkler D, Bediale - Furlong E: Aflatoxin B1 ve M1. *Analytical Chemical Acta*, 829: 68 – 74, 2014.
- Stefanovic S, Spiric D, Petronijevic R, Trailovic J.N, Milicevic D, Nikolic D, Jankovic S: Comparison of two analytical methods (ELISA and LC-MS/MS) for determination of aflatoxin B1 in corn and aflatoxin M1 in milk. *Procedia Food Science*, 5: 270-273, 2015.
- Sezer Ç, Aksoy A, Vatansever L, Bilge N: Kars İlinde Satışa Sunulan Dondurmalarda Aflatoxin M1 Varlığının Belirlenmesi. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 40(1): 90-94, 2014.
- Shuaib FMB, Ehiri J, Abdullahi A, Williams JH, Jolly P: Reproductive health effects of aflatoxin: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 29: 262-270, 2010.
- Silva MV, Janeiro V, Bando E, Machinski Jr M: Occurrence and Estimation of Aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. *Food Control*, 53: 222-225, 2015.
- T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 29 Kasım 2011, Başbakanlık Basımevi Döner Sermaye İşletmesi Müdürlüğü, Ankara.

Tekinşen KK, Uçar G: Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. *Food Control* 19 (1): 27-30, 2008.

Temamoğulları F, Kanıcı A: Short communication: Aflatoxin M1 in dairy products sold in Şanlıurfa, Turkey. *Journal of Dairy Science*, 97(1): 162-165, 2014.

Tomasevic I, Petrovic J, Jovetic M, Raicevic S, Milojevic M, Miocinovic J: Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. *Food Control*, 56: 64 – 70, 2015.

Tsakarlis NI, Tzatzarakis NM, Alegakis KA, Vlachio MI, Renieri EA, Tsatsakis AM: Risk Assessment Scenarios of children's Exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. *Food and Chemical Toxicology*, 56: 261-265, 2013.

Var A, Kabak B, Özkarslı M: Mikotoksin aranmasında kullanılan analiz yöntemleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi [Elektronik Dergi]*, 2(11) : 1-11, 2004. [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702041101](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702041101). *Erişim tarihi*: 4.01.2016.

Vdovenko MM, Lu C-C, Yu F-Y, Sakharov IY: Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk. *Food Chemistry*, 158: 310-314, 2014.

Wang Y, Liu X, Xiao C, Wang Z, Wang J, Xiao H, Cui L, Xiang Q, Yue T: Determination of Aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control*, 28 :131-134, 2012

Xiang JL, Wang YM, Ma MR, Liu J.X.: Seasonal variation of aflatoxin M1 in raw milk from the Yangtze River Delta Region of China. *Food Control*, 34: 703-706, 2013.

Yaroğlu T, Oruç HH, Tayar M: Aflatoxin M1 levels in cheese samples from some provinces of Turkey. *Food Control*, 16 (10): 883-885, 2005.

Yentür G, Er B : Gıdalarda aflatoksinin varlığının değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(1) : 41-52, 2012

Zafar IS, Rafique MA: Assessment of aflatoxin in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 30: 235-239, 2013.

Zhang X, Wen K, Jiang H, Beier RC, Shen J: An ultra-sensitive monoclonal antibody – based fluorescent microsphere immunochromatographic test strip assay for detecting aflatoxin M1 in milk. *Food Control*, 60: 588-595, 2016.

Zheng N, Li S.L, Zhang H, Min L, Gao Y.N, Wang J.Q: A survey of aflatoxin M1 of raw cow milk in China during the four seasons from 2013 to 2015. *Food Control*, 78: 176-182, 2017.

Zhu J, Zhang L, Hu X, Xiao Y, Chen J, Xu Y, Frey J, Chu FS, Correlation of Dietary Aflatoxin B<sub>1</sub> Levels with Excretion of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Human Urine *Cancer Res*, 47:1848-1852, 1987. <http://cancerres.acrjournals.org/content/47/7/1848>. *Erişim tarihi*: 4.02.2016.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İzmir’de doğdu. 2001 yılında İzmir Selma Yiğitalp Lisesi Ağırlıklı Yabancı Dil Bölümü’nden mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi’nde hazırlık sınıfına başladı. 2002 yılında Gıda Mühendisliği Bölümünde akademik eğitimine devam etti. Yedinci sömestrede, Yunanistan’ın MAICH (Mediterranean Agronomic Institute of Hania)’de ERASMUS öğrencisi olarak eğitim aldı. 2007 yılında mezun oldu. 2007 – 2010 yılları arasında BANVİT A.Ş’de üretim mühendisi olarak çalıştı. Evli ve bir çocuk annesidir.

