

ÖYKÜ TOPTAŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

TİCARİ OLARAK SATILAN YOĞURTLARDA
AFLATOKSİN M1 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ÖYKÜ TOPTAŞ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. GONCA ERKÖSE GENÇ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, bilgi ve tecrübelerini aktaran, hep daha başarılı olabilmem için büyük emek sarf eden, karşılaştığım hiçbir problemde beni yalnız bırakmayan, her zaman içtenlikle bana yol gösteren, samimiyetini ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen, öğrencisi olmaktan büyük mutluluk duyduğum çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgilerini paylaşan, başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN'a,

Mikoloji Bilim Dalından değerli hocalarım Prof. Dr. Meltem UZUN'a, Prof. Dr. Zayre ERTURAN'a ve Prof. Dr. Dilek ŞATANA'ya,

Kıymetli hocalarım Prof. Dr. Betigül ÖNGEN'e, Prof. Dr. Özden BÜYÜKBABA BORAL'a, Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a, Prof. Dr. Gülseren AKTAŞ'a, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU'na, Doç. Dr. Lütfiye ÖKSÜZ'e, Doç. Dr. Hayriye KIRKOYUN UYSAL'a, Doç. Dr. Sevim MEŞE'ye ve Dr. Öğretim Üyesi Mustafa ÖNEL'e,

Bu çalışmanın istatistiksel analiz kısmını gerçekleştiren ve alanıyla ilgili bilgi ve tecrübelerini paylaşan Dr. Öğretim Üyesi Ayhan PARMAKSIZ'a,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Öğretim Üyesi Deniz SERTEL ŞELELE ve Dr. Öğretim Üyesi Merve BİLGİN'e,

Yardım ve desteklerini eksik etmeyen laboratuvar çalışanlarına,

Eğitim hayatım süresince bana maddi ve manevi destek sağlayan aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38184

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	İİ
İÇİNDEKİLER	İİİ
TABLolar LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Vİİ
ÖZET	İX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mikotoksinler.....	4
2.1.1. Tarihçe	5
2.1.2. Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler	7
2.1.2.1. Sıcaklık ve Bağlı Nem	7
2.1.2.2. Su Aktivitesi.....	8
2.1.2.3. pH.....	8
2.1.2.4. Mantar Suşu	8
2.1.2.5. Substratın Özelliği.....	8
2.1.2.6. Oksijen ve Karbondioksit Miktarı.....	8
2.1.2.7. Depolama Süresi	9
2.1.2.8. Mekanik Hasar	9
2.1.3. Mikotoksikoz	9
2.1.4. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyonu.....	10
2.2. Aflatoksinler	12
2.2.1. Aflatoksinlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	13
2.2.2. Aflatoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	14
2.2.3. AFB1'in AFM1'e Biyotransformasyonu	17
2.2.4. Sütte ve Süt Ürünlerinde AFM1	19
2.2.5. Yoğurtta AFM1	20
2.2.6. AFM1 Tespit Yöntemleri.....	21
2.2.6.1. ELISA	21

2.3. Mikotoksin Kontaminasyonlarının Kontrolü	22
2.3.1. Mikotoksin Oluşumunu Önleme Stratejileri	22
2.3.2. Mikotoksinlerin Detoksifikasyon/Dekontaminasyon Stratejileri.....	23
2.3.2.1. Fiziksel Yöntemler	24
2.3.2.2. Kimyasal Yöntemler	24
2.3.2.3. Biyolojik Yöntemler.....	25
2.4. Aflatoksinlerin Besinlerde Bulunabilecekleri Limit Değerleri.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Örnekler	30
3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler	30
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	30
3.1.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	30
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	30
3.1.5. Cam ve Plastik Malzemeler	31
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Yoğurt Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması.....	31
3.2.2. ELISA Testinin Uygulanması.....	32
3.2.2.1. Test Kitinin İçeriği	32
3.2.2.2. ELISA Testinde Kullanılan Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması	33
3.2.2.3. Test Prosedürü.....	33
3.2.2.4. ELISA Analizi Sırasında Dikkat Edilen Noktalar	36
3.2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	36
3.2.2.6. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Yoğurt Örneklerinin Türlerine Göre Dağılımı.....	38
4.2. ELISA Testinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	38
4.3. Yoğurt Örneklerinin AFM1 Konsantrasyonları.....	40
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	60
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	66

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bazı mantarların üremeleri ve mikotoksin sentezlemeleri için gerekli sıcaklık değerleri	7
Tablo 2-2: Gıdalarda yaygın olarak bulunan mikotoksinler	11
Tablo 2-3: Ana aflatoksinlerin bazı kimyasal özellikleri.....	14
Tablo 2-4: İnsan vücut sıvılarında aflatoksinlere maruz kalımın göstergesi olan biyobelirteçler	17
Tablo 2-5: TGK'ye göre aflatoksinlerin çeşitli gıdalarda bulunabileceği yasal limitler	27
Tablo 2-6: TGK'nın belirlediği AFM1 limitleri	28
Tablo 2-7: Farklı ülkelerde AFM1'in gıdalarda bulunmasına izin verilen limitler	29
Tablo 4-1: Yoğurt örneklerinin türlerine, yağ ve meyve içeriklerine göre dağılımları ..	38
Tablo 4-2: Birinci mikrolakta çalışılan standartların absorbens değerlerine göre elde edilen veriler	39
Tablo 4-3: İkinci mikrolakta çalışılan standartların absorbens değerlerine göre elde edilen veriler	40
Tablo 4-4:Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonları (1-42. örnekler)	41
Tablo 4-5: Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonları (43-84. örnekler)	42
Tablo 4-6: AFM1 konsantrasyonlarının yoğurt örneklerinin türlerine, yağ ve meyve içeriklerine göre dağılımları.....	44
Tablo 4-7: Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının (ng/kg) karşılaştırılması .	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: En önemli aflatoksinlerin kimyasal yapıları	13
Şekil 2-2: Süt veren ineklerde aflatoksin B1'in metabolizması ve biyotransformasyonu	18
Şekil 2-3: Yarışmalı ELISA yöntemi.....	22
Şekil 3-1: Yoğurt örneklerinin santrifüj aşaması sonrası görünümü	31
Şekil 3-2: Santrifüj sonrası yağ içeriği ayrılmış bir yoğurt örneği	32
Şekil 3-3: Test kitinin içeriği	33
Şekil 3-4: Kuyucuklara antikor eklendikten sonra mikroplağın görünümü	34
Şekil 3-5: Yoğurt örnekleri ve standartlar eklendikten sonra mikroplağın görünümü ...	34
Şekil 3-6: Kuyucuklara konjugat eklendikten sonra mikroplağın görünümü.....	35
Şekil 3-7: Substrat/kromojen eklendikten hemen sonra mikroplağın görünümü	35
Şekil 3-8: Substrat/kromojen eklenerek 15 dakika inkübe edildikten sonra mikroplağın görünümü	35
Şekil 3-9: Stop solüsyonu eklendikten sonra mikroplağın görünümü.....	36
Şekil 4-1: Birinci mikrolakta çalışılan 1-42 numaralı yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği	39
Şekil 4-2: İkinci mikrolakta çalışılan 43-84 numaralı yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği	40
Şekil 4-3: Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının TGK ve AB limit değerlerine göre karşılaştırılması.....	45
Şekil 4-4: Türlerine göre yoğurtların AFM1 konsantrasyonuna ilişkin dağılımları.....	46
Şekil 4-5: Yağ içeriklerine göre yoğurtların AFM1 konsantrasyonuna ilişkin dağılımları	46
Şekil 4-6: Meyve içeriklerine göre yoğurtların AFM1 konsantrasyonuna ilişkin dağılımları.....	47

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg/kg: Mikrogram/kilogram

µl: Mikrolitre

AB: Avrupa Birliği

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AF: Aflatoksin

AFB0: Aflatoksin B1-8,9-epoksit

AFB1: Aflatoksin B1

AFB2: Aflatoksin B2

AFG1: Aflatoksin G1

AFG2: Aflatoksin G2

AFL: Aflatoksikol

AFM1: Aflatoksin M1

AFP1: Aflatoksin P1

AFQ1: Aflatoksin Q1

ATA: Alimenter toksik alöki (Alimentary toxic aleuki)

BEN: Balkan endemik nefropatisi

°C: Santigrat derece

DON: Deoksinivalenol

EDI: Tahmini günlük alım (Estimated daily intake)

ELISA: Enzim bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme linked immunosorbent assay)

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

g: Gram

GC: Gaz kromatografisi (Gas chromatography)

HCC: Hepatoselüler karsinom (Hepatocellular carcinoma)

HI: Tehlike indeksi (Hazard index)

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

HPLC-FLD: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-floresan dedektör (High performance liquid chromatography-fluorescence detection)

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

ICA: İmmünoaffinite kolon testi (ICA-Immunoaffinity coloumn assay)

L: Litre

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

ml: Mililitre

ng/kg: Nanogram/kilogram

ng/l: Nanogram/litre

OTA: Okratoksin A

pg/ml: Pikogram/mililitre

ppb: Milyarda bir (parts per billion)

TDI: Tolere edilebilir günlük alım (Tolerable daily intake)

TGK: Türk Gıda Kodeksi

TLC: İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography)

UV: Ultraviyole

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ÖZET

Toptaş Ö. Ticari olarak satılan yoğurtlarda aflatoksin M1 varlığının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, 2022.

Aflatoksinler (AF) en sık *Aspergillus flavus* ile *Aspergillus parasiticus* olmak üzere *Aspergillus* türleri tarafından sentezlenen ve çeşitli gıda maddelerinde bulunabilen toksik ikincil metabolitlerdir. Önemli AF çeşitlerinden biri olan AFM1, AFB1'in hidroksillenmiş metaboliti olup, AFB1 ile kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinde bulunabilmektedir. Süt ve süt ürünleri her yaştan insanın günlük beslenmesinde önem taşıyan gıdalar olduklarından, karsinogenik ve hepatotoksik etkiler gösteren AFM1 içermesi sağlık için tehlike oluşturmaktadır. Bu nedenle çoğu ülke AFM1'in besinlerde bulunabileceği en yüksek yasal değerleri belirlemiştir. Türk Gıda Kodeksi (TGK) ve Avrupa Birliği (AB)'nin kriterlerine göre süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek en yüksek AFM1 konsantrasyonu 50 ng/kg'dır. Bu çalışmada İstanbul'daki marketlerde satılan 35'i normal, 19'u organik, 15'i meyveli ve 15'i süzme olmak üzere toplam 84 adet yoğurt örneği AFM1 varlığı ve düzeyi açısından ELISA yöntemiyle incelenmiştir. Yoğurt örneklerinin tamamının (%100) 5,08 ng/kg ile 77,48 ng/kg arasında değişen konsantrasyonlarda AFM1 içerdiği belirlenmiş, AFM1 konsantrasyonlarının ortalaması $23,99 \pm 14,67$ ng/kg olarak hesaplanmıştır. Örneklerin 24'ünün (%28,57) 15 ng/kg'ın altında, 41'inin (%48,81) 15,01-30 ng/kg arasında ve 14'ünün (%16,67) ise 30,01-50 ng/kg arasında AFM1 ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. İncelenen yoğurt örneklerinden beşinin (%5,95) TGK'ye ve AB kriterlerine göre belirlenmiş limit değerin üzerinde AFM1 içerdiği saptanmıştır. Hepsi organik yoğurt olan bu örneklerin AFM1 konsantrasyonları sırasıyla 54,78; 59,30; 69,98; 77,09 ve 77,48 ng/kg olarak tespit edilmiştir. Örneklerin tamamının AFM1 ile kontamine olmasının bir halk sağlığı problemi oluşturduğu, bunun önlenmesi için gerekli tedbirlerin alınması ve kontrolünün sağlanmasının önem taşıdığı düşünülmektedir.

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

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38184

ABSTRACT

Toptaş Ö. Investigation of the presence of aflatoxin M1 in commercially sold yoghurts. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. Master Thesis. İstanbul, 2022.

Aflatoxins (AF) are toxic secondary metabolites produced by *Aspergillus* species and can be found in various foodstuffs. AFM1, one of the important AF types, is the hydroxylated metabolite of AFB1 and can be found in milk and dairy products obtained from animals fed with AFB1 contaminated feeds. Since milk and dairy products are important foods, presence of AFM1, which shows carcinogenic and hepatotoxic effects, poses a health hazard. According to the Turkish Food Codex (TFC) and the European Union (EU), the highest AFM1 concentration that can be found in milk and dairy products is 50 ng/kg. In this study, 35 natural, 19 organic, 15 fruity and 15 strained, sold in the markets in Istanbul were examined by ELISA method for the detection of presence and level of AFM1. It was determined that all of the yoghurt samples contained an average of 23.99 ± 14.67 ng/kg AFM1 in the range of 5.08-77.48 ng/kg. Twenty-four of the samples were found to be contaminated with AFM1 below 15 ng/kg, 41 were between 15.01-30 ng/kg, and 14 were between 30.01-50 ng/kg. It was determined that five of the examined yoghurt samples contained AFM1 above the limit value determined according to the TFC and EU criteria. AFM1 concentrations of these samples, all of which were organic yoghurts, were 54.78; 59.30; 69.98; 77.09 and 77.48 ng/kg. It was thought that the contamination of all samples with AFM1 constitutes a public health problem, and it is important to take the necessary precautions and make controls to prevent this.

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

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 38184

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler başta *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi olmak üzere bazı küf mantarları tarafından uygun sıcaklık ve nem şartlarında üretilen, insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkileyen ikincil metabolitlerdir [1, 2]. Koşullar uygun olduğunda hasat öncesinde, hasat, nakliye ve depolama sırasında tarımsal ürünlerde oluşabilmektedir [3]. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO-Food and Agriculture Organization) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO-World Health Organization) besinlerle ilişkili olarak gelişen hastalıkların önemli bir nedeni olarak mikotoksin kontaminasyonlarını göstermiştir [4]. Mikotoksinler hormonal sistemleri bozabilmekte, organları hasara uğratabilmekte, immün sistemi baskılayabilmekte veya kansere yol açabilmektedir [5].

Dünya genelinde dört buçuk milyardan fazla kişi, insan ve hayvan sağlığına olumsuz etkileri olan en tehlikeli mikotoksinler olarak nitelendirilen aflatoksinlerle değişen seviyelerde kontamine olmuş besinlere maruz kalma riski altında bulunmaktadır [6, 7]. Karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileri bulunan aflatoksinlerin sentezinden sorumlu en önemli mantar türleri *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'tur [8, 9]. Bilinen 20 aflatoksin türünün en önemlileri AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 ve AFM2'dir [10]. AFB1 aflatoksinler arasında en kuvvetli karsinojendir ve primer hedef organ karaciğerdir. Bu nedenle Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC- The International Agency for Research on Cancer), AFB1'in karaciğer kanserine neden olduğunu epidemiyolojik kanıtlarla doğrulayarak Grup 1 ajan olarak sınıflandırılmıştır [7]. Kronik Hepatit B virüsü enfeksiyonu olan ve aflatoksinlere maruz kalan kişilerin karaciğer kanserine yakalanma riski, sadece aflatoksinlere maruz kalan bireylerden 30 kat daha fazladır [6].

AFM1, AFB1'in hidroksillenmiş bir metabolitidir. AFB1 ile kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen süt ya da süt ürünlerinde bulunabilmektedir [11]. Hayvanlar AFB1 ile kontamine yemleri tükettikten yaklaşık olarak 12 saat sonra vücutlarındaki AFB1'in %0,3-6,2'si AFM1'e dönüşmekte ve bu dönüşüm kan ve süt gibi vücut sıvılarından tayin edilebilmektedir [12]. AFM1, AFB1'in vücuda alımından 12-24 saat sonra sütte tespit edilebilmekte, birkaç gün geçtikten sonra ise seviyesi yükselmektedir. AFB1'in alımı sona erdikten 72 saat sonra AFM1'in sütteki

konsantrasyonu tespit edilemeyecek seviyeye düşmektedir [13]. AFM1, 2012’de IARC tarafından toksik ve karsinojenik etkileri nedeniyle Grup 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır [14, 15].

Süt, AFM1’in hayvanlardan insanlara geçişindeki en önemli besin kaynağıdır. Ancak yoğurtlar ve diğer süt ürünleri de AFM1 ile kontamine olmuş sütler kullanılarak üretilmeleri halinde kaynak oluşturabilmektedir [12]. AFM1 başta kazein olmak üzere süt proteinlerine bağlanabilmekte ve bu sayede de yoğurt gibi süt ürünlerinde bulunabilmektedir [16]. İçeriğinde bulunan protein, B2, B12, kalsiyum, potasyum ve fosfor nedeniyle tüketimi sağlık açısından yararlı olan yoğurtlar da AFM1 kontaminasyonundan olumsuz etkilenebilmektedir [12, 17].

Bugüne kadar süt ürünlerindeki AFM1’i tamamen yok edebilecek yeterlilikte hiçbir uygulama bulunamamıştır [12]. Aflatoksinler pastörizasyon, ultra yüksek sıcaklık (UHT), pişirme, radyasyon, enzim ya da katkı maddelerinin ürüne eklenmesi gibi besin işleme süreçlerinde ve depolama sırasında kararlılığını korumakta, yapıları bozulmamaktadır. Süt ve süt ürünleri günlük beslenmede yeri olan ve düzenli olarak tüketilen gıdalar olduklarından AFM1’in stabilitesini koruması insan sağlığı için tehlike oluşturmaktadır [16, 18].

Süt ürünlerinin AFM1 ile kontaminasyonu dünyanın her yerinde görülen ve halk sağlığını tehdit eden önemli bir sorundur. Çoğu ülke tüketicinin sağlığını korumak, besin güvenliğini sağlamak ve bireylerin mikotoksinlere maruz kalımını mümkün olabilecek en düşük seviyeye getirebilmek amacıyla bazı mikotoksinlerin besinlerde bulunabileceği limitleri belirlemiştir [19]. Türk Gıda Kodeksi (TGK)’nin AFM1’in çiğ süt, ısıl işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütler için belirlediği en yüksek limit değeri 0,05 µg/kg, bebek formülleri ve devam formülleri için ise 0,025 µg/kg’dır [20]. Türk mutfağında yaygın olarak kullanılan bir süt ürünü olan yoğurt için belirlenmiş bir limit değeri bulunmamaktadır. Avrupa Birliği (AB)’nde yetişkinlerin tüketimine sunulan çiğ süt, ısıl işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütlerde AFM1’in bulunabileceği en yüksek limit değeri 0,05 µg/kg, bebek formülleri ve devam formüllerinde ise 0,025 µg/kg olarak belirlenmiştir [21].

AFM1’in toksik etkileri ve en yüksek limit değerlerinin belirlenmiş olması göz önünde bulundurulduğunda, süt ve süt ürünlerinde bu molekülün varlığının ve

miktarının saptanması büyük önem taşımaktadır. Süt, peynir, süt tozu ve yoğurt gibi süt ürünlerinde bulunan AFM1'in tespit edilmesinde kullanılan yöntemlerden biri de enzim bağılı immünosorbent deneyi (ELISA- Enzyme linked immunosorbent assay)'dir [16].

Yoğurtlardaki mikotoksin seviyelerinin tespit edilmesi amacıyla Türkiye'de ve dünyada yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır [22-25]. Bu çalışmada, İstanbul'daki marketlerde ticari olarak satılan farklı markalarda ve farklı lot numaralarına sahip 84 adet yoğurt örneği AFM1 varlığı ve düzeyi açısından ELISA yöntemi ile araştırılmış, elde edilen verilere göre yoğurtlarda potansiyel bir halk sağlığı riski olup olmadığı belirlenmiş ve epidemiyolojik verilere katkı sağlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksin kelimesi ‘mantar’ anlamına gelen Yunanca ‘mykes’ ile ‘zehir’ anlamına gelen Latince ‘toxicum’ kelimelerinin birleşiminden türetilmiştir [6]. Mikotoksinler özellikle *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi küf mantarları tarafından uygun sıcaklık ve nem şartlarında sentezlenen, insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkileyen zehirli ikincil metabolitlerdir [1, 2]. Koşulların uygun olması halinde hasat öncesinde, hasat zamanında, nakliye ve depolama sırasında tarımsal ürünlerde ortaya çıkabilmektedir [3]. Mikotoksinler et, süt ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdaların yanı sıra tahıllar, fındık, pirinç, baharatlar, mısır, bira, şarap, kahve, üzüm suyu gibi çok çeşitli bitkisel ürünlerde bulunabilmektedir [26].

Bugüne kadar 100’den fazla toksijenik mantar ve 300’den fazla mikotoksin tanımlanmıştır [27]. Bunlar moleküler ağırlığı düşük olan, yüksek kararlılığa sahip bileşikler olma özelliği göstermektedirler [28].

Mikotoksinlerin ikincil metabolitler olarak isimlendirilmelerinin nedeni, mantarların birincil amaçları olan büyüme ve üreme gibi faaliyetlerini gerçekleştirmeleri için gereksinim duydukları ürünlerden olmamalarıdır. Buna karşın bu metabolitlerin mantarların bitkilerin dokularını istila etmelerine destek olmak, böceklerle veya rekabet içinde oldukları diğer mantar türlerine üstünlük sağlamak gibi etkileri bulunmaktadır [5].

Mikotoksinlerin tamamı mantarlar tarafından sentezlenmektedir. Ancak mantarların ürettiği tüm toksinler mikotoksin olarak isimlendirilememektedir. Bunun için üretilen metabolitin hedefi ve konsantrasyonu belirleyicidir [29]. Mikotoksinler düşük konsantrasyonda omurgalılar ve diğer hayvanlar için zehirli etkileri olan kimyasallardır [30]. Etanol gibi yüksek konsantrasyonlarda toksik özellik gösteren metabolitler mikotoksin olarak sınıflandırılmamaktadır. Penisilin gibi bakterilere karşı toksik özellik gösteren mantar ürünleri ise ‘antibiyotik’ olarak adlandırılmaktadır. [29, 30].

Besinlerde sıklıkla bulunan mikotoksinler; aflatoksinler, okratoksinler, fumonisinler, trikotesenler ve zearalenondur [31]. Mikotoksinlerin moleküler yapıları

çeşitlilik gösterdiğinden, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkileri de birbirinden farklıdır [32]. Hormonal sistemleri bozabilmekte, organları hasara uğratabilmekte, immün sistemi baskılayabilmekte veya kansere yol açabilmektedirler [5]. Mikotoksinler yaygın olarak karaciğer kanseri, böbrek yetmezliği gibi hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmekte, ayrıca beyni ve sinir sistemini de etkileyebilmektedirler [5, 32].

2.1.1. Tarihçe

Seneler boyunca tarımsal ürünlerin, besin ve yemlerin mikotoksinlerle kontaminasyonu bu maddelerin toksik özellik göstermesi, çeşitli zehirlenmelere ve hem insanlarda hem de hayvanlarda birçok farklı sağlık problemlerine sebep olmaları nedeniyle endişe kaynağı olmuştur [33].

Toksin sentezleyen mantarlar ve mikotoksinler yaklaşık 10.000 yıl kadar önce insanların ekin yetiştirmeye ve yetiştirdikleri bu ürünleri depolamaya başlamasıyla besin kaynaklarında görülmeye başlanmıştır. İnsanların ve hayvanların beslenmesindeki en büyük mikotoksin kaynağı tahıllardır. Tahılların saklanması, bu bitkilerdeki hastalık yapıcı mantarlar ya da hasadı gerçekleştirilmiş tahıllarda yaşamını sürdüren saprofitik özellikteki mantarlar için uygun bir yaşam ortamı oluşturmuştur [34].

İnsanların beslenme, deri ile temas ve solunum yoluyla mikotoksinlere maruz kalması nedeniyle tarih boyunca birçok salgın yaşanmıştır [35]. Bu salgınlar özellikle kıtlıkların görüldüğü, savaşların ya da sel felaketlerinin yaşandığı dönemlerde ortaya çıkmıştır [36].

Çavdarlardaki *Claviceps purpurea* isimli mantarın ergotizm hastalığına yol açtığı 2000 yıldan uzun zamandan beri bilinmektedir [34]. Orta Çağ'da çavdarın temel gıda olduğu yerlerde birçok salgın görülmüştür. Bu hastalık o yıllarda 'Aziz Antuan ateşi' veya 'kutsal ateş' olarak isimlendirilmiştir. Enfekte çavdar tanelerinden elde edilmiş unlardan yapılmış ve ergot alkaloidleri içeren ekmeklerin yenmesi, ergotizm olarak bilinen bu zehirlenme vakalarına yol açmaktadır [37]. Geçen 1000 yılda bu hastalık Avrupa'da binlerce kişinin ölümüne sebep olmuştur [34]. Güney Fransa'da M.S. 944-945 yıllarında 20.000 kişi ergot zehirlenmesinden hayatını kaybetmiştir [5].

Japonya'da 17. yüzyıldan itibaren bilinen ve küflü pirinçlerin yenmesiyle bağlantılı olan akut kardiyak beriberi hastalığının *Penicillium citreonigrum*'un sentezlediği bir mikotoksin olan sitreoviridin ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır [34].

Hastalığın ilk belirtileri hızlı nefes almanın eşlik ettiği taşikardidir. Birkaç saat geçtikten sonra nefes alıp vermek zorlaşmakta, mide bulantısı ve kusma görülmektedir. İki-üç gün içinde ise ağrı, huzursuzluk, olağandışı davranışlar görülmekte, bazı durumlarda solunum yetmezliğine neden olan ilerleyici felç ölümüne neden olabilmektedir [34]. Artık sadece tarihi önemi olduğu sanılan sitreoviridin 2006 yılında Brezilya’da tekrar ortaya çıkmış, 1000’den fazla vakaya ve 40’tan fazla ölümüne sebep olmuştur. Hastalık yakın zamanda temizlenmiş olan arazilerde pirinç yetiştiren çiftçilerde meydana gelmiş ve genç erkeklerde daha fazla görülmüştür [34].

Fusarium cinsi mantarların sentezlediği T-2 toksinin de 1940’lı yıllarda Rusya’da görülen alimenter toksik alökide (ATA-Alimentary Toxic Aleukia) rolü olduğu bilinmektedir. Hastalık II. Dünya Savaşı sırasında dikkat çekmiştir. İş gücünde yaşanan sıkıntı nedeniyle hasat edilemeyen mahsuller tarlada kalmıştır. Besin yetersizliği, kontamine tahıllardan elde edilen gıdaların tüketilmesine neden olmuş ve bu durum insanlarda ağızda yanma hissine, kusmaya, halsizliğe yol açmıştır. Etkilenen kişiler bir süre sonra kendilerini daha iyi hissetse de ilerleyici lökopeni, anemi ve trombosit sayılarında azalma görülmüştür. Bu tahıllar yenmeye devam edildikçe ağız ve yüzde nekrotik lezyon oluşumu ve vücudun üst kısmında peteşiyal kanamalar görülmüş, bu aşamadan sonra hastaların neredeyse tamamı hayatını kaybetmiştir [34].

Bir başka mikotoksin olan ve nefrotoksik etkiler gösteren okratoksin A (OTA)’nın ise 1950’lerde ortaya çıkan, inflamatuvar olmayan ve bilateral olarak görülen böbrek lezyonuna sebep olan Balkan endemik nefropatisinden (BEN) sorumlu mikotoksin olduğu düşünülmektedir [38]. İlk olarak 1956’da Sırbistan, Bulgaristan, Bosna-Hersek, Romanya ve Hırvatistan’da kronik bir böbrek hastalığı olarak tanımlanan BEN, Bulgaristan, Hırvatistan ve Sırbistan’daki BEN hastalarının böbrek dokularında ve ürotelyal tümörlerinde OTA ilişkili DNA bulgularının saptanmasıyla, hastalığın etiyolojisinde OTA’nın rolüne dair moleküler kanıt bulmayı hedefleyen çalışmaların konusu olmuştur [39].

Mikotoksikoloji çalışmaları 1960’lı yıllarda hindilerin tükettiği yemlerde bulunan aflatoksinlerin keşfi ile başlamıştır [35]. Mikotoksin terimi ilk defa 1962 yılında Londra şehri yakınlarında sayısı 100.000’i bulan hindinin ölümüyle sonuçlanan daha önce karşılaşılmamış bir veterinerlik krizinin yaşanmasıyla ortaya çıkmıştır. Hindi x hastalığı olarak adlandırılan bu hastalığın *Aspergillus flavus*’un sentezlediği

aflatoksinler ile kontamine olmuş yer fıstıklarını içeren yemlerle ilişkili olduğu anlaşılmıştır [19]. Aflatoksinlerin keşfi, modern mikotoksin araştırmalarının başlangıcını temsil etmektedir. Sonraki yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar sayesinde yaygın olarak görülen çoğu mantar türünün hem besinlerin bozulmasına hem de bitkilerde hastalıkların görülmesine sebep olabilen farklı düzeyde toksisiteye sahip birçok metabolitler sentezleyebildiği belirlenmiştir [32].

2.1.2. Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler

Mikotoksinlerin kalitatif ve kantitatif analizi amacıyla doğru ve hassas tekniklerin geliştirilmesiyle araştırmacılar mantar kolonizasyonunu ve mikotoksin sentezini etkileyen birbirine bağlı çeşitli faktörler olduğunu belirlemişlerdir [31].

2.1.2.1. Sıcaklık ve Bağıl Nem

Mantarların üremeleri ve mikotoksin sentezlemeleri bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar çevresel koşullardan ve mantar türlerinin ihtiyaçlarının değişiklik göstermesinden kaynaklanmaktadır. Tropikal ya da subtropikal iklimin hakim olduğu bölgelerde aflatoksinler daha sık görülmektedir [19]. Bu bölgelerde nem ve sıcaklık fazla olduğu için daha yüksek miktarlarda mikotoksin varlığı beklenmektedir [40]. Çoğu mantar türü 5-35°C sıcaklık aralığında üreyebilmektedir. Üremeleri için ideal sıcaklık ise 25-30°C'dir. Üremeleri için elverişli olan koşullar, mikotoksin sentezi için de her zaman olumlu olmamaktadır. Ancak genel olarak bakıldığında 25-30°C sıcaklık değeri ve %88-95 aralığındaki bağıl nem değerleri mantarların üremesi ve mikotoksin üretebilmesi için uygun şartlardır [19]. Bazı mantar türlerinin mikotoksin sentezleyebilmeleri için gerekli olan sıcaklıklar Tablo 2-1'de gösterilmiştir [19].

Tablo 2-1: Bazı mantarların üremeleri ve mikotoksin sentezlemeleri için gerekli sıcaklık değerleri

Mantar	Üreme	İdeal üreme	İdeal toksin sentezi
<i>Aspergillus flavus/A. parasiticus</i>	15-44°C	35°C	33°C
<i>A. ochraceous</i>	10-40°C	24-31°C	25-30°C
<i>A. carbonarius</i>	8-40°C	32-35°C	30-35°C

2.1.2.2. Su Aktivitesi

Depolama esnasında çevrenin nemi besinin denge bağıl nemini aşarsa, besin nem kazanır ve besindeki su aktivitesi yükselir. Depolama sırasında yükselen su aktivitesi mantarların üremesi ve mikotoksin sentezi ile ilişkilidir [19].

Genellikle 0,78'den yüksek olan su aktivitesi mantarların üremesi ve mikotoksin sentezlemeleri için uygundur [19]. *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi birçok küfün gereksinim duyduğu en düşük su aktivitesi 0,75-0,85 aralığındadır ve bu değer 0,93-0,98'e ulaştığında ise daha iyi üremektedirler [6].

2.1.2.3. pH

Her mikroorganizma türünün geliştiği bir optimum pH aralığı vardır. Küfler pH 2,0-8,5 gibi geniş bir pH aralığında çoğalmaktadırlar [41]. Belli mikotoksin çeşitlerinin üretiminde pH değerinin etkisi türler için ayrı ayrı belirlenmemiştir. Ancak asidik ortam koşulların mikotoksin üretimini teşvik ettiği bilinmektedir. Aflatoksin sentezi pH 4 ve altında artmaktadır. [19].

2.1.2.4. Mantar Suşu

Bir türe ait suşların üremesi ve toksin üretmesi için gerekli olan ideal koşullar farklılık gösterebilmektedir. Bununla beraber, aynı türün farklı suşları da farklı mikotoksinler üretebilmektedir. Örneğin *A. flavus* 15-44 °C aralığında AFB1, *A. carbonarius* ise 8-40°C sıcaklık aralığında OTA sentezlemektedir [19].

2.1.2.5. Substratın Özelliği

Mikotoksijenik mantarlar çok çeşitli organik materyaller üzerinde üreyebilmektedir [19]. Konak bitkiye ait metabolitler, nitrojen, karbon ve şekerler aflatoksin sentezini etkileyen faktörlerdendir [8]. Küflerin üremeleri için gereksinim duydukları besin maddeleri özellikle karbonhidratlarda çokça bulunduğundan, neredeyse tüm yiyecek maddelerinde üreyebilmektedirler. Basit şekerlerin varlığında mantarlar daha yoğun ürerken, kompleks şekerlerin varlığında daha yavaş üremektedirler [19].

2.1.2.6. Oksijen ve Karbondioksit Miktarı

Düşük oksijen konsantrasyonu ve yüksek karbondioksit konsantrasyonu mantarların gelişmesinin ve mikotoksin sentezlemelerinin engellenmesine katkı

sağlamaktadır. Oksijen konsantrasyonunun %5'ten %1'e düşürülmesi *Aspergillus* cinsi küflerin üremesini ve aflatoksin sentezini azaltabilmektedir [42].

2.1.2.7. Depolama Süresi

Sıcak ve nemli hava şartları depolamayı önemli ölçüde etkileyerek tahılların bozulmasının hızlanmasına sebep olacak faktörler arasında olumsuz etkileşimlere neden olabilmektedir. Sıcak iklimin görüldüğü yerlerde *A. flavus* yüksek sıcaklıkta üreyebildiği ve aflatoksinleri sentezleyebildiği için riskli hale gelmektedir. Bu risk yüksek neme sahip bölgelerde depolanan tahıllarda artış göstermektedir [19]. Mantarlar uygun şekilde kurutulmuş gıdalarda gelişmemektedir. Eğer hasat sonrasında elde edilen ürünler yeterince kurumaları sağlanmadan depolanacaksa, depolama süreleri üç günden fazla olmamalıdır [10].

2.1.2.8. Mekanik Hasar

Haşerelerin istilası nem seviyesini arttırabilmekte, mahsule fiziksel hasar verebilmekte ve mantarların yayılmasına neden olabilmektedir [19]. Böcekler aflatoksijenik mantarların sporlarını bitkilere yaymakta ve mantarlar böceklerin hasar verdiği bölgede kolonize olmaktadır [31].

2.1.3. Mikotoksikoz

Günümüzde tanımlanmış olan 300'ün üzerinde mikotoksinin çok azı insan ve hayvanlarda görülen mikotoksikozlara neden olmaktadır. Mikotoksikozlar mikotoksinlerin kontamine gıdaların tüketimi, derinin temas etmesi ve solunum yoluyla alınması sonrasında gelişen hastalıklardır. Tropikal bölgelerde yüksek nem ve sıcaklık nedeniyle mantarların üremesi ve mikotoksin sentezlemeleri için koşullar elverişli olduğundan mikotoksikozlar daha sık görülmektedir [3]. Mikotoksinin çeşidine, miktarına, temas şekline ve kişinin yaşına, cinsiyetine, sağlık durumuna bağlı olarak ortaya çıkan klinik tablo ve belirtiler değişiklik göstermektedir [27]. Mikotoksikozlar akut veya kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Akut mikotoksikozlarda semptomlar hızlı bir şekilde ortaya çıkmakta, maruz kalmanın devam etmesi halinde ise ölümle sonuçlanabilmektedir. Kronik mikotoksikozlar düşük miktardaki mikotoksinlere uzun süre maruz kalındığında gelişmekte, çoğu zaman herhangi bir belirti gözlenmemektedir [3].

Bazı mikotoksinler kanser gelişimi ya da immün yetmezlik gibi uzun süreli ve kümülatif etkilere neden olmaktadır [31]. Aflatoksinler akut aflatoksikozun bilinen nedenidir. Aynı zamanda Hepatit B virüsü ile birlikte hepatik karsinomun potansiyel kofaktörüdür. OTA, BEN ile ilişkilendirilmiştir. Balkanlarda yaşayan kırsal nüfusta yüksek oranda kronik böbrek problemleri ve üriner sistem tümörleri görülmektedir. Triketesinler ATA ile, fumonisinler ise özofagus kanseri ile ilişkilendirilmiştir [43].

2.1.4. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyonu

FAO, dünyadaki gıda kaynağı bitkilerin yaklaşık olarak %25'inin kontamine olmasından mikotoksinleri sorumlu tutmaktadır [3]. Mikotoksinlerle kontaminasyon her yıl milyarlarca dolar değerinde tarımsal ve endüstriyel kayba neden olmaktadır [6]. Kontamine olmuş tarım ürünlerinin imha edilmesi gerekli olduğundan, bu kontaminasyonlar önemli ekonomik sonuçları da beraberinde getirmektedir [11].

Dünya genelinde mısır, yer fıstığı, fındık, hindistan cevizi, yağlı tohumlar gibi tarımsal ürünlerin 100 milyon tonu mikotoksinlerle kontaminasyon riski altındadır. Risk altındaki bu tarımsal ürünlerin 20 milyon tonu gelişmekte olan ülkelere aittir [3]. Bu ülkelerde sıcak iklim, gıdaların kontrolünün sağlanamaması, yetersiz üretim teknolojileri ya da kötü işlenme ve depolama koşulları gibi mantarların gelişmesine ve mikotoksin sentezlemelerine elverişli koşulların bulunması nedeniyle mikotoksinlerle kontaminasyona daha sık rastlanmaktadır [6].

Türkiye 1997 yılından 2001'e kadar yıllık ortalama 600.000 ton fındık üretimi ile lider üretici konumuna ulaşmıştır. Türkiye'de ilk kez 1967 yılında en önemli ihracat ürünlerimizden olan kabuklu fındıklarda bulunan aflatoksinlerle ilgili araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Türkiye'de üretilen fındıklarda yüksek miktarda aflatoksin bulunduğu AB tarafından birçok kez rapor edilmiş, bu sebeple İspanya kabuklu fındık üretimi için teşvikler almıştır. AB'nin kabuklu fındıkları reddetmesiyle Türkiye'nin 1998-2002 yılları arasında 4,5 milyon ABD doları kaybı olduğu belirtilmiştir. Kanada ve ABD'ye ihraç edilen kabuklu fındıklar da aflatoksin içerdikleri gerekçesiyle reddedilmiştir. Antep fıstığı, kuru incir ve kırmızı biber ihracatında da zaman zaman benzer sorunlar yaşanmıştır [44].

Gıdalarda yaygın olarak bulunan mikotoksinler ve sağlık üzerine etkileri Tablo 2-2'de özetlenmiştir [1, 5, 19, 27, 45].

Tablo 2-2: Gıdalarda yaygın olarak bulunan mikotoksinler

Mikotoksin	Sentezleyen mantar türleri	Bulunduğu gıda ürünleri	Sağlık üzerine etkileri
Aflatoksinler B1, B2, G1, G2, M1, M2	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nominus</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i>	Tahıllar, mısır, pirinç, yer fıstığı, fındık, baharatlar, buğday, yağlı tohumlar AFM1, AFB1'in metabolitidir. Süt ve süt ürünlerinde bulunur.	Karaciğer kanseri, bağışıklığın baskılanması, mutajenik, teratojenik etkiler
Okratoksinler A, B, C	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Buğday, arpa, yulaf, kakao çekirdekleri, kahve çekirdekleri, meyve ve meyve suyu, kuru meyveler, şarap	İmmunotoksik, nörotoksik, hepatotoksik, teratojenik, nefrotoksik. OTA ürotelyal tümör, böbrek yetmezliği, kronik nefrit, BEN ile ilişkilidir.
Fumonisinler B1, B2, B3	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. nyagamai</i> , <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i>	Mısır ve mısır ürünleri, pirinç, buğday, sorgum, arpa, yulaf, kuşkonmaz, fasulye	Sfingolipid sentezinin inhibisyonu, insanlarda özofagus ve karaciğer kanseri, atlarda at lökoensefalomalazisi, domuzlarda akciğer ödemi
Trikotesenler T-2 toksin, HT-2 toksin, deoksinivalenol, nivalenol, skirpentriol, neosolaniol	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Stachybotrys</i>	Pirinç, yulaf, buğday, sebze, çavdar, arpa, mısır, hayvansal gıdalar (karaciğer, yumurta, süt ve böbrek)	Alimenter toksik alöki, DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu, lipid peroksidasyonu, apoptoz, mitokondriyal fonksiyonların inhibisyonu
Zearalenon	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>	Mısır, buğday, arpa, sorgum	Hiperöstrojenik etkiler
Ergot alkaloidleri			Ergotizm
Ergotamine, ergokriptin, ergokornin, ergokristin, ergovalin	<i>C. purpurea</i>	Çavdar, arpa, buğday, yulaf	
Agroklavin, setoklavin, kanoklavin, elmoklavin	<i>C. fusiformis</i>	Darı	
Dihidroergosin, dihidroelymoklavi	<i>C. africana</i>	Sorgum	
Patulin	<i>P. expansum</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. urticae</i> , <i>P. crustosum</i>	Elma ve elma ürünleri, meyveler, tahıllar, baklagiller	Hayvanlarda immunotoksik ve karsinojenik etkiler. İnsanlarda toksik etkiler göstermesine rağmen, karsinogen olduğunu gösteren güvenilir bir kanıt yoktur.
Siklopiazonik asit	<i>P. griseofulvum</i> , <i>A. flavus</i>	Çavdar, arpa, buğday, yulaf	Baş dönmesi ve mide bulantısı ile karakterize Kodua zehirlenmesi
Sitrinin	<i>P. citrinin</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Monascus spp.</i>	Arpa, yulaf, pirinç, çavdar, buğday	Hayvanlarda nefrotoksik etkiler. Japonya'da görülen sarı pirinç hastalığı ile ilişkilidir.

2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler 1960'lı yıllarda İngiltere'de çoğu hindi olmak üzere yaklaşık 100.000 kümes hayvanının ölümünden sonra yapılan araştırmaların sonucunda toksik olarak sınıflandırılan ilk mikotoksinlerdir. Başlangıçta bu gizemli hastalığın nedeni bilinmediği için adına hindi X hastalığı denmiş, sonradan kümes hayvanlarının yemlerinin aflatoksin ile kontamine olmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bu durum mikotoksinler alanında yapılan araştırmalarda çığır açmış ve küflü ürünlerin yoğun ve sistematik olarak kontrol edilmesini ve bazı ülkelerde limit değerlerinin belirlenmesini sağlamıştır [6].

Aflatoksin kelimesinin ilk harfi olan 'a' *Aspergillus* kelimesinin ilk harfinden ve 'fla' kısmı ise *A. flavus*'tan gelmektedir. Toksin kelimesi de zehir anlamında kullanılmaktadır [46]. En önemlileri AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 ve AFM2 olmak üzere, bilinen 20 aflatoksin türü vardır [10].

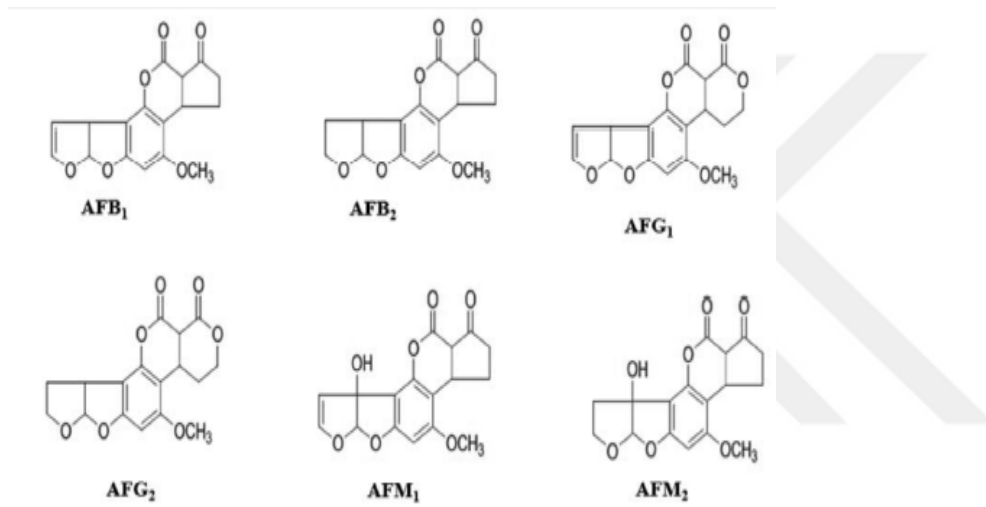
Aflatoksinler özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* olmak üzere *Aspergillus* cinsi mantarlar tarafından sentezlenmektedir. *A. flavus* B1 ve B2, *A. parasiticus* B1, B2, G1 ve G2'yi sentezlemektedir [32]. Aflatoksin sentezleyen diğer türler *A. zhaoingensis*, *A. bombycis*, *A. toxicarius*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola*, *A. nominus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonominus*, *Emericella astellata*, *E. venezuelensis* ve *E. olivicola*'dır [6, 8].

Aflatoksin sentezleyen küflerin gelişimi için 23-35°C sıcaklık ve %70'in üzerinde nispi nem gerekli optimum koşullardır [47]. Aflatoksinler tahıllar, yağlı tohumlar, baharatlar, kuru meyveler, ağaç yemişleri, et ve süt gibi çok çeşitli besinlerde bulunabilmektedirler [48]. Depolama sırasında yüksek nem içeriğine sahip herhangi bir ürün aflatoksinlerle kontamine olabilir ancak özellikle yer fıstığı, mısır, pirinç, sorgum, bazı yağlı tohumlar, hindistan cevizi ve kabuklu yemişler gibi yaz bitkileri, arpa ve buğday gibi kış bitkilerine göre daha fazla risk altındadır. Çünkü soğuk ve yağışlı koşullar aflatoksin sentezleyen mantarların üremesi için elverişli değildir [5].

2.2.1. Aflatoksinlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Aflatoksinler difuranokumarin kimyasal yapısına sahiptirler [30]. En önemli aflatoksinlerin kimyasal yapıları Şekil 2-1’de gösterilmiştir [18]. Toksisitelerine göre en toksik AFB1 ve en az toksik AFG2 olmak üzere AFB1, AFG1, AFB2 ve AFG2 olarak sıralanmaktadır [30].

AFM1 (milk toxin-süt toksini), AFB1’in, ve AFM2 ise AFB2’nin hidroksillenmiş metabolitidir. Laktasyon dönemindeki hayvanlar AFB1 ile kontamine yemleri tükettiklerinde karaciğerde AFM1’e dönüşmekte, oluşan AFM1 de süte geçmektedir [6, 7].



Şekil 2-1: En önemli aflatoksinlerin kimyasal yapıları

Aflatoksinler difurokumarosiklopentenon serisi ve difurokumarolakton serisi olmak üzere iki kimyasal gruba ayrılmaktadırlar. AFB1, AFB2, AFM1, AFM2, difurokumarosiklopentenon serisinden; AFG1 ve AFG2 ise difurokumarolakton serisindendir [30].

Aflatoksinler renksiz ya da soluk sarı renkte kristallerdir [49]. Ultraviyole (UV) ışığı altında AFB1 ve AFB2 mavi renk, AFG1 ve AFG2 ise yeşil renk floresans vermektedir. AFM1 de güçlü bir mavi-mor floresans verme özelliğine sahiptir [12]. Aflatoksinler suda az (10- 20 µg/ml), kloroform, dimetil sülfoksit ya da mentol gibi orta derecede polar çözücülerde iyi çözünürler [49]. AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 ve AFM2’nin bazı kimyasal özellikleri Tablo 2-3’te gösterilmiştir [50].

Tablo 2-3: Ana aflatoksinlerin bazı kimyasal özellikleri

Aflatoksin	Moleküler ağırlık (g/mol)	Formül	Erime noktası (°C)
B1	312,28	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	268-269
B2	314,29	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	286-289
G1	328,28	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	244-246
G2	330,29	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	237-240
M1	328,28	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	299
M2	330,29	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	293

2.2.2. Aflatoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri

İnsan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkileri nedeniyle en tehlikeli mikotoksinler olarak nitelendirilen aflatoksinlere beslenme, solunum ya da cilt teması ile maruz kalılabilmektedir [7, 8, 16].

Aflatoksinlere bağlı olarak gelişen hastalıklar aflatoksikoz olarak adlandırılmaktadır. Akut aflatoksikozlar ölümle sonuçlanabilirken, kronik aflatoksikozlar ise kanser oluşumuna, bağışıklığın baskılanmasına ve diğer yavaş gelişen patolojik durumların görülmesine neden olmaktadır [29].

Akut aflatoksikoz vakaları nadiren bildirilmektedir. Bunun bir örneği 2004 yılında Kenya’da görülmüştür. Toplam 317 kişide tespit edilen akut karaciğer yetmezliği, 125 kişinin ölümüne neden olmuştur. Bu kişilerin serumlarında yüksek konsantrasyonda AFB1 varlığı belirlenmiş ve bölgeden toplanan mısır örneklerinde besinler için tavsiye edilen sınır değer olan 20 ppb’den 220 kat yüksek (4400 ppb) konsantrasyonda AFB1 saptanmıştır [51]. Tanzanya’da 2016 yılında aynı bölgede yaşayan insanlar arasında 20’si ölümle sonuçlanan 68 vaka görülmüş, yapılan incelemelerin ardından sorumlu besinin yetiştirilen mısırlar olduğu sonucuna varılmıştır. Hastaların ve hasta olmayanların serumlarındaki aflatoksin biyobelirteci karşılaştırıldığında, hastalarda 1000 pg/mg’den daha fazla aflatoksin-albümin bulunduğu belirlenmiştir [52].

Aflatoksikozlar için özel bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Aflatoksinler tüm beslenme kaynaklarından uzaklaştırılmalıdır. Aflatoksinlerden etkilenen hayvanlara hastalık belirtilerini ve bulgularını ortadan kaldırmaya yönelik yaklaşımlar uygulanması tavsiye edilmektedir. Az miktarda protein alan hayvanlar aflatoksinlere daha duyarlıdır. Bu nedenle kanatlı hayvanların beslenmesinin metiyonin, kolin, N-asetilsistein ile desteklenmesi önerilmektedir. Aflatoksinlerden en iyi korunma yöntemi, toksin oluşumunu etkileyen ve insan kontrolüne bağlı olan şartlardan kaçınmaktır. Bazı maddelerin aflatoksinlerin toksik etkisini azalttığı gösterilmiştir. Aflatoksinlerin biyotransformasyonunu engellemek amacıyla doğal ürünlerin ya da ilaçların kullanılması önerilmekte, örneğin yeşil çaydaki polifenollerin CYP1A1 enzim aktivitesini azaltarak AFB1'e bağlı olarak gelişen hepatokarsinogenezi azalttığı ya da engellediği belirtilmektedir [8].

AFB1 aflatoksin çeşitleri arasındaki en kuvvetli karaciğer karsinojenidir ve bu nedenle IARC tarafından Grup 1 ajan olarak sınıflandırılmıştır [15]. Kronik Hepatit B virüsü enfeksiyonu olan ve aflatoksinlere maruz kalan kişilerin karaciğer kanserine yakalanma riski, sadece aflatoksinlere maruz kalan bireylerden 30 kat daha fazladır [6]. Beslenme ile alınan AFB1 gastrointestinal sistemde absorbe edildikten sonra karaciğerde biyotransformasyona uğramakta, daha sonra idrar ve dışkı ile atılmaktadır. AFB1'in karsinojenik formu olan AFB1-8,9-epoksit formuna dönüşümünden sitokrom P450 enzimleri sorumludur. Bu epoksit formu biyomakromoleküllere kovalent bağlanabilmekte ve DNA'ya bağlandığında AFB1-N7-guanin, serum albümine bağlandığında lizin eklentileri oluşturabilmektedir. AFB1 ve DNA arasında oluşan bağ, DNA molekülünün yapısını ve biyolojik aktivitesini değiştirerek mutajenik ve kanserojenik etkilerin görülmesine neden olmaktadır. İnsanlarda AFB1-N7-guanin gibi AFB1 metabolitlerinin izlendiği çalışmalar, beslenme yoluyla AFB1'e maruz kalan popülasyonlarda hepatoselüler karsinom (HCC-Hepatocellular carcinoma) riskinin yüksek olduğunu göstermiştir. Bu ilişki AFB1 mikotoksininin tümör baskılayıcı gen p53'te spesifik bir mutasyonu indükleyebilmesine dayanmaktadır [53].

Aflatoksinler bağışıklık sistemini de etkilemektedir. Kümes hayvanları ve diğer hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda aflatoksinlerin T hücre sayısı ve aktivitesinde azalmaya, antikor yanıtının ve interferon gibi humoral bileşenlerin

azalmasına ya da fagositik aktivitenin baskılanmasına sebep olabildiği gösterilmiştir [53].

Aflatoksinler üreme performansını da etkileyebilmektedir. Doğum öncesinde maruz kalındığında olumsuz rahim içi/yumurta içi etkileri görülebilmektedir. Olgun horozlarda testis dejenerasyonu, plazma testosteronunda azalma, testis kütlelerinde azalma ve hormonal yanıtın değişmesine, tavuklarda ise yumurta üretiminin azalmasına sebep olmaktadır [8].

AFM1'in karsinojenisitesi AFB1'inkinin %2-10'u kadardır [22] ancak neredeyse AFB1 ile aynı karaciğer toksisitesi mevcuttur [54]. Toksik ve karsinojenik özellikleri nedeniyle IARC 2012'de AFM1'i Grup 1 karsinojen olarak sınıflandırmıştır [15].

Pediyatrik aflatoksikoz formu olduğu düşünülen iki hastalık vardır. Bunlardan biri Kwashiorkor, diğeri ise ensefalopati ve iç organların yağlı dejenerasyonu ile karakterize Reye sendromu hastalığıdır. Her iki hasta grubundan çocukların karaciğerinde aflatoksin varlığının tespit edilmesi bu hastalıklarla aflatoksinler arasında ilişki olduğunu düşündürmekle birlikte, daha fazla kanıt ihtiyacı bulunmaktadır [27].

İnsanlar aflatoksinlere kontamine gıdaların tüketilmesiyle doğrudan veya kontamine yemleri tüketen hayvanların et ve süt gibi ürünlerinin tüketilmesi ile dolaylı olarak maruz kalabilmektedir [12]. Aflatoksinlere maruz kalındığını gösteren vücut sıvılarındaki biyobelirteçler Tablo 2-4'te verilmiştir [30].

Tablo 2-4: İnsan vücut sıvılarında aflatoksinlere maruz kalmanın göstergesi olan biyobelirteçler

İdrar	Kan	Süt
AFB1	AFB1	AFM1
AFB2	AFB2	
AFG1	AFG1	
AFG2	AFG2	
AFM1	AFM1	
AFQ1	AFQ1	
AFP1	AFP1	
AFB2a	AFB2a	
Aflatoksikol	Aflatoksikol	
AFB1-N7-guanin	AFB1-albumin	
Aflatoksin- merkapturik asit	AFB1-N7-guanin	

2.2.3. AFB1'in AFM1'e Biyotransformasyonu

AFB1'in biyotransformasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği organ karaciğerdir [7]. AFB1 karaciğerde demetilasyon, indirgenme, epoksidasyon ve hidroksilasyon tepkimelerine uğramakta ve gerçekleşen farklı tepkimelerin sonucunda farklı metabolitler meydana gelmektedir [7].

Karaciğer hücrelerinde bulunan CYP3A4 ve CYP1A2 enzimleri AFB1'in aflatoksin-ekzo-8,9-epoksit formuna dönüşümü için gereklidir. CYP1A2 hem epoksidasyon ile AFB1'in aflatoksin-endo-8,9-epoksit formunun hem de hidroksilasyon reaksiyonları ile AFM1'in oluşumunu katalizleyen enzimdir [18].

İndirgenme reaksiyonu sonucunda yüksek toksisiteye sahip olan aflatoksikol oluşmaktadır. Epoksidasyon tepkimeleri sonucunda AFB1-8,9-epoksit oluşmakta ve bu metabolit toksik, mutajenik ve karsinojenik etkiler göstermektedir. Hidroksilasyon tepkimesiyle ise yüksek toksik değere sahip olan ve süte salgılanan AFM1 molekülü ile daha düşük toksik değerdeki aflatoksin Q1 metaboliti ortaya çıkmaktadır. Demetilasyon

249. kodunda gerçekleşen bu mutasyon tümör dokusunda sabit olan kanserojene özgü bir biyobelirtecin ilk örneği olarak sayılmaktadır [29].

2.2.4. Sütte ve Süt Ürünlerinde AFM1

Süt, büyüme ve insan sağlığının korunması için gerekli olan makro ve mikro besinleri sağlayan önemli bir gıdadır. Süt ve süt ürünleri özellikle küçük çocuklar olmak üzere her yaş grubundan insan tarafından tüketildiğinden sütlerin mikotoksinler gibi toksik özellikteki bileşikler içermemesi gerekmektedir [25].

Süt ve süt ürünlerinde AFM1'in bulunması küresel bir endişe sebebidir çünkü bu mikotoksinin çok az miktarı bile uzun süre maruz kalınması halinde zararlı olabilmektedir [57]. AFM1'in karsinojenik potansiyeli AFB1'inkinden daha az olsa da akut toksik etkileri benzerlik göstermektedir [25]. AFM1 pastörizasyon, ultra yüksek sıcaklık (UHT), pişirme, radyasyon, enzim ya da katkı maddelerinin ürüne eklenmesi gibi besin işleme süreçlerinde ve depolama sırasında kararlılığını korumakta, yapısında herhangi bir bozulma meydana gelmemektedir [16, 18]. AFM1 seviyesini düşürmek amacıyla bazı uygulamalar önerilmiş olsa da bugüne kadar süt ürünlerindeki AFM1'i tamamen yok edebilmek için yeterli olan hiçbir uygulama geliştirilememiştir [12]. Bu nedenle süt ürünlerindeki AFM1 özellikle çocuklar gibi bu ürünleri çok miktarda tüketen kişiler için sağlık açısından tehdit oluşturmaktadır [25].

Hayvanlar AFB1 ile kontamine yemleri tükettikten yaklaşık 12 saat sonra AFB1'in %0,3-6,2'si AFM1'e dönüşmektedir. Bu dönüşüm kan ve süt gibi vücut sıvılarında belirlenebilmektedir [12, 58]. Dönüşüm oranı hayvanların genetik yapısından, mevsimsel değişimlerden, sağım sürecinden ve çevresel koşullardan etkilenmektedir [58]. İnsanların beslenme yoluyla aldıkları AFB1'in %0,09-0,43'ü, koyunların aldıklarının %0,26-0,33'ü, domuzların aldıklarının ise yaklaşık bin kat az miktarı sütlerine geçmektedir [8].

AFM1, AFB1'in vücuda alımından 12-24 saat sonra sütte tespit edilebilmektedir. Birkaç gün geçtikten sonra sütteki AFM1 seviyesi yükselmekte, AFB1'in alımının sona ermesinden 72 saat sonra ise tespit edilemeyecek seviyeye düşmektedir [13].

Tolere edilebilir günlük AFM1 alım miktarı, bir kişinin yaşamı boyunca olumsuz yan etkilere maruz kalmadan günlük alabileceği en yüksek toksin miktarıdır

[22]. Kuiper-Goodman AFM1 için tolere edilebilir günlük alım miktarını 0,2 ng/kgvücutağırlığı olarak hesaplamıştır [12].

Avrupalıların beslenmesinde sütün alınan AFM1 miktarı kişi başına günlük olarak 6,8 ng'dır. Aynı değer Latin Amerikalıların diyetine göre 3,5 ng, Uzak Doğu diyetine göre 12 ng ve Afrikalıların beslenmesine göre ise 0,1 ng'dır [59].

2.2.5. Yoğurtta AFM1

Yoğurt binlerce yıldan beri insan beslenmesinin bir parçasıdır. İçeriğinde protein, B2, B12, kalsiyum, potasyum, fosfor gibi başlıca gıda maddeleri bulunmaktadır [17]. AFM1 başta kazein olmak üzere süt proteinlerine bağlanabilme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle yoğurtlarda da bulunabilmektedir [16]. Sütte bulunan aflatoksinlerin yaklaşık %75'i kazein kısmında, %25'i ise peynir altı suyu proteini kısmında bulunmaktadır [8].

Süt AFM1'in hayvanlardan insanlara geçişindeki en önemli kaynaktır. Ancak yoğurtlar ve diğer çeşitli süt ürünleri AFM1 ile kontamine olmuş sütler kullanılarak üretilmeleri ve önemli miktarda tüketilmeleri halinde toksik etkiler gösterebilmektedir. Yoğurt tüketiminin sağlık açısından yararları AFM1 kontaminasyonundan olumsuz yönde etkilenebilmektedir [12].

Yoğurt Türk mutfağında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle yoğurtlardaki mikotoksin seviyelerinin kontrol altında tutulması önem taşımaktadır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda yoğurtların %3,3-100'ünün AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir [13, 23, 60-62]. Yurt dışında yapılan çalışmalarda ise bu oran %2,8-100 olarak bildirilmiştir [24, 63-66].

Mohammadi ve ark. [12] bazı Asya ülkelerinde yoğurt tüketimi yoluyla AFM1'e maruz kalma oranını değerlendirdikleri bir meta analiz çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada 2006-2020 yılları değerlendirmeye alındığında Türkiye'deki yoğurtların %62,71'inin AFM1 ile kontamine olduğu ve %31,25'inin AB limit değeri olan 50 ng/kg'ı aştığı belirlenmiştir. Türkiye'de yoğurttan kişi başına günlük AFM1 alım miktarının 1,93 ng/kişi/gün olduğunu bildirmişlerdir. Tahmini günlük alım miktarının (EDI-Estimated Daily Intake) çocuklar için 0,38 ng/kgvücutağırlığı/gün, yetişkinler için ise 0,08 ng/kgvücutağırlığı/gün olarak tespit edilmiştir. EDI değerinin TDI'ye bölünmesiyle elde edilen tehlike indeksi (HI-Hazard index) çocuklar için 1,90

ng/kgvücutağırlığı; yetişkinler için ise 0,40 ng/kgvücutağırlığı olarak belirlenmiştir. Tehlike indeksinin birin üzerinde olmasının karaciğer kanseri riskindeki artışı gösterdiği belirlendiğinden, çocuklar için tehlikenin endişe verici boyutta olduğu bildirilmiştir.

2.2.6. AFM1 Tespit Yöntemleri

Aflatoksinlerin tespitinde aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır [67]:

- Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (Liquid chromatography mass spectroscopy-LC-MS),
- İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography-TLC),
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography-HPLC),
- Gaz kromatografisi (Gas chromatography-GC),
- İmmünoaffinite kolon testi (Immunoaffinity coloumn assay-ICA)
- Enzim bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme linked immunosorbent assay-ELISA)

Süt ve süt ürünlerinde bulunan AFM1'in belirlenmesinde ince tabaka kromatografisi, sıvı kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve enzime bağlı immünolojik testler kullanılmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılanlar kromatografik yöntemler ve ELISA'dır [12, 64].

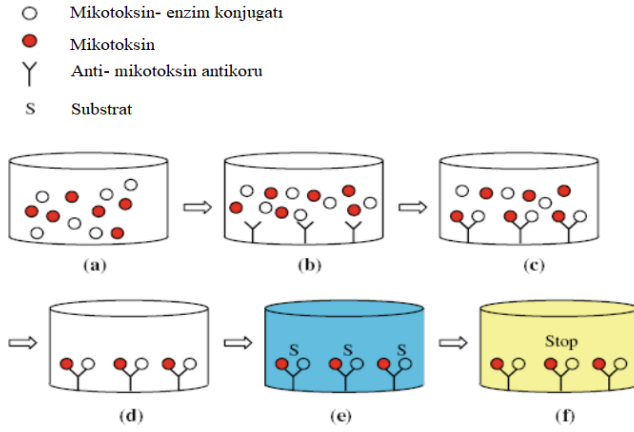
Mikropleyt ve okuyucu bazlı immün testlerde 96 ya da 384 kuyucuklu plaklar kullanılmaktadır. Böylece örneklerin çoklu ve aynı anda analizine imkan sağlanmaktadır. Mikrotitre okuyucular örneklerdeki analit miktarına göre işlenen optik absorbans, kemilüminesans ya da floresansı bildirmek için veri işleme yazılımından yararlanmaktadır. Sıklıkla kullanılan mikroplak bazlı immün testler ELISA, kemilüminesans ve floresans bazlı testlerdir [18].

2.2.6.1. ELISA

Kromatografik metotlar besinlerdeki AFM1'in saptanması ve miktar tayinin gerçekleştirilmesi için daha hassas yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerde daha çok zamana, toksik çözücülerin kullanılmasına ve yöntemi uygulayan kişinin becerisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle kromatografik yöntemler yerini daha az zaman alan ve uygulanışı daha basit olan ELISA'ya bırakmıştır [12]. ELISA ile AFM1 tespiti pastörize ve ultra yüksek sıcaklık (UHT) sütler, süt tozları, peynir ve yoğurt gibi süt

ürünlerinde sıkça uygulanan kolay ve hassas bir yöntemdir. Yarışmalı ELISA metoduna dayanan ve ticari olarak satışa sunulan kitler bulunmaktadır.

Yarışmalı ELISA yönteminde kuyucuklar analizi gerçekleştirilen analite özgü antikorlarla kaplanmıştır. Örnek ilave edilince analit ve enzimle kaplanmış olan analit sınırlı sayıda bulunan antikora bağlanmak için yarışır. İnkübasyon süresinden sonra bağlanmamış haldeki bileşikler yıkanarak uzaklaştırılır. Ardından rengin ortaya çıkmasını sağlayan kromojen madde ilave edilir ve ELISA okuyucu cihazında fotometrik ölçüm yapılır. Enzim aktivitesi örnekteki aflatoksin konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Bu da düşük absorbans değerinin daha yüksek miktarda aflatoksin varlığını işaret ettiğini gösterir [16]. Yarışmalı ELISA yöntemi ile mikotoksin tespiti Şekil 2-3'te gösterilmiştir [68].



Şekil 2-3: Yarışmalı ELISA yöntemi

a)Konjugat ile karıştırılmış örnek b)Antikor kaplanmış kuyucuğa eklenen içerik c)Mikotoksin birinci inkübasyonda antikora bağlanır d)Bağlanmayanlar yıkama ile uzaklaştırılır e)Renk elde etmek için substrat eklenir f)Reaksiyonu durdurmak amacıyla stop solüsyonu eklenir

2.3. Mikotoksin Kontaminasyonlarının Kontrolü

Mikotoksin kontaminasyonlarının kontrolü mikotoksin oluşumunun önlenmesi ve mikotoksinlerin detoksifiye edilmesi olmak üzere iki stratejiye dayanmaktadır [6].

2.3.1. Mikotoksin Oluşumunu Önleme Stratejileri

Ekinlerin mikotoksinlerle kontaminasyonlarının önlenmesi diğer kontrol yöntemlerine göre birincil önlem olarak gösterilmektedir. Mikotoksin oluşumunun önlenmesi için kuraklık stresinin önüne geçilmesi, dayanıklı tohum çeşitlerinin kullanılması, mikotoksijenik mantar biyotasının azaltılmasını hedefleyen ürün

rotasyonu, elde edilen ürünlerin hızlı kurumasının sağlanması ve depolama koşullarının iyi olması gerekmektedir [10].

Mantarlar uygun şekilde kurutulmuş gıdalarda gelişemediğinden, hasat sonrasında tarımsal ürünlerin hızlı bir şekilde kurutulmasıyla mikotoksin oluşumu engellenebilmektedir. Eğer elde edilen ürünler yeterince kurutulmadan depolanacaksa depo süresi üç günden uzun olmamalıdır [10].

Hasara uğramış tahıllar mikotoksinlerle kontaminasyon için daha fazla risk taşımaktadır [10]. Hasat öncesi dönemde henüz gelişmekte olan ürünlerdeki hasarlar aflatoksijenik mantarlar için bir giriş kapısı oluşturmaktadır. Bu nedenle hem kurutma öncesinde hem de kurutma sonrasında ve depolama sırasında ürünlerde hasar oluşumunun önlenmesi gerekmektedir. Bu hasarların en önemli nedeni böceklerdir. Depolama sırasında birçok böcek türü tahılları hasara uğratmakta ve böceklerin aktiviteleri nedeniyle oluşan nemin birikimi mantarların gelişmesi için gerekli olan ideal şartların oluşumuna katkı sağlamaktadır. Depolama sırasında tarımsal ürünlerin nem seviyesinin düşürülmesiyle ise mantarların üremesi ve metabolizması için uygun olmayan şartlar sağlanabilmektedir [8, 10, 69].

Düşük oksijen konsantrasyonu ve yüksek karbondioksit konsantrasyonu mantarların üremesini ve mikotoksin sentezini önleyebilmektedir. Oksijen konsantrasyonu %5'ten %1'e düştüğünde *Aspergillus* cinsi mantarların üremesi ve dolayısıyla aflatoksin sentezi de engellenmektedir [69]. Bunlara ek olarak antifungallerin kullanımı da mikotoksin sentezinin engellenmesinde uygulanan etkili bir kontrol stratejisidir [10].

Bu yöntemler mikotoksijenik mantarların üremesinin ve mikotoksin sentezinin önlenmesi için uygulanabilmektedir. Ancak mikotoksinlerle kontaminasyon meydana geldiğinde, çeşitli yem ve gıdalar için hasattan sonra uygulanabilecek bazı detoksifikasyon yöntemleri bulunmaktadır [69].

2.3.2. Mikotoksinlerin Detoksifikasyon/Dekontaminasyon Stratejileri

Mikotoksinlerin detoksifikasyonu ve dekontaminasyonu için kullanılan yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak bir gıda maddesinde aynı anda bulunan çeşitli mikotoksinlerin tümü için etkin olduğu kabul edilmiş bir metot bulunmamaktadır. Ayrıca tamamen etkili oldukları

kanıtlanmamış olan bu yöntemlerin birçok avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır [19].

2.3.2.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler hasar görmüş ya da kontamine olmuş ürünlerin herhangi bir hasar ya da kontaminasyona uğramamış ürünlerden ayrılması ve fiziksel yollarla aflatoksinlerin uzaklaştırılması ya da inaktive edilmesi esasına dayanmaktadır. Kullanılan yöntemler arasında ayırma, ıslatma, ısıl işlem uygulama, kabuktan ayırma, eleklerle temizleme, ışınlama, yoğunluk ayrımı ve yıkama bulunmaktadır [19, 49].

Ayırma/ayıklama yönteminde çürümüş ve düşük kalitedeki meyveler diğerlerinden ayrılmaktadırlar. Aflatoksinlerle kontaminasyon genellikle heterojen olduğundan, zarar görmüş meyvelerin çekirdek kısımlarının ayrılması ile azaltılabilmektedir [6].

Aflatoksinlerin bir kısmı kontamine tanelerin suya daldırılması ve yoğunlukları sebebiyle suda yüzen kısımlarının atılmasıyla gıda maddesinden uzaklaştırılabilmektedir. Bu yüzdürme tekniği ilgili bir aparat ile kullanılması halinde gıdalardaki aflatoksinlerin %80'e varan miktarının uzaklaştırılabildiği bildirilmiştir [69].

Isıl işlemler zaman ve sıcaklığın kombinasyonuna dayanmaktadır. Fakat birçok mikotoksin ısıya oldukça dayanıklı olduğundan, yok edilebilmeleri için çok yüksek sıcaklıklar ve geleneksel gıda üretimiyle erişilemeyecek kadar uzun süreler gerekmektedir. Ayrıca bu metotların uygulanması sırasında gıda maddeleri çok yüksek sıcaklıklara maruz bırakıldığı için renk gibi fiziksel özelliklerinde değişimler ve yanıklar görülebilmekte ya da ısıya duyarlı olan gıdalar bozulabilmektedir [19].

Depo edilmiş tahıllar için radyasyon kullanılabilmekte, bu sayede patojen mikroorganizmaların sayısı azaltılabilmekte veya yok edilebilmektedir. Fakat radyasyonun etkisiyle besinlerdeki mikotoksinler yalnızca kısmen uzaklaştırılabilmektedir. Ayrıca radyasyonun etkisi muhtemel moleküler reaksiyonları takip eden fiziksel, kimyasal, biyolojik etkiler nedeniyle tartışmalıdır [6].

2.3.2.2. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal yöntemler organik veya sentetik asitlerin, alkalilerin, indirgeyici veya oksitleyici kimyasal bileşiklerin gıdalara eklenmesi yoluyla mikotoksinlerin detoksifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasal maddeler hidrojen

peroksit, hidroklorik asit, amonyum hidroksit, organik asitler, formaldehit, klorlayıcı maddeler, sodyum bisülfid, ozon ya da doğal maddelerden şifalı otlar, baharatlar ve özleridir [19].

Çoğu kimyasal yöntem hem mikotoksinlere karşı etkilidir hem de maliyetleri uygun olsa da uygulama sırasında zehirli yan ürünler açığa çıkabilmektedir. Bu nedenle AB sağlık açısından riskli oldukları gerekçesiyle bu metotların gıdalarda kullanımını yasaklamıştır. Kimyasal yöntemler dünyanın diğer bölgelerinde ise yemlerde bulunan AFB1 gibi yalnızca belli bazı mikotoksinler için uygulanabilmektedir [19].

Kontamine yağlardaki AFB1'in degradasyonunda genellikle sodyum hidroksit ve potasyum hidroksit kullanılmaktadır. Fakat bu kez de kullanılan kimyasal maddeler sebebiyle sekonder kontaminasyonlar gelişebilmekte ve bu durum ürünlerin besin değerlerinin zarar görmesine neden olabilmektedir [6].

Mikotoksinlerde bulunan kimyasal bağlar ozonla muamale sonucunda kırılmaktadırlar. Bu nedenle ozonla muamele yöntemi umut vadeden bir yöntemdir. Fakat yöntemin etkili olabilmesi için uzun süreli muamele gerekmekte, bu durum da yağ bileşenlerinin oksidasyonuna neden olarak besin kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir [19].

2.3.2.3. Biyolojik Yöntemler

Biyolojik metotlarda yararlanılan mikroorganizmalar asetilasyon, hidroliz, glukozilasyon, deaminasyon ya da dekarboksilasyon reaksiyonları aracılığıyla bazı gıdalarda bulunan mikotoksinlere bağlanabilmektedir. Bu bağlanma ile mikotoksinlerin bozulmaları, daha az toksik olmaları sağlanabilmektedir [19].

Mikotoksinleri biyolojik olarak parçalama yeteneği olan birçok bakteri, küf ve maya bulunmaktadır [69]. Laktik asit bakterileri ve mayalar mikotoksinleri bağlayabilmeleri ya da daha az zehirli ürünlere dönüştürebilmeleri nedeniyle mikotoksinlerin dekontaminasyonu sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır [19]. Aflatoksinleri aflatoksikole ya da başka bileşiklere çevirebilen mikroorganizmalar arasında *Corynebacterium rubrum*, *Trichoderma viride*, *Mucor alternans*, *Rhizopus oryzae* ya da bir protozoon olan *Tetrahymena pyriformis* sayılabilmektedir [19, 49, 69].

Biyolojik yaklaşımlar arasında toksijenik özellikleri bulunmayan mantarların çevrelerindeki toksijenik olan mantarlarla yarışması esasına dayanan yöntemler de kullanılmaktadır. ABD’de gelişmekte olan ekinlerin toprağına toksijenik olmayan *A. flavus* ve *A. parasiticus* suşlarının ilave edilmesi yer fıstıklarında bulunan aflatoksin kontaminasyonunun %74,3-99,9 oranında azalmasını sağlamıştır [31].

Biyolojik yöntemler sayesinde toksik olmayan mantarlar, mikotoksin kontaminasyonunun azalmasını sağlasalar da, insanlar için zararlı olabilecek başka toksik metabolitler sentezleyebilmektedirler. Ayrıca mikotoksin sentezleyebilme yeteneğı, toksik olmayan mantar suşlarının toksijenik olanlarla çaprazlanması yoluyla aktarılabilmekte ve bu durum mikotoksin sentezleyebilen mantarların üremesine yol açabilmektedir [19].

2.4. Aflatoksinlerin Besinlerde Bulunabilecekleri Limit Değerleri

Mikotoksinlerin ekinlerde, besin ürünlerinde ve yemlerdeki varlığı tümüyle yok edilememektedir. Kontrol ve dekontaminasyon yöntemlerinin uygulanması da, içerisinde mikotoksin bulundurmayan ürünlerin varlığını kesinleştirmemektedir. Bu nedenle çoğı ülke tüketicinin sağlığını korumak, besin güvenliğini sağlamak ve bireylerin mikotoksinlere maruziyetini mümkün olabilecek en düşük seviyede tutabilmek amacıyla yoğun olarak ticareti yapılan ve çok miktarda tüketilen ürünlerde mikotoksinlerin bulunmasına izin verilebilecek en yüksek limit değerlerini belirlemiştir [19]. Bu limit değerleri Türkiye’de Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, diğer ülkelerde ise ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA-Food and Drug Administration) WHO, FAO ve Avrupa Gıda Güvenliğı Otoritesi (EFSA-European Food Safety Authority) gibi farklı kurumlar tarafından tanımlanmıştır [6].

Dünya genelinde dört buçuk milyardan fazla insan değışen seviyelerde aflatoksinlerle kontamine besinlere maruz kalma riski altındadır [6]. Aflatoksinlerden genellikle AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2’nin toplamı için limit düzenlemeleri yapılmıştır [30].

TGK’nin aflatoksinler için belirlediğı limit değerleri Tablo 2-5’te verilmiştir [20].

Tablo 2-5: TKG'ye göre aflatoksinlerin çeşitli gıdalarda bulunabileceği yasal limitler

Gıda	Maksimum limit (µg/kg)		
AFLATOKSİN	B1	B1+B2+G1+G2	M1
Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar (doğrudan insan tüketimine sunulmayan veya gıda bileşeni olarak kullanılmayan) -Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç	8,0	15,0	-
Badem, Antep fıstığı, kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulmayan veya gıda bileşeni olarak kullanılmayan)	12,0	15,0	-
Fındık ve Brezilya fıstığı (doğrudan insan tüketimine sunulmayan veya gıda bileşeni olarak kullanılmayan)	8,0	15,0	-
Sert kabuklu meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulmayan veya gıda bileşeni olarak kullanılmayan)	8,0	15,0	-
Yer fıstığı, diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) -Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	5,0	10,0	-
Badem, Antep fıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	-
Fındık ve Brezilya fıstığı (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	5,0	10,0	-
Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan ve gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0	10,0	-
Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	-
Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	2,0	4,0	-
Mısır ve pirinç	5,0	10,0	-
Baharatın aşağıdaki türleri için: - Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) - Karabiber (<i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) - Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) - Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) - Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) - Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5,0	10,0	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	-	-

İnsan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle AFM1 için de süt ve süt ürünlerinde bulunabileceği limit değerleri bazı ülkeler tarafından belirlenmiştir. Besin ve yemlerde bulunan kontaminantlar ile ilgili yasal düzenlemelerin bulunmadığı ve düzenli kontrollerin yapılmadığı gelişmekte olan ülkelere sütteki AFM1 molekülünün varlığının izlenmesi önerilmektedir. Çünkü hem AFM1'in tespiti için gerekli uygulamalar basittir, hem de süt ürünleri aynı zamanda yemlerin kontaminasyonunun da bir belirteçidir [25]. Bazı ülkelerde diğer mikotoksinler için limit değerleri belirlenmemişken AFM1'in süt ve süt ürünlerindeki varlığı yasal olarak izlenmektedir [11].

TGK'nin AFM1'in çiğ süt, ısıtılmış süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütler için belirlediği en yüksek limit değeri 0,05 µg/kg'dır [20]. Türk mutfağında yaygın olarak kullanılan bir süt ürünü olan yoğurt için belirlenmiş bir limit değeri bulunmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda yoğurt için de hem TGK hem de AB tarafından süt için belirlenmiş olan 0,05 µg/kg=50 ng/l limit değerinin esas alındığı görülmektedir [24, 60]. AB'de AFM1'in süt ürünlerinde var olabileceği en yüksek limit 50 ng/L olarak saptanmıştır. Ancak ABD bu değer için 500 ng/L'yi kabul etmiştir [12].

Tablo 2-6'da TGK'nin çeşitli gıda ürünlerinde AFM1 için belirlediği limit değerler verilmiştir [20]. Tablo 2-7'de ise farklı ülkeler için çeşitli gıda ürünlerinde AFM1 için belirlenen limit değerler gösterilmiştir [16].

Tablo 2-6: TGK'nın belirlediği AFM1 limitleri

Gıda	Maksimum AFM1 limiti (µg/kg)
Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	0,050
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	0,025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,025

Tablo 2-7: Farklı ülkelerde AFM1'in gıdalarda bulunmasına izin verilen limitler

Ülke	Sütteki limit (µg/L)	Süt ürünleri (µg/kg)
AB	0,05 0,025 (bebek ve küçük çocuklar için gıda ürünleri) <u>Avusturya</u> 0,01 (pastörize bebek sütü) <u>Fransa</u> 0,03 (3 yaşından küçük çocuklar için)	<u>Avusturya</u> 0,020 (tereyağı) 0,25 (peynir) 0,40 (süt tozu) <u>Hollanda</u> 0,020 (tereyağı) 0,020 (peynir)
ABD	0,5	-
Çin	0,5	0,5
Mısır	0	0
İran	0,05	0,50 (süt tozu) 0,020 (tereyağı ve ayran)
Brezilya	0,5	5 (süt tozu) 2,5 (peynir)
İsviçre	0,05	0,25 (peynir)
Arjantin	0,05	0,50 0,25 (peynir)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada 30 Aralık 2021-8 Şubat 2022 tarihleri arasında İstanbul'daki çeşitli marketlerden satın alınan farklı marka ve farklı lot numaralarına sahip 35'i normal, 15'i meyveli, 15'i süzme, 19'u organik olmak üzere dört farklı türde toplam 84 adet yoğurt örneği AFM1 varlığı ve miktarı açısından incelenmiştir. Yoğurt örnekleri laboratuvara soğuk zincir korunarak getirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler

Ridascreen Aflatoxin M1 ELISA Kiti (r-biopharm, Almanya)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)

Potasyum dihidrojen fosfattan (KH_2PO_4) 4,535 g ve disodyum hidrojen fosfattan (Na_2HPO_4) 8,936 g alınarak 1 L steril distile suya ilave edilip çözündürülmüştür. Oluşan çözelti otoklav (Hirayama, Japonya) ile steril hale getirildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

- Tartı (Radwag, Polonya)
- Vorteks karıştırıcı (DragonLAB, Almanya)
- Santrifüj (Heraeus, Almanya)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- ELISA yıkayıcı (Bio-Rad, Almanya)
- ELISA okuyucu (Bio-Rad, Almanya)
- pH metre (WTW, Almanya)
- 200 µl ve 1000 µl'lik otomatik pipetler (Eppendorf Research, Almanya)

3.1.5. Cam ve Plastik Malzemeler

- 500 ml ve 1000 ml'lik steril cam balonlar
- 50 ml'lik steril polipropilen tüp (CAPP, Danimarka)
- 200 µl'lik steril pipet uçları (Microcult, Çin)
- 1000 µl'lik steril pipet uçları (Microcult, Çin)

3.2. Yöntem

3.2.1. Yoğurt Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması

Yoğurt örnekleri analiz için, test kitini üreten firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Her bir yoğurt örneğinden 10 g tartılarak polipropilen tüp (CAPP, Danimarka) içine koyulmuş, üzerine PBS ilave edilerek tüm örnekler 1:3 oranında seyreltilmiştir (Dilüsyon faktörü:3). Bu karışım vorteks karıştırıcı (DragonLAB, Almanya) kullanılarak homojen hale getirilmiş ve 4000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüjlenmiştir (Heraeus, Almanya). Üstte kalan yağ tabakası uzaklaştırılmış, altındaki sıvı kısımdan 100 µl alınarak ELISA testinde kullanılmıştır (Şekil 3-1, 3-2).



Şekil 3-1: Yoğurt örneklerinin santrifüj aşaması sonrası görünümü



Şekil 3-2: Santrifüj sonrası yağ içeriği ayrılmış bir yoğurt örneği

3.2.2. ELISA Testinin Uygulanması

3.2.2.1. Test Kitinin İçeriği

Test kitinin içeriği aşağıda belirtilmiş ve Şekil 3-3'te gösterilmiştir.

1) Her kuyucuğu anti AFM1 antikorlarına karşı spesifik antikorlarla kaplı bir adet 96 kuyucuklu mikropalak

2) Örnek tamponu (60 ml)

3) 6 adet standart solüsyon (1,3'er ml). Standartların içerdiği AFM1 konsantrasyonları aşağıda belirtilmiştir.

Standart 1: 0 ng/L

Standart 2: 5 ng/L

Standart 3: 10 ng/L

Standart 4: 20 ng/L

Standart 5: 40 ng/L

Standart 6: 80 ng/L

4) Yıkama tampon tuzu

5) Konjugat (11 ml)

6) Antikor (11 ml)

7) Substrat/ Kromojen (10 ml)

8) Stop solüsyonu (14 ml)



Şekil 3-3: Test kitinin içeriği

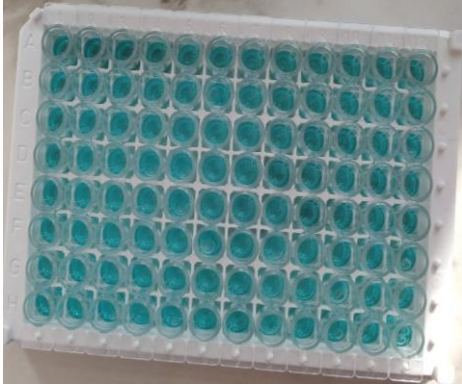
3.2.2.2. ELISA Testinde Kullanılan Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması

Kitin içerisinde bulunan yıkama tampon tuzu 1 L steril distile suya eklenmiş ve tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.2.3. Test Prosedürü

Yoğurt örnekleri ve standartlar ikişer kez çalışılmıştır. Bir kutu 96 testlik kit (r-biopharm, Almanya) ile 42 yoğurt örneği ve altı adet standart ikişer kuyucuk kullanılarak test edilmiştir. ELISA ile analiz firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir [70].

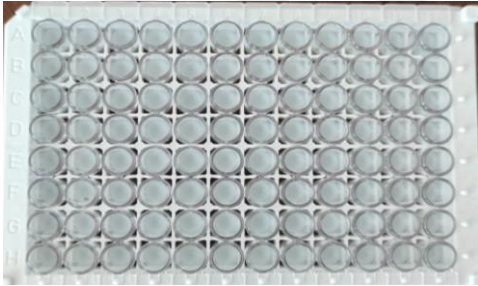
1) Kuyucukların her birine 100 µl antikor eklenmiştir (Şekil 3-4). Mikroplak elle hafifçe sallandıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir.



Şekil 3-4: Kuyucuklara antikor eklendikten sonra mikroplağın görünümü

2)Her bir kuyucuk 250 µl yıkama solüsyonu ile üç defa ELISA yıkama cihazında (Bio-Rad, Almanya) yıkanmıştır.

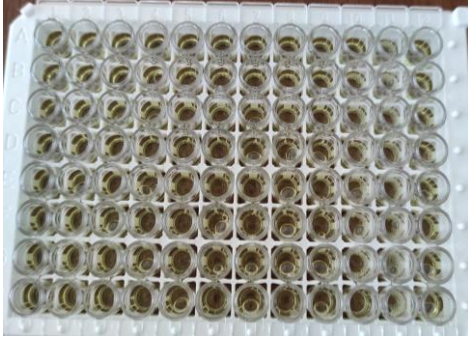
3)Standart solüsyonlardan ve yoğurt örneklerinden 100'er µl mikroplak üzerinde ikişer kuyucuğa yerleştirilmiştir (Şekil 3-5). Mikroplak elle hafifçe sallandıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3-5: Yoğurt örnekleri ve standartlar eklendikten sonra mikroplağın görünümü

4)Her bir kuyucuk 250 µl yıkama solüsyonu ile üç defa ELISA yıkama cihazında yıkanmıştır.

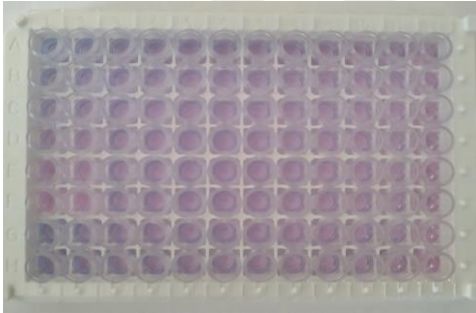
5)Tüm kuyucuklara 100 µl konjugat eklenmiş ve elle hafifçe çalkalandıktan sonra 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Şekil 3-6).



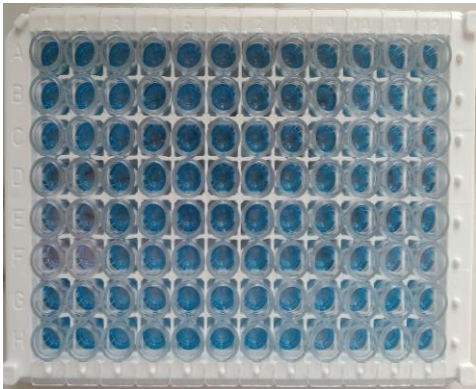
Şekil 3-6: Kuyucuklara konjugat eklendikten sonra mikroplağın görünümü

6)Her bir kuyucuk ELISA yıkama cihazında 250 μ l yıkama solüsyonu ile üç defa yıkanmıştır.

7)Tüm kuyucuklara 100 μ l substrat/kromojen eklenmiş, elle hafifçe karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir (Şekil 3-7, 3-8).

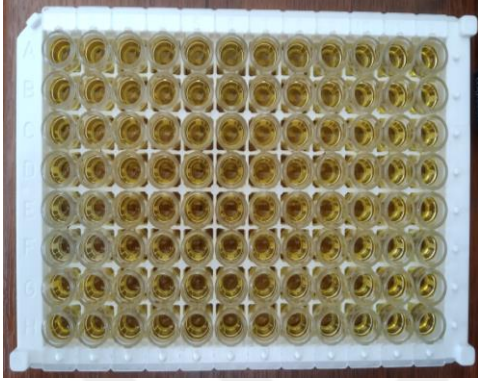


Şekil 3-7: Substrat/kromojen eklendikten hemen sonra mikroplağın görünümü



Şekil 3-8: Substrat/kromojen eklenerek 15 dakika inkübe edildikten sonra mikroplağın görünümü

8) Kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklenmiş ve mikropalak elle hafifçe sallanmıştır (Şekil 3-9).



Şekil 3-9: Stop solüsyonu eklendikten sonra mikropalığın görünümü

9) ELISA okuyucu (Bio-Rad, Almanya) ile 450 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.2.4. ELISA Analizi Sırasında Dikkat Edilen Noktalar

- 1) Kit içeriğinde bulunan tüm kimyasallar analiz öncesinde oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 2) Standartlar vorteks karıştırıcıda karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.
- 3) Testte uygulanan basamakların arasında kuyucukların kuru kalmaması sağlanmıştır.
- 4) İnkübasyon aşamaları sırasında mikropalığın üzeri kapatılarak güneş ışığına maruz kalmaması sağlanmıştır.
- 5) Yıkama aşamalarından sonra mikropalaklar ters çevrilip emici kağıda vurularak kuyucuklardaki tüm sıvıların boşaltıldığından emin olunmuştur.

3.2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar RIDASOFT Win.NET (r-biopharm, Almanya) yazılımı ile hesaplanmıştır. Standartlar için ölçülen absorbans değerleri kullanılarak bu program ile kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu eğriler, kitin içeriğinde bulunan kalite güvence sertifikasındaki standart absorbans eğrisi ile karşılaştırılmış, uyumlu olduğu belirlenmiş

ve testin doğru çalışıldığından, sonuçların doğruluğundan emin olunmuştur. Ardından yoğurt örnekleri için elde edilen absorbans değerleri kullanılarak AFM1 konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu değerler dilüsyon faktörü olan 3 ile çarpılmış ve örneklerdeki AFM1 konsantrasyonları ng/kg cinsinden belirlenmiştir.

RIDASOFT Win.NET programıyla absorbans değerleri kullanılarak AFM1 konsantrasyonlarının belirlenmesinde aşağıda formülü bulunan Remark hesaplaması kullanılmaktadır. Bu formüle göre sıfır standardı %100'e eşitlenmekte ve absorbans değerleri yüzde olarak hesaplanmaktadır [71].

$$\frac{\text{Standartların ya da örneklerin absorbans değeri}}{0 \text{ (sıfır) standartın absorbans değeri}} \times 100 = \% \text{ Absorbans}$$

3.2.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan yoğurt örneklerinde bulunan AFM1 konsantrasyonlarının tespitiyle elde edilen veriler için tüm çözümlemeler SPSS (Version 26) ile yapılmıştır. Nicel değişkenler ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum istatistikleri ile nitel değişkenler ise sayı ve yüzde istatistikleri ile özetlenmiştir. Nicel değişkenler bakımından grup karşılaştırmaları varyans homojenliği sağlanmadığından ve örneklem büyüklüğü yeterli olmadığından parametrik olmayan Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi ile çözümlenmiştir. Kruskal Wallis testi anlamlı çıktığında post hoc testi yapılmış ve ikişerli karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık Bonferroni düzeltmesi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Yoğurt Örneklerinin Türlerine Göre Dağılımı

Bu çalışmada AFM1 varlığı açısından incelenen 84 yoğurt örneğinin türlerine, yağ ve meyve içeriklerine göre dağılımı Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4-1: Yoğurt örneklerinin türlerine, yağ ve meyve içeriklerine göre dağılımları

		Sayı (%)	Farklı marka sayısı
Yoğurt türü	Normal	35 (41,6)	11
	Meyveli	15 (17,9)	4
	Süzme	15 (17,9)	6
	Organik	19 (22,6)	6
	Toplam	84 (100)	16
Yağ içeriği	Tam yağlı (süt yağı $\geq$ 3,8)	56 (66,7)	16
	Yarım yağlı (%2>süt yağı $\geq$ 1,5)	28 (33,3)	9
	Toplam	84 (100)	16
Meyve içeriği	Meyveli	15 (17,9)	4
	Sade	69 (82,1)	15
	Toplam	84 (100)	16

İncelenen toplam 84 yoğurt örneğinin 35’i normal (%41,6), 15’i meyveli (%17,9), 15’i süzme (%17,9) ve 19’u organik (%22,6) yoğurttur. Yağ içeriğine göre sınıflandırıldığında 56 yoğurt tam yağlı (%66,7), 28 yoğurt ise yarım yağlıdır (%33,3). Yoğurt örneklerinin 69’u sade (%82,1), 15’i meyvelidir (%17,9).

4.2. ELISA Testinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Birinci ELISA mikropiçinde 1-42 arasındaki örnekler, ikinci mikropiçte ise 43-84 arasındaki örnekler çalışılmıştır.

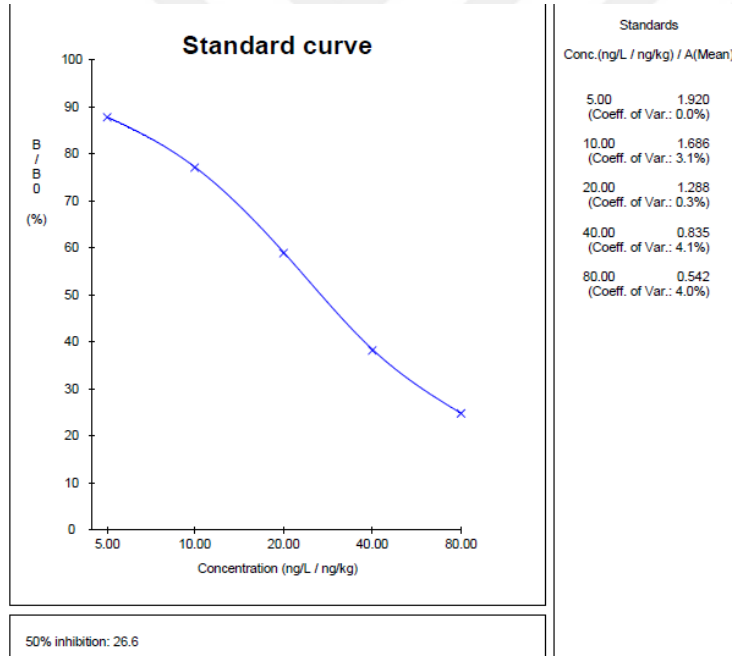
Birinci mikropiçte kitin içinde bulunan standartların çalışılmasıyla elde edilen absorban ve konsantrasyon değerleri Tablo 4-2’de, bu değerlere göre çizilen kalibrasyon grafiği ise Şekil 4-1’de gösterilmiştir. İncelenen yoğurt örneklerinden 42’sinin AFM1 konsantrasyonu değerleri bu grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4-2: Birinci mikroplakta çalışılan standartların absorbens değerlerine göre elde edilen veriler

Standart numarası	Standartların konsantrasyonu (ng/kg)	Absorbans (ortalama)	CV*	B/B0** (%)	Hesaplanan konsantrasyon değerleri (ng/kg)	Standart sapma (%)
1	0,00	2,187	1,3	100,00	0,00	0,0
2	5,0	1,920	0,0	87,8	5,01	0,2
3	10,0	1,686	3,1	77,1	9,98	0,2
4	20,0	1,288	0,3	58,9	19,98	0,1
5	40,0	0,835	4,1	38,2	40,15	0,4
6	80,0	0,542	4,0	24,8	79,82	0,2

*: Coefficient of variation (varyasyon katsayısı)

** : Maksimum absorbens



Şekil 4-1: Birinci mikroplakta çalışılan 1-42 numaralı yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği

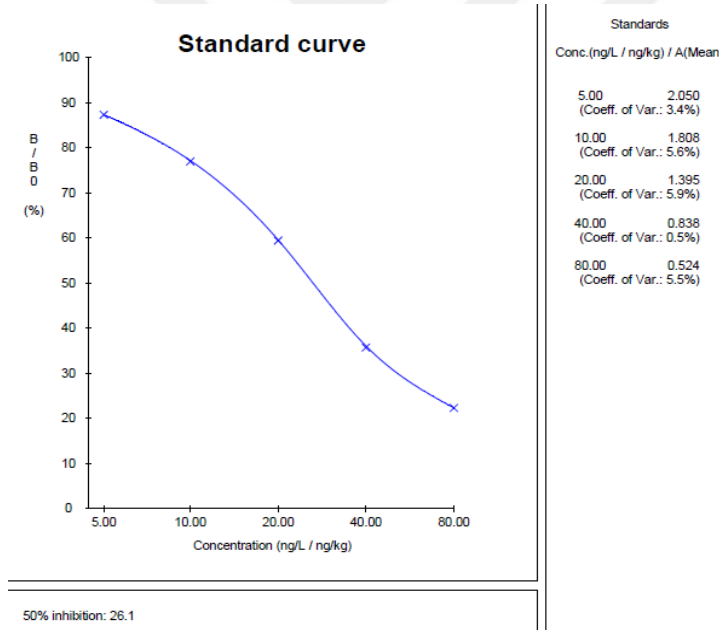
İkinci mikroplakta standartların çalışılmasıyla elde edilen absorbens ve konsantrasyon değerleri Tablo 4-3'te, bu değerlere göre çizilen kalibrasyon grafiği ise Şekil 4-2'de verilmiştir. Örneklerden 43-84 arasında olanların AFM1 konsantrasyonu değerleri bu grafikten yararlanılarak belirlenmiştir.

Tablo 4-3: İkinci mikropakta çalışılan standartların absorbens değerlerine göre elde edilen veriler

Standart numarası	Standartların konsantrasyonu (ng/kg)	Absorbans (ortalama)	CV*	B/B0** (%)	Hesaplanan konsantrasyon değerleri (ng/kg)	Standart sapma (%)
1	0,00	2,348	1,7	100,0	0,00	0,0
2	5,0	2,050	3,4	87,3	5,01	0,2
3	10,0	1,808	5,6	77,0	10,00	0,0
4	20,0	1,395	5,9	59,4	19,93	0,4
5	40,0	0,838	0,5	35,7	40,24	0,6
6	80,0	0,524	5,5	22,3	79,68	0,4

*: Coefficient of Variation (Varyasyon Katsayısı)

** :Maximal Absorbance (Maksimum Absorbans)



Şekil 4-2: İkinci mikropakta çalışılan 43-84 numaralı yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği

4.3. Yoğurt Örneklerinin AFM1 Konsantrasyonları

İncelenen 84 adet yoğurt örneğinin tamamında (%100) AFM1 varlığı belirlenmiştir. Örneklerdeki AFM1 konsantrasyonu 5,08 ng/kg ile 77,48 ng/kg aralığında olup, ortalama değer $23,99 \pm 14,67$ olarak belirlenmiştir. Örneklerdeki AFM1 konsantrasyonları Tablo 4-4 ve Tablo 4-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4-4:Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonları (1-42. örnekler)

Örnek numarası	Yoğurt türü	AFM1 konsantrasyonu (ng/kg)
1	Normal	22,63
2	Normal	14,81
3	Meyveli	14,09
4	Meyveli	14,53
5	Normal	20,44
6	Normal	17,26
7	Normal	17,44
8	Normal	43,80
9	Normal	46,89
10	Normal	26,82
11	Normal	28,67
12	Normal	25,24
13	Meyveli	9,40
14	Meyveli	13,34
15	Meyveli	11,24
16	Normal	37,70
17	Normal	24,52
18	Normal	14,81
19	Normal	27,48
20	Meyveli	28,67
21	Meyveli	26,10
22	Meyveli	19,30
23	Meyveli	21,85
24	Süzme	29,80
25	Süzme	46,82
26	Organik	14,92
27	Normal	34,89
28	Normal	34,41
29	Meyveli	23,21
30	Süzme	21,34
31	Meyveli	20,89
32	Süzme	27,15
33	Normal	31,99
34	Organik	59,30
35	Meyveli	23,08
36	Süzme	33,60
37	Normal	38,26
38	Süzme	45,29
39	Süzme	18,30
40	Organik	77,09
41	Organik	16,07
42	Normal	36,32

Tablo 4-5: Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonları (43-84. örnekler)

Örnek numarası	Yoğurt türü	AFM1 konsantrasyonu (ng/kg)
43	Süzme	14,65
44	Organik	8,79
45	Organik	6,08
46	Organik	54,78
47	Organik	5,08
48	Meyveli	10,99
49	Süzme	19,72
50	Normal	18,65
51	Organik	69,98
52	Organik	14,81
53	Normal	16,96
54	Normal	17,30
55	Normal	15,08
56	Süzme	15,18
57	Normal	14,71
58	Normal	13,88
59	Organik	9,67
60	Normal	23,59
61	Organik	6,63
62	Organik	17,76
63	Organik	6,97
64	Organik	9,14
65	Organik	12,36
66	Normal	21,94
67	Normal	16,11
68	Normal	19,00
69	Normal	21,32
70	Normal	20,76
71	Süzme	11,25
72	Süzme	21,57
73	Meyveli	10,85
74	Meyveli	12,41
75	Süzme	20,09
76	Normal	16,73
77	Normal	30,79
78	Normal	30,05
79	Süzme	21,07
80	Süzme	19,66
81	Organik	25,19
82	Organik	23,33
83	Organik	77,48
84	Normal	33,69

Yoğurt örneklerinin 24'ünün (%28,57) 15 ng/kg'ın altında, 41'inin (%48,81) 15,01-30 ng/kg arasında ve 14'ünün (%16,67) ise 30,01-50 ng/kg arasında AFM1 ile kontamine olduğu saptanmıştır. Örneklerin beşinin (%5,95) TGK'ye ve AB kriterlerine göre AFM1 için limit değeri olan 50 ng/kg'ın üzerinde AFM1 içerdiği, geri kalan 79

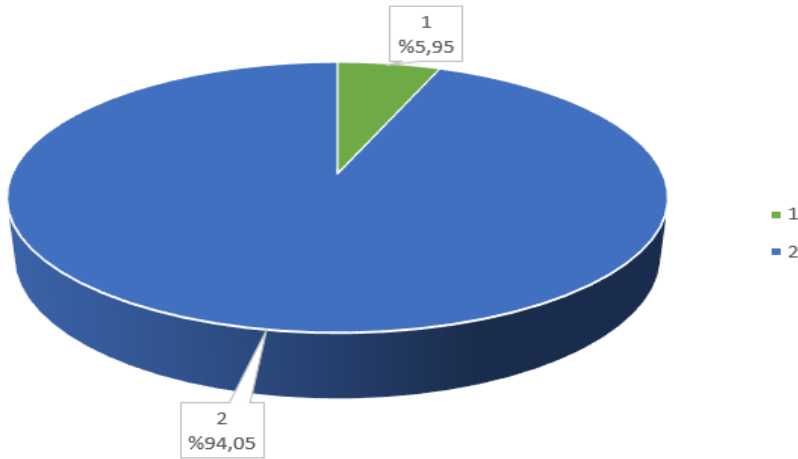
örneğin konsantrasyonunun ise (%94,05) bu limitin altında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4-3). Yasal limiti aşan bu örneklerin beşi de organik yoğurt olup, AFM1 konsantrasyonları sırasıyla 54,78; 59,30; 69,98; 77,09 ve 77,48 ng/kg olarak tespit edilmiştir. En düşük (5,08 ng/kg) ve en yüksek (77,48 ng/kg) AFM1 konsantrasyonuna sahip örnekler organik yoğurt örnekleri olmuştur. AFM1 konsantrasyonlarının yoğurt örneklerinin türlerine, yağ ve meyve içeriklerine göre dağılımları Tablo 4-6'da verilmiştir.

Yağ içeriğine göre değerlendirildiğinde; 56 adet tam yağlı yoğurt örneğinin 16'sının (%28,57) AFM1 konsantrasyonunun 15 ng/kg'ın altında, 26'sının (%46,43) 15,01-30 ng/kg arasında, 9'unun (%16,07) 30,01-50 ng/kg arasında olduğu tespit edilmiş ve beş örneğin (%8,93) ise 50 ng/kg'ın üzerinde AFM1 içerdiği görülmüştür. İncelenen 28 adet yarım yağlı yoğurt örneğinin 8'inin (%28,57) 15 ng/kg'ın altında, 15'inin (%53,57) 15,01-30 ng/kg arasında, beşinin (%17,86) ise 30,01-50 ng/kg arasında AFM1 içerdiği belirlenmiştir. Yarım yağlı yoğurt örneklerinin hiçbirinin AFM1 konsantrasyonu yasal limiti aşmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen 15 adet meyveli yoğurt örneğinin sekizinin (%53,33) 15 ng/kg'ın altında, yedisinin (%46,67) ise 15,01-30 ng/kg arasında AFM1 ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Meyveli yoğurtlar arasında yasal limiti aşan AFM1 konsantrasyonuna sahip olan örnek saptanmamıştır.

Tablo 4-6: AFM1 konsantrasyonlarının yoğurt örneklerinin türlerine, yağ ve meyve içeriklerine göre dağılımları

		Sayı	Konsantrasyon aralığı (ng/kg)				Ortalama (ng/kg)	En düşük- en yüksek (ng/kg)
			<15 (%)	15,01- 30 (%)	30,01- 50 (%)	>50 (%)		
Yoğurt türü	Normal	35	4 (11,43)	20 (57,14)	11(31,43)	-	25	13,88- 46,89
	Meyveli	15	8 (53,33)	7 (46,67)	-	-	17,33	9,40- 28,67
	Süzme	15	2 (13,33)	10 (66,67)	3 (20)	-	24,37	11,25- 46,82
	Organik	19	10 (52,63)	4 (21,05)	-	5 (26,32)	27,13	5,08- 77,48
Yağ içeriği	Tam yağlı	56	16 (28,57)	26 (46,43)	9 (16,07)	5 (8,93)	25,86	5,08- 77,48
	Yarım yağlı	28	8 (28,57)	15 (53,57)	5 (17,86)	-	20,28	9,40- 38,26
Meyve İçeriği	Meyveli	15	8 (53,33)	7 (46,67)	-	-	17,33	9,40- 28,67
	Sade	69	16 (23,19)	34 (49,27)	14 (20,29)	5 (7,25)	25,45	5,08- 77,48
Toplam		84	24 (28,57)	41(48,81)	14 (16,67)	5 (5,95)	23,99	5,08- 77,48



Şekil 4-3: Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının TGK ve AB limit değerlerine göre karşılaştırılması

1: AFM1 konsantrasyonu 50 ng/kg'ın üzerinde, 2: AFM1 konsantrasyonu 50 ng/kg'ın altında

Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının ortalamaları, ortancaları ve gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmaların sonuçları Tablo 4-7'de verilmiştir.

Tablo 4-7: Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının (ng/kg) karşılaştırılması

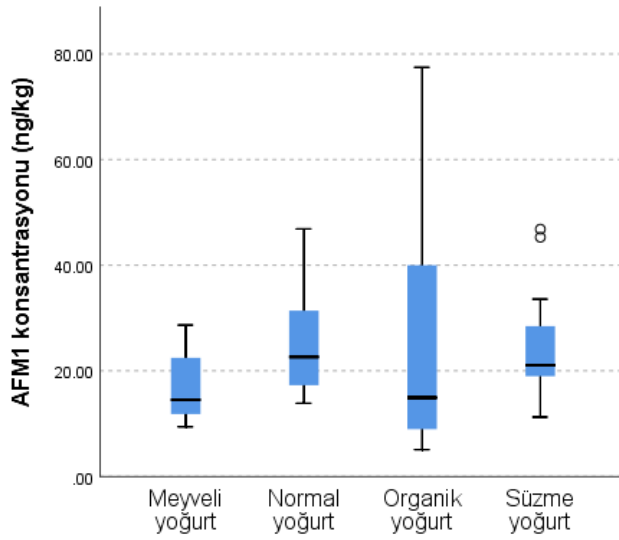
		n (%)	Ort±SS	Ortanca (Min-Maks)	p
Yoğurt Türü	Meyveli yoğurt ^a	15 (% 17,9)	17,33±6,27	14,53 (9,4-28,67)	0,033*
	Normal yoğurt ^b	35 (% 41,7)	25±9,01	22,63 (13,88-46,89)	
	Organik yoğurt ^{a,b}	19 (% 22,6)	27,13±25,96	14,92 (5,08-77,48)	
	Süzme yoğurt ^{a,b}	15 (% 17,9)	24,37±10,49	21,07 (11,25-46,82)	
Yağ İçeriği	Tam yağlı yoğurt	56 (% 66,7)	25,86±16,87	21,21 (5,08-77,48)	0,284**
	Yarım yağlı yoğurt	28 (% 33,3)	20,28±7,83	19,15 (9,4-38,26)	
Meyve İçeriği	Meyveli yoğurt	15 (% 17,9)	17,33±6,27	14,53 (9,4-28,67)	0,038**
	Sade yoğurt	69 (% 82,1)	25,45±15,58	21,07 (5,08-77,48)	

* Kruskal-Wallis testi, ** Mann-Whitney U testi

Aynı harfler ile indislenen grup dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

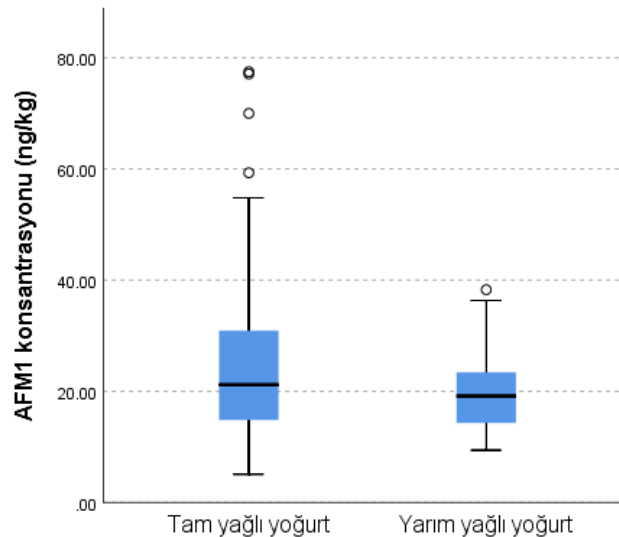
AFM1 konsantrasyonu bakımından yoğurt türleri Kruskal Wallis testi ile çözümlenmiş ve grupların dağılımları (ortancaları) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,033). Yoğurt türleri arasında Post-Hoc testi ile ikişerli karşılaştırmalar yapıldığında ise meyveli yoğurt (ortanca=14,53; min=9,4; maks=28,67) ile normal yoğurdun (ortanca=22,63; min=13,88; maks=46,89) AFM1 konsantrasyonlarının dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunmuştur. Yoğurt türlerine göre AFM1 konsantrasyonlarının dağılımı Şekil 4-4'te gösterilmiştir.



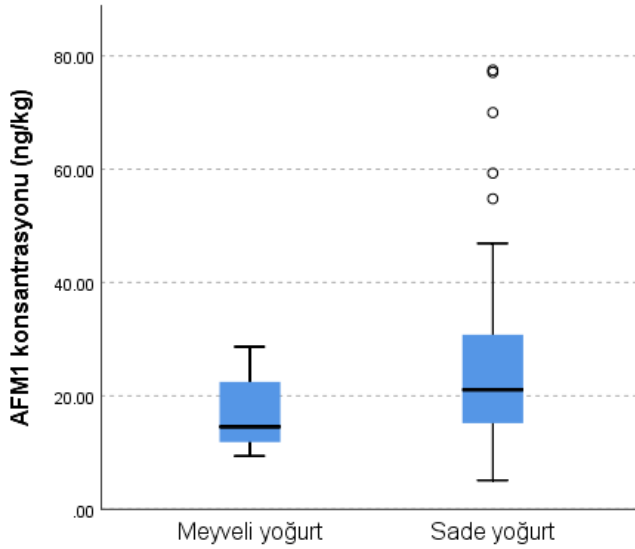
Şekil 4-4: Türlerine göre yoğurtların AFM1 konsantrasyonuna ilişkin dağılımları

Tam yağlı ve yarım yağlı yoğurtlar AFM1 konsantrasyonu açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, grup dağılımları (ortancaları) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,284$). Yoğurtların yağ içeriğine göre AFM1 konsantrasyonlarının dağılımı Şekil 4-5'te gösterilmiştir.



Şekil 4-5: Yağ içeriklerine göre yoğurtların AFM1 konsantrasyonuna ilişkin dağılımları

Meyveli (ortanca=14,53; min=9,4; maks=28,67) ve sade (ortanca=21,07; min=5,08; maks=77,48) yoğurtlar AFM1 konsantrasyonu açısından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,038$). Yoğurtların meyve içeriğine göre AFM1 konsantrasyonlarının dağılımı Şekil 4-6’da gösterilmiştir.



Şekil 4-6: Meyve içeriklerine göre yoğurtların AFM1 konsantrasyonuna ilişkin dağılımları

5. TARTIŞMA

Günümüzde bilinen 20 aflatoksin (AF) türünden biri olan AFB1 güçlü bir karsinojendir ve IARC tarafından Grup 1 ajan olarak sınıflandırmıştır. AFM1 ise AFB1'in hidroksillenmiş bir metabolitidir ve AFB1 ile kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen süt ya da süt ürünlerinde bulunabilmektedir. Hepatotoksik ve karsinojenik etkileri nedeniyle AFM1 de IARC tarafından Grup 1 karsinojenler sınıfına dahil edilmiştir [11, 15].

Süt ve süt ürünleri AFM1'in hayvanlardan insanlara geçişindeki en önemli besin kaynağıdır. Bu besinlerde bulunan AFM1'in varlığının belirlenmesi ve seviyelerinin izlenmesi Türkiye'de 1960 yılından beri önem kazanmakta olan bir konu haline gelmiştir [72]. AFM1'in yüksek kararlılıkta bir bileşik olması nedeniyle tamamen yok edilememesi, süt ve süt ürünlerinin başta bebekler ile çocuklar olmak üzere her yaştan insanın günlük beslenmesinde yeri olan, düzenli olarak tüketilen besinler olması halk sağlığı için tehdit oluşturmaktadır [12]. AFM1'in ülkemizde sevilen ve çok tüketilen yoğurtlardaki varlığının ve düzeyinin düzenli olarak izlenmesi ve limit değerini aşmaması için gerekli önlemlerin alınması önemlidir.

TGK'nin AFM1'in çiğ süt, ısıtılmış süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütler için belirlediği en yüksek limit değeri 0,05 µg/kg'dır [20]. Yoğurt için belirlenmiş bir limit değeri bulunmamaktadır. AB kriterlerine göre de AFM1'in sütte bulunabileceği en yüksek limit değeri 0,05 µg/kg olarak belirlenmiştir. Türkiye'de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda yoğurt için hem TGK hem de AB tarafından süt için belirlenmiş olan 0,05 µg/kg=50 ng/kg limit değerinin esas alındığı görülmektedir [22, 23, 25, 73-75].

Türkiye'de ve diğer ülkelerde yoğurtlardaki AFM1 varlığının ve seviyesinin tespitine yönelik yapılan yeterli sayıda çalışma olmadığından bu konudaki bilgiler sınırlıdır.

Akkaya ve ark., [76] Afyonkarahisar'da tüketime sunulan 104'ü normal, 21'i meyveli ve 52'si süzme olmak üzere toplam 177 yoğurt örneğinden 104'ünün (%58,76) AFM1 ile kontamine olduğunu ELISA yöntemi ile belirlemişlerdir. Normal yoğurtların 68'inde (%65,38), meyveli yoğurtların yedisinde (%33,33) ve süzme yoğurtların

29'unda (%55,77) AFM1 tespit edilmiştir. İnceledikleri yoğurt örneklerinin %14,12'sinin (25/177) yasal sınır olan 50 ng/kg'ın üzerinde AFM1 ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. Normal yoğurtların %11,53'ünün (12/104), meyveli yoğurtların %9,52'sinin (2/21) ve süzme yoğurtların %21,15'inin (11/51) TKG ve AB'nin belirlediği limit değeri olan 50 ng/kg'ı aştığı belirlenmiştir.

Gürbay ve ark., [72] biri ev yapımı, geri kalanları ise Ankara'daki süpermarketlerde satışa sunulmuş olan tam yağlı, yarım yağlı ve yağsız toplam 40 adet yoğurt örneğinin 32'sinde (%80) AFM1 varlığını ELISA yöntemiyle tespit etmişlerdir. Yoğurtların 61,61-365,64 ng/kg konsantrasyon aralığında AFM1 içerdiğini belirlemişlerdir. Diğer örneklerle benzer olarak ev yoğurdunun AFM1 konsantrasyonunu da 73,12 ng/kg olarak bulmuşlardır.

Aydemir Atasever ve ark., [61] Erzurum'daki marketlerden satın aldıkları 80 yoğurt örneğinin 70'inin (%87,5) AFM1 içerdiğini ELISA yöntemiyle saptamışlardır. Pozitif örneklerin 10-475 ng/kg konsantrasyon aralığında AFM1 içerdiği ve AFM1 konsantrasyonu ortalamalarının 66,1 ng/kg olduğunu bildirmişlerdir. Yoğurt örneklerinin %20'sinin (16/80) maksimum limit değerini aştığını belirlemişlerdir.

Ertaş ve ark., [60] Kayseri'de satışa sunulan 25'i tam yağlı ve 25'i yarım yağlı toplam 50 yoğurt örneğini AFM1 varlığı açısından ELISA yöntemiyle değerlendirmiş ve örneklerin 28'inin (%56) 2,5-78 ng/kg aralığında, ortalama 30,3 ng/kg AFM1 içerdiğini tespit etmişlerdir. Örneklerin %14'ünün (7/50) limit değerini aştığını saptamışlardır.

Şahindokuyucu Kocası ve ark.'nın çalışmasında [13] Burdur ilinde 45 adet yoğurt örneği ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir. Örneklerden 20'sinin (%44,4) 50-360 ng/kg aralığında ve ortalama 176,6 ng/kg AFM1 ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Temamoğulları ve ark., [73] Şanlıurfa'da bir kısmı marketlerde satılan, bir kısmı ise geleneksel yöntemlerle üretilmiş toplam 50 yoğurt örneğini AFM1 varlığı açısından ELISA yöntemiyle incelemiş ve bu örneklerin tamamında (%100) 40,62-72,04 ng/kg aralığında ve ortalama 55,28 ng/kg konsantrasyonda AFM1 varlığını tespit etmişlerdir. Örneklerden %10'unun (5/50) 50 ng/kg olan limit değerini aştığını saptamışlardır.

Kayaalp ve ark., [62] Kayseri’de pazarlarda açık olarak satılan 100 adet manda yoğurdu örneğini ELISA yöntemiyle incelemiş ve tamamının (%100) 2,70-79,27 ng/kg aralığında değişen konsantrasyonlarda AFM1 içerdiğini tespit etmişlerdir. Örneklerin %7’sinin (7/100) yasal limiti aşan miktarda AFM1 içerdiğini belirlemişlerdir.

Sarıca ve ark., [22] Ankara’daki süpermarketlerden aldıkları on normal, altı yağsız, üç geleneksel (köy) olmak üzere toplam 19 adet yoğurt örneğinde AFM1 varlığını immünoaffinite kolon ekstraksiyonu (IAC-immunoaffinity coloumn assay) ve ardından yüksek performanslı sıvı kromatografisi-floresan dedektör (HPLC-FLD-high performance liquid chromatography-fluorescence detection) yöntemleri ile araştırmışlardır. Örneklerin 17’sinin (%89,5) 16-107,2 ng/kg aralığında AFM1 ile kontamine olduğunu ve ortalama AFM1 konsantrasyonun 47,92 ng/kg olduğunu belirlemişlerdir. Örneklerin %26,32’sinin (5/19) limit değerini aştığını tespit etmişlerdir.

Şahin ve ark., [23] Çorum’da 49’u tam yağlı 11’i yarım yağlı olmak üzere toplam 60 yoğurt örneğinde AFM1 varlığını ve düzeyini HPLC-FLD yöntemi ile araştırmışlardır. Bu örneklerin yalnızca ikisinde (%3,3) 0,024 ve 0,028 µg/kg konsantrasyonlarında AFM1 tespit etmişler, inceledikleri örneklerin hiçbirinin AFM1 konsantrasyonunun (0/60) yasal limit değerini aşmadığını bildirmişlerdir.

Topal GG [77] 28 normal, 12 süzme, 17 meyveli, sekiz probiyotik ve sekiz organik olmak üzere toplam 73 adet yoğurt örneğini AFM1 varlığı ve düzeyi açısından ELISA yöntemiyle incelemiş, tamamının (%100) AFM1 ile kontamine olduğunu belirlemiştir. Yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonlarının 7,22-41,01 ng/kg arasında olduğunu ve ortalamalarının 14,01 ng/kg olduğunu tespit etmiştir. Normal yoğurtlarda ortalama 13,4 ng/kg, süzme yoğurtlarda 15,4 ng/kg, probiyotik yoğurtlarda 12,4 ng/kg, organik yoğurtlarda 18,4 ng/kg ve meyveli yoğurtlarda 13,2 ng/kg AFM1 olduğunu belirlemiştir. Çalışmada AFM1 konsantrasyonunun en fazla olduğu yoğurt türünün organik yoğurtlar olduğu tespit edilmiştir. Farklı yoğurt türlerinin AFM1 kontaminasyonu seviyesi arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). Türkiye’deki limit değer olan 50 ng/kg’lık AFM1 seviyesini aşan hiçbir örnek tespit edilmemiştir.

Erdal M [78] Afyonkarahisar’da satışa sunulan 20’si çilekli, 30’u orman meyveli ve 30’u muzlu toplam 80 adet meyveli yoğurdun 20’sinde (%25) ELISA yöntemiyle AFM1 varlığını belirlemiştir. İncelediği örneklerin %23,75’inin (19/80) yasal limiti aştığını saptamıştır.

Özmenteşe N [79] HPLC-FLD yöntemi ile İstanbul'da satışa sunulan 15 adet yoğurt örneğinin AFM1 düzeyini incelemiş ve örneklerin sekizinin (%53,3) 0,030-0,198 µg/l aralığında AFB1 ile kontamine olduğu tespit etmiştir. Yoğurt örneklerinin %93,3'ünün (14/15) sahip olduğu AFM1 konsantrasyonunun yasal limiti aştığını belirlemiştir.

Galvano ve ark., [80] İtalya'nın dört büyük şehrinden topladıkları 120 adet yoğurt örneğini IAC ve HPLC yöntemi ile AFM1 varlığı açısından incelemiş ve örneklerin 73'ünde (%61) <1 ng/kg-32,1 ng/kg aralığında ortalama 9,06 ng/kg konsantrasyonunda AFM1 bulunduğunu tespit etmişlerdir. Yoğurt örneklerinin hiçbirinin (0/120) 50 ng/kg'dan yüksek AFM1 konsantrasyonuna sahip olmadığını belirlemişlerdir.

Martins ve ark.'nın çalışmasında [81] Portekiz'de üretilen 48 doğal ve 48 çilekli olmak üzere toplam 96 yoğurt örneği IAC ve HPLC yöntemi ile AFM1 varlığı açısından incelenmiştir. Örneklerin 18'inde (%18,8) 19-98 ng/kg aralığında değişen konsantrasyonlarda AFM1 varlığı tespit edilmiştir. Toplam 48 doğal yoğurdun yalnızca ikisinde (%4,2) 43 ng/kg ve 45 ng/kg AFM1 tespit edilmiştir. Toplam 48 adet çilekli yoğurdun ise 16'sının (%33,3) 19-98 ng/kg aralığında ve 51,12 ng/kg ortalama konsantrasyonda AFM1 içerdiği belirlenmiştir. İncelenen doğal yoğurtların hiçbirinin (0/48) AB limitlerinin üzerinde AFM1 içermediği, buna karşılık çilekli yoğurtların %12,5'inin (6/48) içerdiği bildirilmiştir.

Barjesteh ve ark., [82] İran'ın Mazenderan eyaletinden topladıkları 40 adet pastörize ve 10 adet yöresel yoğurt örneğindeki AFM1 kontaminasyonunu ELISA yöntemi ile test etmiş ve tüm yoğurt örneklerinde AFM1'in bulunduğunu göstermişlerdir. Pastörize yoğurt örneklerindeki AFM1 konsantrasyonları 2,1– 61,7 ng/l aralığında ve 15,13 ng/l ortalamaya sahip iken, yöresel yoğurt örneklerindeki AFM1 konsantrasyonları ise 7-53 ng/l aralığında ve 24,6 ng/l ortalamaya sahip bulunmuştur. Pastörize yoğurt örneklerinin %2,5'inin (1/40) ve yöresel yoğurt örneklerinin %10'unun (1/19) AB limitinin üzerinde AFM1 içerdiğini bildirmişlerdir.

Cano-Sancho ve ark., [63] İspanya'nın Katalonya bölgesindeki 12 farklı şehirden topladıkları 72 yoğurt örneğini ELISA yöntemi ile incelemiş, iki örnekte (%2,8) AFM1 tespit etmişlerdir. Yoğurt örneklerinin ortalama 38,34 ng/kg

konsantrasyonda AFM1 içerdiğini belirlemişlerdir. Yoğurt örneklerinin %1,39'unun (1/72) AB yasal limitini aştığını tespit etmişlerdir.

Xiong ve ark., [24] Çin'de kış mevsimi boyunca topladıkları 329 yoğurt örneğini ELISA yöntemi ile AFM1 varlığı açısından incelemiş ve 194 (%59,0) yoğurt örneğinin AFM1 içerdiğini ve konsantrasyonlarının ortalamasının 20,7 ng/kg olduğunu tespit etmişlerdir. Yoğurt örneklerinin %1,2'sinin (4/329) 50 ng/kg olan AB yasal limitini aştığını ancak Çin'deki yasal limit olan 500 ng/kg'ın altında olduğunu bildirmişlerdir.

Iha ve ark., [83] Brezilya'da dokuz tam yağlı, 21 yarım yağlı ve 23 yağsız olmak üzere toplam 53 yoğurt örneğini sulu metanol ekstraksiyonu, immunoafinite kolonu saflaştırması ve izolasyonu, ters fazlı sıvı kromatografi ayırma ve floresan saptama yöntemleri ile incelemişlerdir. Örneklerin 47'sinin (%72) AFM1 ile 10-529 ng/kg aralığında değişen konsantrasyonlarda kontamine olduğu belirlenmiştir.

Fallah ve ark., [84] İran'da gerçekleştirdikleri çalışmada TLC yöntemi ile 61 endüstriyel ve 60 geleneksel yoğurt örneğini incelemişlerdir. İnek sütünden elde edilen endüstriyel yoğurtların 30'u (%49,2) 0,015-0,102 µg/kg aralığında değişen konsantrasyonlarda ve 0,026 µg/kg ortalama ile AFM1 ile kontamine iken; koyun, keçi sütü veya ikisinin karışımından elde edilen geleneksel yoğurt örneklerinin 14'ünün (%23,3) 0,015-0,036 µg/kg aralığında ve ortalama 0,007 µg/kg konsantrasyonda AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Endüstriyel yoğurtların hem oran hem de konsantrasyon açısından AFM1 kontaminasyonunun geleneksel yoğurtlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonbahar ve kış aylarında toplanan endüstriyel yoğurt örneklerindeki AFM1 seviyelerinin ilkbahar ve yaz mevsiminde toplanan örneklerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Geleneksel yoğurt örneklerindeki AFM1 seviyelerinin de kışın elde edilen ürünlerde diğer mevsimlerde elde edilenlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Endüstriyel yoğurtların %16,4'ünün (10/61), geleneksel yoğurtların ise hiçbirinin (0/60) hem İran'ın hem de AB'nin belirlediği limit olan 50 ng/kg'ı geçmediğini bildirmişlerdir.

Murshed ve ark., [65] Yemen, Mısır'da IAC ve HPLC-FLD yöntemlerini kullanarak 62 yoğurt örneğini incelemiş ve örneklerin 54'ünün (%87,09) AFM1 ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. Örneklerin AFM1 konsantrasyonlarının 0,021-0,893 µg/kg aralığında ve ortalama 0,339 µg/kg olduğunu tespit etmişlerdir. Örneklerin

%83,87'sinin (52/62) AB limiti olan 0,05 µg/l'yi aştığı görülmüştür. Çalışmanın sonucunda Yemen'de tüketilen süt ve süt ürünlerinin kabul edilebilir limit değerinden daha yüksek konsantrasyonda AFM1 içerdiği ve kanser dahil olmak üzere sağlıkla ilgili komplikasyonlar için önemli bir etken olduğu kanısına varılmıştır.

El Khoury ve ark., [85] Beyrut, Lübnan'da 64 yoğurt örneğindeki AFM1 varlığını ve seviyesini ELISA yöntemiyle incelemiş, 21 örneğin (%32,81) kontamine olduğunu saptamışlardır. Örneklerin %6,25'inin (4/64) AB limitini aştığını belirlemişlerdir.

Guo ve ark., [54] ELISA yöntemi ile Çin'de doğal, tatlandırılmış ve aromalı olmak üzere 178 yoğurt örneğinin sekizinde (%4,49) AFM1 varlığını tespit etmişlerdir. Yoğurt örneklerinin %4,49'unun (8/178) AB limit değerini aştığını belirlemişlerdir. Çin'de süt ve süt ürünlerinde AFM1 için belirlenmiş limit değerinin 500 ng/kg olduğunu bildirmişlerdir.

Tavakoli ve ark., [64] Tahran, İran'da 50 yoğurt örneğinde ELISA yöntemiyle AFM1 varlığını araştırmış ve örneklerin 35'inde (%70) 21,1-137,6 ng/kg aralığında AFM1 tespit etmişlerdir. Tüm yoğurt örneklerinin ortalama 26,95 ng/kg AFM1 içerdiği saptanmıştır. Örneklerinin %17,14'ünün (6/50) hem İran'ın hem de AB'nin limiti olan 50 ng/kg'ı aştığı belirlenmiştir. İncelenen yoğurtların 25'i yaz, 25'i ise kış mevsiminde üretilmiştir. Kışın üretilen 25 yoğurt örneğinin 22'sinin (%88) 21,1-137,6 ng/kg aralığında ve ortalama 36,33 ng/kg AFM1 içerdiği, bunlardan %18,19'unun (4/25) yasal limitleri aştığı belirlenmiştir. Yazın üretilen 25 yoğurt örneğinin ise 13'ünün (%52) 22-65,1 ng/kg aralığında ve ortalama 17,58 ng/kg AFM1 içerdiği, bunlardan %15,38'inin (2/25) yasal limitleri aştığı tespit edilmiştir. Ortalama AFM1 konsantrasyonunun kışın elde edilen örneklerde istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha yüksek olduğu görülmüştür.

Rahimi E. [2] İran'da toplam 60 yoğurt örneğini ELISA yöntemi ile incelemiş ve 48'inin (%80) 19,7-319,4 ng/kg aralığında ve ortalama 130,5 ng/kg AFM1 içerdiğini tespit etmiştir. Çalışmada ortalama AFM1 konsantrasyonunun kış ve sonbahar mevsimlerinde yaz ve ilkbahar mevsimlerinde olduğundan anlamlı miktarda daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Nikbakht ve ark., [66] İran'ın Guilan eyaletinde çiftlikler ve mandıralardan temin edilen 90 adet geleneksel yoğurt örneğini ELISA yöntemiyle incelemiş ve örneklerin tamamının (%100) 5-83 ng/kg aralığında AFM1 ile kontamine olduğunu

belirlemişlerdir. İnceledikleri örneklerin %22,22'sinin (20/90) AB limiti olan 50 ng/kg'ı aştığını bildirmişlerdir.

Sohrabi ve ark., [86] İranşehr, İran'da 18 yoğurt örneğinin 15'inde (%83,3) AFM1 varlığını belirlemişlerdir. Ortalama konsantrasyon 10,25 ng/kg, en düşük ve en yüksek konsantrasyon 7,8-12,1 ng/kg'dır. Örneklerin hiçbirinin (0/18) limit değeri aşmadığını bildirmişlerdir.

Hassan ve ark., [87] Doha, Katar'da tüketime sunulan tam yağlı ve yarım yağlı toplam 21 adet yoğurt örneğindeki AFM1 varlığını önce ELISA yöntemi ile incelemiş daha sonra ultra-HPLC yöntemi ile doğrulamışlardır. Örneklerin 16'sında (%76,1) 4,16-38,21 ng/kg aralığında ortalama 31,32 ng/kg konsantrasyonda AFM1 varlığı saptanmıştır. Tam yağlı ve az yağlı yoğurt örneklerindeki AFM1 seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Örneklerin hiçbirisi 50 ng/L olan AB maksimum limit değerini aşmamıştır.

Aiad ve ark., [88] Mısır'ın İskenderiye şehrindeki süpermarketlerden aldıkları toplam 30 yoğurt örneğinin sekizinde (%26) ELISA yöntemi ile 11,40-98,80 ng/kg aralığında ve ortalama 28,41 ng/kg konsantrasyonunda AFM1 varlığını tespit etmişlerdir. Bu örneklerin %63'ü (5/30) AB limitlerini aşmıştır.

Heshmati ve ark., [75] Hamadan, İran'dan aldıkları 50 yoğurt örneğini ELISA yöntemiyle inceleyerek AFM1 varlığını ve seviyesini araştırmışlardır. Yoğurtların 43'ünün (%86) <5-98,65 ng/kg aralığında ortalama 28,56 ng/kg AFM1 içerdiği görülmüştür. Örneklerin %18'inin (9/50) limiti aştığı belirlenmiştir.

Ismaiel ve ark., [74] Zabadi denilen, bufalo ve inek sütünden yapılan geleneksel Mısır yoğurdunun Mısır'da farklı şehirlerden (Kahire, Giza, Kalyubiye) 64 örneğini ince tabaka kromatografisi ile analiz edip, sonuçları HPLC ile doğrulamışlardır. Örneklerin 10'unun (%15,62) 0,1-0,24 µg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda AFM1 ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. Örneklerin %15,62'sinin (10/64) AB'nin belirlediği yasal limitin üzerinde AFM1 içerdiğini saptamışlardır.

Mohammadi ve ark., [12] meta analiz çalışmalarında İran (10 çalışma), Türkiye (sekiz çalışma), Pakistan (üç çalışma), Lübnan (üç çalışma) ve Katar'dan (bir çalışma) yoğurtlardaki AFM1 varlığını araştıran toplam 25 makaleyi ele almışlardır. Çalışmalardaki AFM1 ile kontamine örnek oranı en yüksek ülke %76,68 ile İran olup onu %76,19 ile Katar, %62,71 ile Türkiye, %53,81 ile Lübnan ve %41,38 ile Pakistan takip etmektedir. Çalışmalarda saptanan AFM1 ortalamalarına göre sıralama

yapıldığında en yüksek konsantrasyon Türkiye’de (137,76 ng/kg) belirlenmiş, onu sırasıyla Lübnan (86,70 ng/kg), Pakistan (38,43 ng/kg), Katar (31,30 ng/kg) ve İran (28,24 ng/kg) izlemiştir. Lübnan’da incelenen yoğurt örneklerinin %32,25’inin, Türkiye’de %31,25’inin, Pakistan’da %20,95’inin, İran’da %8,27’sinin ve Katar’da %0’ının AB’nin belirlediği limit değerini aştığı saptanmıştır.

Sumon ve ark., [25] Bangladeş’in farklı şehirlerinden aldıkları (Sylhet, Dakka, Chittagong, Rajshahi) beş adet yoğurt örneğini ELISA yöntemiyle incelemiş ve örneklerin tamamının AFM1 içerdiğini belirlemişlerdir. Yoğurt örneklerinin 8,3-41,1 ng/l aralığında ortalama 16,9 ng/l AFM1 içerdiğini tespit etmişlerdir. Test edilen örneklerin hiçbiri (0/5) yasal AB limitini aşmamıştır.

Iqbal ve Asi [89] Pencap, Pakistan’da üretilen 96 yoğurt örneğindeki AFM1 varlığı ve miktarını HPLC-FLD yöntemi kullanarak araştırmış ve incelenen örneklerin 59’unda (%61) tespit etmiştir. Yoğurt örneklerinde bulunan ortalama AFM1 konsantrasyonunun 147,1 ng/kg olduğu ve 4-615,8 ng/kg aralığında bulunduğu belirlenmiştir. Bu yoğurt örneklerinin %47’sinin (28/96) AB’nin belirlediği 50 ng/kg limit değerini aştığı tespit edilmiştir.

Tomasevic ve ark., [90] Sırbistan’da 56 yoğurt örneğini ELISA yöntemiyle AFM1 varlığı ve seviyesi açısından incelemiş ve 0,05 µg/kg’lık AB limitini aşmış olan 22 (%39,2) adet yoğurt örneği tespit etmişlerdir. Yoğurtlardaki ortalama AFM1 konsantrasyonu ise 0,081 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Tadesse ve ark., [71] Etiyopya’daki endüstriyel ve yerel üreticilerden temin ettikleri 93 yoğurt örneğini ELISA yöntemi ile AFM1 varlığı ve düzeyi açısından incelemiştir. Endüstriyel üreticilerden alınan 83, yerel üreticilerden alınan 10 yoğurt örneğinin hepsi (%100) AFM1 ile kontamine bulunmuştur. Endüstriyel yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonunun 0,09-4,01 µg/l aralığında, yerel yoğurt örneklerinin ise 0,07-4,76 µg/l aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada İstanbul’daki marketlerde ticari olarak satılan 35 normal, 15 meyveli, 15 süzme ve 19 organik olmak üzere toplam 84 adet yoğurt örneği AFM1 varlığı ve düzeyi açısından ELISA yöntemi ile araştırılmış ve örneklerin tamamının (%100) değişen konsantrasyonlarda AFM1 içerdiği görülmüştür. Bu bulgu Türkiye’den Temamoğulları, Kayaalp ve Topal’ın çalışmalarıyla uyumludur [62, 73, 77]. Yurtdışında yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda ise bu sonucun İran’dan Barjesteh’in ve Nikbakht’in, Bangladeş’ten Sumon’un, Etiyopya’dan Tadesse’nin

çalışmalarında belirlenen oranlar ile uyumlu olduğu görülmektedir [25, 66, 71, 82]. Bu çalışmada normal yoğurtların 13,88-46,89 ng/kg aralığında ortalama 25 ng/kg, meyveli yoğurtların 9,4-28,67 ng/kg aralığında ortalama 17,33 ng/kg, süzme yoğurtların 11,25-46,82 ng/kg aralığında ortalama 24,37 ng/kg ve organik yoğurtların 5,08-77,48 ng/kg aralığında ortalama 27,13 ng/kg AFM1 içerdiği görülmüştür. TGK ve AB'nin belirlediği en yüksek limit değeri olan 50 ng/kg konsantrasyon değerini incelenen örneklerin %5,95'inin (5/84) aştığı ve bu beş örneğin de organik yoğurt olduğu belirlenmiştir. Yasal limiti aşan bu beş örnek, incelenen organik yoğurt örneklerinin %26,32'sini oluşturmaktadır.

AFM1 başta kazein olmak üzere süt proteinlerine bağlanmaktadır [16]. Akkaya ve ark., [76] inceledikleri örneklerden süzme yoğurtlarda AFM1'in bulunma yüzdesinin ve konsantrasyonunun daha yüksek olduğunu, bunun nedeninin bu yoğurtlarda kazein konsantrasyonunun daha fazla olmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Topal GG [77] farklı yoğurt türlerinin AFM1 kontaminasyonu seviyesi arasında anlamlı bir fark belirlememiştir. Hassan ve ark. [87] da benzer şekilde tam yağlı ve az yağlı yoğurt örneklerindeki AFM1 seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık tespit etmemiştir. Bu çalışmada da tam yağlı ve yarım yağlı yoğurtlar AFM1 konsantrasyonu açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,284$).

Bu çalışmada meyveli yoğurtlarda 9,4-28,67 ng/kg aralığında ortalama $17,33 \pm 6,27$ ng/kg AFM1 konsantrasyonu belirlenmiştir. Sade yoğurtlarda ise 5,08-77,48 ng/kg aralığında ortalama $25,45 \pm 15,58$ ng/kg AFM1 tespit edilmiştir. Meyveli ve sade yoğurtların dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,038$).

Yoğurtlarda AFM1 varlığı ile ilgili çalışmaların sonuçları farklılık gösterebilmektedir. Bu değişkenlik araştırmanın yapıldığı coğrafi bölge, mevsim değişkenliği, kullanılan yoğurt yapım yöntemleri ve araştırmada tercih edilen analitik yöntem gibi farklı faktörlerle ilişkilidir. Bu çalışmalarda en sık kullanılan yöntemler ELISA, TLC ve HPLC'dir. ELISA yöntemi hızlı ve kolay uygulanan immünokimyasal bir yöntem olma özelliği nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir [12]. Mohammadi ve ark., [12] HPLC ve ELISA yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda tespit edilen AFM1 konsantrasyonu ortalamalarının TLC kullanılan çalışmalara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve ark. [91] ise ELISA ve HPLC yöntemlerini karşılaştırmış,

ELISA yöntemi ile tespit edilen en düşük AFM1 konsantrasyonunun 2 pg/ml olduğunu, buna karşılık HPLC yöntemi ile saptanabilen en düşük konsantrasyonun 10 pg/ml olduğunu belirlemişlerdir. Güney Kore’de yaptıkları çalışma kapsamında inceledikleri 60 adet yoğurt örneğinden ELISA yöntemiyle 50’sinin (%83,3) 3-172 pg/g aralığında AFM1 ile, HPLC yöntemiyle ise yalnızca 31’inin (%51,6) 17-124 pg/g aralığında değişen konsantrasyonlarda kontamine olduğunu saptamışlardır.

AFM1’in besin işleme süreçlerinde ve depolama sırasında kararlılığını koruduğu, yapısında herhangi bir bozulma meydana gelmediği bildirilmiştir. Bazı uygulamalarla süt ürünlerindeki seviyesini düşürmek mümkün olmaktadır ancak tamamen yok edebilmek için herhangi bir uygulama geliştirilememiştir [12].

Albay ve ark.’nın [92] çalışmasında deneysel olarak 0,05 µg/l ve 0,1 µg/l olmak üzere iki farklı konsantrasyonda AFM1 ile kontamine edilmiş sütlerden yoğurt üretilmiştir. Tuzlu yoğurt ve süzme yoğurt üretimi sırasıyla %65; %70,25, %73,75 ve %81,12 oranında AFM1’in azalmasını sağlamıştır. Ayrıca tuzlu yoğurda uygulanan 90 günlük depolama işleminin AFM1 içeriğini 0,019 ve 0,027 µg/l değerlerine azalttığı belirlenmiştir.

Şanlı ve ark.’nın araştırmasında [93] AFM1 ile 1,5 ve 3,5 µg/kg konsantrasyonunda kontamine olan inek sütünden yoğurt üretilmiş ve yoğurdun AFM1 konsantrasyonu üzerine pastörizasyon işleminin ve depolamanın etkileri incelenmiştir. Sütteki AFM1 konsantrasyonunda 95°C’de beş dakika pastörizasyonun sırasıyla %18 ve %16 oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma sağladığı belirlenmiştir. Yoğurt üretiminden sonra AFM1 düzeylerinde sırasıyla %36,5 ve %34,6 oranlarında düşüş gözlenmiştir. Buzdolabında 4°C’de iki haftalık depolama süresinin sonunda ise yoğurt örneklerinin AFM1 konsantrasyonları sırasıyla %6,5 ve %9,0 oranlarında daha da azalmıştır.

El Khoury ve ark., [85] yoğurt yapımı sırasında kullanılan bakteriler olan *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*’un AFM1’e bağlanma özelliği bulunduğunu ve bu sayede AFM1 konsantrasyonunun azalmasını sağladığını bildirmiştir. Ancak konu ile ilgili veriler yetersizdir ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Organik besinlerdeki mikotoksin kontaminasyonu ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Sentetik fungusitler kullanılmadığı için organik mahsullerin küflerle kontaminasyona daha açık olduğu belirtilmektedir. Semaskiene ve ark., [94] organik

tahılların yüksek miktarda toksik mantarlarla ve mikotoksinlerle kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Tosun ve ark., [59] tüm Türkiye’deki organik marketlerden aldıkları 26 adet organik yoğurt örneğini ELISA yöntemiyle incelemiş, örneklerin tamamının (%100) 125-269 ng/kg aralığında ve konsantrasyon ortalamaları 238 ng/kg olmak üzere AFM1 ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Yoğurt örneklerinin hepsinin AFM1 konsantrasyonunun TKG ve AB limit değerlerini aştığını bildirmişlerdir. Aynı çalışma kapsamında incelenen 39 UHT organik süt örneğinin de yine tamamının (%100) AFM1 ile kontamine olduğu ve 39’unun da (%100) TKG ve AB limitlerini aştığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar organik yoğurt ürünlerinin potansiyel bir risk taşıdığını göstermiştir.

Topal GG’nin [77] çalışması kapsamında incelenen yoğurt örneklerinin sekiz tanesi organik yoğurttur ve tamamının (%100) AFM1 ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Çalışmada AFM1 konsantrasyonunun en yüksek olduğu yoğurt türünün ortalama 18,43 ng/kg ile organik yoğurtlar olduğu, AFM1 konsantrasyonlarının 7,22-30,20 ng/kg aralığında olduğu tespit edilmiş, bununla birlikte diğer yoğurt türlerinin AFM1 kontaminasyonu seviyelerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olmadığı belirtilmiştir ($p>0,05$). Organik yoğurtlardaki AFM1 seviyesinin daha yüksek olmasının sebebinin organik tarımda fungusit ve pestisit gibi maddelerin kullanılmaması olabileceği bildirilmiştir.

Ghidini ve ark. [95] organik sütlerin güvenilirliklerini incelemişlerdir. ELISA yöntemiyle gerçekleştirilen çalışmaya göre organik üretim dışındaki etkenlerin de var olabilmesine rağmen organik süt örneklerinin ortalama AFM1 seviyelerinin geleneksel süt örneklerinden anlamlı miktarda daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. AFM1 kararlı yapısı nedeniyle işlendiğinde ya da çeşitli işlemlerden geçtiğinde bozulmamaktadır. Bu nedenle kontamine sütlerden elde edilen yoğurtlar da AFM1 ile kontamine olacaktır. Organik sütlerin kontaminasyona daha yatkın oldukları bu çalışma ile görüldüğünden organik yoğurtların da daha yüksek AFM1 kontaminasyonuna sahip olması beklenmektedir.

Bu çalışmada da incelenen 19 organik yoğurdun tamamında (%100) AFM1 tespit edilmiş, ancak konsantrasyonun Tosun ve ark.’nın [59] araştırmasındaki kadar yüksek olmadığı görülmüştür. Organik yoğurtların 5,08-77,48 ng/kg aralığında ve 27,13

ng/kg ortalama konsantrasyonunda AFM1 içerdiği tespit edilmiştir. Ek olarak 50 ng/kg limitini aşan beş yoğurt örneğinin de organik yoğurt olduğu belirlenmiştir.

Bu alışma ile, İstanbul'daki marketlerde ticari olarak satılan farklı markalarda ve farklı lot numaralarına sahip 84 adet yoğurt örneği AFM1 varlığı ve düzeyi açısından ELISA yöntemi ile araştırılmış ve örneklerin 84'ünün de (%100) AFM1 ile kontamine olduğu görülmüştür. Günlük beslenmede ve Türk mutfağında önemli bir yeri olan yoğurtların tüketimi ile sürekli olarak AFM1'e maruz kalmanın potansiyel bir halk sağlığı riski oluşturduğu düşünülmüştür. Bu nedenle tüketicilerin korunması amacıyla aflatoksinlerin varlığı ve düzeylerinin düzenli olarak kontrolünün sağlanması önem taşımaktadır. Detoksifikasyon ve dekontaminasyon yöntemleri toksinin tamamını yok etmede etkili olmadığından, mikotoksin oluşumunu önleme stratejilerine önem verilmesi gerekmektedir. Eğer sütte AFM1 bulunuyorsa, aynı süttten yapılacak yoğurt ve diğer süt ürünleri de AFM1 içerecektir. Bu nedenle AFM1 oluşumunu önlemek için hayvanların tükettiği yemlerdeki AFB1'in mümkün olduğunca azaltılması ya da oluşumunun engellenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Throckmorton, K., et al., Mycotoxins, in *Manual of Clinical Microbiology*. 2015. p. 2188-2195.
2. Rahimi, E., Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Iran. *Toxicology and Industrial Health*, 2014. 30(8): p. 750-754.
3. Abd-Elsalam, K.A. and M. Rai, An introduction to nanomycotoxicology, in *Nanomycotoxicology*. 2020, Elsevier. p. 1-7.
4. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2001). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Erişim: 5.6.2022, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>
5. Fletcher, M.T. and B.J. Blaney, *Mycotoxins*, in *Encyclopedia of Food Grains*. 2016. p. 290-296.
6. Agriopoulou, S., E. Stamatelopoulou, and T. Varzakas, Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 2020. 9(2): p. 137.
7. Min, L., et al., An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. *Animal Nutrition*, 2021. 7(1): p. 42-48.
8. Coppock, R.W., R.G. Christian, and B.J. Jacobsen, Aflatoxins, in *Veterinary toxicology*. 2018, Elsevier. p. 983-994.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology* (8th ed). Philadelphia: Elsevier, 2016: 678-683.
10. Assefa, T. and T. Geremew, Major mycotoxins occurrence, prevention and control approaches. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2018. 12(1): p. 1-11.
11. Tolosa, J., et al., Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2021. 158: p. 112661.
12. Mohammadi, S., et al., Occurrence of aflatoxin M 1 in yogurt of five countries in west Asia region: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Food Safety*, 2021. 41(4): p. e12897.
13. Kocasari, F.S., F. Tasci, and F. Mor, Survey of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Burdur, Turkey. *International journal of dairy technology*, 2012. 65(3): p. 365-371.
14. Tarannum, N., et al., Aflatoxin M1 detection by ELISA in raw and processed milk in Bangladesh. *Toxicology Reports*, 2020. 7: p. 1339-1343.
15. The International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Erişim: 13.03.2022, <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>
16. Vaz, A., et al., Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products. *Microorganisms*, 2020. 8(2): p. 246.
17. Fisberg, M. and R. Machado, History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition reviews*, 2015. 73(suppl_1): p. 4-7.
18. Matabaro, E., et al., Current immunoassay methods for the rapid detection of aflatoxin in milk and dairy products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2017. 16(5): p. 808-820.
19. Daou, R., et al., Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agriculture and Food*, 2021. 6(1): p. 416-447.

20. Türk Gıda Kodeksi. (2011, 29 Aralık). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Gıdalardaki bulaşanların maksimum limitleri Ek-1. Resmi Gazete. (Sayı: 28157 (3.mükerrer)). Erişim 4.7.2022, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8-1.pdf>
21. European Commission. *Commission Regulation (EC) No: 1881/2006 of 19 September 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. Erişim 13.3.2022, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1881-20220101>
22. Sarica, D.Y., et al., Occurrence of aflatoxin M1 in milk, white cheese and yoghurt from Ankara, Turkey markets. *Biol Chem Res*, 2015. 2015: p. 36-49.
23. Sahin, H.Z., et al., Aflatoxins in dairy cow feed, raw milk and milk products from Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2016. 9(2): p. 152-158.
24. Xiong, J., et al., Occurrence of aflatoxin M1 in yogurt and milk in central-eastern China and the risk of exposure in milk consumers. *Food Control*, 2022. 137: p. 108928.
25. Sumon, A.H., et al., The Presence of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products in Bangladesh. *Toxins*, 2021. 13(7): p. 440.
26. Armendáriz, C.R., et al., *Mycotoxins*, in *Encyclopedia of Toxicology*. 2014. p. 424-427.
27. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology* (8th ed). Philadelphia: Elsevier, 2016: 666-667.
28. Assunção, R. and S. Viegas, *Mycotoxin exposure and related diseases*. 2020, Multidisciplinary Digital Publishing Institute. p. 172.
29. Bennett, J.W. and M. Klich, *Mycotoxins*. *Clinical microbiology reviews*, 2003. 16(3): p. 497-516.
30. Coppock, R.W. and M. M. Dziwenka, *Mycotoxins*, in *Biomarkers in Toxicology*. 2014. p. 549-562.
31. Tola, M. and B. Kebede, Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2016. 2(1): p. 1191103.
32. Pitt, J.I., *Mycotoxins*, in *Foodborne Infections and Intoxications*. 2013. p. 409-418.
33. Omotayo, O.P., et al., Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicological research*, 2019. 35(1): p. 1-7.
34. Pitt, J.I. and J.D. Miller, A concise history of mycotoxin research. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2017. 65(33): p. 7021-7033.
35. Paterson, R.R. and N. Lima, Toxicology of mycotoxins. *Molecular, clinical and environmental toxicology*, 2010: p. 31-63.
36. Stein, R.A. and A.E. Bulboacă, *Mycotoxins*, in *Foodborne Diseases*. 2017. p. 407-446.
37. Grzybowski, A., K. Pawlikowska-Łagód, and A. Polak, Ergotism and Saint Anthony's fire. *Clinics in Dermatology*, 2021. 39(6): p. 1088-1094.
38. Vrabcheva, T., et al., Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000. 48(6): p. 2483-2488.
39. Pavlović, N.M., Balkan endemic nephropathy—current status and future perspectives. *Clinical Kidney Journal*, 2013. 6(3): p. 257-265.
40. Afsah-Hejri, L., et al., A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2013. 12(6): p. 629-651.

41. Hunaefi, D., et al., Optimizing the tray dryer temperature and time of white corn flour culture. *Food Research*, 2021. 5(5): p. 95-104.
42. Conte, G., et al., Mycotoxins in feed and food and the role of ozone in their detoxification and degradation: An update. *Toxins*, 2020. 12(8): p. 486.
43. Barac, A., Mycotoxins and Human Disease, in *Clinically Relevant Mycoses: A Practical Approach*, E. Presterl, Editor. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 213-225.
44. Heperkan, D., The importance of mycotoxins and a brief history of mycotoxin studies in Turkey. *ARI Bulletin of Istanbul Technical University*, 2006. 54: p. 18-27.
45. Awuchi, C.G., et al., Fungal Growth and Mycotoxins Production: Types, Toxicities, Control Strategies, and Detoxification in *Fungal Reproduction and Growth*. 2021.
46. Bakırdere, S., et al., Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different foodstuffs. *Central European journal of chemistry*, 2012. 10(3): p. 675-685.
47. Yangınlar, F. and P. Oğuzhan, Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Başlıca Mikotoksin Türü: Aflatoksinler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2013. 6(2): p. 106-111.
48. Kiarie, G., et al., Aflatoxin exposure among young children in urban low-income areas of Nairobi and association with child growth. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 2016. 16(3): p. 10967-10990.
49. Kumar, V.V., Aflatoxins: properties, toxicity and detoxification. *Nutr. Food Sci. Int. J*, 2018. 6: p. 555696.
50. Santini, A. and A. Ritieni, Aflatoxins: risk, exposure and remediation. *Aflatoxins-recent advances and future prospects*, 2013: p. 343-376.
51. Control, C.f.D. and Prevention, Outbreak of aflatoxin poisoning--eastern and central provinces, Kenya, January-July 2004. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 2004. 53(34): p. 790-793.
52. Kamala, A., et al., Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin Journal*, 2018. 11(3): p. 311-320.
53. de Oliveira, C.A. and C.H. Corassin, Aflatoxins. 2014, *Future Medicine*.
54. Guo, Y., Y. Yuan, and T. Yue, Aflatoxin M1 in milk products in China and dietary risk assessment. *Journal of food protection*, 2013. 76(5): p. 849-853.
55. Mousavi Khaneghah, A., et al., Aflatoxins in cereals: State of the art. *Journal of Food Safety*, 2018. 38(6): p. e12532.
56. Rahimirad, A., et al., Aflatoxin M1 concentration in various dairy products: evidence for biologically reduced amount of AFM1 in Yoghurt. *Iranian Journal of Public Health*, 2014. 43(8): p. 1139.
57. Giovati, L., et al., AFM1 in milk: Physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination. *Toxins*, 2015. 7(10): p. 4330-4349.
58. Iqbal, S.Z., et al., Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2015. 46(1): p. 110-119.
59. Tosun, H. and T. Ayyıldız, Occurrence of aflatoxin M1 in organic dairy products. *Quality assurance and safety of crops & foods*, 2013. 5(3): p. 215-219.
60. Ertas, N., et al., A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control*, 2011. 22(12): p. 1956-1959.

61. Atasever, M.A., M. Atasever, and K. Özturan, Aflatoxin M1 levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2011. 35(1): p. 59-62.
62. Kayaalp, O., N. Ertaş, and A. Serhat, Kayseri Yöresinde Tüketime Sunulan Manda Yoğurtlarında Aflatoksin M1 Düzeyinin Belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2015. 12(1): p. 19-23.
63. Cano-Sancho, G., et al., Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Revista Iberoamericana de Micología*, 2010. 27(3): p. 130-135.
64. Tavakoli, H.R., et al., Assessment of Aflatoxin M-1 Levels by Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Yoghurt Consumed in Tehran, Iran. *Asian Journal of Chemistry*, 2013. 25(5): p. 2836-2838.
65. Murshed, S., Evaluation and assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products in Yemen using high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Quality*, 2020. 2020.
66. Nikbakht, M.R., et al., Aflatoxin M1 contamination in traditional yoghurts produced in Guilan province, Iran. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 2016. 8(1).
67. Nazhand, A., et al., Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. *Foods*, 2020. 9(5): p. 644.
68. Mohamadi, H., H. Abbaspour, and M. Hassanshahian. Comparisons of different methods for detection of aflatoxin in grain and grain products. in *I International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits* 963. 2011.
69. Luo, Y., X. Liu, and J. Li, Updating techniques on controlling mycotoxins-A review. *Food control*, 2018. 89: p. 123-132.
70. R-Biopharm AG (2021) Enzyme Immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins. Ridascreen Aflatoxin M1 Art. No:R-1111. Darmstadt, Germany.
71. Tadesse, S., T. Berhanu, and A.Z. Woldegiorgis, Aflatoxin M1 in milk and milk products marketed by local and industrial producers in Bishoftu town of Ethiopia. *Food control*, 2020. 118: p. 107386.
72. Gürbay, A., et al., Aflatoxin M1 levels in commonly consumed cheese and yogurt samples in Ankara, Turkey. *Ecology of Food and Nutrition*, 2006. 45(6): p. 449-459.
73. Temamogullari, F. and A. Kanici, Aflatoxin M1 in dairy products sold in Şanlıurfa, Turkey. *Journal of Dairy Science*, 2014. 97(1): p. 162-165.
74. Ismaiel, A.A., et al., Two-year survey on the seasonal incidence of aflatoxin M1 in traditional dairy products in Egypt. *Journal of food science and technology*, 2020. 57(6): p. 2182-2189.
75. Heshmati, A., A.S.M. Mozaffari Nejad, and T. Ghyasvand, The Occurrence and Risk Assessment of Aflatoxin M in Yoghurt Samples from Hamadan, Iran. *The open public health journal*, 2020. 13(1).
76. Akkaya, L., et al., Occurrence of aflatoxin M~ 1 in yogurt samples from Afyonkarahisar, Turkey. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, 2006. 50(4): p. 517.
77. Topal, GG., Piyasadaki Farklı Yoğurt Türlerinin Aflatoksin M1 Düzeylerinin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Toplu Beslenme Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017.
78. Erdal, M., Afyonkarahisar İlinde Tüketime Sunulan Meyveli Yoğurtlarda Aflatoksin M1 Varlığının ve Düzeyinin Belirlenmesi, Afyon Kocatepe

- Üniversitesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar, 2020.
79. Özmenteşe, N., İstanbul piyasasından sağlanan süt ve süt ürünlerinin aflatoxin B1 ve M1 içerikleri yönünden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması. Marmara Üniversitesi, 2002.
 80. Galvano, F., et al., Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Additives & Contaminants*, 2001. 18(7): p. 644-646.
 81. Martins, M.L.g. and H.M. Martins, Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 2004. 91(3): p. 315-317.
 82. Barjesteh, M., I.G. Azizi, and E. Noshfar, Occurrence of aflatoxin m1 in pasteurized and local yogurt in mazandaran province (northern iran) using elisa. *Global Veterinaria*, 2010. 4(5): p. 459-462.
 83. Iha, M.H., et al., Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. *Food Control*, 2011. 22(12): p. 1971-1974.
 84. Fallah, A.A., et al., Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*, 2011. 22(10): p. 1653-1656.
 85. El Khoury, A., A. Atoui, and J. Yaghi, Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*, 2011. 22(10): p. 1695-1699.
 86. Sohrabi, N. and H. Gharahkoli, A seasonal study for determination of aflatoxin M1 level in dairy products in Iranshahr, Iran. *Current medical mycology*, 2016. 2(3): p. 27.
 87. Hassan, Z.U., et al., Evidence of low levels of aflatoxin M1 in milk and dairy products marketed in Qatar. *Food control*, 2018. 92: p. 25-29.
 88. Aiad, A.S. and H. Aboelmakarem, Aflatoxin M1 levels in milk and some dairy products in Alexandria city. *Assiut Vet Med J*, 2013. 59(139): p. 94-98.
 89. Iqbal, S.Z. and M.R. Asi, Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 2013. 30(1): p. 235-239.
 90. Tomašević, I., et al., Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. *Food control*, 2015. 56: p. 64-70.
 91. Kim, E., et al., Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additives & Contaminants*, 2000. 17(1): p. 59-64.
 92. Albay, Z. and B. Şimşek, Assessment of Aflatoxin M1 Concentrations During Production and Long Storage of Salted (Tuzlu) Yogurt. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2019. 23(1): p. 46-51.
 93. Şanlı, T., O. Deveci, and E. Sezgin, Effects of pasteurization and storage on stability of aflatoxin M1 in yogurt. *Kafkas üniversitesi veteriner fakultesi dergisi*, 2012. 18(6).
 94. Semaškienė, R., et al., Toxic Fungi Infection And Mycotoxin Level In Organic Grain. *Botanica Lithuanica* (1392-1665), 2005. 11.
 95. Ghidini, S., et al., Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from Northern Italy. *Food additives and contaminants*, 2005. 22(1): p. 9-14.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TİCARİ OLARAK SATILAN YOĞURTLARDA AFLATOKSİN M1 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 11	% 3	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	9lib.net İnternet Kaynağı	% 1
4	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Yüzüncü Yıl Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	app.trdizin.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1

dergipark.org.tr