



BAZI GIDALARIN FLATOKSİN İÇERİĞİNİN HPLC METODU İLE TAYİNİ

PROF. DR. FEVZİ KILIÇEL
DOÇ. DR. HACER SİBEL KARAPINAR

Genel Yayın Yönetmeni / Editor in Chief • C. Cansın Selin Temana

Kapak & İç Tasarım / Cover & Interior Design • Serüven Yayınevi

Birinci Basım / First Edition • © Aralık 2024

ISBN • 978-625-5552-12-9

© copyright

Bu kitabın yayın hakkı Serüven Yayınevi'ne aittir.

Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin almadan hiçbir yolla çoğaltılamaz. The right to publish this book belongs to Serüven Publishing. Citation can not be shown without the source, reproduced in any way without permission.

Serüven Yayınevi / Serüven Publishing

Türkiye Adres / Turkey Address: Kızılay Mah. Fevzi Çakmak 1. Sokak

Ümit Apt No: 22/A Çankaya/ANKARA

Telefon / Phone: 05437675765

web: www.seruvenyayinevi.com

e-mail: seruvenyayinevi@gmail.com

Baskı & Cilt / Printing & Volume

Sertifika / Certificate No: 47083

BAZI GIDALARIN AFLATOKSİN İÇERİĞİNİN HPLC METODU İLE TAYİNİ

PROF. DR. FEVZİ KILIÇEL

DOÇ. DR. HACER SİBEL KARAPINAR

ÖNSÖZ

Mikotoksinler, küfler tarafından oluşturulan ve bunları içeren yem, yem ham maddeleri ve besinleri yiyen hayvan ve insanlarda zehirlenmelere ve ölüme yol açabilen maddelerdir. Küfler (funguslar) birçok tarım ürününde; özellikle kırmızıbiber, incir, fındık, mısır, fıstık, karabiber, ekmek, peynir ve birçok yağlı tohumda tarlada, bahçede, hasat sonrasında, depolama süresince veya bu ürünlerin gıda ve hayvan yemi olarak işlenmeleri sırasında doğal olarak gelişmektedirler. Küflerin metabolizma faaliyetleri sonucunda meydana gelen iz miktarda (mg/kg veya µg/kg seviyelerinde) organik yapıdaki toksik maddelere mikotoksin denir. Mikotoksinler, küflerin ikincil (sekonder) metabolitleridir ve iz miktarlarda meydana gelirler. Çok düşük miktarları bile insan sağlığını etkiler. Mikotoksinleri belirli küf cinsleri üretir ve her birinin ürettiği mikotoksin farklı yapıdadır. Küfler tarafından uygun şartlarda sekonder metabolit olarak oluşturulan mikotoksinler gerek insan gerekse hayvanlarda akut toksik, kanserojenik, mutojenik, teratojenik, östrojenik, genotoksik, neurotoksik, immunotoksik etkiler gösterirler. 1962'den beri yapılan çok sayıda araştırmada kanserojen özelliği en yüksek mikotoksinin aflatoksin olduğu kanıtlanmıştır.

Aflatoksinlerin insan ve hayvanlarda çok sayıda ve değişik sağlık sorunlarına neden olması ve tarımsal ürünlerin değerini düşürerek ekonomik kayıplara yol açması bu konudaki araştırmaları yoğunlaştırmıştır.

Mikotoksinler arasında en önemli ve üzerinde en çok çalışılan aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve çeşitli toksijenik *Aspergillus* soyu ile bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* soyuna bağlı küfler tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir. Aflatoksinler, B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 olmak üzere başlıca altı ana bileşikten oluşurlar. Aflatoksin bileşikleri arasında en toksik ve en yaygın olanı ise aflatoksin B1'dir.

Bu çalışma, Karaman ili semt pazarlarında açıkta satılan fındık, fıstık, badem, kuru kayısı, kuru üzüm, kuru incir, karabiber, kırmızıbiber, mısır, küflü peynir ve marketlerden alınan ekmeklerde 7 gün boyunca AOAC 991.31 yöntemi ile aflatoksin B1, B2, G1, G2 seviyelerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 4 mevsim örnek alınmış ve her örnekten 2 paralel çalışılmıştır. Toplam 45 örnekten 90 ölçüm yapılmıştır. Küflü peynir ve ekmek örnekleri tek mevsim, diğer örnekler ise 4 mevsim alınmıştır. Toplam 40 örnekte (% 88.9) aflatoksin B1, B2, G1, G2 saptanmıştır. Türk Gıda Kodekslerinde ve Avrupa Birliği Standartlarında izin verilen maksimum aflatoksin B1 ve toplam AF bakımından 40 örneğin 4'ünde (kırmızıbiber) belirtilen üst limitlerin üzerinde çıkmıştır.

Sonuç olarak, kuru gıdalarda (kırmızıbiber hariç) aflatoksin miktarları verilen alt limitlerinde altında bulunmuştur. Fakat dört mevsim kırmızıbiber örneklerinde bulunan ortalama aflatoksin B1 13.44 μ /kg'dır. Bu miktar aflatoksin B1'in insan sağlığını tehdit edebilecek düzeyde olduğunu ve bu miktarın aşağılara çekilmesi gerektiğini göstermektedir. Bunun için gerekli önlem ve tedbirlerin alınması gerekmektedir.

"Bu çalışma, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (02-L-11) desteklenmiştir."

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CO₂	Karbondioksit
CaCO₃	Kalsiyum Karbonat
HNO₃	Nitrik Asit
KBr	Potasyum Bromür
M	Molarite
MeOH	Metanol
MgCO₃	Magnezyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
NH₃	Amonyak
N₂O	Diazotmonoksit
AF	Aflatoksin
AOAC	Association of Analytical Chemists
DAD	Diode Array Dedektör
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant Yöntemi
EMIT	Enzim Aktivitesine Bağlı İmmunoteknik
Em	Emisyon
Ex	Eksitasyon
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FPIA	Floresan Polarizasyon İmmunolojik Testi
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Mikotoksinler.....	3
2.2. Mikotoksinler ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	4
2.3. Mikotoksinlerin Sağlık Üzerine Etkisi.....	6
2.4. Mikotoksin Oluşum Şartları	10
2.4.1. Rutubet Etkisi	11
2.4.2. Sıcaklık Etkisi.....	11
2.4.3. pH Etkisi.....	12
2.4.4. Oksijen Etkisi.....	12
2.4.6. Süre Etkisi.....	13
2.5. Mikotoksinlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	13
2.5.1. Kromatografideki Bazı Terimler	15
2.6. Aflatoksinler	18
2.7. Gıda Maddelerinde Küflenmenin Önlenmesi	32
2.8. Mikotoksinler İle İlgili Yasal Düzenleme	33
3. MATERYAL VE METOD	36
3.1. Kullanılan Aletler ve Kimyasallar.....	36
3.2. Materyal	37
3.2.1. Örneklerin Analize Hazırlanması.....	37
3.3. Metod	37
3.3.1. Aflatoksin Standartları	37
3.3.1.1. Aflatoksin B1, B2, G1, G2 Standartları Hazırlanması.....	37
3.3.2. Aflatoksin Miktarının Belirlenmesi.....	40
3.3.3. Sistem Koşulları.....	40
3.3.4. Ekstraksiyon	41
3.3.6. HPLC Koşulları	42
3.3.7. Aflatoksin B1, B2, G1, G2'nin Belirlenmesi.....	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
5. SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	53

1. GİRİŞ

Küfler (funguslar) birçok tarım ürününde; özellikle kırmızıbiber, incir, fındık, mısır, fıstık, karabiber, ekmek, peynir ve birçok yağlı tohumda tarlada, bahçede, hasat sonrasında, depolama süresince veya bu ürünlerin gıda ve hayvan yemi olarak işlenmeleri sırasında doğal olarak gelişmektedirler.

Mikotoksinler, küfler tarafından oluşturulan ve bunları içeren yem, yem ham maddeleri ve besinleri yiyen hayvan ve insanlarda zehirlenmelere ve ölüme yol açabilen maddelerdir. Mikotoksin terimi Yunanca küf anlamına gelen *mykes* ve zehir anlamına gelen *toxicum* kelimelerinin birleştirilmesinden oluşmuştur (Bakırcı, 1995; Hopmans, 1997; Özmenteşe, 2002). Gıda maddeleri ve yemlerde bulunabilen küfler denildiğinde genelde taksonomide *Mycobiota* (funguslar âlemi) içinde *Zygomycota*, *Ascomycota* ve *Deuteromycota* bölümleri içinde yer alan değişik cins ve türdeki küfler anlaşılmaktadır (Tunail, 2000).

Mikotoksinler, küflerin ikincil (sekonder) metabolitleridir ve iz miktarlarda (ppm-mg/kg ve ppb-µg/kg seviyelerinde) meydana gelirler. Çok düşük miktarları bile insan sağlığını etkiler. Mikotoksinleri belirli küf cinsleri üretir ve her birinin ürettiği mikotoksin farklı yapıdadır (Charles ve Hurburgh, 1995).

Küflerin metabolizma faaliyetleri sonucunda meydana gelen iz miktarda organik yapıdaki toksik maddelere mikotoksin denir. Mikotoksinler ile kontamine olmuş gıdaları ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda meydana gelen hastalığa da mikotoksikozis adı verilir (Davis and Diener, 1978; Charles and Hurburgh, 1995).

Küfler tarafından uygun şartlarda sekonder metabolit olarak oluşturulan mikotoksinler gerek insan gerekse hayvanlarda akut toksik, kanserojenik, mutojenik, teratojenik, östrojenik, genotoksik, neurotoksik, immunitoksik etkiler gösterirler (Bakırcı, 1995; Akdemir, 2001; Yiannikouris ve Jouany, 2002).

Tarımsal ürünlerin üretiminden tüketimine kadar geçen işlem aşamalarında mikroorganizmalarla kontamine olma riski oldukça fazladır. Bu mikroorganizmalardan küfler, her ortamda bulunur ve tarımsal ürünlere hasattan önce bulaşarak, hasat, harman ve depolama sırasında bulaşma oranlarının arttığı yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Eke, 1985; Çoksöyler ve Özkaya, 1987).

1962'den beri yapılan çok sayıda araştırmada kanserojen özelliği en yüksek mikotoksinin aflatoksin olduğu kanıtlanmıştır (Davis and Diener, 1978).

Aflatoksinlerin insan ve hayvanlarda çok sayıda ve değişik sağlık sorunlarına neden olması ve tarımsal ürünlerin değerini düşürerek ekonomik kayıplara yol açması bu konudaki araştırmaları yoğunlaştırmıştır.

Mikotoksinler arasında en önemli ve üzerinde en çok çalışılan aflatoksinlerdir. Aflatoksinler *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve çeşitli toksijenik *Aspergillus*

soyu ile bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* soyuna bağlı küfler tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir (Harvey ve ark., 1991; Steyn, 1998). Aflatoksinler, aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 olmak üzere başlıca altı ana bileşikten oluşurlar. Aflatoksin bileşikleri arasında en toksik ve en yaygın olanı ise aflatoksin B1'dir. Aflatoksin M1 ise aflatoksin B1'in karaciğerde metabolize olduktan sonra süt ile atılan türevidir (Applebaum ve ark., 1982; Rao ve Chopra, 2001).

Aflatoksin sorunu, insan sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmalarının yanı sıra, birçok ülke için ekonomik yönden de önem taşımaktadır. Aflatoksin oluşmuş gıdaları ihraç etmek mümkün olmamakta ve çoğu kez ürün imha edilmek zorunda kalınmakta veya denetim mekanizması yetersiz olan ülkelerde iç pazarda tüketime sunulmaktadır. Bu durum ya ağır ekonomik kayıplara yol açmakta ya da söz konusu ülkelerde insan sağlığı yönünden tehdit oluşturmaktadır. Yemlerde bulunan toksin de, hayvanlarda ölüme kadar giden çok çeşitli etkilerin yanı sıra verim düşüklüğüne yol açarak ekonomik sorunlara neden olabilmektedir (Özkaya, 2001). Ayrıca hayvanlara ait ürünlerin tüketilmesi de insanlarda sağlık sorunlarına yol açabilmektedir.

Bu çalışma, dört mevsim Karaman ilinde pazarlardan ve marketlerden toplanmış açıkta satılan fındık, fıstık, karabiber, kırmızıbiber, mısır, incir, kuru üzüm, ekmek ve peynirde aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'nin varlığı ve kontaminasyon düzeyini belirlemek için yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, küfler tarafından üretilen toksik metabolitler olup, canlılarda zararlı ve toksik etkiler meydana getiren maddelerdir. Mikotoksinlerle meydana gelen zehirlenmelere mikotoksikozis adı verilir (Vural 1984).

Mikotoksinli yemlerin tüketimi sonucu hayvanlarda akut ve kronik zehirlenme, verim kaybı, ağırlık artışında azalma ve immunosupresyona neden olur. Ayrıca mikotoksinler genotoksik etkilerinin yanı sıra, aflatoksin, okratoksin ve fumonisin gibi mikotoksinlerin çeşitli kanser tiplerinin oluşumunda rol oynaması ve bu hayvanlardan elde edilen besinler aracılığı ile insanlarda meydana getirecekleri sorunların boyutu nedeniyle halk sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir (Sonal ve Oruç, 2000; Kaya, 2001; Yiannikouris ve Jouany, 2002).

Küf sporları bitki, gıda ve yemlerin yanı sıra hava, su, toprak gibi yollarla da bulaşabilmekte, buralarda sporları üreyip gelişebilmekte ve gelişme fazının sonunda miselleri içinde mikotoksin sentezlenebilmektedirler. Mikotoksinli yemleri yiyen hayvanların et, süt, yumurta gibi ürünlerinin veya doğrudan mikotoksinli bitkinin insanlar tarafından tüketilmesi ile de insanlara mikotoksin bulaşması olmaktadır (Tunail, 2000; Whitlow ve Hagler, 2001; Mavus, 2003).

Gıda ve yemler çok çeşitli küflerin saldırısına hedef olmakla beraber, incelenen binlerce küf türünden büyük çoğunluğu mikotoksin oluşturmamaktadır. Mikotoksin üreten küf sayısının bugün yaklaşık olarak 350 civarında olduğu, bunlardan da sayıları 20-25 civarında olan bir kısmının doğada yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir. Mikotoksin üreticisi olarak en çok bilinen küfler *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türleridir (Gilbert ve Anklam, 2002; Whitlow ve Hagler, 2002; Yiannikouris ve Jouany, 2002).

İnsan ve hayvanlara toksik ve karsinogenik etkileri ile zarar veren mikotoksinlerle ilgili olarak yapılmış çalışmaların büyük bir kısmını aflatoksinler oluşturmaktadır. Aflatoksinlerle birlikte tahıllarda, tohum ve mısırdaki bulunan okratoksin A, trikotesenler, patulin ve fumonisin insan ve hayvan sağlığı açısından büyük problemler oluşturmaktadır (Sonal ve Oruç, 2000; Creppy, 2002; Gilbert ve Anklam, 2002; Whitlow ve Hagler, 2005).

Dünyadaki tarımsal ürünlerin yaklaşık % 25'i her yıl mikotoksinlerden farklı düzeylerde etkilenmekte, bu durum çiftlik hayvanları ve tahıl üreticileri ile işleyiciler ve tüketiciler için büyük ekonomik sorunlara neden olmaktadır. ABD ve Kanada'da yalnızca yemlerde ve çiftlik hayvanlarında

mikotoksinlerin neden olduğu yıllık kaybın 5 milyar \$ düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir (Smith, 2001).

Çiftlik hayvanlarının oldukça fazla miktarda tahıl ve yağlı tohumları tüketmeleri nedeniyle mikotoksinli yemlerin hayvan sağlığı ve üretkenliği üzerindeki olumsuz etkilerinin bildirildiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak insanlarda görülen mikotoksikozis tam olarak anlaşılmamakla birlikte son yıllarda teşhisi giderek artmakta ve konu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Smith, 2001; Richard, 2007).

Mikotoksinlerin gıda ve yemlerle alım miktarı ve süresi göz önüne alındığında, canlılarda çeşitli etkilerinin görülebileceği ve bu nedenle de en güvenli tolerans düzeyinin sıfır olması, yani alınan gıda ve yemlerde mikotoksin bulunmaması gerektiği kabul edilmektedir. Fakat gerçekte ise mikotoksinlerin gıda ve yemlerde yaygın bir şekilde doğal olarak bulunması nedeniyle sıfır olması imkânsız olarak görülmekte ve bu nedenle de bulunabilecek maksimum tolerans değerleri ölçüt olarak kullanılmaktadır (Sonal ve Oruç, 2000).

2.2. Mikotoksinler ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Küf bulaşısı, gelişimi ve mikotoksin üretimi çevre koşullarına (hava ve nem) bağlı olarak tarlada, hasat, işleme, depolama ve nakliye sırasında oluşabilmektedir. Isı ve yüksek nem içeriği küf gelişiminde ani artışlara neden olabilmektedir. Küfler, hasar görmüş tohumu istila ederek orada çoğalabilmekte ayrıca kuraklık veya başka çevresel stresler de bitkilerde küf ve böcek zararını teşvik edici etki göstermektedir (Omaye, 2004).

Küflerin ikincil metabolitleri olan mikotoksinler, insanlarda ve hayvanlarda akut ve kronik toksik (karsinogenite, mutajenite, teratojenite ve östrojenik) etkilere neden olabilmektedirler. Mikotoksin içeren ürünlerin, insanlar ve hayvanlar tarafından tüketilmesi “mikotoksikozis” olarak bilinen toksik sendrom ile sonuçlanmaktadır (Van Genderen, 1997).

Bilinen ilk mikotoksikozis, çavdar ve diğer tahıl tanelerinde üreyen *Claviceps purpurea*’nın salgıladığı ergot alkaloidinden kaynaklanan “Ergotizm” adı verilen mikotoksikozisdir. M.Ö. 600 yılında çavdar mahmuzu adı ile anılan *Claviceps purpurea* sklerotialarıyla bulaşmış tahılların zararlı etkilerinden Asur tabletlerinde söz edilmiştir. M.Ö. 400 yılında Sparta’da ilk toplu zehirlenmeye ilişkin kayıtlar bulunmuştur (Bakırcı, 1995; Yiannikouris ve Jouany, 2002; Kuhn ve Ghannoum, 2003).

Kutsal Ateş veya St. Anthony’s Fire, Aziz Antonius Humması olarak da bilinen Ergotizm, orta çağda Avrupa’da uzun yıllar boyunca görülmüştür. Avrupa’da binlerce insanın ölümüne neden olan bu hastalıkta, *Claviceps purpurea*’nın ürettiği çavdarların unundan yapılan ekmeği yiyen insanlar

hastalığa yakalanmıştır. Hastalıkta yüksek ateş, el, kol, ayak, bacaklar ile el ve ayak parmaklarında nekroz ve gangrenler belirti olarak görülmekte fakat hastalığın nedeni bilinmemektedir. Hastalığa *Claviceps purpurea*'nın toksini olan ergot alkaloidinin neden olduğu ise ancak 19. yüzyılda ortaya konulmuştur. Ergotizm 9. ile 18. yüzyıllar arasında sık görülmekle birlikte, 1925 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde, 1926-1927 yıllarında İngiltere'de, 1928 yılında Rusya'da ve en son olarak da 1978 yılında Etiyopya'da görülmüştür (Van Egmond, 1989; Bakırcı, 1995; Hopmans, 1997; Tunail, 2000; Ender, 2001; Gürses, 2002; Özmenteşe, 2002; Kuhn ve Ghannoum, 2003).

1928 yılında Almanya ve İskandinav ülkelerinde, daha sonra balkan ülkelerinden Yugoslavya, Bulgaristan ve Romanya'nın Tuna nehri kıyıları ile Güney Afrika, Tunus ve tropikal bölgelerde ağır böbrek rahatsızlığı tablosu ile seyreden bir hastalık görülmüş ve Balkan Endemik Nefropatisi (BEN) olarak adlandırılmıştır. Bu hastalığa neden olan bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin ürettiği okratoksin ise çok daha sonra tanımlanmıştır (Tunail, 2000; Ender, 2001; Özmenteşe, 2002).

Diğer bir mikotoksikozis olayı, Rusya'nın Orenburg bölgesinde ikinci dünya savaşı yıllarında (1942-1944) görülmüştür. *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* türleri ve özellikle de *Fusarium graminearum*'la bulaşık tahıllardan (buğday, darı, çavdar) yapılan ekmeklerin yenmesi sonucu meydana gelen hastalık "Alimenter Toxic Aleucia (ATA)" olarak adlandırılmıştır. Savaş nedeniyle hasat yapılamadığı için kışı kar altında geçiren tahılları yiyen evcil hayvanlar ve insanlarda hastalık meydana gelmiştir. Bu olayda hastalığın çıktığı bölgelerde halkın ortalama %10'u hatta bazı bölgelerde ise %60'a yakın bir kısmı hastalıktan etkilenmiş ve binlerce insan ölmüştür. Hastalanan kişilerde deride nekroz, hemoraji, kemik iliği harabiyeti ve lökopeni görülmüştür. Günümüzde ise bu hastalıkta *Fusarium graminearum*'un T-2 toksininin yanında trikotesenlerin de ölümde rol oynadığı bilinmektedir (Tunail, 2000; Ender, 2001; Özmenteşe, 2002; Mavus, 2003).

Japonya'da pirinç tüketimi ile meydana gelen bir hastalık 1890 yılından beri Japon patoloji uzmanları tarafından bilinmekteydi. İkinci dünya savaşı yıllarında da Japonya'da "Sarı Pirinç Hastalığı" olarak isimlendirilen, evcil hayvanların pirinç yemeleri sonucu hastalanmaları ve karaciğer harabiyeti ile sonuçlanan hastalıkta etken saptanamamıştır. Sarı pirinçlerde görülen bu toksisite olayının aydınlanması 1960'lı yıllarda olmuştur. Günümüzde ise artık, sarı pirinçlerde *Penicillium citreoviridae*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium islandicum* ve *Penicillium rugulosum* türleri ile bunların oluşturdukları luteosikrin, sitrinin ve sitreoviridin gibi mikotoksinlerin hastalığa neden oldukları bilinmektedir (Tunail, 2000; Ender, 2001; Özmenteşe, 2002).

1960 yılında İngiltere’de 100.000’den fazla hindi palazının ölümüne, Amerika Birleşik Devletleri’nde de 1.000.000 genç alabalığın (Forelle) ölümüne neden olan bir hastalık olayının araştırma sonuçları, olayın bir mikotoksikozis olduğunu göstermiş ve hastalığa “Turkey X Disease” ya da “Hindi X Hastalığı” adı verilmiştir. Yapılan araştırmada, İngiltere’ye Brezilya’dan getirilen, küflenmiş yer fıstığı küspelerinin katıldığı yemlerin hindiler tarafından yenmesi ile meydana gelen hastalığa; *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından salgılanan toksinlerin neden olduğu ortaya çıkmıştır. Bu olaya kadar meydana gelen mikotoksikozis vakaları çok önemsenmemiş ve sıradan hastalıklar olarak görülmüştür. Fakat çok sayıda ölümüne neden olan Hindi X Hastalığı ile mikotoksine ve özellikle de aflatoksinlere karşı büyük bir ilgi ve merak oluşmuş, araştırmalar bu yönde yoğunlaşmıştır. 1960 yılında meydana gelen bu vaka mikotoksikozis olayları için tam bir dönüm noktası olmuştur. Aslında 1910 yılında bir araştırmacının küflenmiş Brezilya cevizinden *Aspergillus flavus*’u izole ettiğini ve bunun toksisiteye neden olduğunu bildirdiği halde bunun üzerinde çok fazla durulmadığı, 1980 yılında yapılan bir çalışma ile bu konunun doğrulandığı bildirilmektedir (Stoloff, 1980; Bakırcı, 1995; Hopmans, 1997; Kardeş, 2000; Akdemir, 2001; Ender, 2001; Whitlow ve Hagler, 2001; Gürses, 2002; Özmentеше, 2002; Mavus, 2003; Agag, 2004).

Ülkemiz tarihinde ise aflatoksin sorunu ilk olarak, 1967 yılında Kanada’ya ihraç edilen fındık içlerinden on tonluk bir miktarının geri gönderilmesi ile başlamıştır. 1972 ve 1974 yıllarında Amerika Birleşik Devletlerine ihraç edilen Antep Fıstıkları aflatoksin içermeleri nedeniyle geri gönderilmiştir. Kuru incir ihracatımızda, 1972 yılında Danimarka ile 1973 ve 1974 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri ile sorunlar yaşanmış, 1986, 1987 ve 1988 yıllarına gelindiğinde ise tüm ihracatın alıcılar tarafından durdurulması ile karşılaşmıştır. 1995 yılı sonlarında Almanya ve İsviçre’ye ihraç edilen kırmızıbiberlerimizin bakkal ve marketlerden alınan örneklerinde aflatoksin tespit edildiği bildirilmiş fakat ürünler geri gönderilmemiştir (Ender, 2001; Özmentеше, 2002).

2.3. Mikotoksinlerin Sağlık Üzerine Etkisi

Mikotoksinler, gıda güvenliğinin sağlanması açısından kontrol altına alınması gereken önemli sorunlardan biridir (Oruç, 2005). Mikotoksinler çeşitli bitkisel ve hayvansal orjinli gıdalarda yaygın olarak bulunmakta ve bitkisel ürünlerde hasat öncesinde olduğu gibi hasat sonrasında da oluşabilmektedir (Karagözlü ve Karapınar, 2000).

İnsan sağlığı açısından önemli olan fındık, antep fıstığı, kuru incir, siyah zeytin, kırmızı toz ve pul biber gibi ihraç ürünlerinin yanında, başta mısır olmak üzere diğer tahıl ürünleri mikotoksinlerle kontamine ola-

bilmektedir (Oruç, 2005). Süt ve süt ürünleri, et, yumurta gibi hayvansal ürünlerdeki mikotoksin varlığının ise çoğunlukla mikotoksin oluşmuş hayvan yemlerinin tüketilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Kara-gözlü ve Karapınar, 2000).

İnsanlar ve hayvanlar mikotoksinleri direk olarak, kontamine olmuş gıda ve yem maddelerini tüketerek alırlar. Ayrıca kontamine yemle beslenen hayvanların, yumurta ve süt gibi ürünlerine de bu toksinlerin geçmesi nedeniyle, mikotoksinler insanlara dolaylı olarak da ulaşabilmektedir (Anonim, 2007c).

Mikotoksinlerle zehirlenme genellikle kronik nitelikte olurken, akut nitelikte de olabilmekte ve çok ciddi sonuçlarla karşılaşılabilir. Örneğin Kenya'da 2004 yılı nisan ve haziran ayları arasında, temel besin maddesi olarak kullanılan mısır ve mısır ürünlerini yiyen insanlarda ortaya çıkan aflatoksikozis olayında, 317 zehirlenme olmuş ve bunlardan 125'i ölümle sonuçlanmıştır. Bu olayda tespit edilen aflatoksin miktarının mısırdaki 48.000 µg/kg'a ulaştığı bildirilmektedir (Oruç, 2005).

Mikotoksinin toksisitesi özellikle konu olan mikotoksinin molekül özelliğine, maruz kalma sıklığına ve absorbe edilen miktarına bağlıdır (Quillien, 2002). Yüksek dozda mikotoksin alındığında, akut toksik etki meydana gelmekte ve gıda veya yemin tüketilmesinin ardından kısa sürede ölüm görülebilmektedir. Bazı mikotoksinler ölümden önce çok az belirgin semptomlar gösterirler. Bir kısmı ise deri nekrozları, lökopeni (kanda lökosit sayısının azalması) ve immunosupresif (bağışıklık sisteminin baskılanması) etkiler ile belirginleşirler ve ağır hastalıklara neden olurlar (Anonim, 2006).

Daha az dozların uzun süre alınmaları sonucunda kronik hastalıklar görülür. Bunlar; özellikle karaciğer, böbrek gibi organlarda hastalıklar, dejenerasyonlar, bağışıklık sisteminde bozukluklar, kusurlu ve eksik organ oluşumları, deri nekrozları, üremede azalma ve kilo kaybı gibi bozukluklardır. Akut toksik etkiye bireyin duyarlılığı, genetik ve fizyolojik özellikleri ve çevresel faktörler etkindir (Anonim, 2006).

Mikotoksinler içinde yüksek organizmalara en etkili olanlar; aflatoksinler, trikotesenler, fumonisinler ve okratoksin A'dır (Anonim, 2006).

Mikotoksinlerin çeşitli biyolojik etkileri onların reaksiyonca aktif kimyasal yapılarından ileri gelir. Küçük moleküllü bu bileşikler metabolizmada önemli işlevleri olan çok sayıdaki molekülün reseptörleri olarak davranırlar. DNA, RNA, fonksiyonel proteinler, enzim kofaktörleri, membrandaki kimyasal yapılar ile reaksiyona girerler, hormon aktivitelerine etkili olurlar, biyosentez yollarını ve enerji üretimini inhibe ederler. Örneğin difuran kumarin derivatı olan aflatoksin B1 (AFB1)'in kabul edilen etkimekanizması,

toksin molekülünün DNA'ya bağlanarak RNA-polimeraz enziminin çalışmasını inhibe ettiği şeklindedir. m-RNA sentezinin yapılamaması, protein sentezinin gerçekleşmesini engeller. Hepatotoksik ve kanserojen olan AF-B1'in karaciğer kanserine neden olması molekülün nükleik asitlere etkisinin sonucu olarak görülmektedir (Anonim, 2006). Sonuç olarak mikotoksinler insanlarda; karaciğer kanserine ve gen yapısında değişikliklere yol açar, vücudun hormonal dengesini bozar, vücudun koruyucu (bağışıklık) sistemini zayıflatır, kısırlığa ve sakat doğumlara neden olur, gıda emilimini azaltır ve kemikleri zayıflatır, vücut direncini düşürerek vücudu hastalıklara açık hale getirir (Anonim, 2007c).

Doğal kirletici olarak besin ve yemlerde bulunabilen, insan ve hayvan sağlığı yönünden önem taşıyan mikotoksinler, kaynakları, hedef organ ve dokularda oluşturdukları etkiler ile etkilenen canlılar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Mikotoksin çeşitleri, kaynakları, hedef organ, doku, oluşan etki ve etkilenen canlılar (Kaya, 2001)

Mantar çeşidi	Mikotoksinler	Kaynaklar	Hedef organ, doku ve oluşan etki	Etkilenen canlılar
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>P. puberulum</i>	Aflatoksinler	Tahıllar, yemler, yağlı tohum küspeleri	Karaciğer; gelişme hızı ve verimde azalma; sarılık, kanama, sürgün, karaciğer kanseri, bağışıklık sisteminin baskılanması	Tüm hayvan türleri ve insanlar
<i>A. ochraceus</i> <i>P. viridicatum</i>	Okratoksinler	Tahıllar, otlar	Karaciğer ve böbrek hasarı, iştah kaybı, sürgün, bağışıklık sisteminin baskılanması	Kanatlılar ve insanlar
<i>P. rubrum</i>	Rubratoksinler	Tahıllar, baklagiller, yağlı tohumlar	Aflatoksinlere benzer etki gösterirler	Tüm hayvan türleri
<i>F. roseum</i> ve diğer <i>Fusarium</i> türleri	Zearelonon	Tahıllar	Östrojenik etki	Gevişenler ve domuzlar
<i>P. citrinum</i>	Sitrinin	Tahıllar	Sinirsel belirtiler, sürgün, gelişme geriliği, karaciğer ve böbrek nekrozu, kalp ve iskelet kasında miyopati, karaciğer kanseri	Kanatlılar ve domuzlarda
<i>A. versicolor</i> <i>A. nidulans</i>	Aspertoksin Sterigmatosistin	Tahıllar, pirinç, yemler	Karaciğer kanseri	Tüm hayvan türleri
<i>A. clavatus</i> <i>P. patulum</i>	Patulin	Silaj, elma, yemler	Sinirsel belirtiler, beyin kanaması, deri kanseri	Sığırlar
<i>A. ochraceus</i> <i>P. puberulum</i>	Penisillik asit	Tahıllar, mısır	Deri kanseri, kanamalar	Tüm hayvan türleri
<i>Fusarium</i> , <i>Trikoderma</i> , <i>Sefalosporium</i> vb.	Trikotesenler	Tahıllar, yemler	Dermatit, deride nekroz, kanamalar, anemi, granülositopeni vb.	Tüm hayvan türleri
<i>P. citreoviridae</i>	Streoviridin	Pirinç, tahıllar	MSS, kalp ve solunum felci, çırpınmalar	Tüm hayvan türleri
<i>F. tricinctum</i>	Butenolid	Mısır, ot, tahıllar	Bacaklarda gangren, kuyrukta nekroz	Sığırlar
<i>P. islandicum</i> <i>P. rugulosum</i>	Luteoskirin Sikloklorotin Rugulosin	Pirinç	Karaciğer hasarı ve kanseri	Kanatlılar
<i>S. bakeri</i>	Sporidesminler	Tahıllar, ot	Karaciğer hasarı, safra kanalı tıkanması, ışığa aşırı duyarlılık	Gevişenler
<i>Penicillium</i> türleri	Penitremler	Tahıllar	Kas titremeleri, felç, çırpınmalar	Tüm hayvan türleri

Çizelge 2.1. (devam) Mikotoksin çeşitleri, kaynakları, hedef organ, doku, oluşan etki ve etkilenen canlılar (Kaya, 2001)

<i>Acremonium loliae</i>	Lolitremler	Çavdar vb.	Tremorlar, hareket düzensizlikleri, çırpınmalar, şok, spazm	Gevişenler, at
<i>Fusarium türleri</i>	Fuminosinler	Mısır	Beyin ve akciğer yangısı	At, domuz, kanatlılar
<i>Fusarium solanii</i>	4-ipomeanol	Küflü tatlı patates	Akciğer ödemi, pnömoni, amfizem	Sığır
<i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i>	Kojik asit	Mısır	Çırpınmalar, ödem	Tüm hayvan türleri
<i>A. niger</i> <i>A. oxalicum</i>	Okzalik asit	Bitkiler	Mide irkiltisi, MSS ve böbrek hasarı, kanama, kan kalsiyum düzeyinde azalma	Tüm hayvan türleri
<i>C. purpurea</i> <i>C. paspali</i>	Ergot alkaloidler	Tahıllar	Kuru gangren, aşırı uyarı, kanın pıhtılaşması	Tüm hayvan türleri
<i>Stachybotrys atra</i>	Satratoxinler	Tahıllar, otlar	Kemik iliği, deri, mukozalar	Tüm hayvan türleri
<i>Aspergillus</i> , <i>Zygosporium</i> , <i>Nigrosabulum vb.</i>	Sitakalasanlar		Hücre zarları, pıhtılaşma, fagositoz vb	Tüm hayvan türleri
<i>A. terreus</i>	Territremler	Tahıllar, otlar	MSS, tremorlar, nöro-muskuler kavşaklar	Tüm hayvan türleri
<i>S. sclerotiorum</i>	Psoralenler	Kereviz vb.	Deri yangısı	Tüm hayvan türleri

2.4. Mikotoksin Oluşum Şartları

Küflerin önemli bir kısmı yem ve besin maddelerinde saprofit olarak bulunup, bitki veya hayvan hücrelerinin yüzeyi veya içinde yaşarlar ve lifli-tozlu bir görüntü verirler. Bu olaya yem veya besinlerde “küflenme” denilmektedir (Kaya, 2001; Whitlow ve Hagler, 2005). Küflenme olayının meydana gelmesi için öncelikli şart küf sporunun bulunmasıdır. Sporlar doğada hava ve su ile kolay bir şekilde yayılarak bulaşmaya neden olurlar. Gelişmelerine uygun şartları bulduklarında çoğalarak yem ve besinleri küflendirirler. Gelişmelerine uygun şartlar yok ise yıllarca spor formunda kalabilirler. Yani küfler tarafından her zaman ve her ortamda mikotoksin sentezi yapılamaz. Mikotoksin sentezi için o küfe ait şartların oluşması gerekir (Tunail, 2000; Kaya, 2001; Whitlow ve Hagler, 2005). Küçük molekül yapısına sahip mikotoksinlerin, bunları üretme yeteneğinde olan küfler tarafından her zaman, her koşulda üretilebileceklerini düşünmek yanlıştır. Mikotoksin sentezi için özel koşulların oluşması gerekir (Anonim, 2006).

Her ürünün yapısına, bileşimine, içerdiği nem oranına, bulunduğu ortam koşullarına göre ürünün üzerinde gelişen küf cinsleri, türleri, oranları, oluşturdıkları mikotoksin çeşitleri ve miktarları değişmektedir. Besin ve yemlerin küflenmesine neden olan küfleri bulaşma kaynaklarına göre üç gruba ayırabiliriz. Birincisi, bitkinin tarlada büyümesi aşamasında bitki paraziti olarak yaşayan ve uygun ortamlarda üreyen *Fusarium*, *Cladosporium*,

Helmintosporium, *Claviceps* ve *Pullaria* gibi küflerdir. İkincisi, hasat işlemi esnasında tahıllara bulaşan ve tarla ortamına göre daha düşük sıcaklık ve nispi rutubet şartlarına sahip olan ambar ortamına alışan *Aspergillus* ve *Penicillium* türleridir. Üçüncüsü ise depo şartlarında iyi gelişen *Fusarium*, *Sardaria*, *Populaspora*, *Trichoderma* ve *Stachybothria* gibi küflerdir (Kaya, 2001; Whitlow ve Hagler, 2001; Yiannikouris ve Jouany, 2002).

Küflerin üremelerini ve mikotoksin sentezlemelerini genel olarak etkileyen başlıca faktörler; rutubetin etkisi, sıcaklığın etkisi, pH'nın etkisi, oksijen ve karbondioksitin etkisi, gıda maddesinin yapısının etkisi, sürenin etkisi ve diğer faktörler olarak adlandırılabilir.

2.4.1. Rutubet Etkisi

Küflerin gıda ve besin maddelerinde gelişebilmelerinde ortamın ve besin maddesinin rutubetinin büyük etkisi vardır. Ortamın relatif rutubet oranı arttıkça küflerin üremeleri ve toksin üretmeleri kolaylaşır, ortamın ve gıdanın rutubet oranı azaldıkça zorlaşır. Dolayısı ile gıdaların rutubet oranları ayarlanarak küf üremesi ve toksin sentezinin önüne geçilmiş olur (Tunail, 2000; Zettler ve Navarro, 2001; Gürses, 2004).

Atmosferin veya gıda maddesinin bulunduğu ortamın rutubeti ile gıdanın su aktivitesi değeri arasında sıkı bir ilişki vardır. Ortamın rutubeti arttıkça gıdanın da içerdiği rutubet ve su aktivitesi değeri artar (Tunail, 2000; Gürses, 2004).

Küfler, türüne göre değişmekle birlikte, genel olarak ortamın rutubetinin %50 - 60'ın üzerine çıktığı, gıdanın rutubetinin %9'un üzerine, su aktivitesi değerinin de 0,70'in üzerine çıktığı şartlarda kolayca ürer ve mikotoksin sentezleyebilirler (Whitlow ve Hagler, 2002; Yaroğlu, 2002).

2.4.2. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklık, küflerin üremesi ve gelişmesinin yanı sıra mikotoksin sentezlemelerine ve sentezlenen mikotoksinlerin türü üzerine de etkilidir. Küflerin üremeleri geniş sıcaklık aralıklarında olabilir, fakat her küf türünün optimum üreme sıcaklığı farklılık gösterir. Küflerin en yüksek miktarda mikotoksin sentezlemeleri ise o küf türünün optimum üreme sıcaklığında veya bu sıcaklık değerinin biraz altında olmaktadır (Tunail, 2000; Kaya, 2001; Agag, 2004).

Küfler, 10-40 °C arasında üreyebilmekle birlikte, optimum üreme sıcaklığı 20-30 °C arasındadır (Whitlow ve Hagler, 2001). Aflatoksin sentezleyen *Aspergillus*'lar 10-45 °C arası sıcaklıklarda ürerken, 13-42 °C arası sıcaklıklarda toksin sentezlerler. Optimum üreme sıcaklık dereceleri 35-38 °C olup, en yüksek toksin sentezini ise 25-30 °C arası sıcaklıklarda gerçek-

leştirirler (Roy ve Chourasia, 1989; Zettler ve Navarro, 2001; Whitlow ve Hagler, 2002; Agag, 2004).

Gıda ve yemlerde küf gelişmesinin engellenmesi bakımından gıda ve yemlerin depolanmasında depo sıcaklığının 10-15 °C arasında olduğu ve ürün rutubetinin %13,5'in altında olduğu şartlar tavsiye edilmektedir. Depo sıcaklığının daha aşağı derecelere çekilebilme imkanı var ise ürünün rutubetinin biraz daha yüksek olmasında sakınca yoktur (Roy ve Chourasia, 1989; Tunail, 2000; Özmenteşe, 2002).

2.4.3. pH Etkisi

Küfler, pH 1.5-11 gibi geniş bir aralıkta üreyebilmelerine karşın, pH 5-6 arasında optimum üremelerini gerçekleştirmekte ve özellikle de asidik ortamlarda daha iyi üreme göstermektedirler. *Aspergillus* türleri pH 2.5-6 arasında olan asidik ortamlarda toksin sentezleyebilmelerine karşın, maksimum pH 5'tir (Whitlow ve Hagler, 2002; Ehrlich ve ark., 2005).

2.4.4. Oksijen Etkisi

Küfler, üremeleri ve toksin sentezleyebilmeleri için oksijene ihtiyaç duymaları nedeni ile aerobik organizmalardır (Whitlow ve Hagler, 2002). Ortamdaki oksijen miktarının azaltılması veya karbondioksit miktarının arttırılması küflerin gelişmelerini ve toksin sentezlemelerini olumsuz yönde etkiler. Ortamın oksijen yoğunluğunun % 45'den % 1'e düşürülmesi veya karbondioksit yoğunluğunun % 10'dan daha yukarı çıkartılması *Aspergillus flavus*'un üremesini ve aflatoksin sentezini önemli seviyede azaltır. Ortamın karbondioksit yoğunluğu % 20'nin üzerine çıkarıldığında küflerin üremesi ve toksin sentezleri önemli ölçüde etkilenir. Oksijen ve karbondioksinin küfler üzerindeki bu etkilerinden dolayı gıda ve yemlerin depolanmalarında önem arz edebilirler (Tunail, 2000; Kaya, 2001; Zettler ve Navarro, 2001; Yaroğlu, 2002).

2.4.5. Gıda Maddesinin Yapı Etkisi

Gıda ve yemlerin yapısı ve bileşimleri küflerin üremesi ve mikotoksin sentezini etkileyen faktörlerdendir. Karbonhidrat ve yağ bakımından zengin gıda ve yem maddeleri küflerin üreyip toksin sentezleyebilmeleri için uygun ortamlardır. Özellikle mısır, buğday, arpa, yulaf, pirinç gibi ürünler ile yer fıstığı, fındık, ayçiçeği, soya fasulyesi, pamuk tohumu gibi yağlı ürünlerde küfler sıklıkla üremekte ve mikotoksin sentezlemektedirler. Bu ürünlerde sıklıkla aflatoksin oluşumuna rastlanılmaktadır (Kaya, 2001; Yaroğlu, 2002; Kuhn ve Ghannoum, 2003; Agag, 2004).

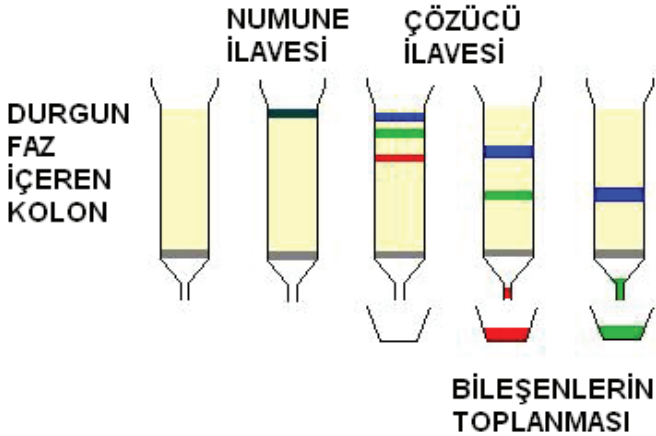
2.4.6. Süre Etkisi

Depolama süresinin uzunluğu üreme ve mikotoksin sentezinin artmasına neden olmaktadır. Küf sporları ile bulaşık bir üründe başta sıcaklık ve rutubet olmak üzere şartların uygun olması halinde 2-4 gün arasında küfler üremekte ve sağlığı tehdit eden miktarlarda mikotoksin sentezleyebilmektedirler (Kaya, 2001; Yaroğlu, 2002).

Küflerin üremesi ve mikotoksin sentezine etki eden diğer faktörler olarak, tarlada yetişen ürünlerin zamanında hasat edilmemesi, iklim şartlarının yağışlı ve rutubetli olması, depolardaki gıdaların az miktarda ışık alması, havalandırmasının yetersiz olması gibi şartların etkileri ile küflerin üremeleri ve mikotoksin sentezleme oranları değişebilmektedir (Kaya, 2001; Yaroğlu, 2002; Yiannikouris ve Jouany, 2002).

2.5. Mikotoksinlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

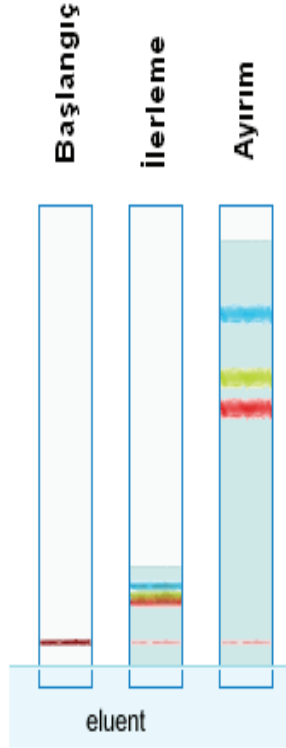
Kromatografi: Gaz, sıvı veya süper kritik akışkan haldeki hareketli bir fazda bulunan karışımdaki bileşenlerin, durgun fazda geçme hızlarına bağlı olarak ayrıldıkları bir tekniktir. Kromatografik ayırmalar biri sabit öteki hareketli olan iki faz arasında gerçekleşir. Numune gaz, sıvı veya süper kritik akışkan olan hareketli faz ile taşınır. Hareketli faz, kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Kromatografik ayırmaların gösterilişi Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Kromatografik ayırmaların gösterilişi

Hareketli fazda bulunan numune bileşenleri, durgun fazdaki hareket hızlarının farklılığı sonucu ayrılır. Hareketli sıvı faz olarak, su, bütanol, metanol ve asetonitril, organik çözücüler ve bunların karışımları olabilir. Hareketli gaz faz olarak, helyum, azot, gibi inert gazlar kullanılabilir. Süper kritik akışkan CO_2 , NH_3 , N_2O gibi maddeler olabilir. Sabit faz olarak, Silika Jel (% 80), Alümina (% 90), Kömür, CaCO_3 , MgCO_3 gibi maddeler kullanılabilir.

Kromotografik ayırmaların gösterilişi Şekil 2.2 ve 2.3'de verilmiştir.



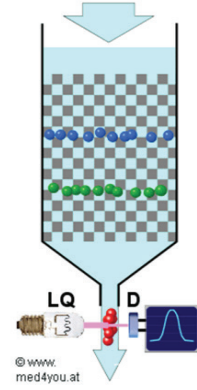
Şekil 2.2. Kromotografik ayırmaların gösterilişi

2.5.1. Kromatografideki Bazı Terimler

ELÜANT (Elüent): Kolona katılan hareketli faz

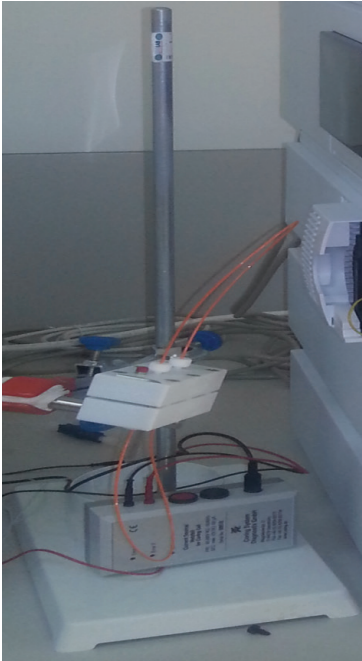
ELÜSYON; Hareketli fazın ilerlemesiyle çözünen maddelerin durgun faz üzerinden yıkayarak taşınmalarına denir

KROMATOGRAM: Zaman-sinyal grafiği.



Şekil 2.3. Kromatografik ayırmaların gösterilişi

HPLC ve Coring Cell cihazlarının görüntüleri, çalışma şemaları ve örnek kromatogram Şekil 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 ve 2.8’de verilmiştir.



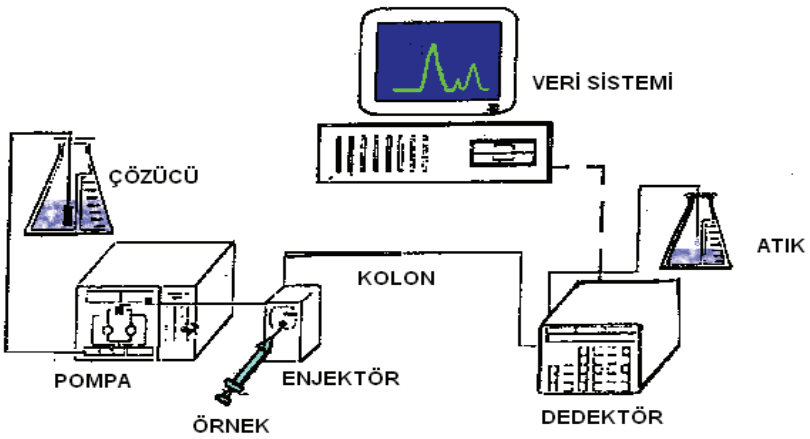
Şekil 2.4. Coring Cell cihazı



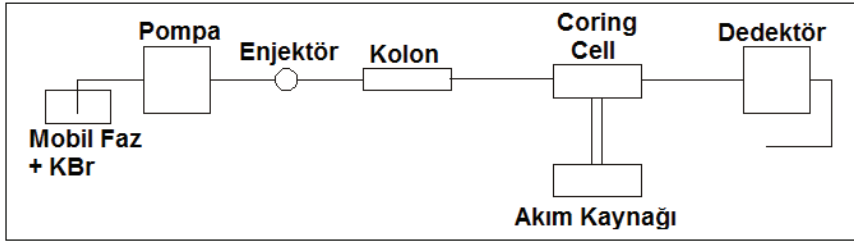
Şekil 2.5. HPLC cihazı



Şekil 2.6. HPLC ve coring cell cihazları



Şekil 2.7. HPLC cihazının gösterilişi



Şekil 2.8. HPLC cihazında coring cell'in yeri

HPLC'nin kullanılmasındaki en önemli sebepler;

- Duyarlıdır.
- Doğruluğu yüksektir.
- Uygulanması kolaydır.
- Hızlı sonuç alınır.
- Değişik bilim dallarına uygulanabilir.
- Birçok maddenin tayinine olanak sağlar.

şeklinde sıralanabilir.

Mikotoksinlerin analizinde, ince tabaka kromatografisi (TLC), Yüksekbasıncılı sıvı kromatografisi (HPLC), Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), Enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (ELISA) ve enzimaktivitesine bağlı immunoteknik (Enzyme Multiplied Immuno-technique/EMIT) gibi yöntemler uzun zamandır kullanılmaktadır. Ancak bunların dışında Flouresans Polarization Immunoassay (FPIA) yöntemi ile de mikotoksinlerin ölçümünde olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir (Oruç, 2005).

Kromatografik teknikler arasında en yaygın kullanım alanı bulan HPLC tekniği, katı sabit bir faz (kolon) ile hareketli bir sıvı faz (mobil faz) arasında, bileşenlerin çeşitli yöntemlere göre ayrımının gerçekleştirildiği bir tekniktir. Kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi gibi klasik ayırma teknikleri ile kıyaslandığında, HPLC'nin birçok avantajı bulunmaktadır (Cemeroğlu, 2007). HPLC'de hareketli faz sıvı (asetonitril, metanol, etanol, tetrahidrofuran, etil asetat, su gibi solventler) ve sabit faz çok küçük katı parçacıklardan (kolonun dolgu maddeleri olan silisyum dioksit, alüminyum oksit, gözenekli polimer ve iyon değiştirici reçineler gibi) oluşmaktadır. HPLC ile mikotoksin analizinde bilinmesi gereken en önemli faktörlerden biri, hangi mikotoksinin hangi dedektörle aranacağını bilmesidir. Örneğin aflatoksinler (AFM1 dâhil), fumonisinler ve

OTA analizlerinde floresans dedektör; trikotesenlerin analizinde UV veya DAD dedektörü kullanılmalıdır. Ayrıca kütle dedektörü (MS/Mass Spectrometer) ile de LC-MS veya LC-MS/MS sistemi şeklinde mikotoksin analizi yapılmaktadır. Aflatoksin, fumonisin, okratoksin analizinde temelde C-18 kolonları ve mikotoksinlerin ekstraksiyon aşamasında toksinlerin daha konsantre ve saf olarak elde edilebilmesi için genellikle İmmüno Affinite Kolonları (IAK) kullanılmalıdır. HPLC mikotoksin analizlerinde en fazla kullanılan analiz yöntemlerinden biridir (Oruç, 2005). Analiz süresindeki muhtemel kayıplar, bir geri kazanım (recovery) testi yürütülerek belirlenebilir. % 90 ve üzerinde elde edilen geri kazanım değerleri, bileşenin tüm analiz sürecindeki kayıplarının minimum düzeyde olduğunun bir göstergesidir (Cemeroğlu, 2007).

Mikotoksinlerin analizinde GC (Gas Chromatography)'ye MS (Mass Spectrometry) dedektörü bağlanarak mikotoksinler atomlarına kadar parçalanabilmekte ve böylece ölçümleri yapılabilmektedir. Ancak mikotoksinlerin analizi GC/MS ile yapılabilmekle birlikte diğer sistemler daha pratik olduğundan GC/MS pek tercih edilmemektedir (Oruç, 2005).

Günümüz yöntemlerinden biri olan mikotoksin analizlerinde en sık kullanılan ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) tekniğinde genellikle katı yüzeylere bağlanmış az miktarda antikor (antibadi) ile örneklerde bulunan toksin ve toksin ile işaretlenmiş enzimlerin bağlanma mücadelesi temel alınmaktadır. Yapılan yıkama sonrası bağlanmamış enzimler ayrılacakta, kullanılan belirli substrat ile meydana gelen renkli maddenin miktarına dayanarak toksin miktarının hesaplanması sağlanmaktadır (Oruç, 2005).

2.6. Aflatoksinler

Gıda maddeleri içinde yer fıstığı, fındık, Antep fıstığı, çam fıstığı, badem, ceviz, ayçiçeği gibi yağlı tohumlarda ve bunların ürünleri olan fıstık ezmesi, fındık ezmesi, badem ezmesinde, mısır, pirinç, buğday, arpa, çavdar, yulaf gibi tahıllarda ve bu tahılların ürünlerinde, kırmızı toz biber, pul biber, karabiber, nane, kimyon gibi baharatlarda, mercimek, nohut, fasulye gibi bakliyatlarda, kurutulmuş meyvelerden incirde, süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, yumurta gibi hayvansal ürünlerde aflatoksinler bulunabilmektedirler (Tunail, 2000; Özmentese, 2002; Yiannikouris ve Jouany, 2002; Agag, 2004). Aflatoksin madde içeren bazı gıda maddelerinin resimleri Şekil 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15, 2.16 ve 2.17'de verilmiştir.



Şekil 2.9. Fıstık



Şekil 2.10. Kırmızı biber



Şekil 2.11. Ekmek



Şekil 2.12. Kuru üzüm



Şekil 2.13. Karabiber



Şekil 2.14. Küflü peynir



Şekil 2.15. Fındık



Şekil 2.16. Mısır



Şekil 2.17. İncir

Aflatoksinler, en toksik mikotoksinler arasında yer almakta olup en önemli üreticileri *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*' tur (Bennet ve Papa, 1988). Aflatoksijenik küfler, yer fıstığı, baharatlar ve incir gibi birçok gıda ürününde bulunabilmektedir (Farber ve ark., 1997).

Aflatoksin üreten küfler olan *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius*, birçok tahıl ürününde yetiştirilme, hasat ve depolanma aşamalarında ortamın ısı ve nemine bağlı olarak yerleşip üremeye ve toksik metabolitleri olan aflatoksinleri üretmeye devam ederler. Yemlerdeki aflatoksinin en önemli kaynakları mısır, yerfıstığı küspesi ve pamuk tohumu küspesi gibi yem hammaddeleridir (Oruç, 2005).

Aflatoksinlerden en sık karşılaşılan ve en yaygın olarak bilinenleri aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2'dir. Aflatoksin sentezleyen *Aspergillus* türlerinden *Aspergillus flavus* sadece aflatoksin B1 ve B2 üretirken, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* ise hem aflatoksin B1 ve B2, hem de aflatoksin G1 ve G2 üretebilme yeteneğine sahiptir. Bu gruptan en toksik ve en karsinojenik olanı aflatoksin B1'dir (Stubblefield ve Shannon, 1974; Van Egmond, 1989; Pittet, 1998; Creppy, 2002).

Aflatoksinler içerisinde gıda ve besinlerde en sık bulunanı, insan ve hayvanlarda oluşturdukları toksik ve karsinojenik etkiler bakımından en tehlikeli olarak kabul edileni aflatoksin B1'dir (Franco ve ark., 1998; Yiannikouris ve Jouany, 2002; Williams ve ark., 2004). İnsan ve hayvanlardaki toksik etkileri göz önüne alınarak bir sıralama yapmak gerekirse, B1>M1>G1>B2>M2>G2 şeklinde sıralayabiliriz, fakat her tür ve ırkta farklılıklar göstermektedir (Ender, 2001; Yaroğlu, 2002; Verma, 2004).

Aflatoksinlerin kimyasal yapılarının aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalarda bu maddelerin bifuran halkasına sahip heterosiklik bileşikler oldukları belirlenmiştir (Heatchcote, 1984). Aflatoksinlerin iki esas metabolitin B1 ($C_{17}H_{12}O_6$) ve G1 ($C_{17}H_{12}O_7$) olduğu bildirilmekte (Şahin, 2003) ve kimyasal yapılarına göre iki ana grupta toplanabilecekleri belirtilmektedir. Birincil gruptaki bileşikler difurankumarin siklopentanon yapısında olup, bu grup içinde B1, B2, B2a, M1, M2, M2a ve Aflatoksikol bulunmaktadır. İkinci gruptaki bileşikler difuranokumarin lakton yapısında olup bu grup ise G1, G2, G2a, GM1, GM2, GM2a, B3 komponentlerini içermektedir. Bu komponentler içinde de B1, B2, G1, G2' ye gıdalarda daha sık rastlanmaktadır ve bunlar toksijenik suşlar tarafından doğrudan sentezlenmektedir (Heatchcote, 1984). B1 ve B2'nin süt ve süt ürünlerindeki kısa formları olan M1 ve M2 ise (Heatchcote, 1984), ruminantların aflatoksin ile kontamine olmuş yemlerle beslenmesi sonucu üretilmekte (Quillien, 2002) ve hayvanların süt, idrar ve dışkılarında bulunmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Aflatoksinler 200-250 °C gibi yüksek ısılara dayanıklıdır. Aseton, asetonitril, etanol, benzol, kloroform gibi birçok organik çözücüde çözünmek-

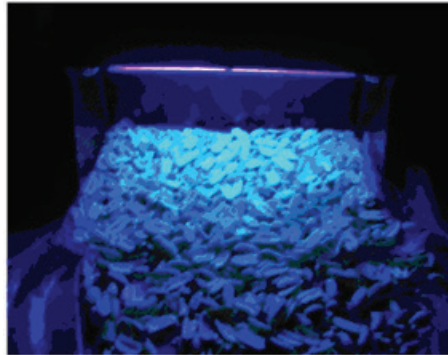
le beraber, su içinde sınırlı, hekzan, izooktan, eter ve petroleterde ise çözülmeyenler. Bulaşık gıdalarla alınan aflatoksinler sindirim kanalından emilimi takiben çoğunlukla serum albuminlerine bağlanımı olarak tanınırlar (Kaya, 2001; Seyrek, 2001; Creppy, 2002).

Aflatoksinler, ultraviyole ışık altında verdikleri renge göre ayrılmışlar ve mavi ışık veren ilk tür B₁ ve B₂ olarak, yeşil ışık verenler ise G₁ ve G₂ olarak adlandırılmıştır. B₂ ve G₂, B₁ ve G₁'in dehidro türevleridir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). Aflatoksinlerin kapalı formülleri, molekül ağırlıkları, erime noktaları ve ultraviyole ışığında verdikleri renkler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Aflatoksinlerin kapalı formülleri, molekül ağırlıkları, erime noktaları ve ultraviyole ışığında verdikleri renkler (Johnson ve Peterson, 1974; Jay, 1992)

Aflatoksin	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Erime Noktası	RENK
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	Mavi
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	Mavi
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244 -246	Yeşil
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	Yeşil-Mavi
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	Mavi-Menekşe
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	Menekşe

Ultraviyole ışık altında flaşlı ve flaşsız çekimde yer fıstığındaki aflatoksinin görünümü Şekil 2.18 ve Şekil 2.19'da verilmiştir.

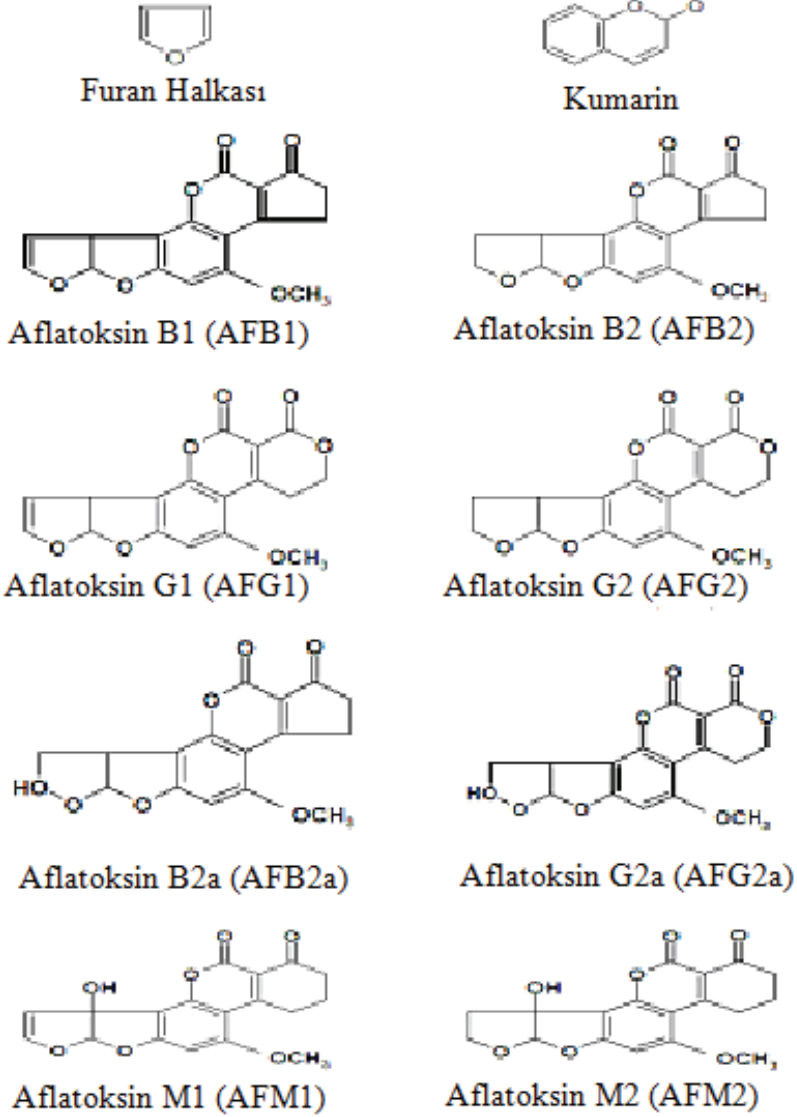


Şekil 2.18. Ultraviyole ışık altında flaşlı çekimde yer fıstığındaki aflatoksinin görünümü



Şekil 2.19. *Ultraviyole ışık altında flaşsız çekimde yer fıstığındaki aflatoksinin görünümü*

Aflatoksinlerin kimyasal yapıları Şekil 2.20’de gösterilmiştir.



Şekil 2.20. Aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Banwart, 1989)

Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerinin ortaya çıkması sonucunda bu konuyla ilgili kuruluşların etkili çalışmaları ile 19 Haziran 1993'te Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO-World Health Organisation) bağlı Uluslararası Kansere Araştırma Kuruluşu (IARC-International Agency for Research on Cancer) tarafından aflatoksin B1 birinci dereceden, aflatoksin M1 ise ikinci dereceden kanserojen maddeler grubuna dahil edilmiştir (Anonim, 1992; Cathey ve ark., 1994; Bakırcı, 1995; Dragacci ve ark., 1995; Akdemir, 2004).

Aflatoksinlerin akut toksisitesi üzerinde hayvanlarda çok çalışma yapılmış ve aflatoksin B1'in hayvanlarda hepatokarsinomaya sebep olduğu tespit edilmiştir. İnsanlarda ise fıstık ve fıstık ürünlerinin tüketimi ile insan karaciğer kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir. Aflatoksinlerin bu tehlikelerinden dolayı dünyanın her yerinde besinlerde ve yemlerde kabul edilebilecek en üst seviyeleri bildirilmiştir (Franco ve ark., 1998; Özmentese, 2002).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) aflatoksin M1'in potansiyel risklerinin minimum düzeye indirgenmesi amacıyla, henüz mantıklı bir maruz kalma seviyesi belirlenemediğinden, tüketiminin çok düşük seviyelerde olmasını tavsiye etmektedir.

Bu riskleri azaltmak amacıyla pek çok gelişmiş ülke süt ve süt ürünlerinde izin verilen maksimum aflatoksin M1 düzeylerini kendi şartlarına göre belirlemiştir (Lopez ve ark., 2001; Van Egmond ve Jonker, 2004).

Bazı Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde besinler için belirlenmiş maksimum aflatoksin ve diğer bazı mikotoksinlerin seviyeleri Çizelge 2.3'de ve ülkemizde gıda maddelerinde belirlenmiş maksimum aflatoksin ve diğer bazı mikotoksinlerin seviyeleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Avrupa Ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde gıdalar için belirlenmiş maksimum aflatoksin ve bazı mikotoksinlerin seviyeleri (Creppy, 2002)

Mikotoksin	Ülke	Maksimum Düzey (µg/kg yada µg/l, ppb)	Besinler
AFB ₁	Finlandiya	2	Tüm besinler
	Almanya	2	Tüm besinler
	Hollanda	5	Tüm besinler
	Belçika	5	Tüm besinler
	Portekiz	25	Yer fıstığı
		5	Çocuk gıdaları
		20	Diğerleri
	Avusturya	1	Tüm besinler
		2	Tahıllar, Fındık
	İsviçre	1	Tüm besinler
		2	Mısır, Tahıllar
	İspanya	5	Tüm besinler
	Lüksemburg	5	Tüm besinler
	İrlanda	5	Tüm besinler
	Danimarka	5	Tüm besinler
	Yunanistan	5	Tüm besinler
Okratoksin A	Fransa	5	Tüm besinler
	Hollanda	0	Tahıllar
	Yunanistan	20	Tüm besinler
	Fransa	5	Tüm besinler
	Hollanda	0	Tahıllar
Fumonisin B ₁ + B ₂	İsviçre	1000	Mısır
Zearalenon	Romanya	30	Tahıllar, Bitkisel yağlar
	Avusturya	60	Tahıllar
	Fransa	200	Tahıllar, Bitkisel yağlar
	Rusya	1000	Tahıllar, Bitkisel yağlar
T ₂ Toksin	Rusya	100	Tüm besinler

Çizelge 2.3. (devam) Avrupa Ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde gıdalar için belirlenmiş maksimum aflatoksin ve bazı mikotoksinlerin seviyeleri (Creppy, 2002)

Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂	İsveç	5	Tüm besinler
	Norveç	5	Yer fıstığı, Brezilya fındığı, Karabuğday
	Finlandiya	5	Tüm besinler
	Almanya	4	Tüm besinler
		0.05	Enzim ve enzim formülasyonları
	İngiltere	4	Fındık ve kurutulmuş incir
	Fransa	10	Tüm besinler
	İtalya	50	Yer fıstığı
	Avusturya	5 (B ₂ + G ₁ + G ₂)	Tüm besinler
		0.02 (M ₁ + B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)	Çocuk besinleri
Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂	İsviçre	5 (B ₂ + G ₁ + G ₂)	Tüm besinler
		0.01	Bebek besinleri
	A.B.D.	20	Tüm besinler
	Belçika	5	Yer fıstığı
Aflatoksin M ₁	Bosna	1 (B ₁ + G ₁)	Tahıllar
		5	Fasulyeler
	İsveç	0.050	Sıvı süt ürünleri
	Avusturya	0.050	Süt
	Almanya	0.050	Süt
		0.020	Tereyağı
		0.200	Peynir
	Rusya	0.5	Süt ve süt ürünleri
	İsviçre	0.020	Bebek besinleri
		0.050	Süt ve süt ürünleri
		0.250	Peynir
	Belçika	0.050	Süt
	A.B.D.	0.50	Süt
	Çek Cum.	0.1	Çocuk sütleri
		0.5	Yetişkin sütleri
	Fransa	0.03	Çocuk sütleri
		0.05	Yetişkin sütleri

Çizelge 2.3. (devam) Avrupa Ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde gıdalar için belirlenmiş maksimum aflatoksin ve bazı mikotoksinlerin seviyeleri (Creppy, 2002)

	Bulgaristan	0.5	Süt ve süt ürünleri
Deoksinival enol	A.B.D.	1000	Buğday
	Rusya	1000	Tahıllar
	Avusturya	750	Buğday
Okratoksin A	Romanya	5	Tüm besinler
	Çek Cum.	1	Bebek besinleri
		20	Tüm besinler
	Danimarka	5	Tahıllar
		25	Domuzlar
	Avusturya	5	Tahıllar
	İsviçre	2	Tahıllar
	Yunanistan	20	Tüm besinler

Çizelge 2.4. Ülkemizde gıda maddelerindeki maksimum aflatoksin ve bazı mikotoksinlerin seviyeleri (Anonim, 2011)

Gıda (1)		Maksimum Limit (µg/kg)		
2.1.	AFLATOKSİN	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
2.1.1.	Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar (2) (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç	8,0 (6)	15,0 (6)	—
2.1.2.	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	12,0 (6)	15,0 (6)	—
2.1.3.	Fındık ve Brezilya fındığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	8,0 (6)	15,0 (6)	—

Çizelge 2.4. (devam) Ülkemizde gıda maddelerindeki maksimum aflatoksin ve bazı mikotoksinlerin seviyeleri (Anonim, 2011)

2.1.4.	Sert kabuklu meyveler (Bölüm 2.1.2 ve 2.1.3’de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0 (°)	15,0 (°)	—
2.1.5.	Yerfıstığı, 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 (°)	—
2.1.6.	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (°) (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0 (°)	10,0 (°)	—
2.1.7.	Fındık ve Brezilya fındığı (°) (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	5,0 (°)	10,0 (°)	—
2.1.8.	Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.6 ve 2.1.7’de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0 (°)	10,0 (°)	—
2.1.9.	Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
2.1.10.	Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.11, 2.1.14 ve 2.1.16’de belirtilenler hariç)	2,0	4,0	—
2.1.11.	Mısır ve pirinç (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	—
2.1.12.	Çiğ süt (°), ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
2.1.13.	Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber (<i>Capsicum spp.</i>) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (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	—

Çizelge 2.4. (devam) Ülkemizde gıda maddelerindeki maksimum aflatoksin ve bazı mikotoksinlerin seviyeleri (Anonim, 2011)

2.1.14.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ⁽³⁾ , ⁽⁶⁾	0,10	—	—
2.1.15.	Bebek formülleri ve devam formülleri ⁽⁴⁾ , ⁽¹⁰⁾ (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025
2.1.16.	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar ⁽¹¹⁾ , ⁽¹²⁾	0,10	—	0,025
2.2.	OKRATOKSİN A			
2.2.1.	İşlenmemiş tahıllar		5,0	
2.2.2.	İşlenmemiş tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil) (Bölüm 2.2.9 ve 2.2.10'da belirtilenler hariç)		3,0	
2.2.3.	Kurutulmuş asma meyveleri (kuşüzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm)		10,0	
2.2.4.	Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve (Bölüm 2.2.5'de belirtilenler hariç)		5,0	
2.2.5.	Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve		10,0	
2.2.6.	Şarap ve meyve şarapları (köpüklü şarap/şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç)		2,0 ⁽¹³⁾	
2.2.7.	Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli ⁽¹⁴⁾		2,0 ⁽¹³⁾	
2.2.8.	Üzüm suyu, konsantreden üretilen üzüm suyu, üzüm nektarı, üzüm sırası ve konsantreden üretilen üzüm sırası ⁽¹⁵⁾ (doğrudan insan tüketimine sunulan)		2,0 ⁽¹³⁾	
2.2.9.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ⁽³⁾ , ⁽⁶⁾		0,5	
2.2.10.	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar ⁽¹¹⁾ , ⁽¹²⁾		0,5	
2.2.11.	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		30,0 (30.6.2012 tarihine kadar) 15,0 (1.7.2012 tarihinden sonra)	
2.2.12.	Meyan kökü (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>G. inflata</i> ve diğer türler)			
2.2.12.1.	Meyan kökü (bitkisel infüzyon bileşeni olarak kullanılanlar)		20,0	
2.2.12.2.	Meyan kökü ekstraktı ⁽¹⁶⁾ (özellikle alkolsüz içecek ve şekerleme üretiminde kullanılan)		80,0	

⁽¹⁾ Meyve, sebze ve hububat için Türk Gıda Kodeksi – Pestisitlerin Maksimum Kalın-
tı Limitleri Yönetmeliğinde yer alan sınıflandırma esas alınır. Buna göre; karabuğday
(*Fagopyrum spp.*) hububat ve karabuğdaydan elde edilen ürünler ise hububat ürünleri

kapsamında değerlendirilir. Meyveler için belirlenen maksimum limitler sert kabuklu meyveleri kapsamaz.

(2) Maksimum limit, işlenmek üzere tarladan fabrikaya doğrudan nakledilen taze ıspanak için uygulanmaz.

(3) Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.

(4) Maksimum limit; üretici tarafından beyan edilen kullanım talimatına göre hazırlanan veya doğrudan tüketime hazır olarak piyasaya arz edilen ürünler için geçerlidir.

(5) GTİP 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207 kapsamındaki yağlı tohumları ve GTİP 1208'den üretilen ürünler; GTİP 1207 99 kavun tohumu hariç

(6) Maksimum limit; yerfıstığı ve sert kabuklu meyvelerin yenilebilir kısımlarına uygulanır. Yerfıstığı ve sert kabuklu meyveler kabuklarıyla analiz edilirse Brezilya fıncığı hariç, afla-toksin miktarı hesaplanırken tüm bulaşanın yenilebilir kısım üzerinden olduğu kabul edilir.

(7) İşlenmiş ürünlerin tamamı veya hemen hemen tamamı bahse konu sert kabuklu meyvelerden üretiliyorsa bu sert kabuklu meyveler için belirlenen maksimum limit; işlenmiş ürünü için de kullanılır. Aksi halde 6 ıncı maddenin birinci, ikinci ve üçüncü fıkraları uygulanır.

(8) Hayvansal Gıdalar için Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliğinde tanımlanan ürünleri kapsar.

(9) Maksimum limit; kuru madde üzerinden geçerlidir. Kuru madde, mikotoksin limitlerinin resmi kontrolü için gıdalardan numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri ilgili mevzuatında belirtilen şekilde hesaplanır.

(10) Bebek formülleri ve devam formülleri ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.

(11) Özel tıbbi amaçlı diyet gıdaları ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.

(12) Maksimum limit; süt ve süt ürünleri için üretici tarafından beyan edilen kullanım talimatına göre hazırlanan veya doğrudan tüketime hazır olarak piyasaya arz edilen ürünlere uygulanırken süt ve süt ürünleri dışındaki ürünler için ise kuru madde üzerinden geçerlidir. Kuru madde, mikotoksin limitlerinin resmi kontrolü için gıdalardan numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri ilgili mevzuatında belirtilen şekilde hesaplanır.

(13) Maksimum limit; 2005 yılı ve sonrasında hasat edilerek üretilen ürünlere uygulanır.

(14) Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli ilgili mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar. Maksimum OTA limiti; son ürünlerdeki şarap ve/veya şıra oranı hesaplanarak uygulanır.

(15) Meyve suyu ve benzeri ürünler mevzuatında tanımlanan ürünleri kapsar.

(16) Maksimum limit; 3-4 kg meyan kökünden üretilen 1 kg saf ve seyreltilmemiş ekstraktlara uygulanır.

Kuru incir meyvesi yüksek oranda şeker içeriği, hasat öncesi ve hasat sonrasında (üretim, depolama, nakliye) koşullar nedeniyle küf ve mikotoksin oluşumunun görüldüğü bir üründür. İncir tarlada küfle kontamine olmakta, küf ve mikotoksin oluşumu daha sonraki aşamalarda da devam etmektedir (Buchanan ve ark., 1975). Kuru incirlerde hasat öncesi ve hasat sonrasında (üretim, depolama, nakliye) çeşitli nedenlerden ötürü istenmeyen değişiklikler ve bozulmalar görülebilmektedir. Küfler fındıkta protein, yağ ve karbonhidratları enzimatik faaliyetlerle parçalayarak gıdanın dokusunu değiştirmekte, yağ içeriğinin azalmasına, serbest yağ asiti miktarının artmasına, proteinlerin parçalanmasına, amino asit bileşiminde değişime, besin değerinin düşmesine, renk değişimine, kötü koku oluşmasına, tat değişimlerine, ağırlık kaybına ve toksin oluşmasına yol açmaktadırlar. Küfler sağlam gıdanın içine de girebildiklerinden bakterilerden daha fazla zarar vermektedirler. Fıstıkta kalite kayıplarına neden olan ve dayanma süresini kısaltan etkenlerden en önemlisi küflenmedir. Fıstıkta küf oluşması yaygın olup, küf gelişimi insan ve hayvan sağlığı için önemli bir risk oluşturmaktadır. Küf gelişimi bahçede başlayabilmekte hasat, yağın halinde bekletme, yetersiz ve uygun olmayan kurutma koşulları ve fıstığın naylon çuvalarda bekletilmesi nedeniyle gelişebilmekte, uygun olmayan depolama koşulları ve taşıma sırasında da bu artış devam etmektedir. Küfün uygun sıcaklık, nem ve besi ortamında gelişmesiyle aflatoksin oluşmaktadır. Fıstıkta aflatoksin oluşması ve aflatoksinin kanserojen olması fıstığın tehlikeli ürünler arasında yer almasına neden olmaktadır. Mısır besin değerinin öneminden dolayı insan ve hayvan beslenmesinde büyük öneme sahiptir. Tahıllar ve yağlı tohumlular gibi birçok ürün tarlada veya depolama sırasında funguslar tarafından infekte olurlar. Dane, yem ve gıdalar üzerinde gelişen küfler ikincil metabolit ürünleri olan mikotoksinleri üretirler. Dünyadaki tarımsal ürünlerin her yıl mevsim, hasat ve depolama şartlarına bağlı olarak %25'inin mikotoksinlerle bulaşık olduğu bilinmektedir. A.B.D'de mikotoksin bulaşıklığı nedeniyle yıllık ortalama ekonomik kaybının 900 milyon dolar olduğu saptanmıştır (Alptekin, 2007). Kırmızıbiber, dünyanın çeşitli ülkelerinde açıkta ve serada yetiştiriciliği yapılan, tüketici, üretici ve işleme endüstrisi açısından önemli olan bir kültür bitkisidir. Kırmızıbiber, üretim, hasat, kurutma ve daha sonraki işleme safhalarında karşı karşıya kaldığı şartlar nedeniyle aflatoksin (AF) oluşumuna hassas ürünlerden birisidir (Çoksöyler, 1999). Özellikle nemli, yağmurlu ve ılıman iklimlerde yetişen biberlerden üretilen kırmızı biberlerde AF bulunma oranı daha fazladır. Türkiye tek başına dünya biber üretiminde % 8, dünya işlenmiş biber ticaretinde ise % 3'lük bir paya sahip olması nedeniyle kırmızı biber, ülke ekonomisi açısından önem taşıyan bir ürün konumundadır (Duman, Zorlügenç ve Evliya, 2002). Dünyada en önemli süt ürünü olarak kabul edilen peynir, ülkemizde de süt ürünleri içerisinde en çok tüketilen ürün çeşidini oluşturmakta ve Türkiye'de peynir çeşitleri arasında beyaz peynir tüketimi

ilk sırada yer almaktadır. Uygun sıcaklık ve nem koşullarında peynirlerin küf gelişimi için çok iyi substrat oldukları bildirilmektedir (Bullerman, 1981; Lopez-Diaz ve ark., 1996; Barrios ve ark., 1997). Peynirlerde aflatoksin M1 varlığı başlıca üç muhtemel sebebe bağlı olabilmektedir:

1- Süt hayvanları tarafından aflatoksin B1 ile kontamine olmuş yemlerin tüketilmesinin bir sonucu olarak peynire işlenecek sütte aflatoksin M1'in bulunması,

2- *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* gibi peynirlerde gelişebilen küfler tarafından üründe aflatoksin (B1, B2, G1 ve G2) sentezlenmesi,

3. Peynire işlenecek sütün zenginleştirilmesinde aflatoksin M1 içeren süt tozunun kullanımı (Trucksees ve Page 1986; Galvano ve ark., 1996; Lopez ve ark., 2001).

2.7. Gıda Maddelerinde Küflenmenin Önlenmesi

Bitkisel ürünlerde hasat öncesinde ve hasat esnasında; küf üremesi ve toksin sentezine dirençli tarım ürünü yetiştirilmesi, modern üretim yöntemlerinin kullanılması, tarım zararlıları ile mücadele edilmesi, ürünün tam olgunluğa ulaştığında hasat edilmesi, hasat sırasında hasar meydana getirilmemesi, yeterince kurutulması, yağmur ve kırağıdan korumak için tarladan çabuk uzaklaştırılması gibi tedbirlerle küf üremesi engellenebilir (Kardes, 2000; Kaya, 2001; Whitlow ve Hagler, 2002; Yiannikouris ve Jouany, 2002; Williams ve ark., 2004).

Hasat edilen ürünün nakledilmesi ve depolanmasında, nakil araçlarının temiz ve rutubetsiz olması, küflü ürünlerin depoya alınmaması, deponun temiz olması, deponun ve ürünün böcek ve küflere karşı ilaçlanması, özellikle düşük ortam rutubeti (% 65'in altında), düşük sıcaklık (20 °C'nin altında), düşük ürün rutubeti (Yer fıstığı, fındık gibi yağlı tohumlarda % 9'dan az, tahıllarda % 12'den az) gibi hususlara dikkat edilmesi küflenmenin önüne geçmede yararlı olmaktadır. Depoda bulunan tahıllar ve yemler ise laktik asit, asetik asit, sorbik asit, benzoik asit, propiyonik asit ve tuzları, bakır sülfat gibi kimyasal maddelerle koruyucu uygulamalar yapılarak küflenmeye karşı korunabilir. Bu maddelerden en çok kullanılanları propiyonik asitin sodyum ve kalsiyum tuzları ile asetik asit, sorbik asit ve amonyum propiyonat içeren piyasa müstahzarlarıdır (Kardes, 2000; Kaya, 2001; Whitlow ve Hagler, 2001; 2005; Williams ve ark., 2004).

Aflatoksinle bulaşık gıdaların detoksifikasyonu maksadıyla bugüne kadar birçok yöntem denenmiştir. Aflatoksinlerin ısıya olan dirençlerinden dolayı ısı uygulamaları sınırlı oranda etkili olmaktadır. Pastörizasyon, buharla muamele etme, fırında pişirme, sterilizasyon gibi işlemlerle aflatok-

sinlerin parçalanmaları mümkün değildir. Sütte bulunan aflatoksin M1'in pastörizasyon ve sterilizasyon ile yıkımlanması olanaksızdır. Ancak yer fıstığı tanelerinin 160 °C'de 30 dakika süreyle kavrulma işlemiyle aflatoksin seviyesinde % 90 azalma olmaktadır. Tahıllar ve yem tanelerinin ince yayılmış bir halde iki gün süresince güneş ışığında tutulmaları aflatoksin seviyesini büyük oranda azaltmaktadır. Su, tuz çözeltileri ve organik çözücülerle (etanol, propanol gibi) aflatoksinlerin detoksifikasyonu çalışmaları arzulanan seviyede iyi sonuçlar vermemiştir. Fıstık, fındık, mısır, kuru kayısı, kuru incir gibi ürünlerde, ultra viole ışık altında mavi-yeşil renk verenlerin seçilmek suretiyle elimine edilmesi ile aflatoksin miktarı büyük oranda (% 50) azaltılabilmektedir. İyonize ışınlarla da aflatoksinler detoksifiye edilebilmektedir, fakat yüksek dozlara gereksinim olması nedeni ile Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation) tarafından sakıncalı görülmektedir (Tunail, 2000; Kaya, 2001).

Çok sayıda kimyasal madde aflatoksinleri inaktive etme özelliğine sahiptir. Aflatoksinlerin yapısındaki lakton bağı alkalilere karşı duyarlıdır. Oksidan maddelere karşı da aflatoksinler dayanıksızdır. Aflatoksinlere karşı en etkili kimyasal maddeler amonyak, klorür gazı, hidrojenperoksit, sodyumhipoklorit, sodyumbisülfid ve ozondur. Bu kimyasal maddelerin kullanılması ile aflatoksinlerin detoksifikasyonu sağlanabilmesine rağmen, bunların kullanımı ile gıda ve yemlerde istenmeyen değişiklikler meydana geldiğinden ve bazı gıdaların besin değeri azaldığından, özellikle gıda sektöründe kullanılmaları uygun değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da laktik asit bakterileri (*Lactobacillus ssp.*) ile aflatoksinin uzaklaştırılmasından olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir (Özkaya ve Temiz, 2003; Haskard ve ark., 2001; Zinedine ve ark., 2005).

2.8. Mikotoksinler İle İlgili Yasal Düzenleme

Aflatoksin B1, aflatoksinlerin en zehirlisi olup gıda maddelerinde çok sık rastlanmaktadır. Yüksek dozda alındığında şiddetli toksik etkisine ek olarak, aflatoksinlerin düşük dozda sürekli alınması, insan sağlığı üzerinde kronik etkiye neden olmaktadır. Bu bilimsel bulgular, gıdalardaki aflatoksin düzeyleri için uluslararası standartların tartışılmasını hızlandırmıştır. Gelişmiş ülkelerde, gıdaların standartlara uygunluğu ve sağlık riskleri oldukça fazla tartışılmaktadır. Gıda güvenliğini sağlamak amacıyla AB komisyonu tarafından aflatoksin düzenlemeleri ile yapılan müdahale ve it-halat yasaklarının kullanımı, artık savunulur duruma gelmiş olup önlem amacıyla uygulanmaktadır (Karaman ve Acar, 2006).

AB Komisyonu 4 Şubat 2002 tarihinde aldığı bir kararda "Türkiye'den gelen veya Türkiye orijinli kurutulmuş incir ve fıstıklarda ve daha az miktarda da fındıklarda oldukça fazla miktarda aflatoksin B1 ve toplam aflatok-

sin kontaminasyonu bulunduğunu, bu ürünlerde Türkiye'den ayrılmadan önce alınan numunelerdeki toplam aflatoksin ve aflatoksin B1 miktarlarının tespit edilmesi gerektiğini belirtmektedirler (Anonim, 2007d).

Danimarka'da Türkiye'den ithal edilen kuru incir ve ezmelerinde en fazla rastlanan çeşidin B1 olduğu tespit edilmiştir. 1988 sezonunda Türk kuru incirindeki aflatoksin bulaşımı, büyük miktarlardaki temiz kuru incir grupların içerisinde çok az kuru meyvenin yüksek seviyede toksin içermesi nedeniyle ortaya çıkmıştır. Örnek alınan partideki kontaminasyon derecesinin ortalama 3 kg'da 1 tane aflatoksin ile bulaşık incir şeklinde olduğu bildirilmektedir (Mathot, 1989).

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2002/80/EC komisyon kararına göre, AB'ne ihracatı yapılan gıda ürünleri için ihracat sertifikası istemektedir. Aflatoksin izleme projesi kapsamında 2002 yılında fındıkta 593, incirde 1695 örnek alınarak denetim yapılmıştır. Fındık ve mamullerinde % 0.6, incir ve mamullerinde % 4.3 oranında olumsuz sonuç çıkmış ve yasal işlem uygulanmıştır. Proje kapsamında, 2001-2002 yıllarında fındık ve kuru incirden alınan tüm örneklerin % 90'ında B1 ve toplam aflatoksin miktarı, AB limitlerinin çok altındadır. AB gümrükleri hızlı gıda uyarı sisteminden 2001 yılında, 10 üye devlet tarafından Türkiye'den ithal edilen incirler için 16 ve fındıklar için 4 kez aflatoksin limitini aştığını gösteren uyarı yapılmıştır. 2002 yılında ise 11 üye devletten incir için 23 ve fındık için 62 uyarı mesajı alınmıştır. Yaşanan bu tür sorunlar nedeniyle Türkiye'de aflatoksin limitlerine uyum ile ilgili aşağıda belirtilen yasal düzenlemeler hazırlanmıştır;

a) Tarım ve Köyişleri Bakanlığının yapısı, fonksiyonları ve yetkilerini tanımlayan 441 sayılı kararname,

b) 560 sayılı kararname ile 28 Haziran 1995 yılında çıkartılmış ve gıda maddelerinin üretimi, tüketimi ve denetlenmesi hakkındaki 4128 sayılı yasa,

c) Türk Gıda Kodeksi hakkındaki düzenleme,

d) 4 Eylül 2000 tarihli Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından yeniden gözden geçirilen ve gıda kontrolü konusunda özel laboratuvarlara onay veren düzenleme,

e) 9 Haziran 1998'de yayınlanan gıda maddelerinin üretimi, tüketimi ve denetimi hakkındaki 23367 sayılı düzenleme,

f) İthalat yapan ülkenin geri gönderdiği ihracat malları hakkında yapılacak işlemler, gıda maddelerindeki belirli kontaminantların maksimum düzeylerinin saptanması, gıda maddelerindeki belirli kontaminantların düzey kontrolü için örnekleme metotları ve analiz metodu, ihracat işlemleri, ithalat kontrolü ve ülke içindeki gıda kontrolleri hakkında genelge,

g) Aflatoksin belirleme metotları, diğer mikotoksin belirleme metotları, antepfıstığı, sert kabuklu meyveler, kuru incir, işlenmiş iç fındık, antepfıstığı ezmesi, fındık un ve püresi hakkında oluşturulan Türk Standartları,

h) Ülke içerisindeki gıda kontrolünü düzenlemek amacıyla 2002/80/EC komisyon kararı dikkate alınarak AB'ne ihracatı yapılan bazı kuru meyveler için sertifikasyon konusunda bakanlık genelgesi,

i) 25 Mart 2002 yılında yayınlanan gıda maddelerindeki belirli kontaminantların kontrolü için analiz ve örnekleme metotlarını içeren 2002/25 sayılı tebliğ,

j) 23 Eylül 2002'de yayınlanan gıda maddelerinde kontaminant düzeyini saptayan 2002/63 sayılı düzenleme yapılmıştır (Karaman ve Acar, 2006). AB, Haziran 1998'de gıdalarda maksimum aflatoksin kalıntı limitini azaltan komisyon düzenlemesi (1525/98), örnekleme analiz metotları ve örnekleme yönteminin ayrıntısını belirten komisyon yönergesini (98/53/EC) benimsenmiştir. Komisyon yönergesi, daha çok işlenme durumuna bağlı olarak yerfıstığında toplam aflatoksin limitini 15 µg/kg (8 µg/kg B1), diğer sert kabuklu meyvelerde ve kurutulmuş meyvelerde ise 10 µg/kg (5 µg/kg B1) olarak belirlemiştir. Ayrıca doğrudan insan tüketimine yönelik işlenmiş tahıllarda, kurutulmuş ve sert kabuklu meyvelerde toplam aflatoksin limiti 4 µg/kg (2 µg/kg B1) olarak belirlenmiştir. AB, süt için aflatoksin M1'i 0.05 µg/l düzeyinde belirlemiştir. JECFA'de (birleşik gıda katkı uzmanlık komitesi) aynı düzeyde önermiştir. Fakat daha sonra, 2001 yılı FAO/WHO Kodeks komisyon toplantısında yapılan tartışmalar sonucunda AB'nin itirazlarına rağmen daha yüksek olan 0.5 µg/l düzeyi onaylanmıştır. FAO/WHO Gıda Kodeks'inde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde, gıdaların tamamında toplam aflatoksin limiti 20 µg/kg olarak belirlenmiş olup, AB toplam aflatoksin standardına göre çok daha yüksektir (Karaman ve Acar, 2006). Aflatoksin kontrollerinde (fındık ve antepfıstığı dâhil) AB'nin uyguladığı tolerans limitleri AFB1 için 2 µg/kg, toplam aflatoksin (B1+B2+-G1+G2) için 4 µg/kg iken, bu limitler Türk Gıda Kodeksi'ne göre sırasıyla 5 ve 10 µg/kg'dır (Oruç, 2005).

k) Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde düzenleme yapılmıştır (2008). Türk Gıda Kodeksi gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında Tebliğ (2008/26) yayınlamıştır. (16 Şubat 2009 tarih ve 27143 sayılı Resmi Gazete değişikliği).

l) Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği hakkındaki düzenleme, 29 Kasım 2011'de yayınlanan gıda maddelerinde kontaminant düzeyini saptayan 2010/5996 sayılı ile yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Aletler ve Kimyasallar

Aflatoksin analizleri G1311A model pompa (seri no: DE91608506), G1316A model kolon fırını (seri no: DE91612000), G1321A model floresan dedektör (seri no: DE92001800) ve G1328A model manuel enjeksiyon (seri no: DE54003460) ünitelerinden oluşan Hewlett Packard Agilent 1200 marka HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'nin UV ışık altındaki doğal floresansını arttırmak ve daha kolay, daha hassas bir şekilde tespit edilmelerini sağlamak için HPLC analizlerinde türevlendirme yapılması gerekmektedir. Araştırmamızda kolon sonrası türevlendirme uygulanmış, bu amaçla Coring Cell Rhone Diagnostics, Glasgow, UK. (Serial No: 00618) kullanılmıştır.

HPLC Cihazı: Agilent Technologies 1200 Series marka kullanıldı.

Coring Cell: Rhone Diagnostics, Glasgow, UK. (Serial No: 00618)

Saf su cihazı: : Ultra Saf Su Cihazı Millipore marka kullanıldı. (Seri no: FONA81849)

Aflatest İmmunoafinite Kolonu: Vicam marka kullanıldı. (Seri No: 1869E)

Karıştırıcı: Waring Commercial marka kullanıldı. (Seri No: 8010ES)

Mikrofiber Filters: Vicam marka kullanıldı. (Seri No: 65464)

Fluted Filter Paper: Vicam marka kullanıldı. (Seri No: 11-051)

Enjektör: Genject marka kullanıldı. (Seri No: 20002)

Analitik Teraz: Analitik Terazi 0,0000 hassasiyete sahip Mettler Toledo JB1603-C/FACT marka hassas terazidir.

Vial: Vicam marka kullanıldı. (Seri no: 5182-0716)

Sodyum Klorür: Merck marka kullanıldı.(Seri no: K40124804-919)

Potasyum Bromür: Merck marka kullanıldı.(Seri no: K41391405-104)

Asetonitril: Merck marka kullanıldı.(Seri no: I569158-105)

Metanol: Merck marka kullanıldı. (Seri no: 20864.320)

Nitrik Asit: Merck marka kullanıldı. (Seri no: K40382656-935)

HPLC Mobil Fazı: Su / Asetonitril / Metanol [(560+180+260) (v+v+v)] karışımı hazırlandı. Çözeltilinin 1 litresine 120 mg potasyum bromür ve 350 µl nitrik asit ilave edildi. Kullanmadan önce süzüldü.

3.2. Materyal

Araştırma materyalini dört mevsim Karaman ilinde satışa sunulan toplamda 45 örnek (kuru İncir, kuru üzüm, kırmızıbiber, karabiber, fındık, fıstık, mısır, ekmek, peynir) oluşturdu. Örnekler, gelişigüzel örnekleme yöntemine göre Karaman semt pazarlarında açıkta satılan gıda maddelerinden toplandı. Sadece ekmek ve peynir örnekleri sonbahar mevsiminde marketten ve pazardan alındı.

3.2.1. Örneklerin Analize Hazırlanması

Semt pazarlarından alınan örnekler 100 gramlık şeffaf poşet torbalar da ve marketten alınan ekmekler poşetlerde laboratuvara getirildi. Örnekler kurutuldu ve homojen hale getirmek için öğütüldü. Bu örneklerin 25 gramı analiz için kullanıldı.

3.3. Metod

3.3.1. Aflatoksin Standartları

Aflatoksin standartları Trilogy firmasından temin edildi.

3.3.1.1. Aflatoksin B1, B2, G1, G2 Standartları Hazırlanması

Konsantrasyonu belli olan sertifikalı kristal halde standart kullanıldı. Standartlar 2-8 °C de gün ışığı almayan yerde muhafaza edildi. Ana stok standart hazırlamak için kristal haldeki standart 10 ml'ye tamamlanarak Asetonitril de çözüldü. Konsantrasyonları 2000 µg/kg B1, B2 ve 500 µg/kg B2, G2 olan karışım çözelti hazırlandı.

3.3.1.2. 1. Düzey Ara Stok Standartın Hazırlanması

Hazırlanan ana stok çözeltiden 2 ml alınıp azot gazı altında uçurulduktan sonra; konsantrasyonları 400 µg/kg B1, G1 ve 100 µg/kg B2, G2 olmak üzere 10 ml'ye tamamlanarak ve metanol ile çözülerek 1. düzey ara stok çalışma standartları hazırlandı.

3.3.1.3. 2. Düzey Ara Stok Standartın Hazırlanması

Hazırlanan 1. düzey ara stok çözeltiden; konsantrasyonları 40 µg/kg B1, B2 ve 10 µg/kg B2, G2 olmak üzere 2.5 ml alınıp 25 ml'ye metanol ile tamamlanarak 2. düzey ara stok çalışma standartları hazırlandı.

3.3.1.4. Çalışma Standartlarının Hazırlanması

0.1 µg/kg lik B1, G1 ve 0.025 µg/kg B2, G2 den 2 ml hazırlama: 0.25 µg/kg B1, G1 ve 0.0625 µg/kg B2, G2 standartından 0.8 ml alınıp, 1.2 ml %50 MeOH/Su karışımı ile karıştırıldı.

0.25 µg/kg lik B1, G1 ve 0.0625 µg/kg B2, G2 den 4 ml hazırlama: 0.5 µg/kg B1, G1 ve 0.125 µg/kg B2, G2 standartından 2 ml alınıp, 2 ml %50 MeOH/Su karışımı ile karıştırıldı.

0.5 µg/kg lik B1, G1 ve 0.125 µg/kg B2, G2 den 4 ml hazırlama: 1 µg/kg B1, G1 ve 0,25 µg/kg B2, G2 standartından 2 ml alınıp, 2 ml %50 MeOH/Su karışımı ile karıştırıldı.

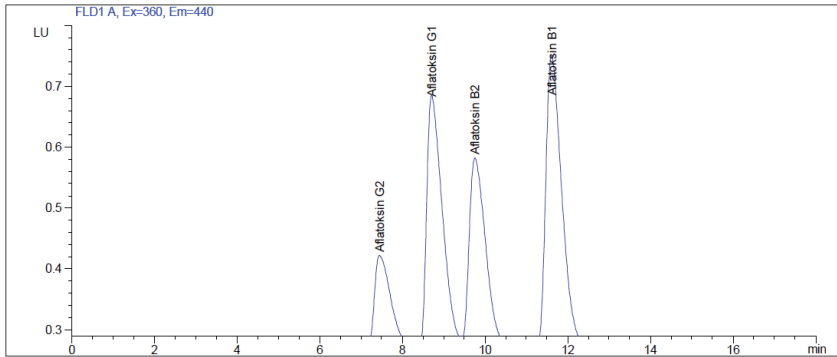
1 µg/kg lik B1, G1 ve 0,25 µg/kg B2, G2 den 4 ml hazırlama: 2 µg/kg B1, G1 ve 0,5 µg/kg B2, G2 standartından 2 ml alınıp, 2 ml %50 MeOH/Su karışımı ile karıştırıldı.

2 µg/kg lik B1, G1 ve 0.5 µg/kg B2, G2 den 4 ml hazırlama: 4 µg/kg B1, G1 ve 1 µg/kg B2, G2 standartından 2 ml alınıp, 2 ml %50 MeOH/Su karışımı ile karıştırıldı.

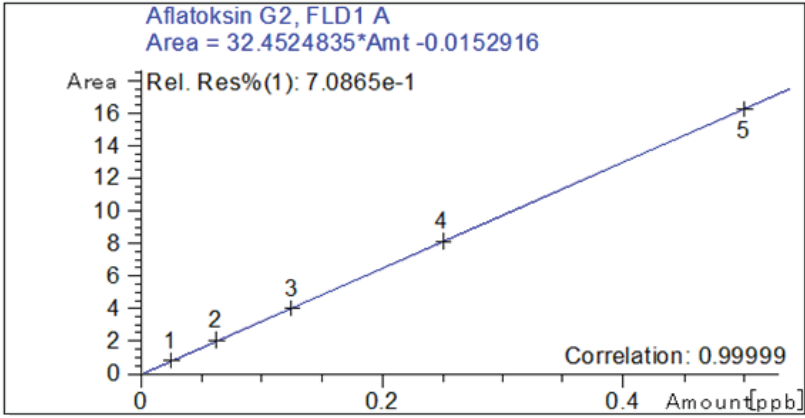
Çalışma standartlarının miktar ve alan verileri Çizelge 3.1'de; aflatoksin G2, G1, B2 ve B1 standartlarının alıkonma zamanları Şekil 3.1'de ve kalibrasyon eğrileri Şekil 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma standartlarının miktar ve alan verileri

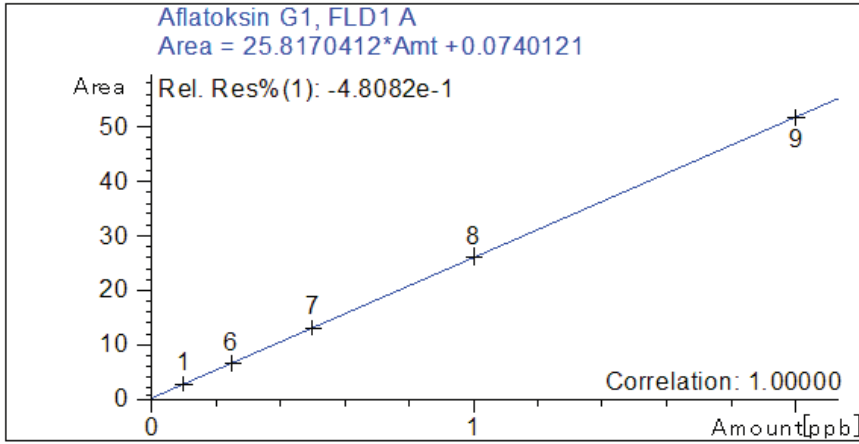
#	Ref.Amount	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[ppb]	Area	ISTD	#
1	2.5000e-2	7.379	FLD1 A	Aflatoksin G2	1	2.5000e-2	8.0166e-1	No	
	6.2500e-2				2	6.2500e-2	2.027		
	1.2500e-1				3	1.2500e-1	4.007		
	0.250				4	0.250	8.084		
	0.500				5	0.500	16.225		
2	0.100	8.652	FLD1 A	Aflatoksin G1	1	0.100	2.643	No	
	0.250				6	0.250	6.534		
	0.500				7	0.500	13.042		
	1.000				8	1.000	25.965		
	2.000				9	2.000	51.656		
3	2.5000e-2	9.663	FLD1 A	Aflatoksin B2	1	2.5000e-2	1.697	No	
	6.2500e-2				2	6.2500e-2	4.150		
	1.2500e-1				3	1.2500e-1	8.129		
	0.250				4	0.250	16.470		
	0.500				5	0.500	32.679		
4	0.100	11.532	FLD1 A	Aflatoksin B1	1	0.100	3.290	No	
	0.250				6	0.250	7.735		
	0.500				7	0.500	15.326		
	1.000				8	1.000	30.405		
	2.000				9	2.000	60.234		



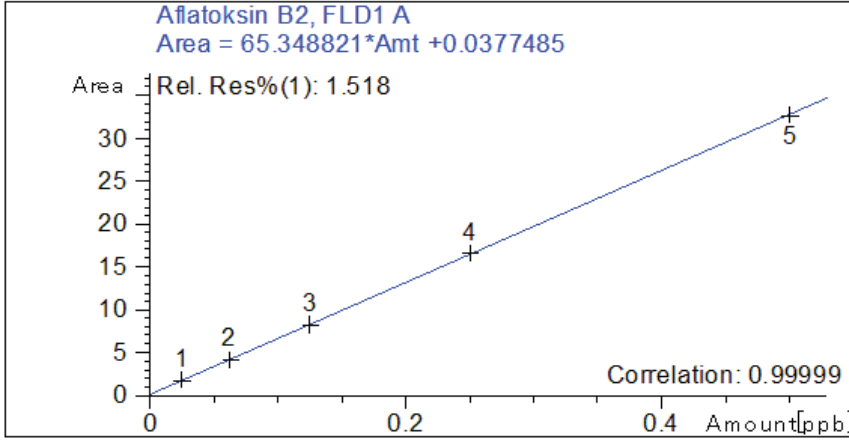
Şekil 3.1. Çalışma standartlarının alıkonma zamanlarının gösterilişi



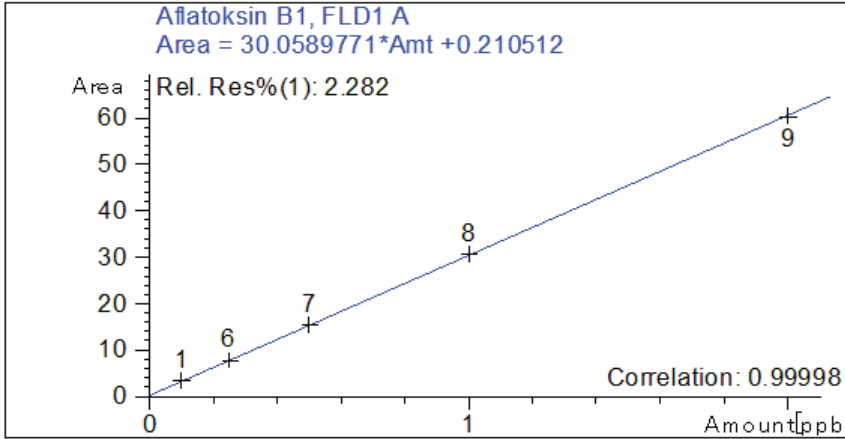
Şekil 3.2. Aflatoksin G2 standartının kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.3. Aflatoksin G1 standartının kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.4. Aflatoxin B2 standartının kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.5. Aflatoxin B1 standartının kalibrasyon eğrisi

3.3.2. Aflatoxin Miktarının Belirlenmesi

Aflatoxin analizi AOAC 'nin 991.31 no'lu metodu kullanılarak HPLC ile yapılmıştır.

3.3.3. Sistem Koşulları

HPLC sistemi: Agilent Technologies 1200 Series

Dedektör: Floresans dedektör; ex.: 360 nm, em.: 435nm

Kolon: C18 (4.6 mm x 250 mm x 5 µl)

Akış Hızı: 1 ml/dakika

Türevlendirme: Kolon sonrası türevlendirme Coring Cell (Rhone Diagnostics, Glasgow, UK)

Mobil Faz: su+asetonitril+metanol (560+180+260)(V+V+V) + 120 mg KBr + 350 µl 4M HNO₃

3.3.4. Ekstraksiyon

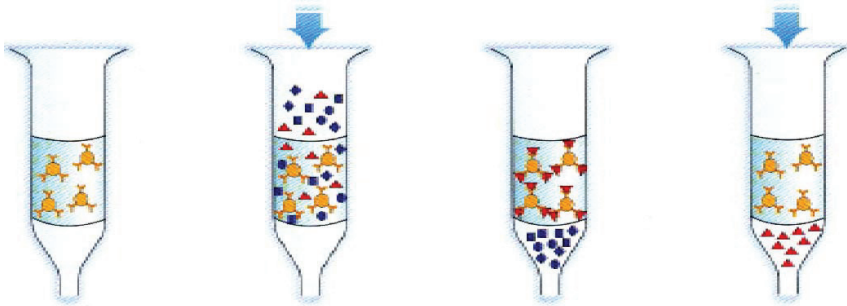
25 gram öğütülmüş numune üzerine 5 gram NaCl ve 125 ml ekstraksiyon solventi (%70 metanol : %30 su) (v/v) ilave edilmiştir. Blenderin kapağı kapatılarak yüksek hızda 2 dakika karıştırılmıştır.

Ekstrakt katlı filtre kâğıdından geçirilip temiz bir beherde toplanmıştır. Süzütünün 15 ml'si temiz bir mezüre aktarılıp üzerine 30 ml distile su ilave edilmiştir. İyice karıştırılıp, karışım cam mikro fiber filtreden geçirilip süzüntü temiz bir beherde toplanmıştır. Süzütünün 15 ml'si 1-2 damla/saniye sabit hızla AflaTest P® kolonundan geçirilmiştir. Kolondan yaklaşık 1-2 damla/saniye sabit hızla 10 ml distile su geçirerek kolon yıkanmıştır. Kolondan bir kere daha 10 ml distile su geçirilmiştir. Kolondan yaklaşık 1 damla/saniye sabit hızla 1.0 ml HPLC dereceli metanol geçirilerek kolondan aflatoksinler ayrılıp eluat temiz bir cam vialde toplanmıştır. Viale 1.0 ml distile su ilave edilerek 2,0 ml eluattan 100 µl HPLC'ye enjekte edilmiştir.

3.3.5. İmmünoafinite Kolon (IAK) Çalışma Prensibi

- İmmünoafinite kolonlar özel bir monoklonal antikor içerir
- Mikotoksin içeren örnek ya da örnek ekstraktı kolondan geçirilir
- Antikor izole halde kalır, mikotoksinler kolonda tutulur
- Geçen eluent kolonda antikoru denatüre eder, toksinler elusyon çözücüsüne geçer, kromatografik yöntemlerle toksin tayini yapılır.

İmmünoafinite kolonun çalışma prensibi Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. İmmünoafinite kolonu

3.3.6. HPLC Koşulları

- HPLC mobil faz: su - asetonitril – asetik asit (560+180+260) (V+V+V)
- Akış hızı: 1 ml/dk (Akış hızı 1 ml/dk olarak değiştirilmiştir)
- Dalga boyu: eksitasyon: 360 nm emisyon: 435 nm (deneyerek en yüksek ve düzgün pikin elde edildiği dalga boyu seçilir)
- Enjeksiyon hacmi: 100 µl
- Kolon sıcaklığı: 30°C
- Hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki standartlar (en az 5 nokta olmalıdır) HPLC'ye enjekte edilir. Aflatoksin B1, B2, G1, G2 miktarına karşılık elde edilen pik yüksekliklerine (veya alanına) göre kalibrasyon grafiği çizilir.
- Numune ekstraktından da enjeksiyon yapılır ve numune kromatogramındaki piklerle, standart pikinin alıkonma zamanı karşılaştırılır.
- Numunede toksin olduğuna karar verilmesi durumunda, standart grafikten enjekte edilen numunedeki Aflatoksin B1, B2, G1, G2 miktarı bulunur.
- Numune ekstraktına ait pik, en yüksek standarda ait pikten yüksekse, numune asetonitril ile seyreltilip, enjeksiyon tekrarlanır.

3.3.7. Aflatoksin B1, B2, G1, G2'nin Belirlenmesi

Aflatoksin B1, B2, G1, G2 AOAC 991.31 metodu kullanılarak belirlenmiştir. 2 ml örnek HPLC'ye enjekte edilerek Aflatoksin B1, B2, G1, G2 düzeyi Hewlett Packard HPLC sistemi (Agilent Technologies 1200) kullanılarak tahrik dalga boyu 360 nm ve emisyon dalga boyu ise 435 nm olacak şekilde floresans dedektör kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrım, Ace 5 C18 (25 cm-4.6 mm i.d.) (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, 120 mg potasyum bromür ve 350 µl 4 M nitrik asit ilave edilen asetonitril-metanol-su (560+180+260) (V+V+V) karışımı olup ve akış hızı dakikada 1 ml'dir. Kolon sonrası türevlendirme Coring Cell kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Karaman ilinde gelişigüzel örnekleme yöntemine göre semt pazarlarından alınan 38 ve marketlerden alınan 7 adet örnekteki aflatoksin B1, B2, G1, G2 miktarları AOAC 991.31 metodu kullanılarak hazırlanmış olan çözeltilerde HPLC ve Coring Cell türevlendirme cihazları ile ölçülmüş ve bulunan değerler Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, ve 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Kuru kayısı, kuru üzüm ve kuru incirdeki aflatoksin miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$), (1, 2 kış mevsimi; 3, 4 ilkbahar mevsimi; 5, 6 yaz mevsimi; 7, 8 sonbahar mevsimi)*

NUMUNE	KURU KAYISI				KURU ÜZÜM				KURU İNCİR			
NO	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
1	---	---	---	---	---	---	---	0.125	---	---	0.011	---
2	---	---	---	---	---	---	---	0.072	---	---	0.073	---
3	0.008	0.027	0.014	0.011	---	---	---	1.426	---	---	0.093	---
4	0.012	0.004	---	---	---	---	---	1.073	0.001	---	0.075	---
5	---	0.004	---	---	---	---	---	0.445	---	0.003	0.011	---
6	---	0.006	0.006	---	---	---	---	0.411	---	0.003	0.018	---
7	---	---	---	0.01	---	---	---	0.792	---	---	0.03	---
8	---	---	---	0.005	---	---	---	1.029	---	---	0.037	---
Ortalama	0.01	0.01	0.01	0.009	---	---	---	0.672	0.001	0.003	0.044	---
Standart Sapma	0.003	0.011	0.006	0.003	---	---	---	0.486	---	---	0.032	---

Çizelge 4.2. *Fındık, fıstık ve bademdeki aflatoksin miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$), (1, 2 kış mevsimi; 3, 4 ilkbahar mevsimi; 5, 6 yaz mevsimi; 7, 8 sonbahar mevsimi)*

NUMUNE	FINDIK				FISTIK				BADEM			
NO	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3	0.011	0.046	--	0.008	--	--	--	--	--	0.009	0.007	0.018
4	0.004	0.02	0.016	0.024	--	--	--	0.01	--	0.001	--	0.008
5	--	0.003	0.007	0.009	--	0.001	0.009	0.012	--	0.006	0.001	0.008

6	--	0.003	0.003	0.015	--	0.006	0.005	0.008	--	0.004	--	--
7	0.014	0.001	0.013	0.018	--	--	0.004	0.001	--	--	--	--
8	--	--	0.006	0.015	--	--	0.006	0.011	--	--	0.012	--
Ortalama	0.01	0.015	0.009	0.015	--	0.004	0.006	0.008	--	0.005	0.007	0.011
Standart Sapma	0.005	0.019	0.005	0.006	--	0.004	0.002	0.004	--	0.003	0.006	0.006

Çizelge 4.3. Mısır, karabiber ve kırmızıbiberdeki aflatoksin miktarları ($\mu\text{g/kg}$), (1, 2 kış mevsimi; 3, 4 ilkbahar mevsimi; 5, 6 yaz mevsimi; 7, 8 sonbahar mevsimi)

NUMUNE	MISIR				KARABİBER				KIRMIZIBİBER			
NO	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
1	----	0.002	----	0.01	0.011	----	0.082	0.028	21.14	2.04	0.187	---
2	0.001	0.002	----	0.019	0.012	----	0.105	0.016	14.35	1.49	0.137	---
3	0.009	0.008	0.005	0.01	----	0.008	----	----	15.46	1.786	0.018	---
4	0.008	0.008	0.004	0.007	----	0.016	----	----	17.2	1.967	0.18	---
5	0.126	0.052	----	----	----	----	0.078	0.016	9.208	0.701	0.1	---
6	0.128	0.053	----	----	----	----	0.04	0.01	9.598	0.715	0.089	---
7	2.754	0.135	----	----	----	----	0.049	----	9.357	1.375	0.05	---
8	2.201	0.117	----	----	0.001	----	0.028	0.013	11.17	1.537	0.061	---
Ortalama	0.747	0.047	0.005	0.012	0.008	0.012	0.064	0.017	13.44	1.451	0.103	---
Standart Sapma	1.194	0.053	0.001	0.005	0.006	0.006	0.029	0.007	4.358	0.513	0.061	---

Çizelge 4.4. Mevsimlere göre toplam aflatoksin miktarları ($\mu\text{g/kg}$)

MEVSİMLER	AF	Kuru Kayısı	Kuru Üzüm	Kuru İncir	Fındık	Fıstık	Badem	Mısır	Karabiber	Kırmızıbiber
KİŞ	B ₁	----	----	----	----	----	----	0.001	0.012	17.75
	B ₂	----	----	----	----	----	----	0.002	----	1.765
	G ₁	----	----	0.042	----	----	----	----	0.094	0.162
	G ₂	----	0.1	----	----	----	----	0.015	0.022	----
	Toplam Aflatoksin	----	0.1	0.042	----	----	----	0.018	0.127	19.68
İLKBAHAR	B ₁	0.01	----	0.001	0.008	----	----	0.009	----	16.33
	B ₂	0.016	----	----	0.033	----	0.005	0.008	0.012	1.877
	G ₁	0.014	----	0.084	0.016	----	0.007	0.005	----	0.099
	G ₂	0.011	1.25	----	0.016	0.01	0.013	0.009	----	----
	Toplam Aflatoksin	0.051	1.25	0.085	0.073	0.01	0.025	0.03	0.012	18.31

YAZ	B ₁	----	----	----	----	----	----	0.127	----	9.403
	B ₂	0.005	----	0.003	0.003	0.004	0.005	0.053	----	0.708
	G ₁	0.06	----	0.015	0.005	0.007	0.001	----	0.059	0.095
	G ₂	----	0.428	----	0.012	0.001	0.008	----	0.013	----
	Toplam Aflatoksin	0.065	0.428	0.018	0.02	0.012	0.014	0.18	0.072	10.21
SONBAHAR	B ₁	----	----	----	0.001	----	----	2.478	0.001	10.27
	B ₂	----	----	----	0.001	----	----	0.126	----	1.456
	G ₁	----	----	0.034	0.01	0.05	0.012	----	0.039	0.056
	G ₂	0.008	0.911	----	0.017	0.006	----	----	0.013	----
	Toplam Aflatoksin	0.008	0.911	0.034	0.028	0.056	0.012	2.604	0.053	11.78

Çizelge 4.5. Bekleme sürelerine göre ekmekteki aflatoksin miktarları (µg/kg)

EKMEK								
	1. PARALEL				2. PARALEL			
	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
1. GÜN	0.001	----	0.001	----	0.004	----	0.004	----
2. GÜN	0.006	----	0.012	----	0.006	0.001	0.013	----
3. GÜN	----	----	----	----	----	----	----	----
4. GÜN	----	----	0.009	----	----	----	----	----
5. GÜN	----	----	0.015	----	----	----	0.016	----
6. GÜN	0.006	----	0.008	----	0.012	----	0.01	----
7. GÜN	0.009	----	----	----	0.012	----	----	----
Ortalama	0.006	----	0.009	----	0.009	0.001	0.011	----
Standart Sapma	0.003	----	0.005	----	0.004	----	0.005	----

Çizelge 4.6. Bekleme sürelerine göre ekmekteki ortalama aflatoksin miktarları (µg/kg)

	EKMEK			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1. GÜN	0.003	----	0.003	----
2. GÜN	0.006	0.001	0.013	----
3. GÜN	----	----	----	----
4. GÜN	----	----	0.009	----
5. GÜN	----	----	0.016	----
6. GÜN	0.009	----	0.009	----
7. GÜN	0.011	----	----	----
Ortalama	0.007	0.001	0.01	----
Standart Sapma	0.004	----	0.005	----

Çizelge 4.7. Küflü peynirdeki aflatoksin miktarları ($\mu\text{g/kg}$)

KÜFLÜ PEYNİR								
	1.Paralel				2. Paralel			
	B1	B2	G1	G2	B1	B2	G1	G2
1. Örnek	----	----	0.08	0.306	----	----	0.011	----
2. Örnek	----	----	0.003	----	----	----	0.007	----
Ortalama	----	----	0.042	0.306	----	----	0.009	----
Standart Sapma	----	----	0.054	----	----	----	0.003	----

Çizelge 4.8. Küflü peynirlerdeki ortalama aflatoksin miktarları ($\mu\text{g/kg}$)

KÜFLÜ PEYNİR				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1. Örnek	----	----	0.046	0.306
2. Örnek	----	----	0.005	----
Ortalama	----	----	0.025	0.306
Standart Sapma	----	----	0.029	----

Çizelge 4.9. Örneklerdeki B1 ve toplam aflatoksin miktarları ($\mu\text{g/kg}$)

ÖRNEK TÜRÜ	ÖRNEK SAYISI	B1	TOPLAM AFLATOKSİN (B1+B2+G1+G2)
KURU KAYISI	4	0.01	0.041
KURU ÜZÜM	4	----	0.672
KURU İNCİR	4	0.001	0.045
FINDIK	4	0.004	0.04
FISTIK	4	----	0.026
BADEM	4	----	0.017
MISIR	4	0.654	0.708
KARABİBER	4	0.006	0.066
KIRMIZIBİBER	4	13.44	14.99

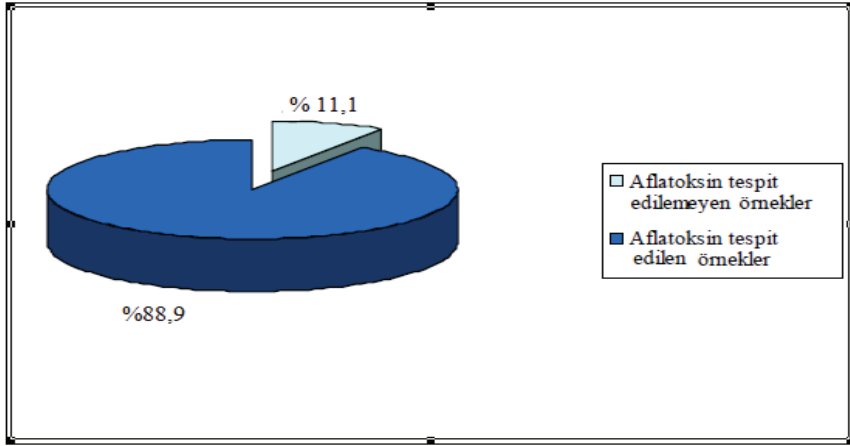
Çizelge 4.10. Ekme ve küflü peynirdeki B1 ve toplam aflatoksin miktarları ($\mu\text{g/kg}$)

ÖRNEK TÜRÜ	ÖRNEK SAYISI	B1	TOPLAM AFLATOKSİN (B1+B2+G1+G2)
EKMEK	7	0.007	0.008
KÜFLÜ PEYNİR	2	----	0.081

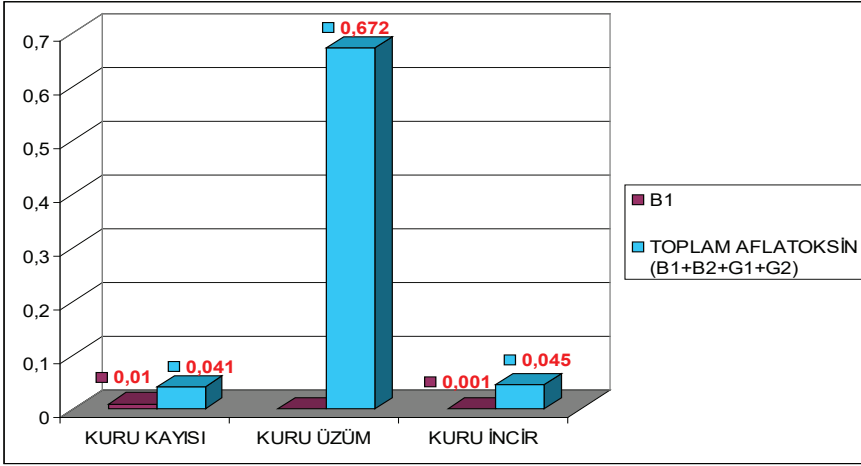
Çizelge 4.11. Alınan örneklerdeki ortalama aflatoksin miktarları ($\mu\text{g/kg}$)

AF Türü	ÖRNEK TÜRÜ								
	Kuru Kayısı	Kuru Üzüm	Kuru İncir	Fındık	Fıstık	Badem	Mısır	Karabiber	Kırmızıbiber
B_1	0.01 ± 0.003	----	0.001	0.01 ± 0.005	----	----	0.747 ± 1.194	0.008 ± 0.006	13.44 ± 4.358
B_2	0.01 ± 0.011	----	0.003	0.015 ± 0.019	0.004 ± 0.004	0.005 ± 0.003	0.047 ± 0.053	0.012 ± 0.006	1.451 ± 0.513
G_1	0.01 ± 0.006	----	0.044 ± 0.032	0.009 ± 0.005	0.006 ± 0.002	0.007 ± 0.006	0.005 ± 0.001	0.064 ± 0.029	0.103 ± 0.061
G_2	0.009 ± 0.003	0.672 ± 0.486	----	0.015 ± 0.006	0.008 ± 0.004	0.011 ± 0.006	0.012 ± 0.005	0.017 ± 0.007	----

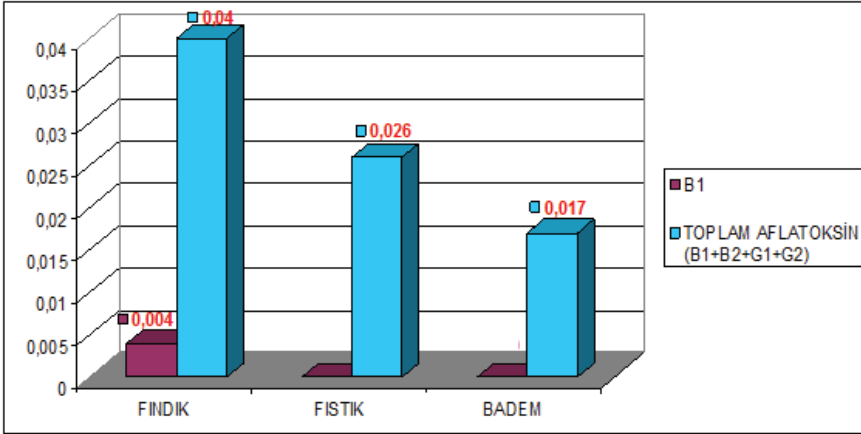
Elde edilen bulgulara göre analizi yapılan 45 örneğin 40 tanesinde yani % 88.9'unda aflatoksin tespit edilmiş, % 11.1'inde tespit edilememiştir. Aflatoksin içeren ve içermeyen örnek yüzdeleri Şekil 4.1'de verilmiştir.

**Şekil 4.1.** Aflatoksin içeren ve içermeyen örnek yüzdeleri

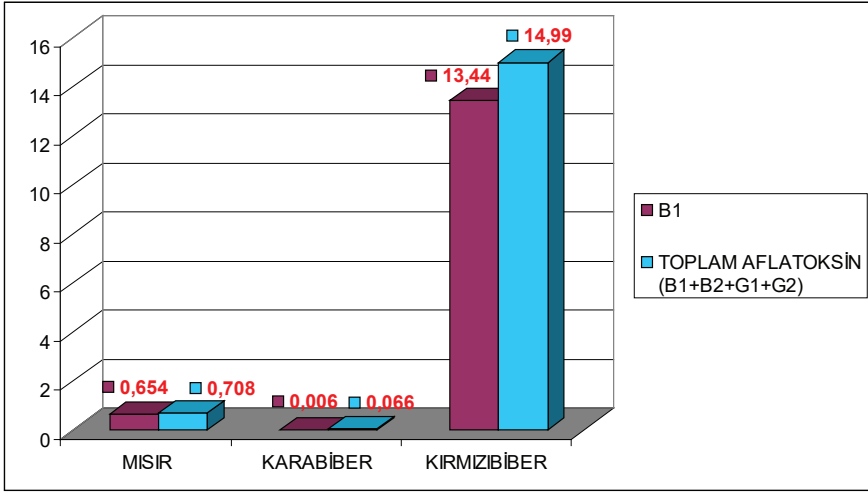
Kuru kayısı, kuru üzüm, kuru incir, fındık, fıstık, badem, mısır, karabiber, kırmızıbiber ekmek ve küflü peynir'de AFB1 ve toplam AF miktarlarının grafikte gösterilişi Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.



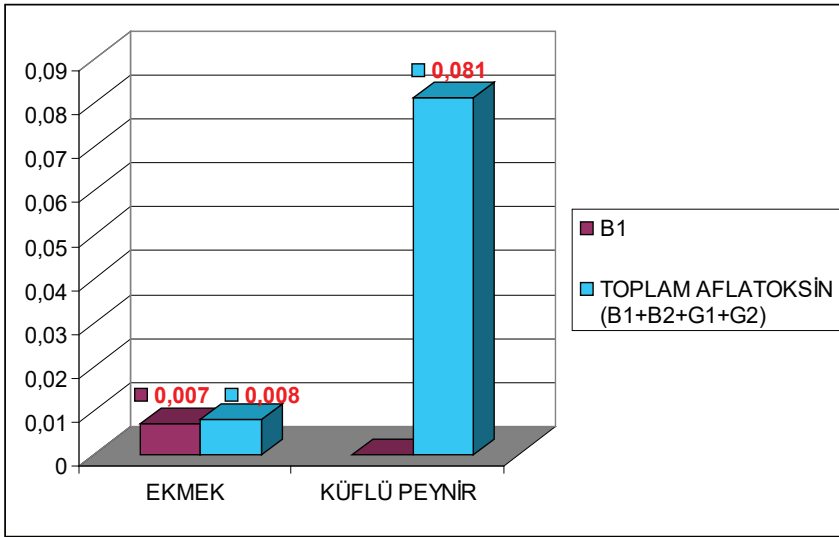
Şekil 4.2. Kuru kayısı, kuru üzüm ve kuru incirin AFB1 ve toplam AF (µg/kg)



Şekil 4.3. Fındık, fıstık, badem AFB1 ve toplam AF (µg/kg)



Şekil 4.4. Mısır, karabiber, kırmızıbiber AFB1 ve toplam AF (µg/kg)



Şekil 4.5. Ekmek, küflü peynir AFB1 ve toplam AF (µg/kg)

Gıdalardaki aflatoksinler ile ilişkili sağlık riskleri nedeniyle, gıdaların kalitesini ve aflatoksin içeriklerini belirlemek önemli bir konudur. Uluslararası ticarete, ihracat amacıyla aflatoksin standartlarına uyulması, ulusal üretimin kalitesini artırır ve tüketiciler için aflatoksin güvenliği olan ürünlerin tüketimini sağlar. Bilimsel çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, aflatoksin kontaminasyonunun düşük dozda bile yüksek kanserojen riski içerdiğini ortaya koymuştur. Böylece, insanların doğrudan tükettiği gıda

maddelerinde aflatoksin limiti daha düşük, fakat işlendikten sonra tüketilen gıda maddelerinde daha yüksek tutulmuştur.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine (Anonim, 2008) göre, fındık, yer fıstığı, antep fıstığı, badem, sert kabuklu meyveler, kurutulmuş meyveler, kayısı çekirdeği, mısır, kırmızıbiber, karabiber için (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) maksimum aflatoksin seviyesi, aflatoksin B1 için 5 µg/kg, toplam aflatoksin için ise 10 µg/kg'dır.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine (Anonim, 2011) göre, fındık, yer fıstığı, antep fıstığı, badem, sert kabuklu meyveler için (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) maksimum aflatoksin seviyesi, aflatoksin B1 için 8 µg/kg, toplam aflatoksin için ise 15 µg/kg'dır. Badem, antep fıstığı, kayısı çekirdeği meyveler için (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) maksimum aflatoksin seviyesi, aflatoksin B1 için 12 µg/kg, toplam aflatoksin için ise 15 µg/kg'dır. Kurutulmuş meyveler, badem, antep fıstığı, kayısı çekirdeği için (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşimi olarak kullanılan) maksimum aflatoksin seviyesi, aflatoksin B1 için 8 µg/kg, toplam aflatoksin için ise 10 µg/kg'dır. Mısır, kırmızıbiber, karabiber için (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) maksimum aflatoksin seviyesi, aflatoksin B1 için 5 µg/kg, toplam aflatoksin için ise 10 µg/kg'dır. Bu çalışmada her bir örnekten iki paralel hazırlanmıştır. Toplam örnek sayısı 45 ve ölçüm sayısı 90'dır. Buna göre incelenen örneklerden 64 (% 71.1) tanesi toplam aflatoksin ve AFB1 değerlerinin izin verilen maksimum seviyeyi aşan miktarların altında kalmıştır. 8 adet kırmızıbiber örneğinde ise toplam aflatoksin (B1, B2, G1, G2) ve AFB1 değerlerinin izin verilen maksimum seviyeyi aşan miktarlarda olduğu belirlenmiştir. Analizi yapılan 8 adet kuru kayısı örneğinin 6 tanesinde (% 75) aflatoksin G1, G2, B1, B2 saptanırken. 2 tanesinde (% 25) saptanamamıştır. 8 adet kuru üzüm örneğinin 8 tanesinde (% 100) aflatoksin G1 saptanmıştır, 8 adet kuru incir örneğinin 8 tanesinde (% 100) aflatoksin G1, B2 saptanmıştır. 8 adet fındık örneğinin 6 tanesinde (% 75) aflatoksin G1, G2, B1, B2 saptanmıştır, 2 tanesinde (% 25) saptanamamıştır. 8 adet fıstık örneğinin 4 tanesinde (% 50) aflatoksin G1, G2, B2 saptanmıştır, 4 tanesinde (% 50) saptanamamıştır. 8 adet badem örneğinin 4 tanesinde (% 50) aflatoksin B2, G1, G2 saptanmıştır, 4 tanesinde (% 50) saptanamamıştır. 8 adet mısır örneğinin tümünde (% 100) aflatoksin G1, G2, B1, B2 saptanmıştır. 8 adet karabiber örneğinin tümünde (% 100) aflatoksin G1, G2, B1, B2 saptanmıştır. 8 adet kırmızıbiber örneğinin tümünde (% 100) aflatoksin G1, G2, B1 saptanmıştır. 14 adet ekmek örneğinin 11

tanesinde (% 78.5) aflatoksin G1, B1, B2 saptanmıştır, 3 tanesinde (% 21.5) saptanamamıştır. 4 adet küflü peynir örneğinin tümünde (% 100) aflatoksin G1, G2 saptanmıştır. Örneklerde belirlenen en düşük aflatoksin miktarı 0.001 µg/kg, en yüksek miktar ise 21.14 µg/kg olarak belirlenmiştir. Dört mevsim semt pazarlarından açıkta satılan örneklerdeki en fazla aflatoksin miktarları: kuru üzüm, kuru incir, fındık ve bademin ilkbahar mevsiminde; mısır ve kuru kayısının yaz mevsiminde; karabiber ve fıstığın sonbahar mevsiminde; kırmızıbiberin ise kış mevsiminde olduğu belirlenmiştir. Avrupa Ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde gıdalar için belirlenmiş maksimum aflatoksin B1 miktarları: Hollanda, Belçika, İspanya, İrlanda, Yunanistan, Danimarka gibi ülkelerde tüm besinlerde maksimum 5 µg/kg; Almanya'da ise maksimum 2 µg/kg olarak verilmiştir. Bu seviyelere göre çalışmamızda sadece kırmızıbiber örneklerinde maksimum limitlerin üzerinde AFB1 belirlenmiştir. Diğer örneklerde ise AFB1 seviyeleri limitlerin altında kalmıştır. Maksimum toplam aflatoksin açısından bakıldığında: İsveç, Norveç, Avusturya, İsviçre, Belçika gibi ülkelerde tüm besinlerde toplam aflatoksin (B1, B2, G1, G2) 5 µg/kg; Almanya'da 4 µg/kg; ABD'de ise 20 µg/kg olarak verilmiştir. Bu seviyelere göre sadece kırmızıbiber örneklerinde maksimum limitlerin üzerinde toplam AF belirlenmiştir. Diğer örneklerde ise toplam AF seviyeleri limitlerin altında kalmıştır.

Bizim çalışmamızda her mevsimde alınan örnekler müstakil olarak alınmıştır. Bu sebepten mevsimler arası karşılaştırma yapmamız mümkün olmamaktadır. Ancak bir mevsimde alınan örnekler bekletilmek sureti ile sıra ile dört mevsim ölçülmüş olsa idi, mevsimler arası karşılaştırma yapmamız mümkün olacaktı. Kış ve sonbahar mevsimlerinin genellikle soğuk ve rutubetsiz geçmesi küf ve aflatoksin oluşumunu azalttığı kanaatindeyiz.

5. SONUÇ

Avrupa Birliği'nin maksimum aflatoksin limit uygulaması, sadece Türkiye'nin değil Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere pek çok gelişmiş ve gelişmekte olan ihracatçı ülkelerin aleyhine olmuştur. İhracat yapan ülkeler, yüksek maliyetler nedeniyle maksimum aflatoksin limitlerine uyumda zorlanmış ve bu ülkelerin ihracat gelirlerinde azalma olmuştur. Bu nedenle, Avrupa Birliği gümrüklerinden ihracat yapılan ürünlerin geri dönmesini önlemek amacıyla gerekli önlemler alınmalıdır. Yapılan çalışmada 45 örnekten 90 ölçüm yapılmış, bu ölçümlerden 82 ölçümde AFB1 ve toplam AF değerleri bakımından Türk Gıda Kodeksi Yönetmelikleri ve AB standartlarına göre daha düşük seviyede aflatoksin olduğu tespit edilmiştir. Ancak 8 ölçümde (kırmızıbiber) Türk Gıda Kodeksi Yönetmelikleri ve AB standartlarına göre belirlenen üst limitlerin üzerinde aflatoksin bulunmuştur. Yurt içinde tüketilen ve ihracatı yapılan ürünlerin hasat edilmesi, kurutma, işleme, depolama ve satışa sunma gibi işlemlerin gerçekleştirilmesi sırasında aflatoksin oluşumunu engelleyecek gerekli tedbirlerin alınması ve oluşuma etki eden faktörlerin belirlenerek çiftçilere, satıcılara ve ihracatçılara yönelik eğitim programları gerçekleştirilmesi hususunun ilgili makamlara bildirilmesi önem arz etmektedir. Özellikle kırmızıbiberlerde hasat öncesi ve sonrası işlemlerde önemli tedbirlerin alınması hususunda gerekli girişimin yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Agag, B.I., 2004. Mycotoxins in foods and feeds. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.*, 7 (1), 173-205.
- Akdemir, Ç., 2001. Ankara'da işlenen Sütlerde Aflatoksin M1 Varlığının ve Düzeylerinin HPLC ile Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara. Control*, 18: 454-457.
- Akdemir, Ç., Altıntaş, A., 2004. Ankara'da İşlenen Sütlerde Aflatoksin M1 Varlığının ve Düzeylerinin HPLC ile Araştırılması. *Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Derg.*, 51, 175-179.
- Anonim, 1992. Aflatoxin food protection report. *Mountly by Charles Felix Assoc.* 8:1. Akdemir, 3.
- Anonim, 2006. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210010320.pdf> Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları; *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü* 891112005.
- Anonim, 2007c. <http://www.ordutarim.gov.tr/subeleler/kontrol/aflatoksin/toksinler.htm>.
- Anonim, 2007d. <http://www.kkgm.gov.tr>.
- Anonim, 2008. *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (Tebliğ no: 2008/26), 16 Şubat 2009 tarih ve 27143 sayılı Resmi Gazete değişikliği).
- Anonim, 2011. *Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği*, Yürütme ve İdare Bölümü, 32 s, (29 Kasım, 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete değişikliği).
- Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.W., Marth, E.H., 1982. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxins. *J. Dairy Sci.*, 65, 1503-1508.
- Bakırcı, İ., 1995. Sütlerde Aflatoksin M1 Olusumu ve Ürünlere Geçisi Üzerinde Bir Araştırma. *Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van*.
- Banwart, G.J., 1989. Basic Food Microbiology. Second Edition, Published by Van Nostiond Reinhold, New York-Tokyo, 399-320.
- Barrios, N. J., Medina, L.M., Cordoba, M.G., Jordano, R. 1997. Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* isolated from cheese. *Journal of Food Protection*, 60(2);192-194.
- Bennet, J.W., Papa, K.E., 1988. The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Adv. Plant. Pathol.* 6, 263-280.

- Bullerman, L.B. 1981. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 64; 2439-2452.
- Cathey, C.G., Huang, Z.G., Sarr, A.B., Clement, B.A., Philips, T.D., 1994. Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M1 in milk. *J., Dairy Sci.*, 77, 1223-1231.
- Charles, R., Hurburg, J.R., 1995. Mycotoxins In the Grain Market. *World Grain* 1995. October, 26-33 s.
- Creppy, E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.*, 127, 19-28.
- Çoksöyler, N., Özkaya, Ş., 1987. Sağlam Kabuklu Fındıkta *Aspergillus Flavus* Penetrasyonu ve Toksin Oluşumu x. *Ulusal Biyoloji Kitabı* cilt 1, 179-183.
- Çoksöyler, N., 1999. Farklı yöntemlerle kurutulan kırmızı biberlerde *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoxin oluşumunun incelenmesi. *Gıda*, 24: 297-306.
- Davis, N.D., and Diener, U.L., 1978. Mycotoxins, Food and beverage mycology, L.R, Beuchat, AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 397-444.
- Demirer, M.A., Dinçer, B., Kaymaz, S., Alperden, Yalçın, S., Özer, E., 1989. Bazı gıda maddelerinde mikroflora ve mikotoksin araştırmaları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 36(1);85-107.
- Dragacci, S., Gleizes, E., Fremi, J.M., Candlish, A.A.G., 1995. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. *Food Add. Cont.*, 12 (1), 59-65.
- Duman, A.D., Zorlugenç, B., Evliya, B., 2002. Kahramanmaraş'ta kırmızı biberin önemi ve sorunları, *KSÜ Fen ve Müh Derg*, 5: 111-117.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cotty, P.J., 2005. Divergent regulation of aflatoxin production at acidic pH by two *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 159, 579-581.
- Eke, D., 1983. Fındıklarda Aflatoxin Gelişimi, *Doktora Tezi*, TÜBİTAK-MAE, Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü, İZMİR.
- Ender, G., 2001. Kaar Peynirinin Olgunlaştırılması Aşamasında Aflatoxin M1 Düzeyinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, izmir.
- Farber, P., Geisen, R., Holzapfel, W.H., 1997. Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *Int J Food Microbiology* 36, 215-220.
- Franco, C.M., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P., 1998. Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1 fluorescence and chromatographic studies. *J. Chrom. A*, 815, 21-29.

- Galvano, F., Galofaro, V., Galvano, G. 1996. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: A worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59 (10); 1079-1090.
- Gilbert, J., Anklaam, E., 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends Anal. Chem.*, 21, 468-486.
- Gürses, M., 2002. Tulum Peynirinde Farklı Depolama Şartlarında Aflatoksin Oluşum Potansiyelinin Belirlenmesi. *Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum*.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T., 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (7), 3086-3091.
- Harvey, R.B., Philips, T.D., Ellis, J.A., Kubena, L.F., Huff, W.E., Peterson, H.D., 1991. Effects on aflatoxin M1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin contaminated diets of dairy cows. *Am. J. Vet.*, 52 (9), 1556-1558.
- Heatcote, J.G., 1984. The Physical and Chemical Properties. 98-111 s, Vlademir, B. (Ed). *Mycotoxins*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-Newyork-Tokyo.
- Hopmans, E.C., 1997. Patulin, a mycotoxin in apples. *Perishables Handling Quarterly*, Issue No:91, 5-6.
- Iamanaka, B.T., Menezes, H.C., Vicente, E., Leite, R.S.F., Tanıwaki, M.H., 2007. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil, *Food*.
- Jay, J.M., 1992. *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall. London. 675 s.
- Johnson, A.H., Peterson, M.S., 1974. *Encyclopedia of Food Technology*. Vol. 2. The Avi Publishing Company Westport-Connecticut. 12-15 s.
- Karagözlü, N., Karapınar, M., 2000. Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Ochratoxin-A ve Fungal Kontaminasyon, *Türk J. Biol*, 24 (2000), 561-5.
- Karaman, S., Acar, B., 2006. Uluslararası Gıda Ürünleri Ticareti ve Aflatoksin Yasal Düzenlemeleri, *Doğuş Üniversitesi Dergisi*, 7 (2) 2006, 190-197.
- Kardeş, E., 2000. Türk Silahlı Kuvvetleri'ne bağlı birliklere alınan peynirlerde aflatoksin B1 ve aflatoksin M1 varlığının ve seviyelerinin saptanması. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
- Kaya, S., 2001. Mikotoksinler. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, ikinci Baskı. Editörler: Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. Medisan Yayınevi, 537-571.
- Kıvanç, M., 1990. Mold growth and presence of aflatoxin in some Turkish cheeses. *Journal of Food Safety*, 10, 287-294.

- Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A., 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 144–172.
- Lopez, C.E., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., Perez, J., 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 211-215.
- Lopez, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., Perez, J. 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. Journal Food microbiology*, 64, 211-215.
- Lopez-Diaz, T.M., Roman-Blanco, C., Garcia-Arias, M.T., Garcia-Fernandez, M.C., Garcia-Lopez, M.L., 1996. Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. *Int. Journal of Food Microbiology*, 30, 391-395.
- Mathot, P.J., 1989. Approach in the Netherlands Concerning Aflatoxin In Dried Figs. International Dried Figs and aflatoxin Symposium, Çeşme, Turkey, 4-8 April 1989.
- Mavuş, H., 2003. Kayseri yöresinde satışa sunulan sütlerden aflatoksin tayini. *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Omaye, S.T., 2004. Food and Nutritional Toxicology. CRC Press, ISBN 1-58716-071-4, 308 s.
- Oruç, H.H., 2005, Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri, *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 24 (2005), 1-2-3-4: 105-110.
- Özkaya, Ş., 2001. Ülkemizde Aflatoksin Sorunu Yaşanan Bazı Gıdalarda AFB1'in Azaltılması veya Giderilmesinde *Flavobacterium aurantiacum*'un Etkinliğinin Araştırılması. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora Tezi.* Ankara. 86 s.
- Özkaya, Ş., Temiz, A., 2003. Aflatoksinler, kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1, 1–21.
- Özmenteşe, N., 2002. İstanbul piyasasından sağlanan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin B1 ve M1 içerikleri yönünden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması. *Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.*
- Pittet, A., 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an updated review. *Med. Vet.*, 149 (6), 479-492.
- Rao, S.B.N., Chopra, R.C., 2001. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats. *Small Ruminant Research*, 41, 203–213.
- Roy, A.K., Chourasia, H.K., 1989. Effect of temperature on aflatoxin production in *Mucuna pruriens* seeds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (2), 531-532.

- Seyrek, K., 2001. Türk Silahlı Kuvvetleri'ne bağlı birliklerde tüketilen beyaz peynirlerdeki aflatoxin M1 seviyesinin ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) metodu ile saptanması. *Vet. Hek. Der. Derg.*, 55-58.
- Smith, J.E., 2001. Mycotoxins, (Edited by David H. Watson) Food Chemical Safety, CRC Press ISBN 0-8493-1210-8, 234-255.
- Sonal, S., Oruç, H.H., 2000. Bursa bölgesindeki tavuk çiftliklerinden sağlanan yemlerde mikotoksin düzeyleri. *Y.Y.Ü. Vet.Fak.Derg.*, 11 (2), 1-6.
- Steyn, P.S., 1998. The biosynthesis of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.*, 149 (6), 469-678.
- Stoloff, L., 1980. Aflatoxin M in Perspective. *J., Food Prot.*, 43, 226-230.
- Stubblefield, R.D., Shannon, G.M., 1974. Aflatoxin M1 analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. *J. Assoc. Off.*
- Şahin, E., 2003. Büyük Menderes ve Küçük Menderes Havzalarında Yetiştirilen Kurutmalık İncirlerde (*Ficus caria* L.) Aflatoksin ve Okratoksin A Varlığının, Dağılımının ve Kalite İle İlişkinin Araştırılması, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, doktora tezi*. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. İzmir.
- Tunail, N., 2000. Funguslar ve Mikotoksinler, ikinci Baskı. Editör, Tunail, N. Medisan Yayınevi, 4-34.
- Trucksess, M.W., Page, S.W., 1986. Examination of imported cheeses for aflatoxin M1. *Journal of Food Protection*, 49 (8), 632-633.
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., 1998. Gıda Mikrobiyolojisi 1. Baskı. Mengi Tan Basımevi. İzmir.
- Quillien, J.F., 2002. Mycotoxins. <http://www.fevia.be/pdf/Flair%20Flow%20>
- Van Egmond, H.P., 1989. Introduction. *Mycotoxins in dairy products*. 1-10. İn:Tekinsen, K.K., Tekinsen, O.C., 2005. Aflatoxin M1 in white pickle and Van otlı (herb) cheeses consumed in southeastern Turkey. *Food Cont.*, 16, 565-568.
- Van Genderen, H., 1997. Adverse Effects of Naturally Occurring Nonnutritive Substances (Edited by John De Vries). Food Safety and Toxicity, CRC Press, ISBN 0-8493-9488-0, 153-168 p.
- Verma, R.J., 2004. Aflatoxin cause DNA damage. *Int. J. Hum. Genet.*, 4 (4), 231-236.
- Vural, N., 1984, Toksikoloji: Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 56, Ankara, 416 s.

- Whitlow, L.W., Hagler, W.M., 2001. Mycotoxin contamination of feedstuffs, an additional stres factor for dairy cattle. 25. *symposium sur les bovins laitiers held on October 17, 2001* in St-Hyacinthe, Quebec.
- Whitlow, L.W., Hagler, W.M., 2002. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs*, 74 (28).
- Whitlow, L.W., Hagler, W.M., 2005. Mycotoxins in dairy cattle, occurrence, toxicity, prevention and treatment. *Proc. Southwest Nutr. Conf.*, 124-138.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries, a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80 (5), 1106-1122.
- Yaroğlu, T., 2002. Türk Silahlı Kuvvetlerine Bağlı Birliklerde Tüketime Sunulan Peynirlerde Aflatoksin M1 Düzeylerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.*
- Yiannikouris, A., Jouany, J.P., 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. *Anim. Res.*, 51, 81-99.