

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAYVAN YEMLERİNDE AFLATOKSİN TAYİNİ

MUHAMMET KUŞCU

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yasemin BAKIRCIOĞLU KURTULUŞ

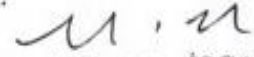
EDİRNE-2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı




Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet IŞCAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Yasemin BAKIRCIOĞLU KURTULUŞ
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından KİMYA Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

Prof. Dr. Yasemin BAKIRCIOĞLU KURTULUŞ

Prof. Dr. Süleyman AKMAN

Prof. Dr. Selçuk YURTSEVER

Doç. Dr. Mustafa ÖZCAN

Yrd. Doç. Dr. Mesut BOZ

İmza



.....
.....
S. Yurtsever
Mustafa
.....

Tarih: 07/11/2014

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.


07/11/2014
Muhammet KUŞCU

Doktora Tezi

Hayvan Yemlerinde Aflatoksin Tayini

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Aflatoksinler, önemli tarımsal ürünlerde sentezlenebilen (kabuklular, tahıllar vb.) küf metabolitleridir. İnsan ve hayvan sağlığı için önemli sağlık etkilerine neden olabilirler.

Bu çalışmada, hayvan yemlerinde aflatoksinlerin kantitatif tayini için, asetonun (% 55/45, % 70/30, % 85/15), metanolün (% 60/40,% 70/30,% 80/20), asetonitrilin (% 55/45, % 70/30, % 85/15) farklı karışımları kullanıldı. Metodun validasyonu için sertifikalı referans madde (hayvan yemi) ve spike yapılmış örnekler (hayvan yeminde toplam aflatoksinin farklı konsantrasyonları olarak; 1.3-2.6-5.2-10.4-15.6 µg/kg) kullanılmıştır. Belirlenen HPLC şartlarında ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 430$ nm, akış hızı: 1.0 mL/dk, kolon sıcaklığı: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 100 µL, C18 kolon, mobil faz: su/metanol/asetonitril (56/26/18) 120 mg KBr ve 350 µL 4M HNO₃ içeren) örnekler analiz edildi. Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2' nin geri alma oranları, %70/30 metanol/su karışımında kantitatif olarak bulunmuştur. Çalışma sonunda, seksen adet hayvan yemi örneğinin beş adedinde 10-20 µg/kg ve bir adet örnekte 122.51 µg/kg aflatoksin B1 tespit edilmiştir. Yirmi dokuz adet örnekte aflatoksin B1 tespit edilememiştir.

Örneklerin aflatoksin B1 ortalaması 4.78 µg/kg' dır. Sadece 1 adet örnek (122.51 µg/kg) yasal limiti aşmıştır.

Yıl : 2014
Sayfa Sayısı : 89
ANAHTAR KELİMELER : Aflatoksin, Ekstraksiyon, İmmunoaffinitesi, HPLC.

Doctorate Thesis

Analyze of Aflatoxins in Animal Feed

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

ABSTRACT

Aflatoxins are fungal metabolite that can be synthesized in important agricultural products (nuts, cereals, etc.) For human and animal health, aflatoxins cause important health effects.

In this study, different mixtures of acetone (% 55/45, % 70/30, % 85/15), methanol (% 60/40, % 70/30, % 80/20), acetonitrile (% 55/45, % 70/30, % 85/15), used for the quantitative determination of aflatoxins in animal feed. Certified reference material (animal feed) and spiked samples (different concentrations of total aflatoxin at animal feed: 1.3-2.6-5.2-10.4-15.6 µg/kg) are used for method validation. At optimized conditions for HPLC ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 430$ nm, flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 25 °C, injection volume: 100 µL, C18 column, mobil phase: water/methanol/acetonitrile (56/26/18) with 120 mg KBr and 350 µL 4M HNO₃) samples were analysed. Recoveries of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 were stable when samples were extracted with %70/30 methanol/water mixture. In this study, aflatoxin B1 were detected with 10- 20 µg/kg at five sample and 122.51 20 µg/kg at one sample.

At twenty nine of eighty sample aflatoxin B1 not detected. Mean aflatoxin B1 concentration of samples is 4.78 µg/kg. Only one sample (122.51 µg/kg) exceeded the legal limit of 20 µg/kg aflatoxin B1.

Year : 2014
Number of Pages : 89
KEYWORDS : Aflatoxin, Extraction, Immunoaffinity, HPLC.

ÖNSÖZ

Ülkemizde tarım ve hayvancılık faaliyetleri yoğun olarak yapılmaktadır. Mikotoksinler tarımsal ürünlerde ciddi etkiler oluşturan bileşiklerdir. Aflatoksinler dünyada en yaygın karşılaşılan mikotoksinlerdendir. Bugün, tespit edildiği günden beri hep gündemde olan aflatoksinlerin belirlenmesi, tarımsal ürünlere verdiği zararlar, insan ve hayvanlar için oluşturabileceği yüksek sağlık risklerinden dolayı önemlidir. Hayvan yemlerinde aflatoksinlerin belirlenmesi için yapılan bu çalışmanın, bu alanda katkı sağlayacağını düşünmekteyim. Bu düşüncelerle çalışmalarım sırasında;

Bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren Danışman Hocam, Değerli Büyüğüm

Sayın Prof. Dr. Yasemin BAKIRCIOĞLU KURTULUŞ'a,

Çalışmalarımı yakından takip eden

Sayın Prof. Dr. Selçuk YURTSEVER ve Doç. Dr. Dilek BAKIRCIOĞLU'ya,

Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne ve çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan anne ve babama,

İyi bir eğitim almamı sağlayan ablam Fatma Selda KUŞCU'ya,

Sabrından ve desteğinden dolayı eşim Songül KUŞCU'ya,

Çalışmalarımıza destek olan TÜBAP (Proje No: 2010-177)'a teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	2
YEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER	2
2.1. Yemlerin Sınıflandırılması.....	2
2.1.1. Kaba Yem.....	3
2.1.2. Karma (kesif) Yem.....	3
2.2. Karma Yem Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	3
BÖLÜM 3	5
AFLATOKSİNLER	5
3.1. Aflatoksinlerin Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri.....	7
3.2. Aflatoksin Oluşturan Faktörler	9

3.2.1. Rutubet Ve Su Aktivitesinin (a_w) Etkisi.....	11
3.2.2. Sıcaklık Etkisi	11
3.2.3. Diğer Faktörlerin Etkisi.....	11
3.3. Aflatoksinlerin Kontrol Altına Alınması	12
3.3.1. Hasat Öncesi Kontrol Yolları.....	13
3.3.2. Hasat Ve Sonrası Kontrol Yolları	13
3.3.3. Taşıma Sırasında Kontrol.....	14
3.4. Aflatoksinlerin Detoksifikasyonu	14
3.4.1. Fiziksel Metotlar	15
3.4.2. Kimyasal Metotlar.....	16
3.4.3. Biyolojik Metotlar	16
3.5. Aflatoksinlerin Canlılar Üzerine Etkileri	18
BÖLÜM 4.....	20
AFLATOKSİNLERİN BELİRLENMESİ.....	20
4.1. Numune Ön Hazırlık Metotları	21
4.1.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (SSE).....	22
4.1.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon (SFE).....	22
4.1.3. Kat Faz Ekstraksiyonu (KFE)	23
4.2. Ayırma Metotları.....	23
4.2.1. Kromatografik Metotlar	23
4.2.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	24
4.2.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	24
4.2.1.3. Gaz Kromatografisi (GC)	25
4.2.2. ELISA (Enzim-Bağlantılı Immunosorbent Assay) Bazlı Yöntemler.....	25
BÖLÜM 5.....	26
YEM VE YEM HAMMADDELERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	26
5.1. Dünya’da Ve Türkiye’de Yasal Mikotoksin Sınırları.....	30
BÖLÜM 6.....	35
DENEYSEL BÖLÜM	35
6.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
6.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	36
6.3. Örneklerin Toplanması.....	36

6.4. Örneklerin Öğütülmesi ve Saklanması	37
6.5. Rutubet Tayini	38
6.6. Örneklerin Kalite Analizlerinin Yapılması	39
6.6.1. Ham Kül Tayini	41
6.6.2. Ham Selüloz Tayini	43
6.6.3. Ham Protein Tayini	43
6.7. Aflatoksin Tayini	45
6.7.1. Aflatoksin Tayini İçin HPLC Şartlarının Belirlenmesi.....	45
6.7.2. Türevlendirme	46
6.7.3. Aflatoksin B1,B2,G1,G2' nin Tanımlanması Ve Lineer Çalışma Aralığının Belirlenmesi	47
6.7.4. Ekstraksiyon Ve Temizleme (Clean-up) Basamağı	53
6.7.4.1. Asetonun Farklı Oranlardaki Karışımlarının Denenmesi	54
6.7.4.2. Asetonitrilin Farklı Oranlardaki Karışımlarının Denenmesi.....	59
6.7.4.3. Metanolün Farklı Oranlardaki Karışımlarının Denenmesi	59
6.7.5. LOD (Limit of Detection) ve LOQ (Limit of Quantification) Değerlerinin Belirlenmesi	66
6.7.6. Sertifikalı Referans Madde (CRM) Kullanılarak Yapılan Çalışmalar	67
6.7.7. Gerçek Örneklerin Aflatoksin Miktarlarının Belirlenmesi	67
BÖLÜM 7	73
SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMALAR	73
7.1. Örneklerin Kalite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	73
7.2. Rutubet Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	74
7.3. Ekstraksiyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	75
7.4. CRM Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	84
7.5. Örneklerin Aflatoksin Sonuçlarının Değerlendirilmesi	85
7.6. Tartışma.....	87
KAYNAKLAR	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

a_w	su aktivitesi
$^{\circ}\text{C}$	santigrat derece
dk	dakika
g	gram
kg	kilogram
M	Molar
mg	miligram
mL	mililitre
ng	nanogram
nm	nanometre
ppb	milyarda bir kısım
ppm	milyonda bir kısım
λ_{ex}	Emisyon dalgaboyu
λ_{em}	Absorpsiyon dalgaboyu
μA	Mikroamper
μg	mikrogram
UV	ultraviole

Kısaltmalar

A.B.	Avrupa Birliği
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
ATA	Alimentary Toxic Aleukia
CIT	Sitrinin
DAD	Diod–Array Dedektör
DNA	Deonükleik asit
DON	Deoksinivalenol
ELISA	Enzim-Bağlantılı Immunosorbent Assay
FLD	Floresans Dedektör
FUM	Fumonisin
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Likit Kromatografi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
KFE	Kat Faz Ekstraksiyonu
LOD	Limit of dedection
LOQ	Limit of quantification
Mak	Maksimum
Min	Minumum
MS	Kütle Spektrometresi
OTA	Okratoksin-A
PC	Kağıt Kromatografisi
RNA	Ribonükleik asit
SFE	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon
SSE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu
TDI	Günlük alınabilecek kabul edilebilir doz
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
U.S.A.	Amerika Birleşik Devletleri

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Karma yem üretiminde kullanılan bitkisel kaynaklı hammaddeler.	4
Tablo 3.1. Mikotoksin türleri, küf çeşidi ve bulunduğu ürünler	6
Tablo 3.2. Aflatoksinlerin çeşitli fiziksel özellikleri.	9
Tablo 3.3. Aflatoksinlerin ısı ile uzaklaştırılması uygulamalarına örnekler	17
Tablo 5.1. Asya ve Okyanus bölgesi kaynaklı hayvan yemi ve yem maddelerinde mikotoksin kontaminasyonunun varlığı	27
Tablo 5.2. Avrupa ve Akdeniz bölgesi kaynaklı hayvan yemi ve yem maddelerinde mikotoksin kontaminasyonunun varlığı	28
Tablo 5.3. Amerika bölgesinde yapılan çeşitli çalışmalar.....	29
Tablo 5.4. Avrupa Birliği ülkelerinde yürürlükte olan gıda, yem ve yem maddelerinde mikotoksin sınırları	32
Tablo 5.5. Çeşitli ülkelerde yürürlükte olan gıda, yem ve yem maddelerinde mikotoksin sınırları	33
Tablo 5.6. Türkiye’de yem ve yem maddelerinde mikotoksin seviyeleri	34
Tablo 6.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.	35
Tablo 6.2. Ana Stok aflatoksin konsantrasyonları.....	36
Tablo 6.3. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler.	37

Tablo 6.4. Örnek kodları ve türleri.....	39
Tablo 6.5. % Rutubet sonuçları.....	40
Tablo 6.6. % Ham kül sonuçları.....	42
Tablo 6.7. % Ham selüloz sonuçları.....	44
Tablo 6.8. % Ham protein sonuçları.....	45
Tablo 6.9. Gıda ve yem maddelerinde Aflatoksin B1 için maksimum limitler	47
Tablo 6.10. Çalışmalarda uygulanan HPLC şartları.....	48
Tablo 6.11. II. Aşama Standart çözelti son konsantrasyonları	49
Tablo 6.12. II. Aşama stok çözülden 6 basamaklı çalışma aralığı hazırlanması.....	49
Tablo 6.13. Çalışma aralığı basamaklarında bulunan aflatoksin konsantrasyonları	49
Tablo 6.14. Aflatoksin piklerinin çıkış zamanları, miktarları ve alanları.	51
Tablo 6.15. Örneklere ilave edilen aflatoksin standartlarının içerikleri.....	55
Tablo 6.16. % 55-45 Aseton-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	56
Tablo 6.17. % 70-30 Aseton-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	57
Tablo 6.18. % 85-15 Aseton-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	58
Tablo 6.19. % 55-45 Asetonitril-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	60
Tablo 6.20. % 70-30 Asetonitril-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	61
Tablo 6.21. % 85-15 Asetonitril-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	62
Tablo 6.22. % 60-40 Metanol-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	63
Tablo 6.23. % 70-30 Metanol-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	64
Tablo 6.24. % 80-20 Metanol-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.....	65
Tablo 6.25. Spike yapılarak hazırlanmış son konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{kg}$).	66
Tablo 6.26. Hesaplanan LOD ve LOQ değerleri.....	66
Tablo 6.27. ERM – BE 376 Sertifikalı Referans Madde içeriği.	67
Tablo 6.28. CRM'nin %80-20 metanol-su ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçlar.....	68
Tablo 6.29. CRM'nin %70-30 metanol-su ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçlar.....	68
Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları.	69
Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları (devam)	70
Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları (devam).	71
Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları (devam).	72
Tablo 7.1. Karma yem ve küspe normları kriterleri.	74
Tablo 7.2. Örneklerin farklı düzeylerde % rutubet içerikleri	75

Tablo 7.3. Aflatoksin G2 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.	76
Tablo 7.4. Aflatoksin G1 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.	78
Tablo 7.5. Aflatoksin B2 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.	80
Tablo 7.6. Aflatoksin B1 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.	82
Tablo 7.7. Örneklerde bulunan aflatoksin B1 'in farklı aralıklarda bulunan oranları.	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Mikotoksin üretici küf ve mantarların taksonomisi.....	7
Şekil 3.2. Aflatoksin B1 ^A , B2 ^B , G1 ^C , G2 ^D , M1 ^E nin kimyasal yapıları.....	10
Şekil 6.1. Numunelerin öğütme öncesi ve öğütme sonrası durumu	38
Şekil 6.2. Yemlerin bileşenleri	41
Şekil 6.3. Aflatoksin G2, G1, B2, B1 piklerinin çıkış zamanları ve tanımlamaları	50
Şekil 6.4. Aflatoksin G2 için kalibrasyon grafiği	52
Şekil 6.5. Aflatoksin G1 için kalibrasyon grafiği	52
Şekil 6.6. Aflatoksin B2 için kalibrasyon grafiği	53
Şekil 6.7. Aflatoksin B1 için kalibrasyon grafiği	53
Şekil 6.8. Aflatoksin içermeyen karma yem örneği (HPLC kromatogramı).	55
Şekil 7.1. Aflatoksin G2 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları.	77
Şekil 7.2. Aflatoksin G1 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları.	79
Şekil 7.3. Aflatoksin B2 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları.	81

Şekil 7.4. Aflatoksin B1 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları	83
--	----

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kuraklık, aşırı seller, biyolojik ve kimyasal kirlenmeler, büyük çevre felaketleri, dünya nüfusunun hızlı artışı, tarımsal faaliyetlerde önemli değişiklikler meydana getirmektedir. Meydana gelen değişiklikler hayvancılığı etkilemektedir.

Dünya’ da yıllık yem üretimi 2008 yılı verilerine göre 650 milyon ton civarındadır [1]. Bu kadar büyük üretim içinde, yemlerin mikotoksinlerle kirlenmesi önemli kayıplara neden olmaktadır. Dünya tahıl üretiminin %1’i mikotoksinlerle kullanılmaz hale geldiği, %20’ sinin ise kirlenildiği düşünüldüğünde, ülkemizin yıllık yem üretimine eş değer bir rakamda zarar söz konusu olur [2]. Yine aynı şekilde Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D) sadece deoksinivalenol denilen bir mikotoksin çeşidinden dolayı yıllık kayıpların 650 milyon dolar olduğunu düşünüldüğünde mikotoksin bulaşmasının hayvancılık sektöründeki ekonomik kaybın ne kadar önemli olduğunu görebiliriz [3]. Böyle bir ekonomik zarar bizim ülkemiz için de ciddi bir tehdit içermektedir. Tabii ki bu sadece hayvancılık açısından maddi olarak önemlidir. Mikotoksin kirlenmesini bir de sağlık yönünden ele aldığımızda uğrayabileceğimiz zarar daha da artmaktadır. Mikotoksinlerin bir kısmı kanserojenik etki gösterirken, bir kısmı nefrolojik ve mutajenik etkiler göstererek ciddi sonuçlar doğuracak sağlık sorunlarına neden olmaktadır.

Tüm bu saydığımız nedenlerden dolayı Dünya genelinde yaklaşık 77 ülkede mikotoksinler ile ilgili yasal düzenlemeler yapılmıştır. En sert önlemlerin A.B.D. ve Avrupa Birliği ülkelerinde alındığını, ülkemizde de bu düzenlemelerin Avrupa Birliği düzenlemeleri paralelinde yürütüldüğünü görmekteyiz. Bu sebeplerden dolayı mikotoksinlerin sıkı kontrolünün yapılması önemlidir.

BÖLÜM 2

YEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER

İnsanlar gibi hayvanlar da canlılıklarını sürdürebilmeleri için karbonhidrat, yağ, protein, vitamin, mineral maddeler gibi hücrelerin temel yapı maddelerine ihtiyaç duyar. Hayvanlar bu maddeleri kullanarak süt, et, yumurta gibi hayvansal ürünlere dönüştürürler. İhtiyaç duyulan bu maddeler bazen bitkilerden, bazen içtikleri sudan ve bazen de yemlerden sağlanmaktadır.

Yemin bugüne kadar birçok tanımı yapılmış olsa da en genel anlamda hayvancılıkta beslenme amacıyla kullanılan tüm maddeleri “yem” olarak tanımlayabiliriz [4]. Daha bilimsel bir tanımla, “hayvanlara yedirildiğinde, hayvanın sağlığına zararlı etkisi olmayan, hayvanların yaşamlarını sürdürmelerini ve verim vermelerini sağlayan, hayvanların yararlanabileceği formlarda organik ve inorganik besin maddeleri içeren maddelere” yem denir [5]. Yemin ülkemizdeki tanımı ise “hayvanların ağız yoluyla beslenmesi amacıyla kullanılan işlenmiş, kısmen işlenmiş veya işlenmemiş yem katkı maddeleri dâhil her türlü madde veya ürün” olarak ifade edilmektedir [6].

2.1. Yemlerin Sınıflandırılması

Yemler, bitkisel (otlar, tahıllar gibi) veya hayvansal kaynaklar (süt) içeren doğal ürünlerden oluşabilmelerinin yanında, bu kaynakların işlenmesi sonucu oluşan artıklar (kepekler, küspeler) ve bunların yan ürünlerinden (mısır gluteni, kan ve kemik unu, süt tozu) meydana gelebilmektedirler.

Hayvancılığın çok çeşitli olması ve de yemlerde kullanılan ürünlerin zenginliği, yemlerin bilimsel olarak sınıflandırılmasında zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Bazı bilimsel kaynaklarda, sahip olunan ortak özelliklere göre (suca zengin yemler, kaba yemler, endüstri yan ürünleri gibi) gruplandırılma yapılırken, bazılarında ise üretim

durumları ile (çiftlik yemi ve ticari yemler) sınıflandırılma yapılmıştır [7]. En genel, kolay ve anlaşılır sınıflandırma kaba yem ve kesif (karma) yem şeklindedir [8].

2.1.1. Kaba Yem

Hiçbir işlem görmeden, hayvanlara yedirilen yemlerdir. İçerdiği su oranına göre sulu ve kuru kaba yemler olarak ikiye ayrılabilir. Sulu kaba yemler; çayır ve meralar, kök ve yumru yemler, yaş meyve ve sebzeler, ağaçların dal ve yaprakları, silajlar gibi ürünlerdir. Kuru kaba yemler; kuru otlar, saman, kılıf, kabuk ve kavuz gibi ürünlerdir.

2.1.2. Karma (kesif) Yem

Fabrika yemi (sanayi yemi) karma yem olarak da bilinmektedir. Yemin tarifinde olduğu gibi, karma yem için farklı amaçlara hizmet eden yapılar (çiftçiler, yem üreticileri, bilim insanları ve yasa koyucular) için farklı tanımlamalar yapılabilmektedir.

Bilimsel olarak karma yemin herkes tarafından kabul edilebilecek tanımı “karma yem evcil hayvanların çok miktarda ve nitelikli ürün verebilmelerini sağlayan, yapısı garanti edilmiş ve ağız yoluyla tüketilen organik ve anorganik maddeler karışımıdır [9]. Diğer bir tanım ise; hayvanların ağızdan beslenmesi için tam veya tamamlayıcı yem şeklinde, yem katkı maddelerini içeren veya içermeyen, en az iki yem maddesinin karışımıdır [10].

Karma yemler; hayvanın türü, cinsi, yaşı ve miktarına dikkat edilerek hazırlanırlar. Tüm bu faktörlerden ötürü karma yem üretiminde çok çeşitli hammaddeler kullanılmaktadır [7].

2.2. Karma Yem Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Karma yem üretiminde, hayvanın ihtiyacını karşılayacak şekilde bitkisel kaynaklı hammaddeler, hayvansal kaynaklı hammaddeler ve yem katkı maddeleri kullanılmaktadır [5]. Karma yemler hazırlanırken, bitkisel kaynaklı hammaddelerden % 90 oranında, hayvansal ve mineral kaynaklardan ise daha az oranlarda yararlanılır.

Bitkisel kaynaklı hammaddeler (Tablo 2.1), öncelikle enerji ve protein ihtiyaçları olmak üzere, pelet bağlayıcı ve yemde lezzet artırıcı özelliklerinden dolayı da karma yemlerde kullanılırlar.

Tablo 2.1. Karma yem üretiminde kullanılan bitkisel kaynaklı hammaddeler.

Enerji verimi yüksek yem hammaddeleri	Tahıl taneleri (Arpa, mısır, çavdar, buğday, sorgum, yulaf gibi) ile endüstriyel yan ürünler (arpa, buğday, çavdar, mısır kepekleri, melas)
Protein verimi yüksek yem hammaddeleri	Küspe çeşitleri (Ayçiçek tohumu küspesi, pamuk tohumu küspesi, yer fıstığı küspesi, soya fasulyesi küspesi, keten tohumu küspesi, fındık içi küspesi ve gibi yağ sanayi yan ürünleri)
Protein ve enerji verimi yüksek yem hammaddeleri	Bezelye, bakla, soya fasulyesi, burçak gibi baklagil taneleri.

Karma yem endüstrisinde et-kemik unu, balık unu, tavuk unu gibi hayvansal kökenli yem hammaddeleri de bitkisel ürünlerle beraber kullanılmaktadır. Yemlerde kullanılan katkı maddeleri (vitaminler, mineral maddeler, probiyotikler vb.) ise yemlerin bozulmasını önleyici, sindirime yardımcı ve büyümeyi hızlandırıcı gibi etkiler gösterirler [7].

BÖLÜM 3

AFLATOKSİNLER

Mikotoksinler düşük molekül ağırlığında olup, belirli küfler (aspergillus, fusarium, penicillium gibi) tarafından üretilen kimyasal bileşiklerdir. Aflatoksin, okratoksin, zearalenon, fumonisin, patulin, deoksinivalenol en bilinen mikotoksinlerdendir [12]. Mikotoksinlerin, hangi amaç ile küfler tarafından oluşturulduğu belli değildir. Fakat sıcaklık, pH, rutubet, su aktivitesi gibi bazı faktörlerin mikotoksin oluşturdıkları bilinmektedir.

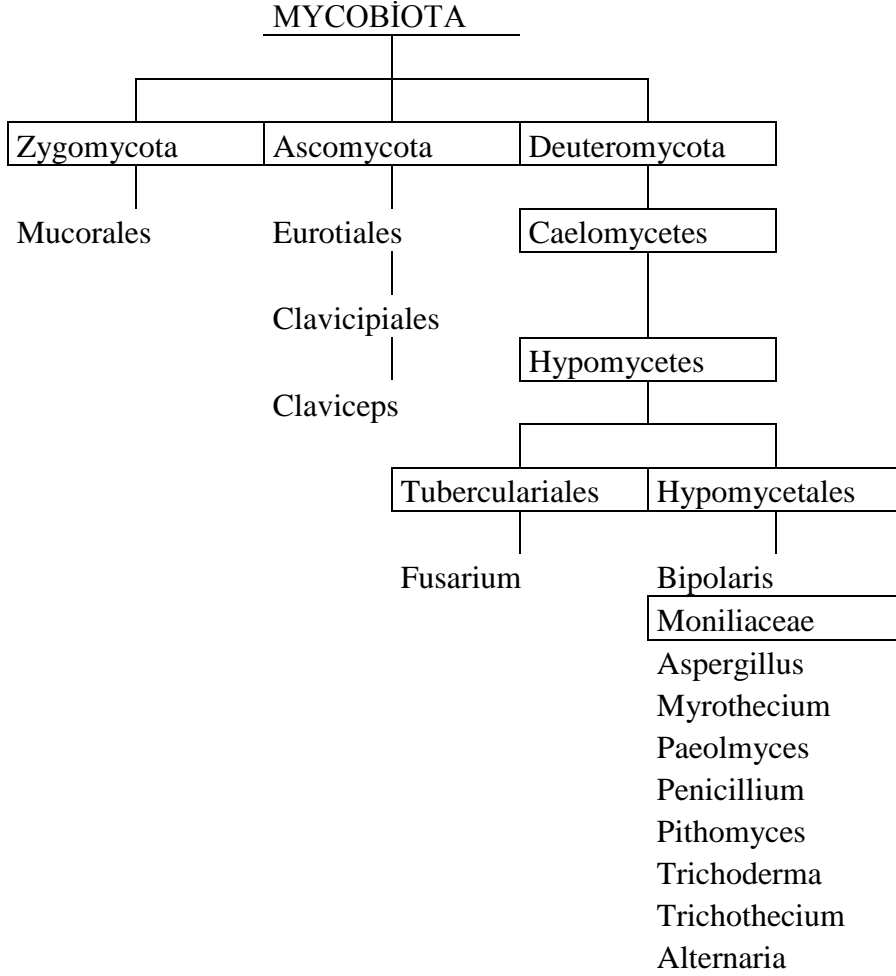
Şimdiye kadar 70.000 mantar türü raporlanmış ve tanımlanmıştır. Mantarlar, hasat öncesi (tarla seviyesinde) veya hasat sonrası durumlarda (depo, ulaşım ve işlemede) yayılabilir, kolinize olabilir ve mikotoksin üretebilir. Bugün kimyasal yünden tanımlanmış 60 kadar mikotoksin grubu bilinmektedir[13]. Gıda ve yemlerde çoğunlukla rastlanılan, mikotoksin üreten küfler ve bunların toksinleri Tablo 3.1' de verilmiştir.

Mikotoksinlerin tanımlanması; hangi küf tarafından, hangi cins üründe oluştuğuna bakılarak yapılır. Bu tanımlamanın doğru yapılabilmesi için de küf ve mantarın aleminden türe kadar olan sınıflama içindeki yerini bilmek gerekmektedir. Şekil 3.1, mikotoksin üretici küf ve mantarların (Aspergillus, Penicillium, Alternaria ve Fusarium) Mycobiota alemi içindeki yerlerini göstermektedir [2].

Sentez edilen bir mikotoksinin hangi küf ve mantar tarafından sentezlendiğini biliyorsak isimlendirmeyi yapabiliriz. En yaygın olarak bulunan mikotoksin çeşidi olan aflatoksin, aspergillus türleri tarafından sentezlenir ve tanımlaması da **Aspergillus Flavus**' un baş harfleri ve “*toksin*” kelimesi kullanılarak “*Afla*” ön adı ile beraber aflatoksin olarak isimlendirilir [15].

Tablo 3.1. Mikotoksin türleri, küf çeşidi ve bulunduğu ürünler [14].

Mikotoksin Türü	Toksini Üreten Küf Çeşidi	Bulunduğu Ürün	Memeli Hayvanlara Etkileri
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus ostianus</i> , <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium citrinium</i> <i>Aspergillus nomius</i>	Antep fıstığı, Yerfıstığı, Fındık, Pirinç, Soya, Mısır, Baharatlar, Kakao, Süt ve süt ürünleri, Yemler.	Hepatotoksik, kanserojen, Teratojen (AFB ₁)
Okratoksin	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus sulph ureus</i> <i>Aspergillus ostianus</i> <i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium commune</i>	Arpa, Mısır, Buğday, Çavdar, Fındık, Yerfıstığı, Kahve, Peynir, Soya, Kakao.	Nefrotoksik, hepatotoksik, teratojen, immunosupresif
Patulin	<i>P.patulum</i> , <i>P.rugulosum</i> , <i>P.cyclopi</i> , <i>P.expensum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>	Meyve suları (elma suyu, armut suyu) Peynirler	Nörotoksik, hücreye toksik
Rubratoksin	<i>Pen. Rubrum</i> , <i>P. Purpurogenum</i>	Mısır	Hepatotoksik, teratojen
Trikotesenler (T-2 Toksin, Nivalenol)	<i>F.sporotrichioides</i> , <i>F. Graminearum</i> <i>Myrothecium roridum</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Mısır Diğer çeşitli tahıllar	Alimentary Toxic Aleukia (ATA), kusma, lökopeni, deri nekrozları
Zaeralenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fus. culmorum</i> , <i>Fus. Equiseti</i> , <i>Fusarium moniloforme</i> <i>Fusarium tricinctum</i>	Mısır ve çeşitli tahıllar	Östrojen benzeri etki
Sitrinin	<i>Penicillium citrinium</i> , <i>A. Terreus</i>	Arpa, Çavdar, Buğday, Darı, Pirinç, Peynir.	Nefrotoksik, nörotoksik



Şekil 3.1. Mikotoksin üretici küf ve mantarların taksonomisi.

3.1. Aflatoksinlerin Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri

Aflatoksinler, *aspergillus flavus*, *aspergillus parasiticus*, *aspergillus nomius*, *aspergillus bombycis*, *aspergillus ochraceoroseus* ve *aspergillus pseudotamari* türleri tarafından belirli şartlar altında üretilen sekonder metabolitlerdir [16]. Bu türlerden *aspergillus flavus* aflatoksin B1 ve aflatoksin B2'nin, *aspergillus parasiticus* aflatoksin B1 ve B2, aflatoksin G1 ve G2' nin üretiminden sorumlu olduğu bildirilmektedir [17].

Aflatoksinlere en çok bitkisel ürünlerde karşılaşılır. Kabuklu ürünler ve bunlardan yapılmış ürünler (fındık, antep fıstığı, yer fıstığı, ceviz, badem, bunlardan yapılmış ezmeleler, çikolata), tahıllar (buğday, mısır, arpa, çavdar, pirinç, yulaf), tahıllardan yapılmış ürünler

(kepek, un, irmik, makarna), yağlı tohumlar (susam, ayçiçeği, kolza, pamuk tohumu), baklagiller (fasulye, bezelye, mercimek, soya fasulyesi) kahve çekirdeği, kakao, baharatlar (karabiber, kırmızı biber) ve kurutulmuş meyveler (kuru üzüm, incir) en çok karşılaşılan bitkisel ürünlerdir [18].

Hayvansal ürünlerde süt ve süttten yapılmış ürünler (süt tozu, krema, tereyağı, peynir) aflatoksin M1 ile kontamine olabilmektedir [19]. Hayvan yemleri, yemlerde kullanılan darı, mısır, sorgum, küspeler (yer fıstığı, ayçiçeği, soya, pamuk tohumu küspeleri) gibi hammaddelerden dolayı, aflatoksin ile kontamine olmaktadır.

Aflatoksinler, renksizden soluk sarıya doğru renklenebilen kristal yapıda bileşiklerdir. Aflatoksinler 362 nm' de UV ışığı şiddetli olarak absorplarlar ve 425-450 nm'de UV ışıkta mavi, yeşil, mavi-yeşil renklerde olmak üzere son derece floresans özellik gösterirler. Aflatoksin B1 ve B2 mavi, Aflatoksin G1 yeşil, Aflatoksin G2 mavi-yeşil renkte floresans gösterirler. Aflatoksinlerin floresans özelliklerinden yararlanarak floresans dedektör ile tayinleri yapılmaktadır.

Aflatoksinler 300 °C gibi yüksek sıcaklıklarda bile dayanıklı olmalarına rağmen, güneş ışığına, oksijen varlığında UV ışığa, düşük (<3) ve yüksek (>10) pH seviyelerine ve oksitleyici maddelere karşı kararlı özellik göstermezler. Aflatoksinler, suda 10-30 µg/mL arasında biraz, polar-olmayan çözücülerde hiç, polar organik çözücülerde orta derecede (kloroform, metanol vb.) ve özellikle dimetil sulfoksitte tamamen çözünebilirler [20]. Aflatoksinlerin çeşitli fiziksel özellikleri Tablo 3.2' de verilmiştir [21].

Aflatoksinler, di-furan kumarin bileşikleridir (yapılarında lakton ve bifuran bağlantısı bulundurlar). Difurokumarosikloptenon (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A) ve difurokumarolakton (AFG1 ve AFG2) şeklinde iki grupta sınıflandırılırlar. Bunlardan AFB1 gıdalarda ve yemlerde en bol bulunan çeşittir [16].

Günümüzde aflatoksinlerin 18 çeşit türü tanımlanmış olup, en yaygın ve temel olanları aflatoksin G1, G2, B1 ve B2'dir. Aflatoksin M1, M2, B2A, G2A diğer ana tür olup, düşük miktarlarda üretilir.

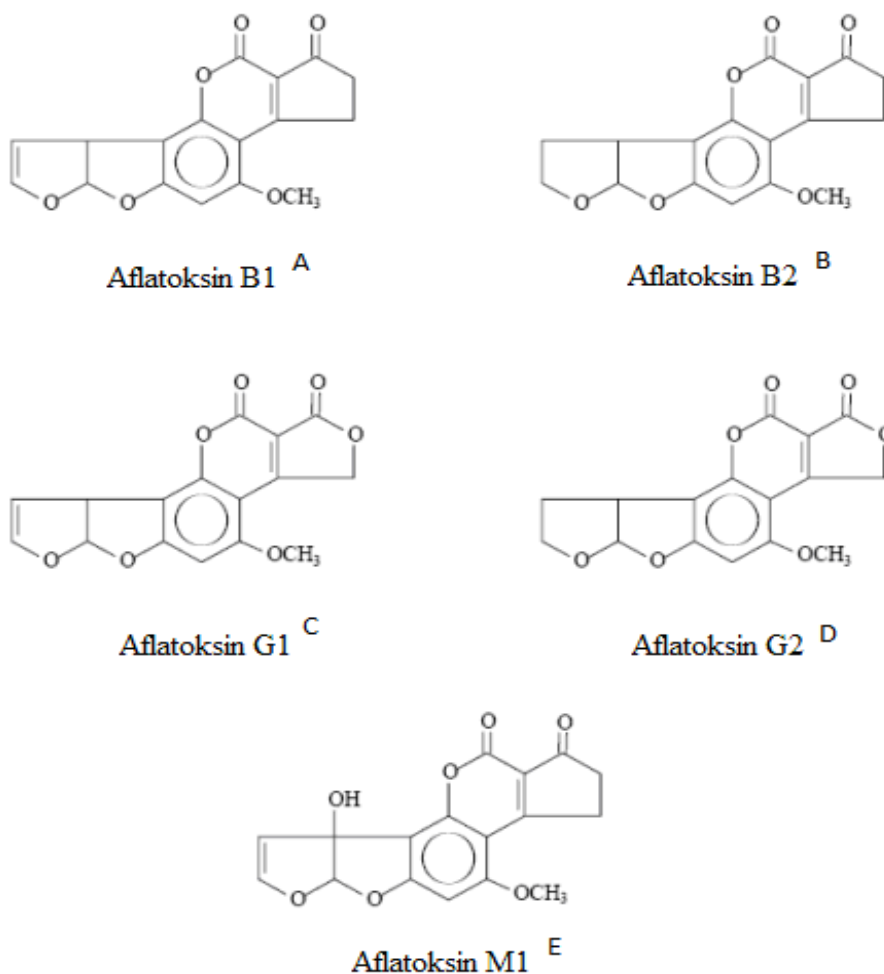
Aflatoksin türlerinin kimyasal yapıları Şekil 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2. Aflatoksinlerin çeşitli fiziksel özellikleri.

Aflatoksin Türü	Molekül Yapısı ve Ağırlığı	Erime Sıcaklığı (°C)	UV Absorpsiyonu (Etanolde)		Floresans Emisyonu (nm)
			λ_{mak} (nm)	ϵ (L/mol.cm)	
Aflatoksin G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇ - 328	244-246	243	11500	450
			257	9900	
			264	10000	
			362	16100	
Aflatoksin G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ - 330	237-240	265	9700	450
			363	21000	
Aflatoksin B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆ - 312	268-269	223	25600	425
			265	13400	
			362	21800	
Aflatoksin B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ - 314	286-289	265	11700	425
			363	23400	
Aflatoksin M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇ - 328	299	226	23100	
			265	11600	
			357	19000	

3.2. Aflatoksin Oluşturan Faktörler

Aflatoksinlerin oluşum mekanizmaları şu ana kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Aynı şekilde aflatoksin oluşumuna neden olabilecek faktörler belirlenmiş olsa da, aflatoksinlerin oluşumu için bu faktörlerin ayrı ayrı mı yoksa birkaçının aynı anda mı olması gerektiği konusu hala tartışılmaktadır. Toksin üretimi için gerekli faktörleri, biyolojik ve kimyasal kaynaklı ve de çevresel kaynaklı faktörler olarak ayırabiliriz. Biyolojik ve kimyasal kaynaklı faktörler; bitkisel ürünlerin veya gıda maddelerinin cinsi, su aktivitesi, pH, kimyasal bileşimi ve hasat sırasındaki olgunluk seviyesidir. Çevresel kaynaklı faktörler ise; ortamın sıcaklık koşulları, bağıl nem durumu, oksijen, ışık, ürünün yetiştirildiği yerin iklimi, coğrafi bölge, ürünün geçirdiği (depolama, kurutma teknikleri) işlemlerdir [22].



Şekil 3.2. Aflatoxin B1^A, B2^B, G1^C, G2^D, M1^E'nin kimyasal yapıları [20].

^A 6-Metoksidifurokumarin,(6aR,9aS)-2,3,6a,9a-tetrahidro-4-metoksisiklopenta[c]furo-(3',2':4,5)furo[2,3-*h*][*l*]benzopiran-1,11-dion(9CI),

^B Dihidroaflatoxin B1,(6aR,9aS)-2,3,6a,8,9,9a-hekzahidro-4-metoksisiklopenta[c]-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][*l*]benzopiran-1,11-dion (9CI),

^C (7aR,10aS)-3,4,7a,10a-tetrahidro-5-metoksi-1*H*,12*H*-furo- [3',2':4,5] furo[2,3-*h*]pirano[3,4-*c*][*l*]benzopiran-1,12-dion (9CI),

^D Dihidroaflatoxin G1, (7aR,10aS)-3,4,7a,9,10,10a-hekzahidro-5-metoksi-1*H*,12*H*furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][*l*]benzopiran-1,12-dion (9CI),

^E 4-Hidroksiaflatoxin B1,(6aR,9aR)-2,3,6a,9a-tetrahidro-9a-hidroksi-4-metoksisiklopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][*l*]benzopiran-1,11-dion (9CI),

3.2.1. Rutubet Ve Su Aktivitesinin (a_w) Etkisi

Aflatoksin sentezinden sorumlu olan *aspergillus* türü mantarlar ile birçok üründe (tahıllar, yağlı bitkiler, yem hammaddeleri vb.) yaygın bir şekilde karşılaşılır. Ürün çeşitliliği de dikkate alınır, % 9-14 arası veya daha yüksek oranlarda rutubet içeren besinler ile ortam sıcaklığının 24-45 °C olduğu durumlarda, 3-4 günde küflenme gözlenebilmektedir. Depolama şartlarında tahıl için % 12, yağlı ürünler için % 8-9'dan küçük nem oranlarının olması önemlidir.

Mantarların etkinliğinin artmasında rutubetin yanında, su aktivitesi de önemli bir yer tutar. Gıdanın su aktivite (a_w) değeri, bağıl nemden düşük olduğunda, gıda maddesi nem çekmeye başlar [23]. Özellikle endüstriyel depolama ve işlemede, küf gelişiminin sınır değerlerde tutulması veya tamamen engellenmesinde su aktivitesi değerlerinden yararlanılır [16]. Genel olarak $a_w=0.60$ olduğunda mikroorganizmal faaliyetler başlamaktadır. $0.78 < a_w < 0.90$ aralığında ise mikotoksin üreticisi küfler gelişebilmektedir. Aflatoksin üreticisi *aspergillus flavus* için $a_w=0.78$ değeri optimum şartlarda küf gelişiminin başladığı sınır olurken, *aspergillus parasiticus* için bu sınır değer $a_w=0.82$ 'dir. a_w 0.82-0.87 arasında ise aflatoksin üretiminin olduğu görülmüştür [23].

3.2.2. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklık, küflerin gelişmesi ve aflatoksinlerin oluşması için önemli faktörlerden biridir. Küflerin oluşması için nem ve sıcaklık arasında da bir ilişki bulunmaktadır. Bu ilişki kullanılarak uygun depolama ortamı hazırlanmaktadır. Aflatoksin üretiminde sıcaklığın etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, sıcaklığın *a.flavus* ve *a. parasiticus*'un gelişimi için önemli bir faktör olduğu ortaya konmuştur [23].

3.2.3. Diğer Faktörlerin Etkisi

Aflatoksin üreticisi küflerin gelişimine nem, su aktivitesi, sıcaklık gibi başka diğer faktörlerde etki eder. Bu faktörler; pH, O₂-CO₂, metal varlığı, böcek gibi diğer canlılar, coğrafi konum ve mekanik zararlarıdır.

Mikroorganizmaların gelişmesini pH etkilemektedir. pH 4'den küçük olduğunda mikroorganizmalar gelişme gösterebilirler. pH=7' de ise en iyi gelişmeyi gösterme

yeteneğine sahiptirler. Genel olarak pH= 3.5-8.0 aralığında küflerin geliştiği bilinmektedir [23].

Küflerin gelişmesinde ortamdaki metallere varlığı da incelenmiştir. Dutton, Llewellyn ve ark. aflatoksin oluşumunun metal iyonları tarafından etkilendiğini belirtmiştir [24]. Diğer bir faktör olan iklim ise farklı dönemlerde örnekler alınmasında, tarımsal uygulamalardan, hasat ve depolama şartlarındaki farklılıklardan kaynaklanan aflatoksin seviyeleri üzerinde etkilidir. Serin iklimlerdeki ürünler, sıcak bölgelerdeki ürünlere göre aflatoksin sentezleyen küfler tarafından daha az kontamine olurlar.

Bitkilerin gelişme döneminde, kuşlar ve böcekler tarafından bitkide oluşturulan fiziksel lezyonlar fungal sporların bitkiye girişine yol açtığından kontaminasyonu kolaylaştırabilir. Ayrıca çeşitli böceklerin mikotoksijenik küflerin dağılmasında görev aldığı düşünülmektedir [25].

3.3. Aflatoksinlerin Kontrol Altına Alınması

Bitkiler ve bunlardan yapılmış ürünlerin mikrobiyal olarak saldırıya uğramasında, yetiştirildikleri çevre, bitki çeşidi, kimyasal işlemlerle muamele (böcek ve küf koruyucular, gübreleme), hasat, ürünlerin nem içeriğinin belli oranda tutulması (kurutma), prosesler, depolama koşulları önemli derecede etkilidir. Bu noktalarda alınacak önlemler toksin kontrolünün temelidir.

Aflatoksin ile kirlenmenin önlenmesinde izlenecek stratejiler, hasat öncesi ve sonrası alınacak tedbirlere göre değerlendirilmelidir. Hasat öncesi işlemler, aflatoksin oluşturacak küflerin, bitkiler gelişme döneminde iken kendi florasında küflerin oluşmadan önlenmesini amaçlar. Hasat sonrası uygulamalar yetişmiş ürünlerin depolama ve sevkiyat gibi işlemlerde aflatoksin üretici küflerle kirlenmesini önlemeyi amaçlar.

Endüstriyel uygulamalarda aflatoksin ile kontamine gıda, yem gibi ürünleri değerlendirmek için, ürünün kalitesinde ekonomik kayıplar oluşturmayacak şekilde fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemlerle, mikotoksinlerin etkilerinin azaltılması amaçlanır [26].

3.3.1. Hasat Öncesi Kontrol Yolları

Bu uygulamalar proaktif işlemler olup, bitkinin veya ürünün mikrobiyal bulaşma olmadan önlemlerin alınmasını amaçlar. Bitkilerin yetiştirildiği alanlar, seralar, özel laboratuvar şartları gibi kapalı ortamlar değilse, her türlü saldırıya (böceklerin, kemiricilerin istilasından dolayı fiziksel zararlar) ve kirlenmeye (kullanılan kimyasallar ve mikroorganizmalar) açık yerlerdir.

Tarla ortamında bitkilerle beraber yabancı zararlı otların bulunması, tarlada bulunan taş ve kırıntılar, böceklerin, kemiricilerin ve diğer canlıların zararlı etkilerinin sonucu; bitkinin dış kısımlarında oluşan mekanik zedelenmeler bitki direncinin düşmesine ve böylece bitkinin funguslarla enfekte olmasına neden olur. Fiziksel olarak zarar görmemiş bitkiler de aflatoksin üretici küf ve mantarlar tarafından enfekte olabilir [27].

3.3.2. Hasat ve Sonrası Kontrol Yolları

Bitkisel ürünlerin hasadı sırasında atılacak adımlar depolamada küflenmenin dolayısıyla aflatoksin üretiminin gözlenmemesi için önemlidir. Bu adımlar şunlardır;

- Ürün tarladan uygun zamanda (tam olgunlaşma) çıkartılmalı,
- Ürünün fiziksel zarar görmesi engellenmeli,
- Uygun metotlar ile uygun ekipmanlar kullanılarak hasat yapılmalıdır [28].

Ürünlerin ister hasat edildikten sonra hammadde olarak (buğday, mısır, fındık vb.), isterse bazı işlemler neticesinde gıda veya yem maddelerine dönüştükten sonra olsun belli bir dönemde saklanması veya depo edilmesi gerekebilir. Gıda veya yem maddelerinin depolanması sırasında, aflatoksin üretici küflerin oluşumunu kolaylaştıracak faktörler kontrol altına alınmalıdır. Bu amaçla depolamada aşağıdaki şartların göz önüne alınması gerekmektedir;

- Farklı türdeki küf mantarları, gelişmeleri için farklı orandaki neme ihtiyaç duyarlar. Depolama esnasında gıda veya yem maddelerinde nem oranı küf mantarlarının gelişmeye başladığı % 13' ün üstünde (*aspergillus glaucus* için % 14.6-16.9) olmamasına dikkat edilmelidir. Yine depoların bulunduğu çevrede ortam neminin % 75 üzerinde olmaması gerekir.

- Depo sıcaklıkları, küf mantarlarının geliştiği 20-35 °C sıcaklık aralığı dikkate alınarak kontrol altında tutulmalıdır. Ayrıca ürünlerin sıcaklığı ve depoların iyi bir şekilde hava almamasına bağlı olarak oluşan su buharları, nemlenmeye neden olur.

Küf mantarları aerobik ortamda gelişirler. Oksijen oranı % 1 olsa bile çoğalabilirler. Depolama şartlarında karbondioksit miktarı % 20 olduğunda mantarların gelişmesi yavaşlayacaktır.

- Ürünlerde mekanik hasar olması mikroorganizmaların çoğalmalarını hızlandırır.

- Kemirgenlerin, kuşların, böceklerin (güve ve kurtçuklar vb.) verdiği zararlara dikkat edilmelidir.

- Depolar ürünlerin çıkışından sonra aktif olarak fungal ve bakteriyel gelişime karşı temizlenmelidir.

Bu noktalarda alınacak etkin önlemler, ürünlerin depo şartlarında herhangi bozulma ve kontamine olma riskine karşı güvenle depolanmasına yardımcı olacaktır [29].

3.3.3. Taşıma Sırasında Kontrol

Gıda ve yem ürünleri, üretim yapıldıkları yerlerden, tüketim noktalarına ulaşıncaya kadar; hava, deniz ve kara ulaşım sistemlerinden biri kullanılmaktadır. Bu sistemlerin taşıyıcı elemanlarına küf ve mantarların bulaşması, ürünlerin ulaştığı noktaların da kontaminasyonla karşı karşıya kalması demektir. Taşıyıcı elemanların, her taşıma işleminden sonra çeşitli bulaşmalara karşı temizlikleri yapılmalıdır. Yine başka bir sorun, (özellikle gemi ile yapılan taşımacılıkta veya yağışlı günlerde) ürünlerin uzun süren hareketlerinde nem oranlarının artmasıdır. Nemlenmenin önüne geçmek için modern koruyucu ekipmanlar kullanılmalıdır [27].

3.4. Aflatoksinlerin Detoksifikasyonu

Ürünlerin aflatoksinlerle kontaminasyonun engellenemediği durumlarda, gıda ve yemlerden aflatoksinin uzaklaştırılması veya etkilerinin azaltılması amacıyla detoksifikasyon çalışmaları yapılmaktadır. Aflatoksinlerin detoksifikasyonunda; fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlar kullanılmaktadır [28].

3.4.1. Fiziksel Metotlar

Aflatoksinlerin ayırımında fiziksel metotlardan yararlanılmaktadır. Bu metotlar manuel olarak aflatoksin ile kontamine tanelerin fiziksel olarak ayrılmasından, floresans, yüksek sıcaklık uygulaması, UV, X-ray veya mikrodalga ışınlaması ve solvent ekstraksiyonu gibi çeşitli toksin inaktive metotlarını içermektedir [29].

Manual olarak veya çeşitli elektronik ekipmanlar kullanılarak, ürünlerden renk bozulmasına uğramış, bozulmuş tanelerin ayrılması genel olarak uygulanmaktadır [30]. Yer fıstığı, mısır veya pamukta aflatoksinli tanelerin ayıklanmasında bu metotlar kullanılmıştır. 3-250 ppb arasında aflatoksin içeren mısır tanelerinde bu metotla ayırım gerçekleşmiş, ayırımdan sonra ortalama aflatoksin seviyesinin 56 ppb olduğu görülmüştür. Bu çalışma, fiziksel ayırmalarla aflatoksin kontaminasyonunun güvenli seviyelere düşürülmesinin mümkün olmadığını göstermektedir [31]. Aflatoksin ile kontamine tanelerin ayrılmasından başka diğer bir yaklaşım tanelerin yıkanmasıdır. Mısır tanelerinin, su veya sodyum karbonat ile yıkanması Fusarium toksinlerinin kontaminasyonunu azaltabileceği belirtilmiştir [29]. Aflatoksinlerin floresans özellikleri kullanılarak da ayırma yapılabilir. UV bölgede 365 nm' de sarı-yeşil renkli ışımaya yapan tanelerin (renkli ışımaların, üründe aflatoksin ile beraber üretilen kojik asit tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir) ayrılması mümkündür.

Aflatoksinlerin detoksifikasyonunda kullanılan diğer bir fiziksel uygulama ise ısı ile muameledir. Bu amaçla fıstık, ceviz, mısır gibi ürünlerde kavurma işlemleri metot olarak denenmiştir [31]. Isı uygulamasında ürünün kalitesinde (görüntü, tat, koku) değişiklik olması, bütün aflatoksin çeşitlerine uygulanamaması gibi nedenlerden dolayı sınırlı bir kullanım alanı bulunmaktadır.

Isı ile muamele için çeşitli örnekler Tablo 3.3'de verilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi her ne kadar ısı uygulamasında aflatoksinler için belli seviyelere inilse de, üründen tamamen uzaklaştırılması söz konusu değildir.

Aflatoksinlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan diğer bir fiziksel yöntem ışınlamadır. Diğer uzaklaştırma işlemlerinde olduğu gibi ışınlamada amaç, zararsız parçalanma ürünlerine aflatoksinlerin dönüştürülmesidir.

3.4.2. Kimyasal Metotlar

Kimyasal metotlar, diğer bütün alanlarda olduğu gibi, aflatoksinlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu amaçla oksitleyici (ozon, hidrojen peroksit) ve indirgeyici (bisüfitler) reaktifler, asitler, bazlar (amonyak, kostik, soda), tuzlar gibi çeşitli kimyasallar; özellikle yem sanayinde, aflatoksinler başta olmak üzere mikotoksinlerin azaltılmasında kullanılmaktadır. Fakat kimyasal metotlar fiziksel metotlara göre ilave uygulamalar (kurutma, temizleme) içerdiği için zaman harcayan, pahalı yöntemlerdir [29].

Amonyak ile muamele özellikle yem endüstrisinde kimyasal metotlar içinde en yaygın olarak kullanılan metotlardandır. Pamuk tohumlarından aflatoksinin uzaklaştırılmasında amonyak ile yapılan çalışmada, aflatoksin seviyeleri 316-545 ppb'den 4 ppb seviyelerine kadar inmiştir [33]. Yine 30-100 ppb aflatoksin içeren mısırlara laboratuvar ortamında amonyaklama işlemi uygulanmış, aflatoksin seviyesi 1-3 ppb'e kadar düşürülmüştür. Depo şartlarında yüksek nem içeriğine sahip mısırlarda % 2 amonyak veya % 1 propiyonik asit gibi kimyasal maddelerin kullanılmasının *a. parasiticus* veya *a. flavus* gelişimini ve aflatoksin üretimini durdurmada etkili olduğu bildirilmiştir [31].

Kimyasal detoksifikasyonun ana sakıncaları, renkte bozulmaların görülmesi, keskin koku oluşturması, yemlerde aşırı kalıntı kalması (amonyak) ile hayvan sağlığının bozulmasıdır.

Kimyasal uygulamalar, aflatoksinlerin uzaklaştırılmasında fiziksel işlemlere göre daha iyi sonuçlar gösterse de, gıda ve yemlerde oluşacak kalıntıların insan ve hayvan sağlığı açısından riskli olması, besin değerlerinde kayıplara yol açması, standart prosedürler haline gelmemeleri gibi dezavantajlara sahiptirler [28].

3.4.3. Biyolojik Metotlar

Fiziksel ve kimyasal metotların pahalı, uygulama alanının sınırlı, zararlı etkilerinin çok olması, hayvanlarda mikotoksikozisi kontrol etmek için yeni bir strateji izlenmesine yol açmıştır. Bu amaçla bazı mikotoksinleri daha az toksik metabolitlere çevirme yeteneğine sahip mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır [28].

Gıda fermantasyonunda iki önemli mikroorganizma olan *saccharomyces cerevisiae* ve laktik asit bakterileri, farklı mikotoksinleri güçlü bir şekilde hücre duvarı bileşenlerine bağlar. Besleyici özelliğinin yanında maya veya maya hücre duvarı, potansiyel mikotoksin

Tablo 3.3.Aflatoksinlerin ısı ile uzaklaştırılması uygulamalarına örnekler [32].

Ürün Çeşidi	Uygulama	Değişiklik
Yer fıstığı (yağında)	10 dakika 250°C	Aflatoksin B1'de % 96 azalma
Yer fıstığı	30 dakika 160°C	100 ppm'den 5 ppb'ye azalma
Mısır (yemlik)	145-165°C ısı uyg.	Aflatoksin B1'de % 40-80 azalma
Mısır	Yağ ile kızartma-haşlama	% 28 oranında parçalanma
Aflatoksin standardı	4 saat 120°C	Aflatoksin B1 floresans göstermez.
Sulu aflatoksin çözeltileri	20 dakika 120°C	Aflatoksin B1'de % 20 azalma
Süt	Pastörizasyon-Sterilizasyon	% 22 ile % 28 arasında parçalanma

bağlayıcı olarak davranır. Bütün hücreler yerine, sadece maya hücre duvarları kullanarak, mikotoksinin adsorpsiyonu zenginleştirilebilir [28].

Hücre duvarlarında bulunan polisakkaritler (glukomannanlar), proteinler ve lipidler, farklı bağlanma mekanizmaları (hidrojen bağları, iyonik veya hidrofobik bağlantılar) ile çok sayıda farklı ve kolay ulaşılabilir adsorpsiyon merkezleri olarak davranır. Fakat birçok bakteri ve fungi çeşidinin, enzimatik olarak mikotoksinleri yok ettiği bilinmesine rağmen, enzimatik yıkım ürünlerinin toksisitesi ve fermantasyonun istenmeyen etkilerinin gıda kalitesi üzerine etkileri ile ilgili belirsizlik hala açıktır.

3.5. Aflatoksinlerin Canlılar Üzerine Etkileri

Mikotoksinlerle kontamine olan yem ve gıdaları tüketen hayvan ve insanlarda latent (gizli), akut (hızlı ilerleyen), subakut (akut-kronik arası durum) veya kronik olarak gerçekleşen durumlara mikotoksikozis denmektedir.

Mikotoksinlerin canlılar üzerindeki biyolojik etkileri, organizmaya alındıkları miktara, mikotoksin türü, süresine, insan ve hayvanın duyarlılığına bağlıdır. Mikotoksinlerin canlı organizmasına sırasıyla düşük-uzun süreli ve yüksek-kısa süreli miktarlarda alınmalarına göre kronik hastalıklar ve akut zehirlenme ile ölüm olayları gözlenebilir. İnsanlar ve hayvanlar için zararlı etkiler; karsinojen, teratojen (embriyonal gelişimi etkileyen), dermatitik (deriye etkili olan), hepatotoksik (karaciğere etki eden), nefrotoksik (böbreklerde toksik etki yapan) ve neurotoksik (sinir sistemine etki eden), mutajenik, immunosupresif (bağışıklık baskılayıcı) şeklinde olabilmektedir [34].

Mikotoksinlerin kana girişi ve organizma boyunca dağılımını kontrol eden gastrointestinal absorpsiyon, sıvı fazda polar bileşiklerin basit difüzyonu, iyonik olmayan bileşiklerin sıvı fazda difüzyonu ve aktif taşıma ile olmaktadır. Mikotoksinler canlı yapısına difüze olduktan sonra, organizma için hayati önemi olan proteinler, enzimler, RNA-DNA, ve ortamda bulunan diğer kimyasal yapılar ile reaksiyona girerek, protein sentezine engel olma, hormonları etkileme, albumin-globulin seviyelerinde azalma, vitamin ve besin maddelerinin alımında azalışa (enerji üretiminin azalması) neden olma gibi etkilere sahiptir [29].

Mikotoksinlerin içinde aflatoksinlere, gıda güvenliği açısından büyük riskler oluşturması ve ekonomik olarak büyük kayıplar vermesinden dolayı bütün dünyada ciddi önem verilmektedir. Toksik ve kanserojen yapma özelliğinden dolayı birçok gelişmiş ülke, gıda ve yemlerde maksimum izin verilebilir aflatoksin miktarına sıkı düzenlemeler getirmiştir.

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), uzun yıllar çeşitli çalışma grupları ile yaptıkları araştırmalar (Aralık 1971, Ekim 1975, Mart 1987 ve Haziran 1992) ve izlemeler sonucunda 1993 yılında yayınladıkları rapor ile aflatoksinleri insanlarda kanserojen yapıcı olarak sınıflandırmıştır (GRUP 1) [20]. Araştırmacılar, hem hepatit B virüsü hem de

aflatoksin B1' in, P53 geninde meydana getirdikleri değişiklik sonucu karaciğer kanserinin oluştuğunu belirlemişlerdir.

İnsanlar, direkt ve indirekt olarak aflatoksinlerle karşılaşabilir. Direkt olarak, aflatoksinlerin gıdalar ile alınması, indirekt olarak ise aflatoksinler içeren besin maddeleri ile beslenen hayvanların ürünlerinin insanlar tarafından tüketilmesi ile olur. Bu karşılaşma, süt ve süt ürünleri (peynir, tereyağ vb.) ve yumurtanın tüketilmesi ile olabilir. Aflatoksin için günlük alınabilecek kabul edilebilir doz (TDI) 0.014 ng/kg olarak açıklanmıştır. Yani 80 kg olan bir insanda bu değer; $80 \times 0.014 = 0.112$ ng olur [2].

Hayvanlarda (maymun, alabalık, rat vb.) aflatoksinlerin etkileri, maruziyet dozu, süresi, türüne, cinsine, diyet veya beslenme durumuna, genel sağlık durumuna göre değişir. Bu etkiler akut ve kronik etkiler olarak değişmektedir. Karaciğerde zarar olma durumu, kanser, süt üretiminde azalış, immun baskılama, anemi gibi sağlık problemlerine neden olabilir. Besili ineklerde süt üretiminde düşüş ve sütün yağ iğeriğinde artış 50 ile 150 mg AFB1 uygulanmasından sonra gözlenmiştir. Başka bir ęalıřmada 120 ppb aflatoksin ile kontamine olmuş mısır ile maruz kalmış sürüde küçük doğum olma, sağlıksız buzağılar, solunum bozuklukları, kıl dökülmeleri, yem tüketiminde düşüş gözlenmiştir [29].

Aflatoksinler, metabolitleri halinde hayvanların sütlerinde ve dolayısıyla süt ürünlerinde aflatoksin M1 halinde bulunmaktadır. Aflatoksinlerin yemden süte geğişi % 0.3-3 arasında olup, bu değer hayvandan hayvana, günden güne, bir süt sağımından diğerine göre değişir [35]. Sütten üretilen bebek mamaları, yoğurt, biręok peynir ęeřidi, tereyağı gibi ürünlerde aflatoksin M1'e rastlanılmıştır [36].

Aflatoksin M1 ve M2, aflatoksin B1 ve B2' in mono hidroksi türevleridir [37]. Aflatoksin M1, stabil bileşik olduğundan ham ve işlenmiş sütte bulunmakla beraber, pasterizasyon veya peynire işlenmesi ile kaybolmaz [35]. Diğer mikotoksinlerden deoksinivalenol, yemde yüksek miktarlarda bulunsa da sütte tespit edilmemiştir. T-2 nin süte geğiş oranı % 0.05-2 arasındadır. Okratoksin A ve metabolitleri inek sütünde sadece vücut ağırlığının her bir kg için 1.66 mg okratoksin uygulandığında tespit edilmiştir.

IARC, aflatoksin M1'i, Grup 2B (potansiyel kanser yapıcı bileşik) sınıfında değerlendirmiş, aflatoksin M1'i insanlarda kanser yaptığına dair yetersiz veri olduğunu belirtmekle beraber, hayvanlarda yeterli kanıtın olduğunu belirtmiştir [20].

BÖLÜM 4

AFLATOKSİNLERİN BELİRLENMESİ

Mikotoksinlerin, çok düşük konsantrasyonları (aflatoksin M1 gibi) insan ve hayvanlar için zararlıdır. Dünya genelinde ticaretten dolayı mikotoksin kontaminasyonlarının artması artık daha kolay ve hızlı olmaktadır. Bu da ülke yöneticilerini, hem ulusal düzeyde kendi yasalarında ve hem de uluslararası standartlarda mikotoksinlerin üst sınırlarını belirlemeye sevk etmiş ve araştırmacıların güvenilir ve kesin sonuçlar verecek metotlar üzerinde çalışmalarının artmasına neden olmuştur.

Mikotoksinlerin bulunduğu matrikslerin kompleks yapıda olması, düşük konsantrasyonlar, mikotoksinlerin analitik olarak tespit edilmesini güçleştirmektedir. Bilim adamları, mikotoksinlerin tespiti için yaptıkları çalışmalarda aşağıdaki hususların dikkat edilmesi gereken noktalar olduklarını belirtmişlerdir. Bunlar;

1. Mikotoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından birbirinden farklıdır. Bu özelliklerin birbirinden farklı olması nedeni ile mikotoksin analizleri standardize edilerek bütün mikotoksinler tek bir metot ile tespit edilememektedir. Aflatoksin, okratoksin, zearalenon gibi mikotoksin çeşitleri için ayrı ayrı metotlar geliştirilmiştir [11].

2. Mikotoksinler, gıda ve yem maddelerinde düşük konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. Mikotoksinler için ayrı ayrı metotlar geliştirilirken, farklı ve efektif ekstraksiyon işlemleri üzerinde detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

3. Mikotoksinler gıdalarda ve hayvan yemlerinde dağınık olarak farklı yerlerde bulunurlar. Mikotoksin analizinin kesinlik ve hassasiyetinin artması için iyi bir homojenizasyon işlemi yapıldıktan sonra, yeterli sayıda paralel analizler yapılmalıdır.

4. Mikotoksin teşhisi, fiziksel ve kimyasal özelliklere dayandığından, metotlar oluşturulurken esnek (flexible) ve geniş tabanlı (broad-based) analitik tekniklere dayanmalıdır.

5. İyi bir laboratuvar uzmanlığına ihtiyaç vardır.

6. Pahalı olmayan ve uzmanlık gerektirmeyecek personel ile yapılacak basit bir metot tercih edilmelidir.

7. Mikotoksinlerin belirlenmesinde, hem gıdalardaki ve yemlerdeki yasal sınırları karşılayacak ve hem de toksisiteden dolayı basit, ucuz ve etkili çözeltiler kullanılmalıdır.

8. Başarılı bir teşhis metodu, geniş bir aralıktaki bileşikler için güçlü, hassas ve yüksek bir esneklikte olmalı fakat gerektiğinde spesifik olmalıdır.

9. Sistem hızlı ve uygulanabilir olmalıdır [11].

4.1. Numune Ön Hazırlık Metotları

Gıda ve yem örneklerinin aflatoksin analizleri genel olarak matriksten toksinin ekstraksiyonu ve farklı analitik tekniklerle miktarının tayini esasına dayanır [38]. Bu iki basamağa ilave olarak numune alma ve zenginleştirme basamakları eklendiğinde, ön hazırlıktan analizin sonlanmasına kadar aflatoksin analizleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- a. Örneklerin homojenizasyon basamağı,
- b. Ekstraksiyon basamağı,
- c. Zenginleştirme ve temizleme basamağı,
- d. Tanımlama ve miktar tayini

Numune alma ve homojenizasyon basamağı örneklerin sonuçlarının doğruluğu ve paralellik göstermesi açısından en önemli basamaktır. Aflatoksinler ürünlerde küflerin farklı yerlere yayılabilmeleri sonucu dağınık halde bulunurlar. Bu dağınıklık, numuneden alınan kısımların, örneği temsil etme yeteneğini güçleştirir. Bazı durumlarda, aynı yerlerden örnek alınmasına rağmen analiz sonuçları farklılık gösterir. Bundan dolayı tüm partinin etkin olarak temsil edilmesi için, uygun yerlerden yeterli miktarlarda örnekler alınmalıdır [39].

Aflatoksin analizlerinde ekstraksiyonun amacı, mikotoksinin ekstraksiyon solventi içinde çözünmesidir. Ekstraksiyon için kullanılan solventlerin su ile seyreltilmesi ile üründeki etki alanı genişletilebilir.

Aflatoksinlerin ekstraksiyonu için kloroform [40], diklormetan, metanol, asetonitril [41], aseton [42], gibi organik solventler kullanılmaktadır.

Temizleme işlemlerinde, likid-likid dağılımı, kolon sistemlerinden (immunoafiniti [43], multi fonksiyonel [44] ve florisil kolonları [45]) ve çöktürme metotlarından yararlanır. Ayrıca SPE [46] ve SFE [47] de temizleme amacı görebilir.

Aflatoksinlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde, immunokimyasal (ELISA) ve kromatografik yöntemler de (TLC, HPLC vb.) kullanılmaktadır [38].

4.1.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (SSE)

Mikotoksinlerin ön hazırlığında kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu (SSE), toksinin farklı sıvı fazlarda farklı çözünürlüğünden yararlanarak, matriksten istenilen çözücüye geçirilmesi işlemidir. Bu amaç ile asetonitril, aseton, metanol, hekzan gibi organik çözücüler kullanılabilir. Bu çözücüler yardımıyla polar özellikte olmayan, toksini maskeleyebilecek bazı safsızlıklar (kolesterol, yağ vb.) analiz çevresinden uzaklaştırılır. SSE'nin uzun süren işlem süreleri, fazla miktarda solvent kullanımı, kantitatif olmayan sonuçlar, matriksin cam ekipmanlarda adsorpsiyonu ve çözücülerin uzaklaşmaması ile kirlilik oluşması gibi dezavantajları vardır [48].

4.1.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon (SFE)

Süperkritik akışkan ekstraksiyon, CO₂ gibi süperkritik akışkanın, matriksten gerekli bileşeni ekstrakte etmek için kullanıldığı ön hazırlık metodudur. Bu metot yüksek çözme gücü ve çözücü sıvının yoğunluğu ile çalışır. Süperkritik akışkan kromatografisi, öncelikli olarak silika kapiler kolonlarda toksinlerin ayrılması için uygulanmıştır, fakat SFE'nin kendine özgü problemlerinden dolayı çok başarılı bir yöntem değildir. Bundan daha ötesi maliyetlerin çok pahalı olması ve özel ekipmanlar gerektirmesinden dolayı yaygın olarak kullanılan bir metot değildir [47].

4.1.3. Kat Faz Ekstraksiyonu (KFE)

Katı Faz Ekstraksiyonu (KFE)'de kullanılan kartuşlarda yüksek bağlama kapasitesine sahip fonksiyonel grup içeren adsorbentler kullanılmaktadır. Bu fonksiyonel gruplara etil (C2), oktil (C8), silika jel (SiOH), C-18 (oktadesil), florisil ($MgSiO_3$), fenil, aminopropil, iyon-değiştirici reçineler, immunoaffinité maddeler ve moleküler baskılama polimerleri (MIPs) örnek verilebilir.

Silika jel SPE'de sık kullanılan popüler adsorbanlardandır. Silanol grupları içeren silika yüzeyi elektrostatik olarak adsorbenti bağlayabilmektedir. Çeşitli fonksiyonel grupların modifikasyonu ile silikanın kullanımı genişletebilir. Mikotoksin analizlerinde ise silika jel, direkt veya modifiye edildikten sonra kullanılabilir.

KFE; az çözücü kullanımı, uygulama hızının kısa ve pratik olması, yüksek geri kazanım oranı, ön-zenginleştirme ile iyi dedeksiyon sonuçlarının alınması, yaygın kullanım alanı gibi avantajlara sahip olduğundan birçok ekstraksiyon ve dedeksiyon metodunun bir parçası olmuştur [48]. KFE'nin dezavantajı ise bütün toksinlerin ekstraksiyonunda kullanılacak tek tip kapsamlı (universal) kartuşun geliştirilmesinin zor olmasıdır. Çünkü her bir toksin belirli şartlarda çalışır ve pH, çözücü ve numunenin iyon konsantrasyonundan etkilenebilir [11].

4.2. Ayırma Metotları

Aflatoksin analizleri için kromatografik metotlar, ELISA tabanlı metotlar, hızlı metotlar şeklinde çeşitli sınıflarda metotlar kullanılmaktadır [49,50]. Bu metotların içinde en yaygın olarak kullanılanı kromatografik metotlardır.

4.2.1. Kromatografik Metotlar

Kromatografik metotlar, kolon ve düzlemsel kromatografi olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Kolon kromatografisinde durgun faz ince bir kolonda tutturulur ve hareketli faz basınç altında bu durgun faz arasından geçmeye zorlanır (GC, LC, SFC gibi). Düzlemsel kromatografide, durgun faz düz bir plaka üzerine veya bir kâğıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder (PC, TLC gibi).

Mikotoksinlerin yapı ve miktar tayinlerinde; ince tabaka kromatografisi (TLC) [51], gaz kromatografisi (GC) [52] ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [53] yöntemlerinden yararlanılır.

4.2.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile aflatoksin analizlerinin uygulanması çok sayıdaki numunede analiz edilebilmesi, düşük maliyet, hem kantitatif hem de yarı-kantitatif tayini gibi avantajlarından dolayı yaygın kullanım alanı bulmuştur. TLC’ de sabit faz olarak modifiyeli ve modifiyesiz silika-jel yaygın olarak kullanılmaktadır. Oktadesil bağlı olanları en çok kullanılan çeşitler olup silanlanmış [54], organik asit ile muamele edilmiş [55], poliamid tabanlı [56] olanları da kullanılmaktadır. Numune hazırlama sırasında, toksinin çeşidine ve özelliğine dayanan temizleme prosedürü TLC’de temel gereksinimdir. Bu amaçla, silika-jel kolonları [46], pH-bağlı kartuşlar [57] kullanılmıştır.

4.2.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Mikotoksinlerin modern analizi, büyük bir oranda toksinin fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olduğundan HPLC’ de çeşitli adsorbanlarla yapılabilmektedir. Bu amaçla, mikotoksinleri ayırmak ve saflaştırmak için normal ve ters faz kolonlar kullanılmaktadır. Mini kolonlar, numunenin ön hazırlığı için kullanılmıştır [11].

Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazları; sabit (kolon) ve hareketli faz, dedektör, enjeksiyon sistemi ve pompa bölümlerinden oluşur. Mikotoksinlerin çeşidine göre hareketli ve sabit faz değişebilmektedir. Buna göre, sistemin floresans derecesi hareketli fazın bileşiminden etkilenir. Kloroform içeren hareketli fazlarda aflatoksinlerin B grupları, aflatoksin G gruplarından daha az floresans ortaya çıkartabilir. Bu sistemlerde kullanılan pompa ve enjektörlerin tekrarlanabilirlikleri incelendiğinde iyi sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Pompalar 600 bar basınca kadar çıkarken, puls içermeyen bir akış oluştururlar.

Mikotoksinlerin tayini için kullanılan dedektörlerin seçiciliği, duyarlılığı, gürültü seviyeleri analizlerin sonuçlarını etkilemeyecek derecede iyidir. Mikotoksinlerin belirlenmesinde UV absorpsiyon, floresans, diod–array dedektörler (DAD) ve kütle (MS) dedektörleri kullanılmaktadır. Mikotoksin analizlerinde kullanılan en genel dedektör ise

floresans (FLD) dedektörlerdir. Birçok mikotoksin çeşidi (OTA, AFT, CIT gibi) doğal olarak floresans karakterdedir ve direkt olarak HPLC-FLD ile tayin edilebilir. Floresans özelliği göstermeyen mikotoksinlerin (FUM gibi) uygun kromofor grupları eksiktir. Bundan dolayı türevlendirmeye ihtiyaç duyarlar. Türevlendirme için kullanılan ajanlar o-fitaldialdehid ve 9-(florenilmetil) kloroformat gibi kimyasallardır. Türevlendirme ile hassasiyet artar. Türevlendirme kolon öncesi (pre) ve sonrası (post) yapılabilir.

4.2.1.3. Gaz Kromatografi (GC)

Gaz kromatografisi, gıdalarda bulunan mikotoksinlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikotoksinler uçucu yapıda olmayan, termal olarak stabil hale gelmeyen bileşiklerdir. Bundan dolayı GC ile tayin edilebilmeleri için kimyasal reaksiyonlarla türevlendirilmeleri gerekir (okratoksin A uçucu hale getirilemediği için GC ile analiz edilemez) [58]. Gaz kromatografisinin mikotoksin tayini için kullanımı, HPLC gibi ucuz ve hızlı bir alternatifinin olması nedeniyle çok kullanım alanı bulamamıştır.

4.2.2. ELISA (Enzim-Bağlantılı Immunosorbent Assay) Bazlı Yöntemler

HPLC, TLC ve LC/MS gibi yöntemler; doğru ve hassas ölçümler için yararlı olsa da hızlı ve pratik analizler için uygun değildirler. Bu nedenle birçok cihaz üreticisi mikotoksin analizleri için mevcut ELISA cihazlarını geliştirmişlerdir. ELISA cihazlarının düşük analiz maliyeti, kolay uygulanabilirliği, portatif olması, hızlı ve yüksek derecede spesifik olması popüler olmasına neden olmuştur. ELISA' nın dezavantajı ise kullanılan kitlerin tek kullanımlık olmasıdır [59]. Ticari olarak satılan ELISA kitleri ile; aflatoksinler, okratoksin A, fumonisin, zearalenon, deoksinivalenol' un kantitatif tayinleri yapılabilmektedir [60].

BÖLÜM 5

YEM VE YEM HAMMADDELERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Dünya genelinde iki yıl süre ile planlı yapılan araştırmada, temel üretim bölgelerinde imalatı gerçekleştirilen yem ve yem hammaddelerinde mikotoksin varlığı araştırılmıştır. İki yıl boyunca Avrupa ve Akdeniz marketlerinden alınan 1507 örnekte 2753 analiz, Asya-Pasifik bölgesinden alınan 1291 örnekte 6391 analiz yapılmıştır. Yine bu araştırma ile fusarium toksinleri (deoksinivalenol, T-2 toksin, zearalenon, fumonisin B1, B2 ve B3) ile okratoksin A ve aflatoksin B1 arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Mikotoksin analizleri ile ilgili sonuçlar Tablo 5.1 ve 5.2' de verilmiştir [61]. Bu çalışmadan farklı olarak, Amerika kıtasında çeşitli bölgelerde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 5.3'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Asya ve Okyanus bölgesi kaynaklı hayvan yemi ve yem maddelerinde mikotoksin kontaminasyonunun varlığı [61].

	Deoksinivalenol		Zearalenon		Fumonisinler		Okrotoksin A		Aflatoksin B1	
	P.Ö.S./T.Ö.S	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S.	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S.	Mak. Seviye
Mısır	219/312	10626	128/312	6468	213/309	14714	9/36	143	54/311	457
Buğday	79/98	18991	26/98	1489	4/98	646	6/8	23	0/97	T.E.
Mısır Gluteni	7/37	4423	34/37	3158	34/37	3740	0/15	T.E.	3/37	45
Soya	9/122	1347	21/122	1078	9/122	331	4/31	11	3/122	13
Fasulyesi										
Karma	194/531	4994	204/532	4132	306/524	4909	23/87	59	109/536	330
Yem										
Sılab	33/80	1860	35/79	4738	2/80	733	3/6	1.5	19/80	17
Pirinç	1/27	79	5/27	162	2/27	929	0/1	T.E.	3/27	11
Diğer Yem Maddeleri	28/74	2690	23/74	10374	7/73	331	3/15	82	7/71	70

T.E.:Tayin Edilemedi, P.Ö.S.: Pozitif Örnek Sayısı, T.Ö.S.: Toplam Örnek Sayısı, Mak. Seviye: µg/kg.

Tablo 5.2. Avrupa ve Akdeniz bölgesi kaynaklı hayvan yemi ve yem maddelerinde mikotoksin kontaminasyonunun varlığı [61].

	Deoksinivalenol		Zearalenon		Fumonisinler		Okrotoksin A		Aflatoksin B1	
	P.Ö.S./T.Ö.S	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S.	Mak. Seviye	P.Ö.S./T.Ö.S.	Mak. Seviye
Mısır	197/244	3970	59/93	1958	9/16	2174	0/11	T.E.	3/14	311
Buğday	157/254	5510	44/48	921	1/14	580	5/12	7	0/11	T.E.
Arpa	81/161	1400	9/81	970	0/1	T.E.	1/31	33	0/3	T.E.
Soya Fasulyesi	13/32	840	1/18	50	½	3120	0/0	0	0/0	-
Karma Yem	166/294	2226	45/166	2348	3/10	1077	24/33	530	18/56	60
Yulaf	41/50	3021	0/11	T.E.	0/1	T.E.	0/0	0	0/0	-
Diğer Yem Maddeleri	345/472	8020	37/143	1392	7/18	530	17/25	293	11/30	656

T.E.:Tayin Edilemedi, P.Ö.S.: Pozitif Örnek Sayısı, T.Ö.S.: Toplam Örnek Sayısı, Mak. Seviye: µg/kg.

Tablo 5.3. Amerika bölgesinde yapılan çeşitli çalışmalar [62].

Ürün	Mikotoksin Türü	Pozitif Örn./ Örnek Sayısı	Mak. Seviye $\mu\text{g/kg}$
Mısır	Aflatoksin B1	21/70	130
Mısır Ürünleri	Aflatoksin B1	66/654	1600
Sorgum	Aflatoksin B1	14/130	7,33
Mısır	Aflatoksin B1	82/214	129
Yem	Zearalenon	33/50	122
Yem	Okratoksin A	15/45	352
Yem	Fumonisin B1	240/240	4,02
Mısır	DON	190/1560	4600
Mısır ve ürünleri	Fumonisin B1	852/1737	19130
Mısır	Zearalenon	65/214	246

Türkiye’de hayvan üretiminde kullanılan yem ve yem hammaddelerinde aflatoksinlerin ve çeşitli mikotoksinlerin varlığı çeşitli araştırmacılar tarafından farklı bölgelerde incelenmiştir. G.Altuğ ve G.Beklevik tarafından 1998-2000 yıllarında çeşitli yerlerden (balık üreten tesisler ve yem fabrikaları) alınan 85 tane balık yemi (alabalık, levrek, çupra) numunelerinde aflatoksin miktarları TLC ve ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. Buna göre, 43 tane örnekte aflatoksin tespit edilmemiştir. Diğer 42 örneğin ise 5-42.4 $\mu\text{g/kg}$ seviyelerinde toplam aflatoksin (G2, G1, B2, B1) içerdiği görülmüştür [63].

Y.Karakaya ve M. Atasever tarafından Erzurum’da yem ve sütlerde aflatoksin B1 ve aflatoksin M1 seviyeleri araştırılmıştır. Buna göre 72 adet yem örneğinde, (3 örnek haricinde) ortalama $361.12 \pm 94.76 \mu\text{g/kg}$ aflatoksin B1, 72 adet süt örneğinde (6 örnek haricinde) ortalama $3.85 \pm 3.71 \mu\text{g/kg}$ aflatoksin M1 bulunmuştur. Hayvanlar tarafından alınan yemde bulunan aflatoksin B1’in, aflatoksin M1 olarak % 1.07 oranında süte geçtiği belirlenmiştir [64].

Konya’da 52 adet yem ve 26 adet mısır örneği olmak üzere toplam 78 örnekte ELISA yöntemi ile toplam aflatoksin miktarları araştırılmıştır. Bu araştırmaya göre yem örneklerinden 37 adedinde (% 71.1) ve mısır örneklerinin 15 adedinde (% 57.7)

1.5-133 µg/kg arasında aflatoksin tespit edilmiştir. Bununla beraber aflatoksin kontaminasyonunun büyük çoğunluğu (pozitif örneklerin % 50'sinde) 5 µg/kg'dan daha azdır [65].

Kars' da A. Doğan vd. tarafından 100 tane yem örneğinde (20 tane süt yemi, 40 tane besi yemi, 20 tane ot örneği, 20 tane karma yem), toplam aflatoksin B1 düzeyleri araştırılmıştır. Buna göre, örneklerin % 30' unda aflatoksin B1'e rastlanmamıştır. % 8' inde 10 µg/kg'dan yüksek, % 62' sinde 10-20 µg/kg arasında aflatoksin B1' e rastlanmıştır.

S. Kaya. vd. 51 adet yem hammaddesinde (20 adet mısır örneği, 11 adet ayçiçek küspesi örneği, 9 adet soya fasulyesi örneği, 11 adet pamuk tohumu küspesi) tarama çalışması ile okratoksin A varlığını araştırmışlardır [66]. Okratoksin A, 1 adet mısır örneğinde 260 µg/kg, 6 adet ayçiçeği küspesi örneğinde 200-800 µg/kg arasında (ortalama 438 µg/kg) bulunmuştur [67]. A. Ayar vd. tarafından 48 adet işlenmemiş süt, 48 adet yem örneğinde aflatoksin düzeyleri araştırılmıştır. İşlenmemiş sütte 3-200 ng/kg arasında aflatoksin M1, yemde 600-17000 ng/kg aflatoksin B1 bulunmuştur [68].

5.1. Dünya'da Ve Türkiye'de Yasal Mikotoksin Sınırları

1960 yılında aflatoksinlerin keşfi ile birçok ülke, tüketicileri gıdalara kontamine olabilecek mikotoksinlerin zararlı etkilerinden korumak amacıyla yasal düzenlemeler yayınlamaya başladı. Mikotoksinlerin limitlerinin belirlenmesinde karar almada birçok faktör rol oynar (risk, gıda tüketim bilgileri, örnekleme ve analiz için detaylı bilgiler ve sosyo-ekonomik yayınlar gibi bilimsel faktörleri içerir). 1974'den beri, bazı ülkeler gıdalarda maksimum mikotoksin limitlerini düzenlemekte veya önermektedir. Şu anda birçok ülke, ulusal ve uluslararası bazı organizasyonlar ve ajanslar tarafından hazırlanan tavsiye kararları düzenleyen, standart protokoller geliştiren bazı özel komiteler ve komisyonlara sahiptirler. Ülkelerde bulunan bu kurumlar ve bunların tecrübeleri ile yasal sınırlar çeşitli ülkeler tarafından yayınlanmıştır [69]. Tablo 5.4 ve 5.5' de bu amaç ile Avrupa Birliği ve çeşitli ülkelerde yürürlükte olan yem ve yem maddeleri için geçerli mikotoksin sınırları verilmiştir.

Türkiye'de de mikotoksinler hakkında düzenlemeler Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yapılmaktadır. Gıdalarda mikotoksin seviyeleri,

Avrupa Birliği Komisyon Tüzüğü dayanak alınarak, 1881/2006/EC sayılı Gıdalardaki Belirli Bulaşanların Maksimum Limitlerinin Belirlenmesi Hakkında, 29 Aralık 2011 28157 tarihli Resmi Gazetede yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğine göre düzenlenmiştir. Yem ve yem maddelerinde ise mikotoksin sınırlandırılmaları “Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde (Tebliğ No: 2005/3)” belirtilmiştir [70]. Tablo 5.6’da bu tebliğe göre belirlenen seviyeler verilmiştir.

Tablo 5.4. Avrupa Birliği ülkelerinde yürürlükte olan gıda, yem ve yem maddelerinde mikotoksin sınırları [71].

Ülke	Matriks	Mikotoksin Çeşidi	Sınır Değer $\mu\text{g/kg}$
Avrupa Birliği Ülkeleri (Avusturya, Belçika, Bulgaristan, Çek Cum. Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İrlanda, İtalya, Litvanya, Lüksemburg, Hollanda, Polonya, Romanya, İsveç, Portekiz, İngiltere, İspanya vd.)	İşlem görmüş yerfıstığı (insan tüketim amaçlı)	Aflatoksin B1 Toplam Aflatoksin	8 15
	Tüm tahıllar ve bunlardan üretilen ürünler (işlem görmüş mısır hariç)	Toplam Aflatoksin	4
	İşlem görmüş mısır (insan tüketim amaçlı)	Aflatoksin B1	5
	İşlem görmemiş tahıllar	Okratoksin A	5
	İşlem görmemiş mısır	Deoksinivalenol	1750
	İşlem görmemiş tahıllar (mısır hariç)	Zearalenon	100
	İşlem görmemiş mısır		200
	İşlem görmemiş mısır	Fumonisin B1	2000
	Yem Maddeleri	Aflatoksin B1	20
	Tamamlayıcı ve Tam Yemler		10
	2006/576/EC'e göre hayvan yem maddelerinde;		Sınır Değer mg/kg
	Yem Maddeleri (Mısır hariç tahıllar)		8
	Tamamlayıcı ve Tam Yemler	Deoksinivalenol	5
	Yem Maddeleri (Mısır hariç tahıllar)		2
	Mısır ve ürünleri		3
	Tamamlayıcı ve Tam Yemler (buzağı, süt ineği koyunu ve keçici için)	Zearalenon	0,5
	Yem Maddeleri	Okratoksin A	0,25
	Tamamlayıcı ve Tam Yemler (balık)		10
Tamamlayıcı ve Tam Yemler (kümes hayvanları, kuzu)	Fumonisin B1 ve B2	20	

Tablo 5.5. Çeşitli ülkelerde yürürlükte olan gıda, yem ve yem maddelerinde mikotoksin sınırları [71].

Ülke	Matriks	Mikotoksin Çeşidi	Sınır Değer $\mu\text{g}/\text{kg}$
Rusya	Yağlı tohumlar Ekmeklik tahıl (buğday, arpa, yulaf, darı, pirinç, mısır, sorgum)	Aflatoksin B1	5
İsviçre	Tam ve tamamlayıcı yemler (Sığır yemi, koyun, keçi)	Aflatoksin B1	50
Çin	Kümes hayvanları için yem bileşeni	Aflatoksinler	20
Çin	Yem bileşeni ve mısır	Okratoksin A	100
İran	Mısır	Aflatoksin B1	5
		Toplam Aflatoksin	30
Japonya	Tüm Gıdalar	Aflatoksin B1	10
	Sığır ve tavuk için bileşim yemler	Aflatoksin B1	20
Filipinler	Karışım Yemler	Aflatoksin B1	20
Kanada	Kabuklu yemişler ve ürünleri	Toplam Aflatoksin	15
	Bütün yemler	Toplam Aflatoksin	20
Meksika	Tahıllar ve ürünleri	Toplam Aflatoksin	20
A.B.D.	Mısır ve yer fıstığı ürünleri (sığır için)	Toplam Aflatoksin	300
	Mısır ve mısır ürünleri, pamuk tohumu ve diğer hayvan yemleri, hayvan türleri için		20
	Hayvan yemleri ve İçerikleri	Toplam Aflatoksin	50
Fas	Tüm Gıdalar	Aflatoksin B1	10
	Tahıllar	Okratoksin A	30
	Yerfıstığı, pamuk tohumu, mısır ve onların ürünleri	Aflatoksin B1	20
Senegal	Yer fıstığı ürünleri (yem içerikleri)	Aflatoksin B1	300
Mısır	Hayvan ve tavuk yemi	Aflatoksin B1	10
		Toplam Aflatoksin	20

Tablo 5.6. Türkiye’de yem ve yem maddelerinde mikotoksin seviyeleri [70].

Matriks	Mikotoksin Çeşidi	Sınır Değer µg/kg
Tüm yem maddeleri		20
Süt hayvanları (sığır, koyun, kuzu, keçi)		5
Keçi, koyun, sığır karma yemler	Aflatoksin B1	20
Tahıl ve tahıl ürünleri (mısır yan ürünler hariç)		8000
Mısır yan ürünleri		12000
Tam ve Tamamlayıcı Yemler (kuzu, buzağı, domuz, oğlak tam yemleri hariç)	Deoksinivalenol	5000
Tahıl ve tahıl ürünleri (mısır yan ürünler hariç)		2000
Mısır yan ürünleri	Zearalenon	3000
Süt ineği, keçi, kuzu, buzağı		500
Tam ve tamamlayıcı yemleri		
Tahıl ve tahıl ürünleri		250
Kanatlı tam ve tamamlayıcı yemleri	Okratoksin A	100
Mısır ve mısır ürünleri		60000
Tam ve tamalayıcı yemler;		
Ev hayvanı, tavşan, at	Fumonisin B1+B2	5000
Balık		10000
Kuzu, kanatlı, oğlak, buzağı		20000

BÖLÜM 6

DENEYSEL BÖLÜM

6.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri Tablo 6.1' de verilmiştir.

Tablo 6.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici	Teknik Özelliği
Aflatoksin Mix Kit	Supelco	Metanolde çözünmüş, 1 mL'lik amber ampullerde Aflatoksin B1: 12.9 µg/kg
Sert. Ref. Mad.	ERM	Aflatoksin B2: 0.68 µg/kg Aflatoksin G1: 5.2 µg/kg
Metanol (CH ₃ OH)	Merck	HPLC Gradient
Aseton (C ₃ H ₆ O)	Merck	HPLC Gradient
Asetonitril (CH ₃ CN)	Merck	HPLC Gradient
KBr ve NaCl	Merck	% 99.9
HNO ₃	Merck	% 65
H ₂ SO ₄ ve KOH	Merck	% 99.9

Çalışmalarda kullanılan standart aflatoksin çözeltileri (mix) Supelco (U.S.A.) firmasından satın alındı. Standartlar 1 mL'lik ampüller içinde mix olarak aflatoksin B1, B2, G1 ve G2' i içermektedir. Standart aflatoksin çözeltisinin konsantrasyonları

Tablo 6.2. Ana Stok aflatoksin konsantrasyonları.

Aflatoksin Türü	Konsantrasyon (ng/mL)
Aflatoksin G2	300 ng/mL
Aflatoksin G1	1000 ng/mL
Aflatoksin B2	300 ng/mL
Aflatoksin B1	1000 ng/mL
Toplam Aflatoksin	2600 ng/mL

Tablo 6.2’ de verilmiştir. Sertifikalı Referans Madde olarak ERM firmasından satın alınan ERM-BE 36 kodlu aflatoksin G1, B1 ve B2 içeren hayvan yemi örneği kullanıldı.

6.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Aflatoksin tayini için deneysel çalışmalarda Agilent-1100 Series marka (Palo Alto, CA, USA) HPLC kullanıldı. Türevlendirmede Coring-Cell marka elektrokimyasal hücre kullanıldı. Aflatoksinlerin tanımlanması için ACE (Aberdeen, Scotland) firmasından satın alınan C₁₈ -250 mm uzunlukta, 4.6 mm çapında, 5µm partikül boyutlu analitik kolon kullanıldı.

Cihazda kullanılan ekipmanlar ve deneyler de kullanılan araç ve gereçler Tablo 6.3’ de verilmiştir.

6.3. Örneklerin Toplanması

Kocaeli, Sakarya ve Yalova illerinde bulunan yem fabrikalarından ve bunların satış yerlerinden rastgele örnekleme yöntemiyle 80 adet çeşitli özellikte hayvan yemi ve bunların yapımında kullanılan yem hammaddeleri toplandı. 80 adet yem örneğinin 36 adeti karma yem, 18 adet sığır yemi (besi, süt ve buzağı yemleri), 3 adet kuzu yemi, 6 adet tavuk yemi (piliç büyütme, civciv yemi), 17 adet yem hammaddesidir (7 adet soya küspesi, 8 adet ayçiçeği küspesi, 1 adet mısır, 1 adet yem katkı). 500 g olarak alınan örneklere, laboratuvar ortamında Şekil 6.1’de görüldüğü gibi ince toz haline gelinceye (1 mm’lik elekten geçecek şekilde) kadar öğütme işlemi uygulandı.

Tablo 6.3. Deneyleerde kullanılan araç ve gereçler.

Kullanılan Alet Ve Ekipmanlar	Marka /Model	Özellik ve Kullanılan Ekipmanlar
HPLC	Agilent-1100 Series	400 bar basınca dayanabilen, Kolon fırını sıcaklığı ayarlanabilen, FLD dedektörlü, Otomatik örnekleyci içeren
Türevlendirme /elektrokimyasal hücre,	Coring-Cell	100 µA akım sağlayabilen.
Analitik kolon	ACE	Paslanmaz çelik 250 mm x 4.6 mm, 5µm
Analitik terazi	Sartorius	4 haneli hassas terazi
Protein Tayin	LECO-FP 528	Termal iletken dedektörlü
Ultrasonik su banyosu	Elma S 100	12 L su hacimli.
Etüv	Nüve FN 500	Farklı sıcaklıklara ayarlanabilen
Çelik öğütücü	Waring	1 L örnek kapasiteli
Mikro pipet	Eppendorf	100-1000 µL ve 0-100 µL arasında güvenli miktarlarda ölçüm yapabilen.
Cam Malzemeler	Muhtelif	10, 25, 50, 100 mL kalibreli cam balonlar, 10 mL hacimli deney tüpleri, 250 mL hacimli cam balonlar, 110 mL çaplı cam huniler, Desikatör ve Gooch Kroze
Şırınga	Muhtelif	Plastik, Disposable, 20 mL rezervuarı olan
Filtre Kağıdı	Whatmann	20 µm gözenek boyutlu.

6.4. Örneklerin Öğütülmesi ve Saklanması

Öğütme işlemi, 1 L hacme sahip çelik öğütücüler kullanılarak, örneklerin yapısal özellikleri değişmeyecek şekilde yapıldı. Öğütme işlemi ile sadece örneklerin belli bir boyuta getirilmesi amaçlanmadı aynı zamanda yapısı gereği örneklerde dağınık halde olabilen aflatoksinlerin homojen bir şekilde dağılması da gerçekleştirilmiş oldu (Şekil 6.1).

Örnekler, öğütme işleminden sonra saklanmak üzere kodları üzerine yazılmış polietilen numune kaplarına yerleştirildi (Örnek kodları Tablo 6.4' de verilmiştir. Örnek kapları, +4 °C'lik ortamda saklandı [72].



Şekil 6.1. Numunelerin öğütme öncesi ve öğütme sonrası durumu.

6.5. Rutubet Tayini [73]

Rutubet tayininde amaç, su hariç diğer bütün maddelerin toplamını (kuru madde oranı) hesaplayabilmektir. Ayrıca rutubet oranı yemin kalitesini gösteren değerlerden biridir.

Rutubet tayini sırasında, alınan örnekler bekletilmeden, % rutubet oranlarının belirlenmesi için analize alındı. Sabit tartıma getirilmiş cam petri kaplarına, örneklerden 0.1 mg hassaslıkta analitik terazi ile ± 3.00 g civarında tartıldı. Cam petri kapları 105°C' de etüvde 4 saat bekletildi. 4 saat sonra petri kapları oda sıcaklığına kadar soğuması için desikatöre alındı. Soğutulan cam petri kapları tekrar tartıldı.

Tablo 6.4. Örnek kodları ve türleri.

Örnek No	Örnek Türü	Örnek No	Örnek Türü	Örnek No	Örnek Türü	Örnek No	Örnek Türü
1	Karma Y.	21	Buzağı Y.	41	Sığır B. Y.	61	Ayç. K.
2	Soya K.	22	Ayç. K.	42	Kuzu B. Y.	62	Ayç. K.
3	Ayç. K.	23	Ayç. K.	43	Karma Y.	63	Karma Y.
4	Buz. Büy.Y.	24	Soya K.	44	Karma Y.	64	Soya K.
5	Ayç. K.	25	Karma Y.	45	Karma Y.	65	Soya K.
6	Karma Y.	26	Karma Y.	46	Karma Y.	66	Karma Y.
7	Karma Y.	27	Sığır B. Y.	47	Soya K.	67	Karma Y.
8	Buz. Büy.Y.	28	Karma Y.	48	Yem Katkı	68	Karma Y.
9	Karma Y.	29	Karma Y.	49	Karma Y.	69	Soya K.
10	Karma Y.	30	Karma Y.	50	Buz.Baş.Y.	70	Piliç B. Y.
11	Sığır Be.Y.	31	Sığır S.Y.	51	Buz. Bü.Y.	71	Karma Y.
12	Karma Yem	32	Karma Y.	52	Ayç. K.	72	Karma Y.
13	E.Piliç Y.	33	Sığır S.Y.	53	Karma Y.	73	Karma Y.
14	Sığır Yemi	34	Sığır Be.Y.	54	Sığır Be. Y.	74	Karma Y.
15	Sığır Yemi	35	Sığır Süt Y.	55	Besi Yemi	75	Ayç.K.
16	Kuzu B.Y.	36	Piliç Büy.y.	56	Sığır Be.Y.	76	Karma Y.
17	Karma Y.	37	Sığır Be.Y.	57	Karma Y.	77	Karma Y.
18	Karma Y.	38	E.Piliç Y.	58	Karma Y.	78	Soya K.
19	Kuzu B.Y.	39	Tavuk Y.	59	Karma Y.	79	Mısır
20	Karma Y.	40	E. Cıvciv Y.	60	Karma Y.	80	Karma Y.

Aşağıdaki formüle göre % rutubet miktarı belirlendi;

$$\% \text{ Rutubet} = \left[\frac{\text{Son tartım} - \text{İlk tartım}}{\text{Örnek miktarı}} \right] \times 100 \quad (6.1)$$

Son tartım= Petri kabı+ numune İlk tartım= Boş petri kabı

Sonuçlar Tablo 6.5’ de verilmiştir.

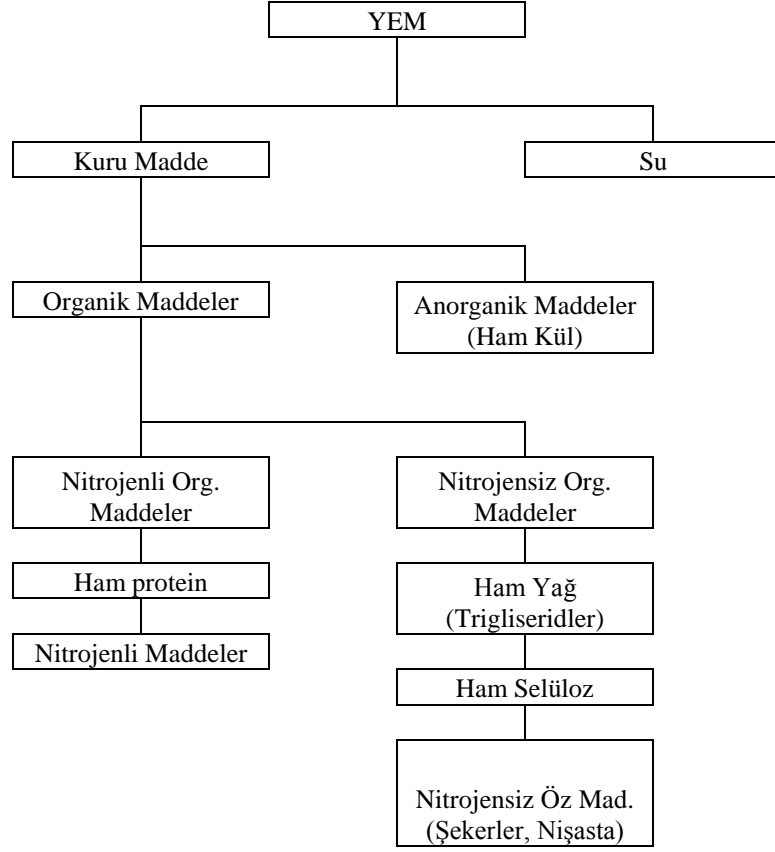
6.6. Örneklerin Kalite Analizlerinin Yapılması

Yemler, kendilerini oluşturan su, yağ, nitrojenli maddeler, selüloz ve mineral maddelerden oluşur. Yem ve yem hammaddelerinin değerlendirilmesinde fiziksel (sertlik, renk, koku), kimyasal (protein, selüloz, yağ ve kül) ve biyolojik (enerji) analizlerden faydalanılır. Bu analizlerin anlam kazanması için Şekil 6.2’ de verilen yemlerin kimyasal yapıları bilinmelidir.

Tablo 6.5. % Rutubet sonuçları.

Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%
No	Rutubet	No	Rutubet	No	Rutubet	No	Rutubet
1	8.20	21	8.54	41	11.90	61	7.59
2	10.80	22	9.93	42	8.80	62	7.39
3	9.63	23	8.56	43	10.09	63	9.34
4	8.95	24	10.34	44	9.59	64	7.89
5	8.42	25	8.39	45	13.50	65	8.47
6	9.08	26	9.28	46	10.70	66	7.37
7	9.16	27	10.96	47	10.92	67	7.02
8	8.56	28	8.33	48	3.14	68	7.95
9	9.02	29	8.17	49	10.55	69	8.30
10	8.24	30	8.52	50	10.35	70	7.35
11	9.32	31	9.58	51	10.50	71	6.99
12	5.54	32	7.94	52	9.05	72	5.97
13	9.97	33	11.49	53	9.38	73	6.34
14	9.75	34	11.60	54	10.79	74	7.35
15	8.28	35	10.12	55	8.39	75	6.21
16	10.37	36	12.97	56	9.72	76	7.42
17	9.10	37	10.52	57	11.22	77	5.20
18	8.66	38	7.80	58	11.27	78	11.71
19	10.12	39	8.80	59	12.31	79	6.14
20	9.75	40	9.22	60	9.67	80	10.05

Yem kalitelerinin belirlenmesinde kullanılan ham protein, ham selüloz, ham yağ, ham kül gibi kimyasal analizler genelde Weende analiz yöntemlerine göre yapılmaktadır [74].



Şekil 6.2. Yemlerin bileşenleri.

6.6.1. Ham Kül Tayini [73]

Yem ve yem hammaddesi örneklerinin ham kül tayinleri için örnekler, belirli sıcaklıkta (550 °C) yakılır, organik kısım yakma ile uçurulur ve geriye kalan anorganik kısım % olarak hesaplanır.

Yakma işleminde kullanılacak porselen krezeler temizlendikten sonra, etüvde sabit tartıma getirilene kadar bekletildi. Porselen krezeler desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra analitik terazi de daraları alındı. Porselen krezelere ince öğütülmüş yem numunesinden ± 3 g civarında tartıldı. Krezeler 550 °C sıcaklığa ayarlı kül fırınına yerleştirildi. 550 °C sıcaklıkta 4 saat (örnekleri kömürleşme oluşturmada açık gri-beyaz renk skalasında kül oluşuncaya kadar) tutuldu. Dört saat sonra fırın kapağı yarım seviye açılarak soğumaya bırakıldı. Desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra son tartım alındı.

% Ham kül değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ Ham Kül} = (c-a) \times 100/b-a \quad (6.2)$$

a: Porselen krozenin boş ağırlığı (dara, g)

b: Porselen krozenin boş ağırlığı (dara) + yem örneğinin ağırlığı (g)

c: Porselen krozenin boş ağırlığı (dara) + ham külün ağırlığı (g)

Elde edilen sonuçlar Tablo 6.6' da verilmiştir.

Tablo 6.6. % Ham kül sonuçları.

Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%
No	Ham Kül	No	Ham Kül	No	Ham Kül	No	Ham Kül
1	8.80	21	7.76	41	7.90	61	7.71
2	7.50	22	6.60	42	10.30	62	7.07
3	7.53	23	6.15	43	8.62	63	7.45
4	9.31	24	7.16	44	11.05	64	5.82
5	7.80	25	9.02	45	7.17	65	7.12
6	13.05	26	7.87	46	7.85	66	7.19
7	8.12	27	13.75	47	6.00	67	8.37
8	7.20	28	9.75	48	21.63	68	8.42
9	5.50	29	9.95	49	7.70	69	6.83
10	8.60	30	6.98	50	7.55	70	4.78
11	8.19	31	19.30	51	7.70	71	9.09
12	3.15	32	6.57	52	7.78	72	7.65
13	4.93	33	14.15	53	8.40	73	37.48
14	8.48	34	13.13	54	9.19	74	8.23
15	7.23	35	8.40	55	10.07	75	7.56
16	14.40	36	5.05	56	8.42	76	8.05
17	6.71	37	7.76	57	10.67	77	2.49
18	12.17	38	5.35	58	6.10	78	7.13
19	14.40	39	12.98	59	5.32	79	1.64
20	8.90	40	5.90	60	10.03	80	9.02

6.6.2. Ham Selüloz Tayini [73]

İnce şekilde öğütülmüş yem veya yem hammaddesi örneğinden yaklaşık olarak ± 1.0 g cam balona tartıldı. Cam balon, üzerine 100 ml hacimde % 1.25' lik sülfürik asit çözeltisi ilave edildikten sonra geri soğutucuya bağlanarak ısıtıcıya yerleştirildi. Çözelti ve numune karışımı kaynamaya başladıktan 30 dk sonra üzerine 10 ml % 28'lik potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek 30 dk daha kaynatma işlemine devam edildi. 30 dk sonra numune, süzülmesi için önce Gooch krozesi kuvars kumla yarı seviyeye kadar dolduruldu ve vakum pompası kullanılarak sıcak saf su ile yıkanarak kuvarz kum sıkıştırıldı. Sıcak numune, gooch krozesinden filtre edildi. Filtre işleminden sonra kuvarz kum üzerinde selüloz içeren kalıntı birikti. Biriken kalıntı 2 defa sıcak su, 10 ml % 1' lik sülfürik asit çözeltisi ile yıkandı. Sıcak saf su ile yıkama yapıldıktan sonra 10 ml % 1' lik sodyum hidroksit çözeltisi ve sıcak saf su ile tekrar yıkandı. Son kalıntı aseton ile yıkandı. Gooch krozesinde kalan kalıntı 1 saat 130 °C' de etüvde kurutuldu. Krozeler etüvden desikatöre alındı ve oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra tartıldı (tartım1). Tartılan gooch krozesi yakma fırınına konuldu ve 550-600 °C' de 30 dk yakıldı. Desikatörde soğutuldu ve tartıldı (tartım 2).

% Ham selüloz değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ Ham Selüloz} = \frac{[\text{Tartım1} - \text{Tartım2}]}{\text{numune ağırlığı (g)}} \times 100 \quad (6.3)$$

Elde edilen sonuçlar Tablo 6.7' de verilmiştir.

6.6.3. Ham Protein Tayini [75]

Yem ve yem hammaddesi örneğinin bileşiminde bulunan protein içeriğinin belirlenmesi için saf oksijen, örnek ile yüksek sıcaklıkta yakılarak ortaya çıkan serbest azot, LECO cihazında bulunan termal iletkenlik dedektörü yardımıyla ölçülür. Uygun sayısal faktör ile çarpılarak eşdeğer protein hesaplanır.

Ham protein tayininde işlem için, alüminyum analiz kağıtlarına örneklerden 0.15-0.25 g civarında tartıldı ve kalibrasyon ayarından sonra örnekler okunmaya alındı.

Cihazda elde edilen % N (serbest azot) değeri kullanılarak % ham protein değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ Ham Protein} = \% \text{ N} \times 6.5 \quad (6.4)$$

Elde edilen sonuçlar Tablo 6.8' de verilmiştir.

Tablo 6.7. % Ham selüloz sonuçları.

Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%
No	H.Selüloz	No	H.Selüloz	No	H.Selüloz	No	H.Selüloz
1	13.80	21	10.43	41	7.54	61	17.83
2	3.68	22	17.30	42	15.90	62	19.06
3	18.17	23	14.96	43	6.69	63	12.62
4	16.01	24	2.46	44	10.80	64	2.06
5	18.78	25	6.40	45	11.18	65	3.20
6	13.55	26	8.66	46	11.50	66	8.85
7	12.96	27	11.40	47	2.65	67	10.49
8	13.11	28	9.67	48	16.43	68	8.10
9	5.05	29	8.82	49	7.75	69	12.86
10	12.50	30	11.32	50	7.60	70	2.82
11	16.93	31	20.20	51	10.05	71	13.35
12	21.09	32	9.20	52	17.66	72	16.41
13	2.13	33	11.07	53	7.88	73	17.77
14	8.78	34	8.02	54	23.29	74	9.55
15	24.94	35	12.92	55	16.77	75	32.58
16	16.05	36	1.75	56	7.26	76	20.29
17	13.61	37	13.78	57	11.29	77	15.21
18	14.98	38	2.20	58	12.58	78	4.52
19	13.95	39	6.92	59	8.62	79	10.29
20	8.50	40	2.62	60	10.23	80	9.13

Tablo 6.8. % Ham protein sonuçları.

Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%	Örnek	%
No	H.Protein	No	H.Protein	No	H.Protein	No	H.Protein
1	12.95	21	18.13	41	13.82	61	38,32
2	48.21	22	34.85	42	21.54	62	38.59
3	7.85	23	38.84	43	14.41	63	19.96
4	14.78	24	48.11	44	17.06	64	26.25
5	37.06	25	16.10	45	22.64	65	49.96
6	17.45	26	19.87	46	16.34	66	17.31
7	18.94	27	13.33	47	46.87	67	19.27
8	15.89	28	14.02	48	3.28	68	15.87
9	14.63	29	16.17	49	17.28	69	53.05
10	12.14	30	20.45	50	18.32	70	23.78
11	15.89	31	10.01	51	16.98	71	18.51
12	21.01	32	16.85	52	34.25	72	20.34
13	21.08	33	16.59	53	15.02	73	17.62
14	18.78	34	15.63	54	19.65	74	18.44
15	19.63	35	20.65	55	22.99	75	37.91
16	14.00	36	22.75	56	20.66	76	16.99
17	15.77	37	15.42	57	16.01	77	24.12
18	21.87	38	19.08	58	20.52	78	49.56
19	14.00	39	16.25	59	15.54	79	8.89
20	14.76	40	23.13	60	15.78	80	15.05

6.7. Aflatoksin Tayini

6.7.1. Aflatoksin Tayini İçin HPLC Şartlarının Belirlenmesi

Aflatoksinlerin çeşitli dalga boylarındaki absorpsiyonları incelendiğinde 362 nm' de UV ışığı kuvvetli olarak absorpladığı ve 425-450 nm' de floresans emisyonu gösterdiği bilinmektedir [34]. Çeşitli çalışmalarda aflatoksinlerin belirlenmesi için absorpsiyon ve emisyon dalga boyları 360-450 nm aralığında belirtilmiştir [76]. Bu çalışmada da floresans dedektör aflatoksinlerin belirlenmesi için kullanılmış, absorpsiyon ve emisyon dalga boyları için sırasıyla 360 ve 430 nm' de çalışmalar yapılmıştır.

Aflatoksinlerin tayininde araştırmacılar kolon fırının sıcaklığı için oda sıcaklığından 40 °C' e kadar aralıktaki değişen sıcaklıklar kullanmışlardır [77]. Bu çalışmada, kolon fırın sıcaklığı oda sıcaklığına yakın değer olarak 25 °C ayarlanmıştır.

Hazırlanan standartlar ve örnekler, otomatik örnekleiyici (autosampler) kullanılarak, 100 µL hacimli loop takılmış enjektör ile otomatik olarak sisteme enjeksiyon yapıldı.

Birçok çalışmada yem ve yem hammaddelerinde aflatoksinlerin belirlenmesinde mobil faz akış hızı değişik aralıklarda (0.5 mL/dk – 2.0 mL/dk) denenmiştir. Bu çalışmada mobil faz akış hızı olarak M. U. Beg, vd. (2006) ve L.Decastelli vd. (2007) tarafından uygulanan 1.0 mL/dk seçilmiştir. HPLC ile aflatoksinlerin ayrılması ve tanımlanması için sabit faz olarak 250 mm uzunlukta, 4.6 mm çapında, 5µm C₁₈ partikül boyutlu analitik kolon kullanılmıştır [78,79].

HPLC'de mobil faz içerikleri farklı oranlarda karışımlar halinde olabileceğinden izokratik veya gradient olarak sistemde kullanılabilir. Bu alışmada, HPLC'de mobil faz izokratik olarak, su/metanol/asetonitril (56/26/18) karışımı kullanılmıştır [80]. Çalışmalarda kullanılan mobil faz HPLC' e takılmadan önce ultrasonik su banyosunda hava kalmayınca kadar bekletildi. Yine HPLC' e mobil fazın her takılışında sistem içinde kalabilecek havanın dışarı atılması için purge vanası açılarak, sistemde olması muhtemel hava baloncukları sistem dışına atıldı.

Analitik kolonda gerçekleşen ayırmalar sonucu elde edilen sinyaller ChemStations bilgisayar yazılımı ile otomatik olarak integrasyonları hesaplandı. Analizler sırasında elde edilen veriler bilgisayara ait hard diskte depolandı.

6.7.2. Türevlendirme

Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2' nin HPLC' de floresans dedektör kullanılarak belirlenmesinde, sadece B2 ve G2 su bazlı mobil fazlarda yeterli yoğunlukta analitik olarak kullanılış olan floresans üretirler. Fakat numune içinde bulunan aflatoksin B1 ve G1' in HPLC ile tayin edilebilmeleri için, UV ışığı altındaki doğal floresans yayınımlarının türevlendirme reaksiyonu ile güçlendirilmesi gerekmektedir. Aflatoksin B1 ve G1' in floresans şiddetini önemli derecede arttırmak için, kuvvetli asitler veya oksidanlar, brom veya iyot gibi çeşitli reaktiflerin reaksiyonları incelenmiştir [81].

Son 20 yıldır elektrokimyasal hücreler yardımıyla kolon sonrası türevlendirmede (post-column derivatization-PCD) brom ile yapılan çalışmalar, çeşitli türde örneklerin türevlendirmesi için geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu amaçla elektrokimyasal hücreler yaygın olarak kullanılmaktadır. Burada istenilen brom, mobil fazda bulunan bromit tarafından kolondan elektrokimyasal hücreye doğru akarken üretilir. Üretilen bromun miktarı üretilen akım tarafından kontrol edilebilmektedir. Elektrokimyasal hücrede brom kullanılarak yapılan türevlendirme için çok çeşitli örneklerde yüksek geri alma ve düşük dedeksiyon limitlerine ulaşılmıştır [82].

Bu çalışmada analitik kolonda aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2) birbirinden tam olarak ayrılması ve aflatoksin B1 ve aflatoksin G1' in floresans şiddetinin kuvvetlendirilmesi için Coring-cell marka (Tablo 6.10) kolon sonrası (post column) türevlendirme amaçlı elektrokimyasal hücreden yararlanıldı. Bromun üretilmesi için, kullanılan her 1 L mobil faza 120 mg KBr ve 350 µL 4 M HNO₃ eklenmiştir.

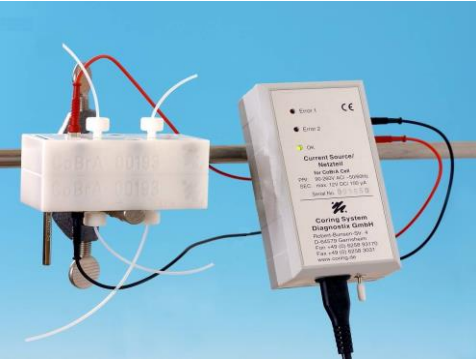
6.7.3. Aflatoksin B1,B2,G1,G2' nin Tanımlanması Ve Lineer Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Bu çalışmada, yemler için yayınlanan yasal limitlerden yararlanarak çalışma aralığının sınırları belirlenmiştir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliği ve Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde belirtilen gıda ve yemler için maksimum limitler Tablo 6.9' da verilmiştir. Çalışma aralığı belirlenirken bu sınırlara yakın değerler dikkate alınarak basamaklar hazırlanmıştır.

Tablo 6.9. Gıda ve yem maddelerinde Aflatoksin B1 için maksimum limitler [70].

Matriks	Örnek Türü	Yasal Sınır (µg/kg)
Yem Maddeleri	Yem	20
Tam yemler (süt hayvanları)	Yem	5
Sığır, keçi, koyun, kanatlı tam yemi	Yem	20

Tablo 6.10. Çalışmalarda uygulanan HPLC şartları.

Mobil Faz (İzokratik)	Su/metanol/asetonitril, (56:26:18) 120 mg KBr ve 350 µL 4M HNO ₃
Mobil Faz Akış Hızı	1.0 mL/dk
Kolon	250 x 4.6 mm, 5µm partikül boyutlu
Kolon Sıcaklığı	25 ⁰ C
Elektrokimyasal Hücre	Coring-celli marka -100 µA 
Floresans dedektör	λ _{ex} : 360 nm ve λ _{em} :430 nm
Enjeksiyon Hacmi	100 µL

Aflatoksinlerin tanımlanması piklerin çıkış zamanına göre (standart madde sertifikasyonu esas alınarak) belirlenmiştir. Çalışma aralıklarının belirlenmesinde kullanılan standart çözeltiler, Tablo 6.2’ de içeriği verilen ana stok üzerinden hazırlandı. Ana stok çözelti kullanılarak II.Aşama standart çözelti hazırlandı. İkinci aşama standart çözeltisi hazırlanması için 1 mL’ lik mix aflatoksin çözeltisi, 10 mL’lik balon jöjeye aktarıldı ve HPLC saflıkta metanol kullanılarak 10 mL çizgisine kadar tamamlandı. Hazırlanan standart çözeltilerin son konsantrasyonları Tablo 6.11’ de verilmiştir.

Tablo 6.11. II. Aşama Standart çözelti son konsantrasyonları.

Aflatoksin Türü	Konsantrasyon ng/mL
Aflatoksin G2	30 ng/mL
Aflatoksin G1	100 ng/mL
Aflatoksin B2	30 ng/mL
Aflatoksin B1	100 ng/mL
Toplam Aflatoksin	260 ng/mL

İkinci aşama stok çözeltilerden, Tablo 6.12’ de belirtilen hacimlerde standart çözelti, bidistile su ve HPLC saflıkta metanol kullanılarak 10 mL’ lik çözeltiler halinde 6 seviyeli standart çalışma aralığı hazırlandı. Elde edilen konsantrasyonlar Tablo 6.13’ de verilmiştir.

Tablo 6.12. II. Aşama stok çözeltilerden 6 basamaklı çalışma aralığı hazırlanması.

	II. Aşama Stoktan Alınan Hacim µL	Metanol µL	Bidistile Su µL	Toplam Hacim mL
1.Seviye	40	3960	6000	10
2.Seviye	120	3880	6000	10
3.Seviye	200	3800	6000	10
4.Seviye	280	3720	6000	10
5.Seviye	360	3640	6000	10
6.Seviye	720	3280	6000	10

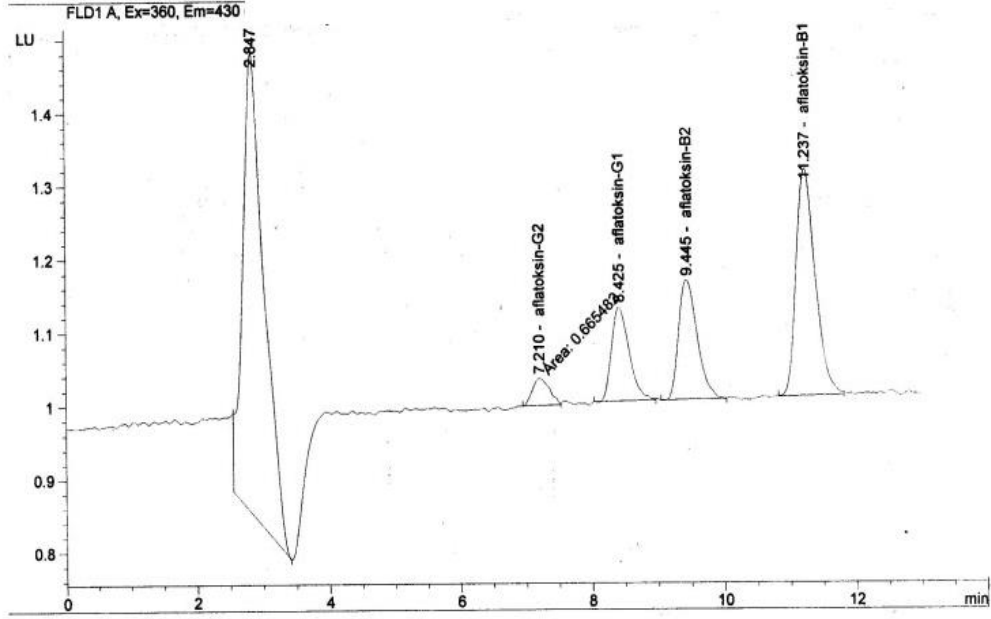
Tablo 6.13. Çalışma aralığı basamaklarında bulunan aflatoksin konsantrasyonları.

	Aflatoksin B1 ng/mL	Aflatoksin B2 ng/mL	Aflatoksin G1 ng/mL	Aflatoksin G2 ng/mL
1.Standart	0.40	0.12	0.40	0.12
2.Standart	1.20	0.36	1.20	0.36
3.Standart	2.00	0.60	2.00	0.60
4.Standart	2.80	0.84	2.80	0.84
5.Standart	3.60	1.08	3.60	1.08
6.Standart	7.20	2.16	7.20	2.16

Tablo 6.13’ de belirtilen konsantrasyonları içeren standart çözeltiler HPLC’ de 100 µL’ lik hacim halinde otomatik olarak enjeksiyon edilerek okumalar yapıldı.

Kromatogramdan aflatoksin piklerinin çıkış zamanları belirlenerek aflatoksinlerin tanımlamaları yapıldı (Şekil 6.3).

Şekil 6.3’ de belirtilen kromatogramdan da görüldüğü gibi önce 6.43 dk’ da aflatoksin G2 piki, 7.42 dk’ da aflatoksin G1 piki, 8.26 dk’da aflatoksin B2, 9.71 dk’ da flatoksin B1 piki elde edilmiştir (Tablo 6.14).

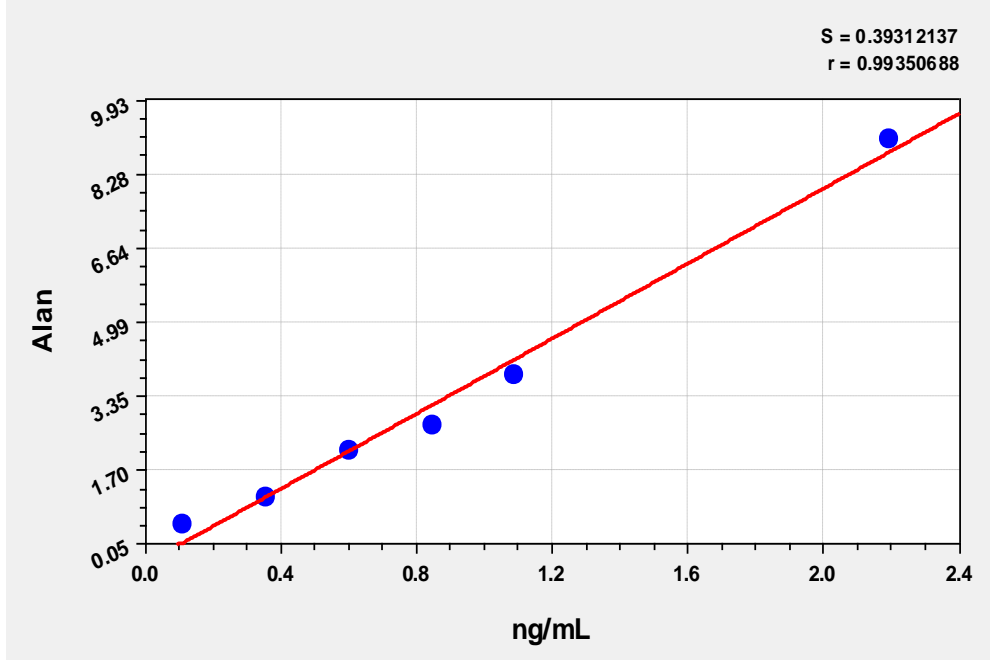


Şekil 6.3. Aflatoksin G2, G1, B2, B1 piklerinin çıkış zamanları ve tanımlamaları.

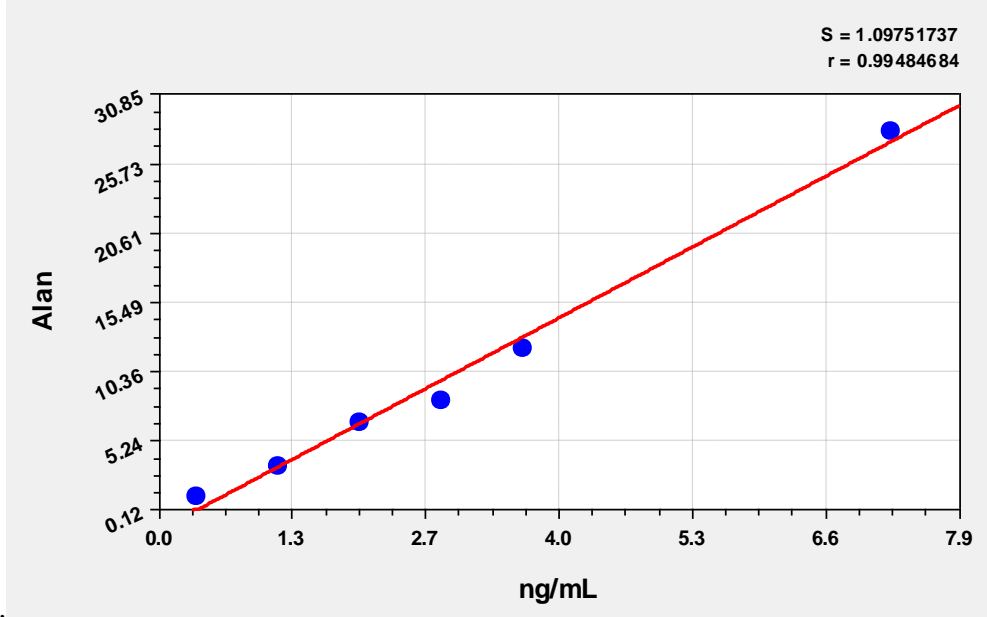
Piklerin integrasyonları otomatik olarak yapıldı ve pik alanları hesaplandı. Piklerin çıkış zamanları, alanları ve konsantrasyonları Tablo 6.14’ de verilmiştir. 4 aflatoksin türü (aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 için ayrı ayrı) için elde edilen pik alanları, konsantrasyona (ng/mL) karşı grafiğe geçirildi (Aflatoksin G2: Şekil 6.4, Aflatoksin G1: Şekil 6.5, Aflatoksin B2: Şekil 6.6, Aflatoksin B1: Şekil 6.7).

Tablo 6.14. Aflatoksin piklerinin çıkış zamanları, miktarları ve alanları.

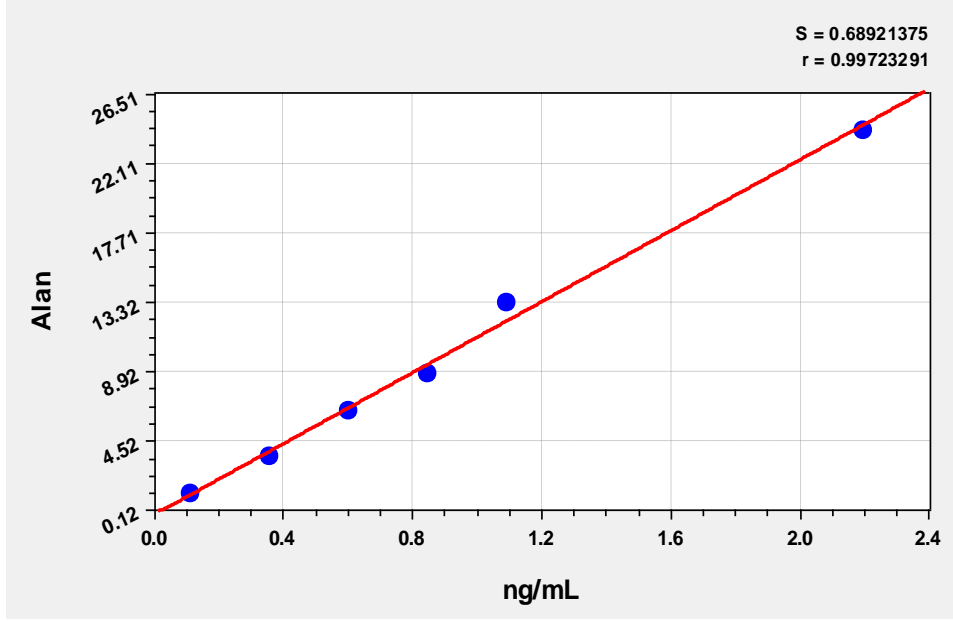
Çıkış Zamanı dk	BileşenAdı	Basamak	Miktar (ng/mL)	Alan (Area)
6.43	Aflatoksin G2	1	0.12	0.53
		2	0.36	1.12
		3	0.6	2.13
		4	0.84	2.70
		5	1.08	3.82
		6	2.16	9.08
7.42	Aflatoksin G1	1	0.4	1.23
		2	1.2	3.45
		3	2.0	6.61
		4	2.8	8.21
		5	3.6	12.16
		6	7.2	28.16
8.26	Aflatoksin B2	1	0.12	1.25
		2	0.36	3.58
		3	0.6	6.43
		4	0.84	8.83
		5	1.08	13.30
		6	2.16	24.21
9.71	Aflatoksin B1	1	0.4	2.28
		2	1.2	6.52
		3	2.0	11.09
		4	2.8	15.79
		5	3.6	21.24
		6	7.2	41.22



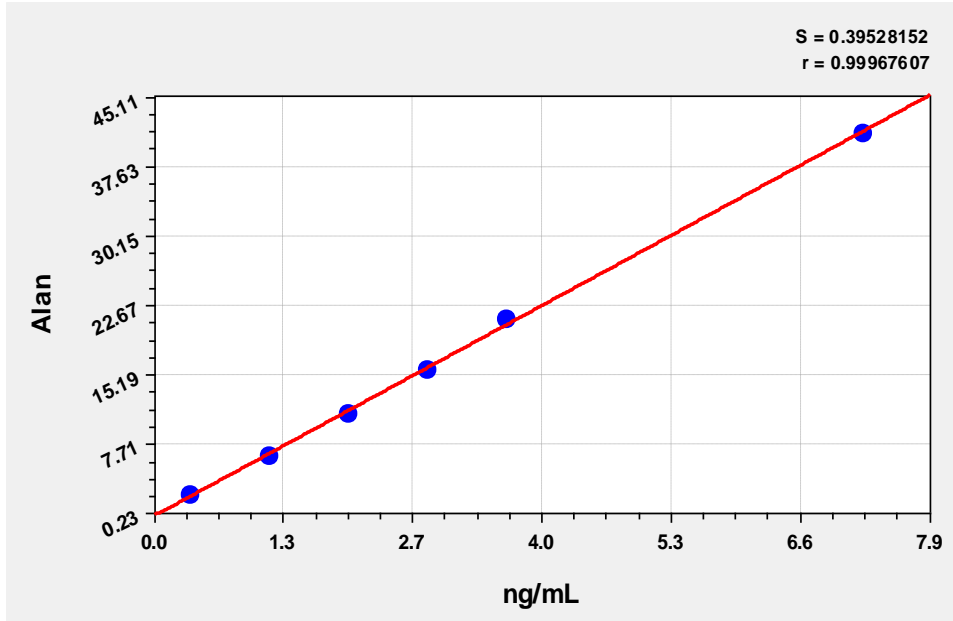
Şekil 6.4. Aflatoksin G2 için kalibrasyon grafiği ($y= mx+b$ olmak üzere, $m = 4.25$ (eğim), $b = -0.43$, Korelasyon kat sayısı: 0.9935)



Şekil 6.5. Aflatoksin G1 için kalibrasyon grafiği ($y= mx+b$ olmak üzere, $m = 4.00$ (eğim), $b = -1.51$, Korelasyon kat sayısı: 0.9948)



Şekil 6.6. Aflatoxin B2 için kalibrasyon grafiği ($y= mx+b$ olmak üzere, $m = 11.46$ (eğim), $b = -0.25$, Korelasyon kat sayısı: 0.9972)



Şekil 6.7. Aflatoxin B1 için kalibrasyon grafiği ($y= mx+b$ olmak üzere, $m = 5.77$ (eğim), $b = -0.19$, Korelasyon kat sayısı: 0.9996)

6.7.4. Ekstraksiyon Ve Temizleme (Clean-up) Basamağı

Araştırmacılar çeşitli matrislerden aflatoxinlerin ekstraksiyonu için aseton, asetonitril, metanol, kloroform gibi organik çözücülerin farklı oranlardaki karışımlarını kullanmışlardır [82].

Bu çalışmada ekstraksiyon işlemleri için aseton, metanol ve asetonitrilin farklı oranlardaki karışımları kullanıldı. Ekstraksiyon için çelik blenderlara 50 g örnek ve 5 g NaCl tartıldı. Ekstraksiyonda kullanılacak çözelti hacmi 250 mL olarak belirlendi.

Immunoaffiniti kolon uygulaması için ekstrakte edilen örnek, Whatman filtre kağıdından (20 µm) filtre kağıdından süzüldü. Süzüntüden 20 mL alınıp, 60 mL hacme saf su ile seyreltildi. Seyreltilen filtrat cam-mikrofiber süzgeç kâğıdından süzüldü. Süzüntüden 15 mL alınarak, immunoaffiniti kolon üzerine 20 mL rezervuara sahip takılmış şırınga içine boşaltıldı ve saniyede 1-2 damla ve sürekli olarak geçecek şekilde şırınganın pistonuna bastırılarak geçirildi. Daha sonra immunoaffiniti kolon 10 mL bidistile su ile yıkandı.

Elüsyon işlemi 1 mL HPLC saflıkta metanol ile gerçekleştirildi. Daha sonra metanolün seyreltilmesi için 1 mL distile su kullanıldı. Toplam 2 mL örnek çözeltisi 1gr numuneye eşdeğer olmuştur. Örnek çözeltileri viallere konularak, sıra ile HPLC’de analiz edildi.

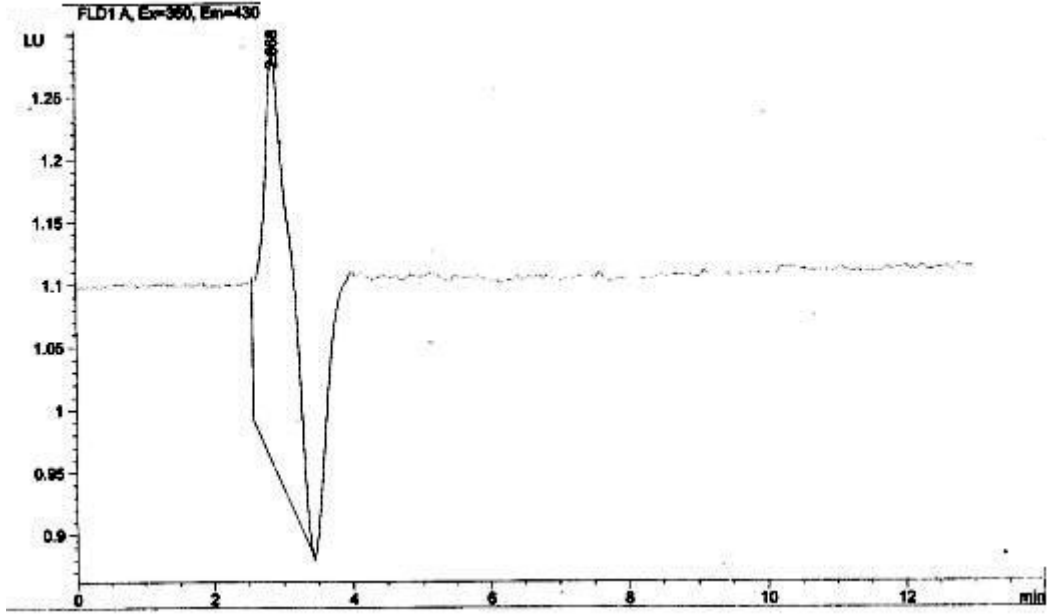
Bu çalışmada farklı ekstraksiyon çözeltilerinin analizinde, aflatoksin içermediği bilinen karma yem örneği üzerine (Şekil 6.8), toplam aflatoksin konsantrasyonları 1.3-2.6-5.2-10.4-15.6 µg/kg olan standart aflatoksin karışımlarından (II. aşama stok çözeltilerden) ilave edilerek spike yapıldı. Spike işlemi için kullanılan 5 farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerin içerikleri Tablo 6.15’ de verilmiştir.

6.7.4.1. Asetonun Farklı Oranlardaki Karışımlarının Denenmesi

Toplam aflatoksin konsantrasyonları 1.3-2.6-5.2-10.4-15.6 µg/kg olacak şekilde Tablo 6.15’de verilen çözeltiler (Çözelti 1, 2, 3, 4ve 5) kullanılarak kirletilen örnekler, hacimce aseton/su oranları % 55/45, % 70/30, % 85/15 olan ekstraksiyon çözeltileri ile ekstrakte edilmiştir. Aseton ile yapılan ekstraksiyon çalışmalarının % geri kazanım sonuçları Tablo 6.16-18’ de verilmiştir.

% Geri kazanım oranları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Geri Kazanım} = [\text{Ölçüm Sonucu/Referans Değer}] \times 100 \quad (6.5)$$



Şekil 6.8. Aflatoksin içermeyen karma yem örneği (HPLC kromatogramı).

Tablo 6.15. Örneklere ilave edilen aflatoksin standartlarının içerikleri.

Çözelti No	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam Aflatoksin (µg/kg)
1	0.50	0.15	0.50	0.15	1.3
2	1.0	0.30	1.0	0.30	2.6
3	2.0	0.60	2.0	0.60	5.2
4	4.0	1.20	4.0	1.20	10.4
5	6.0	1.80	6.0	1.80	15.6

Tablo 6.16. % 55-45 Aseton-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.70	140	0.11	11	2.37	118.5	3.82	95.50	4.76	79.33
Aflatoksin B2	0.03	20	0.06	20	0.22	36.66	0.36	30	0.48	26.66
Aflatoksin G1	0.12	24	0.12	12	0.35	175	0.61	15.25	0.73	12.16
Aflatoksin G2	0.11	73.3	0.12	40	0.16	26.66	0.29	24.16	0.27	15
Toplam Aflatoksin	0.96	73.84	0.41	15.76	3.10	59.61	5.09	48.94	6.25	41.66

Tablo 6.17. % 70-30 Aseton-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.77	154	1.21	121	1,04	52	3.05	76.25	4.56	76
Aflatoksin B2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	10.55
Aflatoksin G1	0.11	22	0.17	17	0,12	6	0.38	9.5	0.59	9.83
Aflatoksin G2	-	-	-	-	0,11	18.33	0.16	13.33	-	-
Toplam Aflatoksin	0.88	67.69	1.38	53.07	1,27	24.42	3.59	34.51	5.36	34.35

Tablo 6.18. % 85-15 Aseton-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0,56	112	0.78	78	1.56	78	4.05	101.25	3.44	57.33
Aflatoksin B2	-	-	-	-	-	-	0.26	21.66	-	-
Aflatoksin G1	0,73	146	0.88	88	1.20	6	1.36	34.00	0.48	8
Aflatoksin G2	0,25	166,66	0.27	90	0.34	56.66	0.07	5.83	-	-
Toplam Aflatoksin	1,54	118	1.94	74.61	3.10	59.61	5.76	55.40	3.92	25.12

6.7.4.2. Asetonitrilin Farklı Oranlardaki Karışımlarının Denenmesi

Toplam aflatoksin konsantrasyonları 1.3-2.6-5.2-10.4-15.6 µg/kg olacak şekilde Tablo 6.15' de verilen çözeltiler (Çözelti 1, 2, 3, 4, ve 5) kullanılarak kirletilen örnekler, hacimce asetonitril/su oranları % 55/45, % 70/30, % 85/15 olan ekstraksiyon çözeltileri ile ekstrakte edilmiştir. Asetonitril ile yapılan ekstraksiyon çalışmalarının % geri kazanım sonuçları tablo 6.19-6.21'de verilmiştir.

6.7.4.3. Metanolün Farklı Oranlardaki Karışımlarının Denenmesi

Toplam aflatoksin konsantrasyonları 1.3-2.6-5.2-10.4-15.6 µg/kg olacak şekilde Tablo 6.15' de verilen çözeltiler (Çözelti 1, 2, 3, 4,ve 5) kullanılarak kirletilen örnekler, hacimce metanol-su oranları % 60/40, % 70/30, % 80/20 olan ekstraksiyon çözeltileri ile ekstrakte edilmiştir. Metanol ile yapılan ekstraksiyon çalışmalarının % geri kazanım sonuçları tablo 6.22-24' de verilmiştir.

Tablo 6.19. % 55-45 Asetonitril-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.73	146	0.85	85	1.58	79	1.46	36.5	0.25	4.16
Aflatoksin B2	0.18	175.20	0.023	7.66	0.14	23.33	0.05	4.16	-	-
Aflatoksin G1	0.034	6.80	0.052	5.20	0.26	13	0.56	14	0.43	7.16
Aflatoksin G2	0.16	145.45	0.33	110	0.12	20	0.10	8.33	0.093	5.16
Toplam Aflatoksin	1.11	85.38	1.26	48.46	2.10	40.38	0.71	6.82	0.77	4.93

Tablo 6.20. % 70-30 Asetonitril-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.59	118	-	-	1.80	90	0.16	4.00	0.17	2.83
Aflatoksin B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aflatoksin G1	0.07	14	0.20	20	0.13	6,50	-	-	0.29	4.83
Aflatoksin G2	-	-	0.10	33.33	0.14	23.33	0.31	25.83	0.08	4.44
Toplam Aflatoksin	0.63	48.46	0.30	11.53	2.07	39.80	0.48	4.61	0.54	3.46

Tablo 6.21. % 85-15 Asetonitril-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.43	86	0.67	67	0.89	44.5	1.17	29.25	-	-
Aflatoksin B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aflatoksin G1	0.024	4.8	0.03	3.00	0.064	3.20	0.07	1.75	-	-
Aflatoksin G2	-	-	0.12	40	-	-	-	-	0.17	9.44
Toplam Aflatoksin	0.45	34.61	0.80	30.76	0.95	18.26	1.24	11.92	0.17	1.08

Tablo 6.22. % 60-40 Metanol-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.61	122	0.85	85.09	1.42	71.45	2.86	71.73	3.89	64.83
Aflatoksin B2	0.18	124.87	0.27	92.26	0.43	72.16	0.89	74.52	1.25	69.66
Aflatoksin G1	0.58	116.22	0.98	98.06	1.64	82.00	3.07	76.98	4.50	75.12
Aflatoksin G2	0.17	114.28	0.18	60.53	0.29	49.33	0.76	64.03	1.33	74.08
Toplam Aflatoksin	1.54	119.22	2.28	88.05	3.80	73.07	7.61	73.18	10.98	70.41

Tablo 6.23. % 70-30 Metanol-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.76	150.00	0.89	89.00	1.95	97.50	3.12	78.00	3.71	61.83
Aflatoksin B2	0.15	100.00	0.22	73.33	0.43	71.66	0.78	65.00	1.01	56.11
Aflatoksin G1	0.54	108.00	0.76	76.00	1.66	83.19	3.09	77.25	3.78	63.00
Aflatoksin G2	0.14	93.33	0.19	63.33	0.46	76.66	0.74	61.66	0.99	55.00
Toplam Aflatoksin	1.61	123.84	2.07	79.61	4.52	86.92	7.75	74.51	9.50	63.33

Tablo 6.24. % 80-20 Metanol-Su ile yapılan ekstraksiyon çalışması sonuçları.

Aflatoksin Türü	Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg		Referans Değer µg/kg	
	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %	Ölçüm Sonucu µg/kg	Geri Kazanım %
	AFL B1: 0.50 AFL B2: 0.15 AFL G1: 0.50 AFL G2: 0.15 TOPLAM AFL: 1.3		AFL B1: 1.00 AFL B2: 0.30 AFL G1: 1.00 AFL G2: 0.30 TOPLAM AFL: 2.6		AFL B1: 2.00 AFL B2: 0.60 AFL G1: 2.00 AFL G2: 0.60 TOPLAM AFL: 5.2		AFL B1: 4.00 AFL B2: 1.20 AFL G1: 4.00 AFL G2: 1.20 TOPLAM AFL: 10.4		AFL B1: 6.00 AFL B2: 1.80 AFL G1: 6.00 AFL G2: 1.80 TOPLAM AFL: 15.6	
Aflatoksin B1	0.85	170.68	0.88	88.00	1,45	72,53	2.71	67.75	4.74	79.11
Aflatoksin B2	0.19	126.93	0.23	79.80	0,37	62,68	0.66	55.00	1.11	61.69
Aflatoksin G1	0.51	103.64	0.90	90.09	1,53	76,86	2.67	66.75	4.83	80.57
Aflatoksin G2	0.07	50.26	0.08	28.93	0,21	35,00	0.45	37.50	0.79	44.18
Toplam Aflatoksin	1.63	125.96	2.10	81.04	3,57	68,82	6.50	62.50	11.48	73.63

6.7.5. LOD (Limit of Detection) ve LOQ (Limit of Quantification) Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan metodun LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi için, aflatoksin içermediği bilinen karma yem örneğinin üzerine, Tablo 6.11' de hazırlanan II. Aşama standart çözeltiden 125 µL hacimde ilaveler yapılarak, 10 adet örnek hazırlandı. Elde edilen son konsantrasyonlar Tablo 6.25' de verilmiştir.

Tablo 6.25. Spike yapılarak hazırlanmış son konsantrasyon (µg/kg).

Top.Aflatoksin (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL B1 (µg/kg)
1.30	0.15	0.50	0.15	0.50

10 adet örneğin standart sapmaları (S_s) ve eğim (m) değerleri kullanılarak, aşağıda verilen (6.6) ve (6.7) formülleri ile LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

$$\text{LOD}=3 S_s/m \quad (6.6)$$

$$\text{LOQ}=10 S_s/m \quad (6.7)$$

Elde edilen veriler ve sonuçlar Tablo 6.26' da verilmiştir.

Tablo 6.26. Hesaplanan LOD ve LOQ değerleri.

Çalışma No	Aflatoksin G2 (µg/kg)	Aflatoksin G1 (µg/kg)	Aflatoksin B2 (µg/kg)	Aflatoksin B1 (µg/kg)
1	0.07	0.53	0.13	0.47
2	0.05	0.52	0.12	0.48
3	0.09	0.48	0.12	0.50
4	0.05	0.50	0.12	0.52
5	0.05	0.53	0.12	0.55
6	0.05	0.52	0.12	0.54
7	0.05	0.52	0.12	0.40
8	0.06	0.50	0.13	0.40
9	0.07	0.56	0.12	0.45
10	0.06	0.50	0.13	0.46
Ortalama (X_{ort})	0.06	0.52	0.12	0.48
STD (S_s)	0.014	0.021	0.004	0.052
Eğim (m)	4.25	4.00	11.46	5.77
LOD				
3(S_s)/m	0.0101	0.0162	0.0011	0.027
LOQ				
10(S_s)/m	0.034	0.054	0.004	0.09

6.7.6. Sertifikalı Referans Madde (CRM) Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Hayvan yemlerinde aflatoksin tayini için uygulanan deneysel prosedürün doğruluğunu teyit için aflatoksin içeriği (hayvan yemi) bilinen ERM – BE 376 kodlu Sertifikalı Referans Madde kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi paralel çalışmalar ile % 80/20 ve % 70/30 metanol/su karışımı ile tekrarlanarak, sonuçlar karşılaştırıldı.

Kullanılan CRM' nin referans değerleri Tablo 6.27'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ve % geri kazanım değerleri Tablo 6.28 ve Tablo 6.29' da verilmiştir.

Tablo 6.27. ERM – BE 376 Sertifikalı Referans Madde içeriği.

Kod No	ERM – BE 376	
Bileşim	HAYVAN YEMİ	
	Sertifikalı Değer (Certified Value)	Belirsizlik (Uncertainty)
	µg/kg	µg/kg
Aflatoksin B1	12.9	1.8
Aflatoksin B2	0.68	0.10
Aflatoksin G1	5.2	0.80

6.7.7. Gerçek Örneklerin Aflatoksin Miktarlarının Belirlenmesi

Toplanan örneklerin aflatoksin miktarlarının belirlenmesinde ekstraksiyon çözültisi olarak % 70/30 metanol/su karışımı ve Tablo 6.10' da belirtilen HPLC şartları kullanılmıştır. Bu şartlara göre elde edilen sonuçlar Tablo 6.30' da verilmiştir.

Tablo 6.28. CRM'nin %80-20 metanol-su ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçlar.

Çalışma No	Aflatoksin B1 µg/kg	Aflatoksin B1 % G.K.	Aflatoksin B2 µg/kg	Aflatoksin B2 % G.K.	Aflatoksin G1 µg/kg	Aflatoksin G1 % G. K.
1	9.08	70.38	0.56	82.35	0.24	4.61
2	8.82	68.37	0.51	75	0.72	13.84
3	9.73	75.42	0.59	86.76	0.93	17.88
4	9.6	74.41	0.58	85.29	0.85	16.34
5	9.12	70.69	0.57	83.82	0.98	18.84
6	9.31	72.70	0.59	86.76	1.01	19.42
7	7.07	54.80	0.51	75	0.43	8.26
Ort.	8.96	69.53	0.55	82.14	0.74	14.17

Tablo 6.29. CRM'nin %70-30 metanol-su ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçlar.

Çalışma No	Aflatoksin B1 µg/kg	Aflatoksin B1 % G.K.	Aflatoksin B2 µg/kg	Aflatoksin B2 % G.K.	Aflatoksin G1 µg/kg	Aflatoksin G1 % G. K.
1	12.86	99.70	0.49	72.08	5.09	98.01
2	12.95	100.39	0.49	77.72	4.89	94.11
3	11.15	86.40	0.53	78.57	4.30	82.74
4	11.37	88.15	0.55	80.14	4.21	80.97
5	11.15	91.73	0.46	68.14	4.77	91.73
6	10.63	82.40	0.39	58.47	4.52	86.98
7	11.22	85.32	0.39	57.02	4.44	85.32
8	9.99	77.42	0.41	60.36	4.46	85.95
9	9.43	81.86	0.36	52.63	4.26	73.11
10	9.70	84.04	0.35	51.44	4.37	75.17
11	10.22	84.17	0.38	56.05	4.38	84.17
Ort.	10.97	87.41	0.45	64.78	4.51	85.29

Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları.

Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)	Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)
1 Karma Y.	1.58	0.15	-	-	1.73	11 Sığır B. Y.	-	-	-	-	-
2 Soya K.	-	-	-	-	-	12 Karma Y.	122.51	10.76	-	-	133.28
3 Ayç. K.	-	-	-	-	-	13 E.Piliç Y.	3.20	0.45	0.88	-	4.54
4 Buz. Büy.Y.	8.09	0.69	-	-	8.79	14 Sığır Y.	-	-	-	-	-
5 Ayç. K.	0.26	0.037	0.11	0.065	0.48	15 Sığır Y.	0.29	-	-	-	0.29
6 Karma Y.	0.57	-	-	-	0.57	16 Kuzu B.Y..	18.12	1.57	-	-	19.70
7 Karma Y.	1.11	0.12	-	-	1.22	17 Karma Y.	1.45	0.13	-	-	1.74
8 Buz. BüyY..	0.30	-	-	-	0.30	18 Karma Y.	0.33	0.19	-	1.20	1.73
9 Karma Y.	0.17	-	-	-	0.17	19 Kuzu B.Y.	0.38	-	-	0.85	1.23
10 Karma Y.	1.13	0.1	-	-	1.24	20 Karma Y.	2.18	0.37	-	-	2.55

Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları (devam).

Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)	Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)
21 Buzağı Y.	3.90	0.58	0.84	-	5.33	31 Sığır Süt Y.	11.62	0.81	-	-	12.43
22 Ayç. K.	0.21	-	-	0.16	0.36	32 Karma Y.	1.06	0.13	-	-	1.20
23 Ayç. K.	0.37	0.044	0.11	0.13	0.65	33 Sığır S. Y.	6.89	0.66	-	-	7.56
24 Soya K..	-	-	-	-	-	34 Sığır B. Y.	1.01	0.15	-	-	1.17
25 Karma Y.	5.15	0.48	-	-	5.63	35 Sığır Süt Y.	0.20	-	-	-	0.20
26 Karma Y.	-	-	-	-	-	36 Piliç Büy. Y.	11.72	0.67	-	-	12.4
27 Sığır Be. Y.	10.38	0.84	-	-	11.22	37 Sığır Besi Y.	1.71	0.17	0.44	0.10	2.44
28 Karma Y.	0.70	-	-	-	0.70	38 E.Piliç Y.	0.20	-	-	-	0.20
29 Karma Y.	0.73	-	-	-	0.73	39 Tavuk Y.	0.26	0.04	0.20	-	0.51
30 Karma Y.	0.99	-	-	-	0.99	40 E. Cıvciv Y.	-	-	-	-	-

Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları (devam).

Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)	Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)
41 Sığır B. Y.	-	-	-	-	-	51 Buz. B.Y.	1.71	0.16	-	-	1.87
42 Kuzu B. Y.	0.55	0.079	-	-	0.63	52 Ayç. K.	-	-	-	-	-
43 Karma Y.	-	-	-	-	-	53 Karma Y.	1.48	0.21	-	-	1.69
44 Karma Y..	0.24	-	-	-	0.24	54 Sığır B. Y.	0.32	-	-	-	0.32
45 Karma Y.	-	-	-	-	-	55 Besi Yemi	0.13	0.03	0.11	-	0.28
46 Karma Y.	-	-	-	-	-	56 Sığır B. Y.	-	-	-	-	-
47 Soya K.	-	-	-	-	-	57 Karma Y.	-	-	-	-	-
48 Yem Katkı	-	-	-	-	-	58 Karma Y.	0.36	0,04	-	-	0.40
49 Karma Y.	0.42	0.10	0.41	-	0.93	59 Karma Y.	0.24	-	-	-	-
50 Buz.Baş.Y.	0.12	-	-	-	0.12	60 Karma Y.	-	-	-	-	-

Tablo 6.30. Yem örneklerinde tayin edilen aflatoksin miktarları (devam).

Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)	Sıra No/ Örnek Türü	AFL B1 (µg/kg)	AFL B2 (µg/kg)	AFL G1 (µg/kg)	AFL G2 (µg/kg)	Toplam AFL (µg/kg)
61 Ayç. K.	-	-	-	0.21	0.21	71 Karma Y.	-	-	-	-	-
62 Ayç. K.	-	-	-	0.30	0.30	72 Karma Y.	-	-	-	-	-
63 Karma Y.	-	-	-	-	-	73 Karma Y.	0.14	-	-	-	0.14
64 Soya K.	10.16	0.62	-	-	10.78	74 Karma Y.	0.14	-	-	-	0.14
65 Soya K.	-	-	-	-	-	75 Ayç. K.	0.75	0.14	0.26	-	1.15
66 Karma Y.	7.30	0.63	-	-	7.93	76 Karma Y.	0.33	-	-	-	0.33
67 Karma Y.	-	-	-	-	-	77 Karma Y.	0.70	0.13	-	-	0.83
68 Karma Y.	-	-	-	-	-	78 Soya K.	-	-	-	-	-
69 Soya K..	-	-	-	-	-	79 Mısır	-	-	-	-	-
70 Piliç B.Y.	-	-	-	-	-	80 Karma Y.	-	-	-	-	-

BÖLÜM 7

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMALAR

7.1. Örneklerin Kalite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yem ve yem hammadde örneklerinin kalitesinin belirlenmesi için elde edilen ham protein, ham selüloz, ham kül değerleri; Yemlerin Piyasaya Arzı ve Kullanımı Hakkında Yönetmelik (27.12.2011 tarih, 28155 sayılı Resmi Gazete), Gıda ve Yemin Resmi Kontrollerine Dair Yönetmelik (17.12.2011 tarih, 28145 sayılı Resmi Gazete) ve 1734 sayılı Yem Kanununa dair çıkan Yem Yönetmeliğinde bulunan (05.08.1974 tarih, 14967 sayılı Resmi Gazete) karma yem ve küspe normları kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Bu kriterler, Tablo 7.1' de verilmiştir.

Yapılan deneyler ile belirlenen ham kül değerleri (Tablo 6.6), Tablo 7.1' de verilen ham kül normlarına göre, tolere değerlerde dikkate alınarak değerlendirildi. Çok çeşitli örneklerden deneysel olarak elde edilen ham kül değerleri, % 1.64 (mısır) ile % 37.48 (karma yem) arasında değişmektedir. Karma yem örneklerinden 14 tanesi (örnek no; 6, 16, 18, 19, 27, 31, 32, 34, 42, 44, 54, 55, 57, 73) ham kül normlarına göre sınırların dışına çıkmıştır.

Yapılan deneyler ile belirlenen ham selüloz değerleri (Tablo 6.7), Tablo 7.1' de verilen ham selüloz normlarına göre, tolere değerlerde dikkate alınarak değerlendirildi. Çok çeşitli örneklerden deneysel olarak elde edilen ham selüloz değerleri, % 2.06 (soya küspesi) ile % 32.58 (ayçiçeği küspesi) arasında değişmektedir. Karma yem örneklerinden 17 tanesi (örnek no; 4, 8, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 31, 42, 54, 55, 72, 73, 75, 76, 77) ham selüloz normlarına göre sınırların dışına çıkmıştır.

Yem ve yem hammaddelerinde yapılan deneyler ile belirlenen ham protein değerleri (Tablo 6.8), Tablo 7.1' de verilen ham protein normlarına göre, tolere

Tablo 7.1. Karma yem ve küspe normları kriterleri.

Yem Türü	Ham Selüloz % en çok	Ham Protein % en az	Ham Kül % en çok	Kuru Madde % en az
Kuzu Başlangıç	11	18	8	88
Kuzu Büyütme	10	16	10	88
Kuzu Besi	12	15	9	88
Buzağı Başlangıç	12	18	8	88
Buzağı Büyütme	12	17	10	88
Sığır Besi	14	12	9	88
Sığır Süt	14	16	9	88
Ayç.Toh.Küspesi	27	27	9	88
Soya Küspesi	8	40	8	88

değerlerde dikkate alınarak değerlendirildi. Çok çeşitli örneklerden deneysel olarak elde edilen ham protein değerleri, % 8.89 (mısır) ile % 53.05 (soya küspesi) arasında değişmektedir. Karma yem örneklerinden 5 tanesi (örnek no; 3, 14, 16, 19, 31) ham protein normlarına göre sınırların dışına çıkmıştır.

7.2. Rutubet Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yem ve yem hammadde örneklerinin % rutubet sonuçlarının değerlendirilmesi; Yemlerin Piyasaya Arzı ve Kullanımı Hakkında Yönetmelik (27.12.2011 tarih, 28155 sayılı Resmi Gazete), Gıda ve Yemin Resmi Kontrollerine Dair Yönetmelik (17.12.2011 tarih, 28145 sayılı Resmi Gazete) ve 1734 sayılı Yem Kanununa dair çıkan Yem Yönetmeliğinde bulunan (05.08.1974 tarih, 14967 sayılı Resmi Gazete) karma yem ve küspe normları kriterlerinde belirlenen % 12' lik maksimum rutubet miktarına göre yapılmıştır (Tablo 7.1).

Yem ve yem hammaddelerinde yapılan deneyler ile belirlenen % rutubet değerleri (Tablo 6.5), Tablo 7.1' de verilen kuru madde normlarına göre, tolere

değerlerde dikkate alınarak değerlendirildi. Deneysel olarak elde edilen % rutubet değerleri, % 3.14 (yem katkı) ile % 13.5 (karma yem) arasında değişmektedir. Yem örneklerinden 3 tanesi (örnek no; 36, 45, 59) kuru madde normlarına göre değerlendirilmiştir (% 12 rutubet içeriğinden büyüktür). Rutubet sonuçları 3 farklı düzeyde Tablo 7.2' de verilmiştir. Buna göre, rutubet oranı % 8' den düşük 19 adet örnek, rutubet oranı % 8-10 arasında olan 37 adet örnek, rutubet oranı % 10-12 arasında olan 21 adet örnek, rutubet oranı % 12' den büyük olan 3 adet örnek bulunmuştur.

Tablo 7.2. Örneklerin farklı düzeylerde % rutubet içerikleri

	Rutubet İçeriği (%)			
	< 8	8-10	10-12	> 12
Örnek Sayısı	19	37	21	3
Toplam	n=80			

7.3. Ekstraksiyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

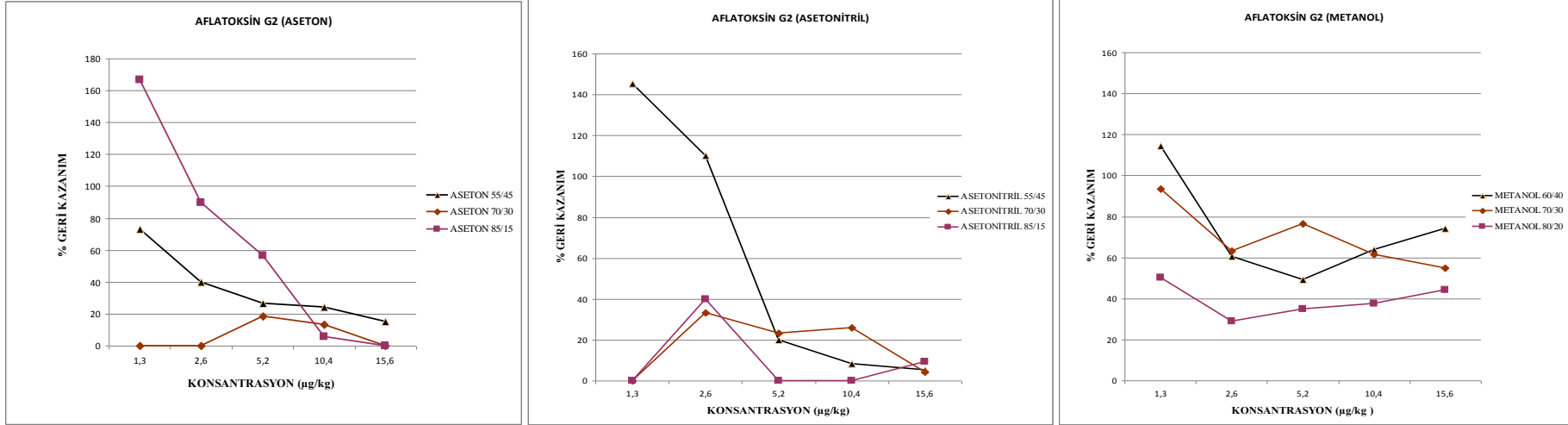
Yem ve yem hammaddelerinin aflatoksin G2, G1, B2 ve B1 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılacak ekstraksiyon çözeltilerinin belirlenmesi için aseton, asetonitril ve metanolün değişik oranlardaki çözeltileri kullanıldı. Spike yapılırken, aflatoksin G2, G1, B2 ve B1'in 5 farklı konsantrasyonunda denemeler yapıldı. Değişik oranlardaki çözelti karışımları ile her bir aflatoksin türüne göre elde edilen geri kazanım oranları Şekil 7.1-7.4' de verilmiştir. Şekiller incelendiğinde, çalışmalarda % 0 ile % 175 arasında geri kazanım oranlarının elde edildiği görüldü.

Aflatoksin G2 için, yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Şekil 7.1), aseton ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 0 - 166.66 arasında olduğu, asetonitril ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 0-145.45 arasında olduğu, metanol ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 28-114.28 arasında olduğu görüldü. Aseton ve asetonitril karışımlarının, farklı konsantrasyonlarda % 0 geri kazanım oranları verdiği ve en kararlı, en yüksek geri kazanım oranlarının metano-sul ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.3 ve Şekil 7.1’ de metanol-su karışımının farklı oranlardaki karışımlarının standart sapma değerleri incelendiğinde en çok sapmanın 24.99 ile % 60/40 (metanol/su, h/h) ’lık çözeltide olduğu görüldü. % 70/30 (metanol/su, h/h) ve % 80/20 (metanol/su, h/h) karışımları arasında sapma en az % 80/20 (metanol/su, h/h) çözeltisinde görülmesine rağmen, çok düşük geri kazanım oranları elde edilmiştir. Bundan dolayı, aflatoksin G2 için en kararlı sonucun % 70/30 (metanol/su, h/h) ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.3. Aflatoksin G2 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.

Konsantrasyon	Metanol çözelti karışımları (h/h)		
	60/40	70/30	80/20
1.3	114.28	93.33	50.26
2.6	60.53	63.33	28.93
5.2	49.33	76.66	35
10.4	64.03	61.66	37.5
15.6	74.08	55	44.18
Standart Sapma	24.99	15.23	8.26



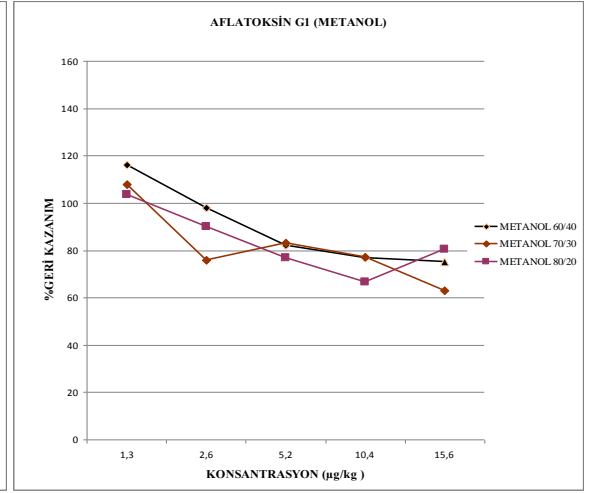
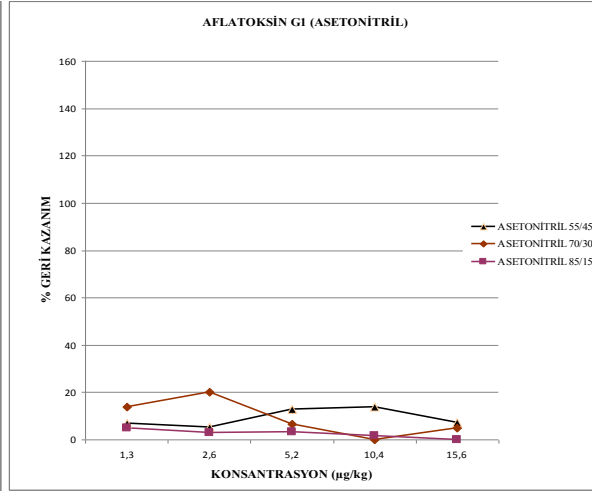
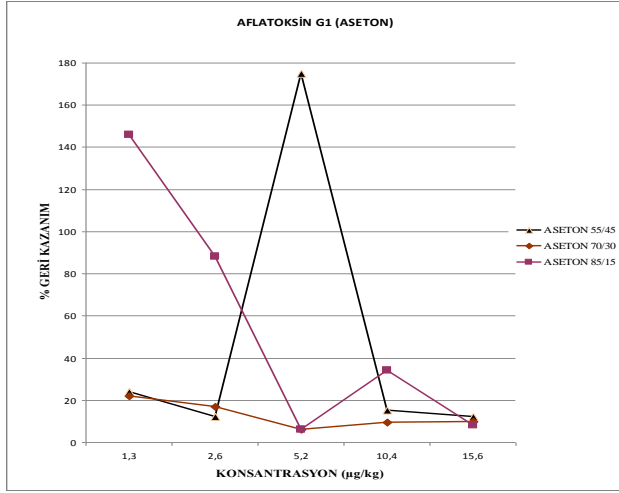
Şekil 7.1. Aflatoksin G2 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları.

Aflatoksin G1 için elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Şekil 7.2), aseton ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 6 -175 arasında olduğu, asetonitril ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 0-14 arasında olduğu, metanol ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 63-116.22 arasında olduğu görüldü. Aseton ve asetonitril karışımları, farklı konsantrasyonlarda % 0 ve % 6 gibi çok düşük geri kazanım oranları verdiği ve en kararlı ve en yüksek geri kazanım oranlarının metanol-su ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.4 ve Şekil 7.2’ de metanol-su karışımının farklı oranlardaki karışımlarının standart sapma değerleri incelendiğinde en çok sapmanın 17.37 ile % 60/40 (metanol/su, h/h) ’lık çözeltide olduğu görüldü. % 70/30 (metanol/su, h/h) ve % 80/20 (metanol/su, h/h) karışımları arasında sapma en az % 80/20 (metanol/su, h/h) çözeltisinde görüldü. Bundan dolayı, aflatoksin G1 için en kararlı sonucun % 80/20 (metanol/su, h/h) ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.4. Aflatoksin G1 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.

Konsantrasyon	Metanol çözelti karışımları (h/h)		
	60/40	70/30	80/20
1.3	116.22	108	103.64
2.6	98.06	76	90.09
5.2	82	83.19	76.86
10.4	76.98	77.25	66.75
15.6	75.12	63	80.57
Standart Sapma	17.37	16.55	13.98



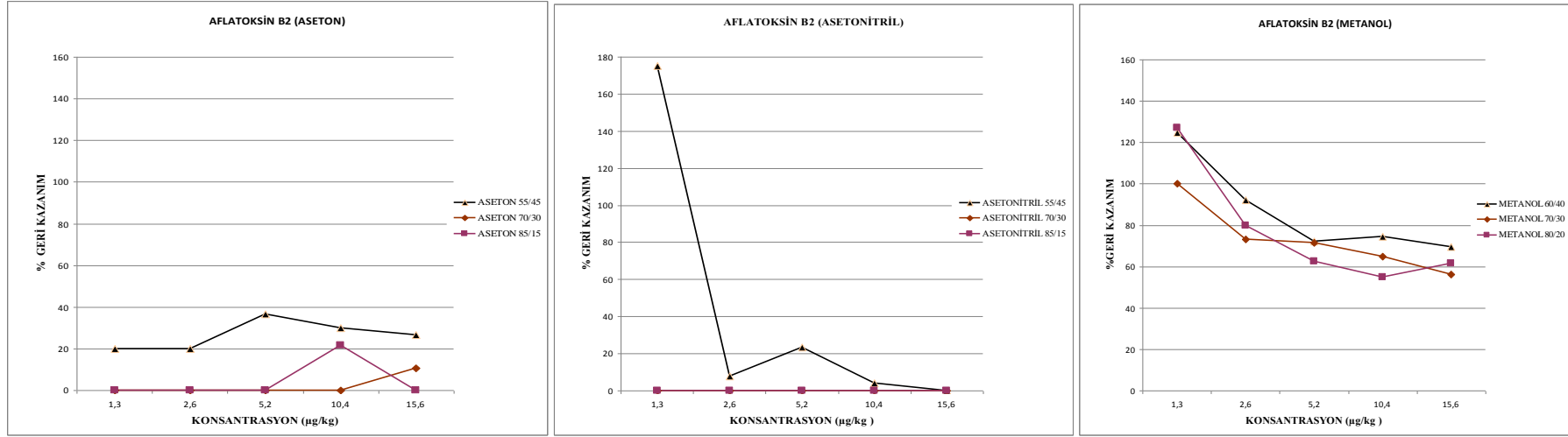
Şekil 7.2. Aflatoksin G1 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları.

Aflatoksin B2 için elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Şekil 7.3), aseton ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 0 -36.66 arasında olduğu, asetonitril ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 0-175.2 arasında olduğu, metanol ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 55-126.93 arasında olduğu görüldü. Aseton ve asetonitril karışımları, farklı konsantrasyonlarda bazı aflatoksin türlerinde % 0 gibi düşük geri kazanım oranları elde edildiği ve en kararlı, en yüksek geri kazanım oranlarının metanol-su ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.5 ve Şekil 7.3’ de metanol-su karışımının farklı oranlardaki karışımların standart sapma değerleri incelendiğinde en az sapmanın 16.431 olduğu, aflatoksin B2 için en kararlı sonucun % 70/30 (metanol/su, h/h) ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.5. Aflatoksin B2 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.

Konsantrasyon	Metanol çözelti karışımları (h/h)		
	60/40	70/30	80/20
1.3	124.87	100	126.93
2.6	92.26	73.33	79.8
5.2	72.16	71.66	62.68
10.4	74.52	65	55
15.6	69.66	56.11	61.69
Standart Sapma	23.12	16.43	29.26



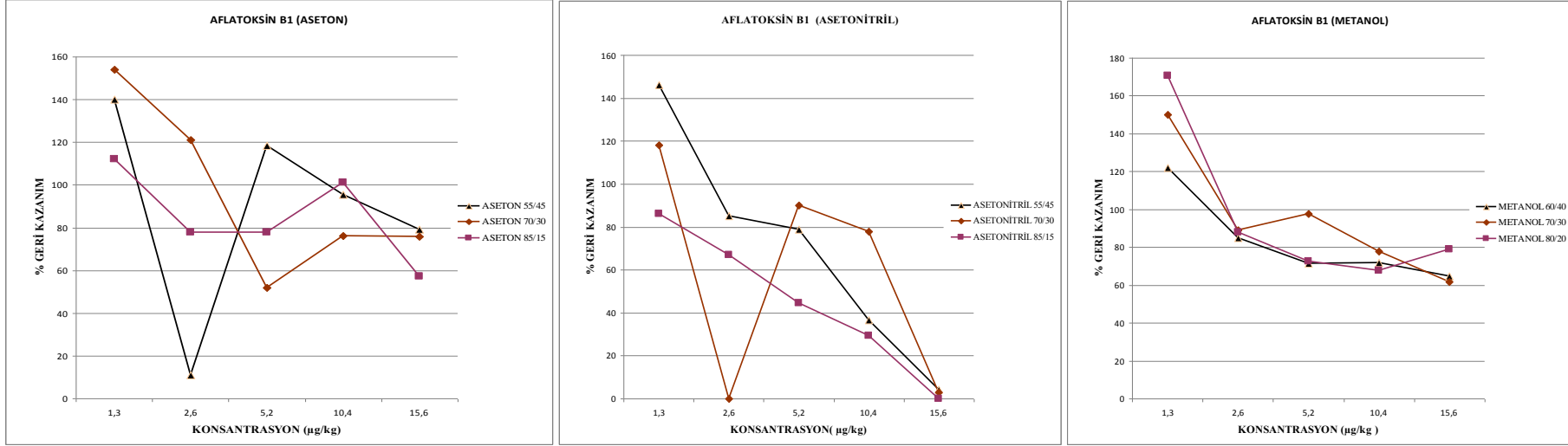
Şekil 7.3. Aflatoxin B2 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları.

Aflatoksin B1 için elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Şekil 7.4), aseton ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 11 -154 arasında olduğu, asetonitril ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 0-146 arasında olduğu, metanol ile elde edilen geri kazanım oranlarının % 61.83-170.68 arasında olduğu görüldü. Aseton ve asetonitril karışımları, farklı konsantrasyonlarda % 0 ve % 11 gibi çok düşük geri kazanım oranları verdiği, en kararlı ve yüksek geri kazanım oranlarının metanol-su ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.6 ve Şekil 7.4’ de metanol-su karışımının farklı oranlardaki karışımlarının standart sapma değerleri incelendiğinde en az sapmanın 22.99 ile % 60/40 (metanol/su, h/h) ’lık çözeltide olduğu görüldü. Fakat % 60/40 (metanol/su, h/h) karışımı, % 70/30 (metanol/su, h/h) karışımına göre, daha düşük geri kazanım oranları elde edilmiştir. Bundan dolayı, aflatoksin B1 için en kararlı sonucun % 70/30 (metanol/su, h/h) ile elde edildiği görüldü.

Tablo 7.6. Aflatoksin B1 için farklı konsantrasyonların standart sapma değerleri.

Konsantrasyon	Metanol çözelti karışımları (h/h)		
	60/40	70/30	80/20
1.3	122	150	170.68
2.6	85.09	89	88
5.2	71.45	97.5	72.53
10.4	71.73	78	67.75
15.6	64.83	61.83	79.11
Standart Sapma	22.99	33.38	42.65



Şekil 7.4. Aflatoxin B1 için aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon sonuçları.

Bütün ekstraksiyon çözeltileri incelendiğinde aflatoksin G2, B2, B1 için en iyi çözeltilerin % 70/30 (metanol/su, h/h), aflatoksin G1 için ise % 80/20 (metanol/su, h/h) karışımı olduğu görülmüştür. Bütün aflatoksin türleri, aynı kromatogramda farklı zamanlarda beraber belirlendiğinden, % 70/30 (metanol/su, h/h) ile % 80/20 (metanol/su, h/h) karışımlarını karşılaştırmak için CRM ile çalışmalar yapıldı.

7.4. CRM Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Spike yapılan örnekler üzerinden % geri kazanım değerleri dikkate alınarak % 70/30 (metanol/su, h/h) ve % 80/20 (metanol/su, h/h) karışımları kararlı sonuçlar göstermişti. Bölüm 6.7' de belirtilen HPLC şartları (Tablo 6.10) ve uygun ekstraksiyon çözeltilisinin performansının belirlenmesi için ERM – BE 376 kodlu Sertifikalı Referans Madde kullanıldı (Tablo 6.27). Ekstraksiyon çözeltileri olarak % 70/30 ve % 80/20 (metanol/su, h/h) karışımları kullanıldı ve sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirildi.

% 80/20 metanol/su ekstraksiyonu ile elde edilen değerler ortalama olarak aflatoksin G1 için 0.74 µg/kg, aflatoksin B2 için 0.55 µg/kg, aflatoksin B1 için 8.96 µg/kg olarak bulundu (Tablo 6.28).

% 70/30 metanol/su ekstraksiyonu ile elde edilen değerler ortalama olarak aflatoksin G1 için 4.51 µg/kg, aflatoksin B2 için 0.45 µg/kg, aflatoksin B1 için 10.96 µg/kg olarak bulundu (Tablo 6.29).

Sertifikalı referans maddenin, referans aflatoksin değerleri dikkate alınarak ortalama % geri kazanım değerleri hesaplandı. Bu değerler, % 70/30 metanol/su ekstraksiyonu için daha iyi olduğu gözlemlendi (aflatoksin G1 için % 85.29, aflatoksin B2 için % 64.78, aflatoksin B1 için % 87.41)

Standart referans madde kullanılarak bulunan aflatoksin B1 için elde edilen % 87.41 geri kazanım oranı, spike yapılarak elde edilen % 61.83 geri kazanım oranından daha yüksek olduğu görüldü. Bu karşılaştırma Tablo 6.15' de spike yapılan örnek konsantrasyonlarında, standart referans maddeye en yakın aflatoksin B1 konsantrasyonu içeren (6 µg/kg) 5 numaralı çözeltilinin referans değerine göre yapıldı.

Aflatoksin B2 için standart referans madde kullanılarak elde edilen % 64.78 geri kazanım oranı, spike yapılarak elde edilen % 71.66 geri kazanım oranından daha düşük

olduğu görüldü. Bu karşılaştırma Tablo 6.15' de spike yapılan örnek konsantrasyonlarında, standart referans maddeye en yakın aflatoksin B2 konsantrasyonu içeren (0.6 µg/kg) 3 numaralı çözeltilinin referans değerine göre yapıldı.

Aflatoksin G1 için standart referans madde kullanılarak elde edilen % 85.29 geri kazanım oranı, spike yapılarak elde edilen % 63 geri kazanım oranından daha yüksek olduğu görüldü. Bu karşılaştırma Tablo 6.15' de spike yapılan örnek konsantrasyonlarında, standart referans maddeye en yakın aflatoksin G1 konsantrasyonu içeren (1.8 µg/kg) 5 numaralı çözeltilinin referans değerine göre yapıldı.

7.5. Örneklerin Aflatoksin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Örneklerin aflatoksin G2, G1, B2 ve B1 konsantrasyonlarının belirlenmesi, ERM-BE 376 kodlu Sertifikalı Referans Madde' nin aflatoksin içeriğinin belirlenmesinde de kullanılan, % 70/30 (metanol/su, h/h) karışımı ve Tablo 6.10' da belirlenen HPLC şartları uygulandı. Örneklerde gözlenen aflatoksin G2, G1, B2 ve B1 konsantrasyonları Tablo 6.30' da verilmiştir. Örneklerde bulunan aflatoksin konsantrasyonlarının tespit sınırı olarak Tablo 6.26' da belirtilen LOQ değerleri kullanıldı. Bu değerler aflatoksin G2 için 0.033 µg/kg, aflatoksin G1 için 0.054 µg/kg, aflatoksin B2 için 0.004 µg/kg, aflatoksin B1 için 0.09 µg/kg' dır.

Örneklerin sadece 3 adedinde 4 aflatoksin türüne de rastlandı. 7 adet örnekte 3 farklı aflatoksin türüne aynı anda rastlandı. 2 aflatoksin türünün aynı anda bulunduğu örnek sayısı 24 tür. 19 adet örneğin, sadece 1 aflatoksin türü içerdii gözlendi. Örneklerin 27 adedinde aflatoksinin hiçbir türüne rastlanmadı.

8 adet örnekte aflatoksin G2 tespit edilmiştir. 8 adet örnekte bulunan aflatoksin G2'nin ortalaması 0.38 µg/kg'dır. Aflatoksin G2 miktarı 0.06-1.2 µg/kg arasında değişmektedir.

9 adet örnekte aflatoksin G1 tespit edilmiştir. 9 adet örnekte bulunan aflatoksin G1' in ortalaması 0.37 µg/kg'dır. En düşük aflatoksin G1 miktarı 0.11 µg/kg, en yüksek miktar 0.88 µg/kg' dır.

32 adet örnekte aflatoksin B2 tespit edilmiştir. 32 adet örnekte bulunan aflatoksin B2 'nin ortalaması 0.66 µg/kg' dır. En düşük aflatoksin B2 miktarı 0.03 µg/kg, en yüksek aflatoksin B2 miktarı 10.76 µg/kg' dır.

51 adet örnekte aflatoksin B1 tespit edilmiştir. 51 adet örnekte bulunan aflatoksin B1 'nin ortalaması 4.78 µg/kg' dır. En düşük aflatoksin B1 miktarı 0.09 µg/kg, en yüksek aflatoksin miktarı 122.51 µg/kg' dır.

22 adet örnekte aflatoksin B1 ve aflatoksin B2 aynı örnekte tespit edilmiştir.

Yem ve yem maddelerinde bulunan aflatoksin G2, G1, B2 ve B1 değerlendirilmesi için Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından çıkartılan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ' ne (Tablo 5.6) ve Avrupa Birliği ülkelerinde yürürlükte olan yem ve yem maddelerinde aflatoksin sınırlarına göre değerlendirilmiştir (Tablo 5.4). Yayınlanan bu düzenlemelerde sadece aflatoksin B1 için sınırlandırmalar verildiğinden, değerlendirmeler sadece aflatoksin B1 için yapıldı.

5.4 ve 5.6 numaralı tablolar ve tablo 6.30' da bulunan örneklerden elde edilen aflatoksin B1 sonuçları incelenerek değerlendirildiğinde, örneklerin % 36.25' inde aflatoksin B1 tespit edilmedi. Yine örneklerin % 36.25' inde aflatoksin B1 miktarı 0.09-1.00 µg/kg aralığında bulunmuştur. 1-10 µg/kg aralığında aflatoksin B1 içeren örnek sayısı tüm örneklerin % 20' sidir. 10-20 µg/kg aralığında örnek sayısı örneklerin % 6.25' i ve 20 µg/kg'dan büyük konsantrasyonda aflatoksin B1 içeren örnek sayısı örneklerin % 1.25' dir (Tablo 7.7)

Tablo 7.7. Örneklerde bulunan aflatoksin B1'in farklı aralıklarda bulunan oranları.

	Konsantrasyon Aralığı				
	Tespit Edilemeyen	0.09-1,00 µg/kg	1-10 µg/kg	10-20 µg/kg	>20 µg/kg
Örnek Sayısı	29	29	16	5	1
%	36.25	36.25	20	6.25	1.25

Örnekler incelendiğinde, karma yem için Türkiye’de limit değer olan 20 µg/kg aflatoksin B1 sınırını sadece 122.51 µg/kg aflatoksin B1 içeren 1 adet karma yem örneğinin geçtiği görüldü.

Sığır tam yemi ve kanatlı yemi örnekleri ve yem hammaddeleri incelendiğinde, aflatoksin B1 için sınır değer olan 20 µg/kg miktarını aşan örneğe rastlanmadı. Süt hayvanları için belirlenen 5 µg/kg’lık sınır aflatoksin B1 değeri, 2 örnekte (6.89 ve 11.62 µg/kg) aşılmıştır.

Avrupa Birliği ülkelerinde yürürlükte olan düzenlemede tam ve tamamlayıcı yem maddelerinde aflatoksin B1 sınır değeri 10 µg/kg’ dır (Tablo 5.4). Bu düzenlemeye göre elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, sınır değeri aşan 5 adet örnek tespit edilmiştir.

7.6. Tartışma

Araştırmacılar, farklı amaçlarla mikotoksinlerin tespiti için birçok analiz metodu geliştirmişlerdir. Uzun yıllar, ince tabaka kromatografisi ile tespitler yapılmış, kantitatif ve kalitatif olarak bu metodun performansının sınırlı olması, yerine başka metotların (HPLC ve ELISA tabanlı) geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Yine bu amaçla geliştirilen hızlı analiz metotları dünya ticaretinde önem ifade etse de, yasal limitleri sağlamada eksik kalması kullanımını sınırlandırmıştır. Tüm bu çalışmaların paralelinde araştırmacılar modern tayin yöntemleri ile de mikotoksinlerin tespitini gerçekleştirmek için çalışmışlardır. Bu çalışmalarda özellikle HPLC, GC ve son zamanlarda da LC-MS gibi tayin metotları kullanılmış, hem kantitatif hem de kalitatif olarak yeterli sonuçlar alınmıştır [51,52]. 1990’ lardan itibaren mikotoksinlerin çeşitli gıda ve yem maddelerinde tespiti için yapılan çalışmalara bu aletler damgasını vurmuştur.

Mikotoksin analizleri incelendiğinde, hangi metot ile yapılırsa yapılsın ekstraksiyon basamağının ön plana çıktığı görülmektedir. Ekstraksiyon prosedürü aflatoksin ile kirlenmiş olan ürünlerin fizikokimyasal özellikleri üzerine büyük ölçüde bağlıdır. Literatürde yapılan çalışmaları incelediğimizde aflatoksinler polar çözücülerde çözünebilir olduğundan, genelde asetonitril, kloroform veya metanol gibi organik çözücülerin karışımı ile ekstrakte edildiği görülmüştür. Önceki çalışmalarda, kloroform ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılsa da daha çevre dostu çözücülerle yer değiştirmiş durumdadır. Biz

de bu amaç doğrultusunda çevreye olan zararlarından dolayı, çalışmalarımızda kloroform çözücüsüne yer vermedik. Çalışmalarımızı aseton, asetonitril ve metanol çözücüleri ile gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar içinde en tutarlı ve kararlı olan çözücünün metanol olduğunu gördük. Bu sonucumuz, Gilbert ve Vargas (2003) tarafından ekstraksiyon için metanol-su karışımının asetonitril-su karışımına göre daha uygun olduğunu raporladığı çalışma ile uyumludur.

Mikotoksin analizlerinin ikinci önemli basamağı, etkili ekstraksiyon basamağı sonrası, özellikle yüksek lipid ve pigment içeriği olan ürünlerin seçici bir metotla saflaştırılmaları gerekliliğidir. Yem ve yem hammaddelerinin yüksek lipidli ürünler içermesi ve kompleks bir ürün içeriğine sahip olmasından dolayı çalışmamız da bu amaçla immunoaffinité kolon sisteminden yararlandık. İmmunoaffinité sistemi, antibody temelli olarak çalıştığından aflatoksinlerin seçici olarak ayrılmasında çalışmalarımıza önemli katkı sunmuştur. Ayrıca temizleme (clean-up) basamağından sonra HPLC ile okumalarımızı gerçekleştirdiğimizden, aflatoksin piklerinin safsızlıklardan uzak bir ortamda net bir şekilde ayrılmasını sağlamakta yardımcı olmuştur. İmmunoaffinité kolon ile çalışmanın dezavantajı, tek kullanımlık olmalarından dolayı maliyetlerinin diğer temizleme yöntemlerine göre yüksek olması ve çevre kirliliğini arttırmasıdır.

Aflatoksin B1 ve G1' in düşük floresans özellik göstermesi, bu bileşiklerin sinyallerinin güçlendirmelerini gerekli kılar [79]. Bu amacın gerçekleştirilmesi için çalışmamızda, kolon sonrası türevlendirme sistemi olan elektrokimyasal hücre (kobra-cell) kullanıldı. Bu sistem 4 sn gibi kısa bir sürede türevlendirmeyi gerçekleştirdiğinden, metodumuza hızlılık kazandırmıştır. Aflatoksinin 4 ana türü güçlendirilmiş sinyaller ile aynı anda tek kromatogramda elde edildi.

Literatür çalışmaları incelendiğinde aflatoksinler için yüzlerce çeşit analiz metotları ile karşılaşmaktayız [53]. Aynı durum diğer mikotoksin çeşitleri içinde geçerlidir. Daha önceki araştırmacıların tecrübeleri ve burada kazandığımız tecrübeler de göstermiştir ki, aflatoksinlerin (mikotoksin çeşitleri de dahil) tayininde belli bir standartlaşma düzeyine ulaşmak zor gözükmektedir. Bu noktada öne çıkan faktörler, her bir bitkisel ürünün kendine özgü yetiştirme şartlarının ve içeriklerinin (yağ, protein vs.) farklılık göstermesidir. İşlenmiş gıdalar ve karma yemler gibi bir çok üründen ve kompleks yapıdan (vitamin, mineral gibi)

oluşan ürünlerde bu zorluklar artmaktadır. Burada metot standartlaşmasında, analizcilerin işini kolaylaştıracak bir yöntem belki benzer özellikteki ürünlerin gruplandırılması olabilir. Böylece ürünlerin ortak özelliklerinden yararlanarak, analiz metodlarının en az bir basamağı (ekstraksiyon gibi) standart bir yöntem kullanılarak ortak hale getirilebilir (buğday, arpa, vb. gibi tahılların aynı grup altında ele alınması gibi). Burada unutulmaması gereken en önemli husus, aflatoksin üretici fungusların grup üyesi ürünlerde toksin üretme yeteneğine sahip olup olmadığı olacaktır.

Buradaki çalışmanın sonuçları incelendiğinde, örneklerde aflatoksinlerin 4 türüne beraber rastlanılmış, diğer aflatoksin türleri de 2' şer ve 3' er türler halinde örneklerde bulunmuştur. Sonuçların değerlendirilmesi, ulusal ve uluslararası düzenlemelerde aflatoksin B2, G1 ve G2 için sınır değerler olmadığından, sadece aflatoksin B1'e göre yapılmıştır. Yem ve yem hammaddeleri içeren örnekler ulusal değerlere göre [70] 3 adet, A.B. kriterlerine göre [71] ise 5 adet örnekte değerler aşılmıştır. Örnekler incelendiğinde, karma yem limit değeri olan 20 µg/kg aflatoksin B1 sınırını [70] sadece 122.51 µg/kg aflatoksin B1 içeren 1 adet karma yem örneğinin geçtiği görüldü. Yemlerde bulunan aflatoksin B1'in % 3-6' nın süte aflatoksin M1 olarak geçtiği düşünülürse [64], aflatoksin M1 yasal sınır değerlerini (süt için; 0.05 µg/kg) aşmış olacaktır. Bu kadar düşük değerlerin gözlenmesinde ana sebep aflatoksinlerin tarladan depolamaya, yem üretiminden hayvanın önüne gelinceye kadar ki süreçte yapılan sıkı takiplerdir. Özellikle küflü ve kalitesi düşük hammaddelerin kullanılmaması aflatoksin üretiminin düşük oranlarda kalmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Yine örneklerin çok az bir oranı için kalite değerlerinde limitlerin [73] dışına çıkmış olması, bu ifadeyi doğrulamış olacağı düşünülmektedir.

Çalışmanın bütünü ve şimdiki kadar mikotoksinler için yapılan çalışmaları dikkate aldığımızda, araştırmacıların sadece aflatoksinler için değil diğer mikotoksin çeşitleri üzerine de ortak metot gelişimi için yeni çalışmalar yapması gerekmektedir. Son yıllarda multitoksin olarak bu mikotoksinlerin aynı anda belirlenmesi, bunların birleşik etkilerinin insan ve hayvan bünyesinde oluşturacağı etkilerin araştırılması büyük bir ilgi görmektedir. Bizde bu çalışmaların, organizasyon yeteneğine sahip büyük kuruluşların öncülüğünde, ilgi alanına giren ülkelerin ortak destek vermesiyle daha hızlı ve verimli sonuçlar alınacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] Türkiye Süt, Et, Gıda Sanayicileri Ve Üreticileri Birliği, ***Dünyada Ve Türkiye’de Yem, Et Ve Süt Sektörlerinde Mevcut Durum Ve Öngörülere Raporu***, (2013).
- [2] Anonim, ***Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları***, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Gen.2. Baskı, 522 s., (2000).
- [3] Şanlı, Y. ***Küflenmiş Yem kullanımı, tüketimi ve sakıncaları***, Çiftlik Dergisi 62, 23-25, (1989).
- [4] DPT, ***Özel İhtisas Komisyonu Raporu***, Yem Sanayii, (2001).
- [5] P. Karahocagil, Hüsnü Ege, ***Karma Yem Sanayi***, Tarımsal Araştırma Ekonomi Enstitüsü, Sayı 5,Nüsha 9, (2004).
- [6] T.G.H.Bak., ***5996 Sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda Ve Yem Kanunu***, R.Gazete, Sayı 27610, (13/6/2010).
- [7] Hasan Rüştü Kutlu, ***Yem Değerlendirme ve Analiz Yöntemleri***, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Sayfa 1-5, (2008).
- [8] T.Güngör, M. Başalan, İ.Aydoğan, ***Kırıkkale yöresinde üretilen bazı kaba yemlerde besin madde miktarları ve metabolize olabilir enerji düzeylerinin belirlenmesi***, Ankara Üni. Vet. Fak Derg., 55, s: 111-115, (2008).
- [9] Mustafa ERGÜL, ***Karma Yemler ve Karma Yem Teknolojisi***,Ege Üni.Yay.,İzmir,(2008).
- [10] T.G.H.Bak. ***Yemlerin Piyasaya Arzı Ve Kullanımı Hakkında Yönetmelik***, Resmi Gazete, Sayı: 28155, (27.12.2011).
- [11] N.W. Turnera, S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky, ***Analytical methods for determination of mycotoxins- review***, Analytica Chimica Acta 632, 168–180,(2009).
- [12] C.M.Pereyra, L.R.Cavaglieri, S.M.Chiacchiera. ***Fungi and Mycotoxins in Feed Intended for Sows at Different Reproductive Stages in Argentina***. Veterinary Medicine International., Article ID 569108, (2010).
- [13] Hawksworth DL., ***The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation***, Mycol Res 95:641-55, (1991).
- [14] Aydın N., ***Hayvan Sağlığında Mikotoksinler ve Mikotoksikozisler***, (Ankara Üni. Vet.Fak., Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara).
- [15] Ayşe Gül Çelikay, ***Kurutulmuş Kırmızı Biberin Mikrobiyolojik Kalitesi Ve Aflatoxin Aranması***, S.D.Ü. Fen Bilimleri Estitüsü, S:12,(2003).
- [16] Ramesh C. ***Veterinary Toxicology***, Elsevier Inc. 939 Gupta ISBN: 978-0-12-370467-2,(2007).
- [17] IARC 1993, ***Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins***, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 56, Lyon IARC, (1993).
- [18] Cheryl E.A. Lovelace-William G.L. Aalbersberg, ***Aflatoxin levels in foodstuffs in Fiji and Tonga islands***, Plant Foods for Human Nutrition 39, p: 393-399, Kluwer Academic Publishers, (1989).

- [19] Markaki P, Melissari E., *Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC*, Food Addit. Contam., 14:451-6, (1997).
- [20] IARC, *Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene Summary of Data Reported and Evaluation*, , Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 82, p:171, (2002).
- [21] Bullerman, L.B., *Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health*, Journal of Food Protection, 42(1): 65–86, (1979).
- [22] E.Viktoria, R. Florian Vouk, J.Böhm, E. Razzazi Fazeli, *Aflatoxins in rice- A limited survey of products marketed in Austria*, Food Control, 21,988–99,(2010).
- [23] Kamuran Ayhan, *Gıdalarda Mikroorganizma Gelişmesini Etkileyen Faktörler*, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yay., Genişletilmiş 2. Baskı, 2. Bölüm, 2. kısım, 522 s,(2000).
- [24] Dutton, M. F.,*Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis*, Microbiol.Rev.,52,274-295, (1988).
- [25] Le Bars J., *Facteurs de l'accumulation d'acide pénicillique dans les denrées d'origine végétale*, Sci. Alim., 2 HS II, 29–33, (1982).
- [26] Ergül M. *Yemler Bilgisi*, Ege Üni Yay. No:487, Sayfa 5-10,(2008).
- [27] F.A.O, *Prevention of mycotoxins, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Food and Nutrition paper, No:10, Rome, (1979).*
- [28] *Evaluation of Effect of Mycotoxin Binders in Animal Feed on the Analytical Performance of Standardised Methods for the Determination of Mycotoxins in Feed*, JRC Scientific and Technical Reports.
- [29] A.Yiannikouris, J.P. Joun, *Mycotoxins and ruminants*, p:89-93.
- [30] Basmacıoğlu H., Ergül M., *Yemlerde Bulunan Toksinler ve Kontrol Yolları, Hayvansal Üretim*, 44(1),9-17,(2003).
- [31] O.L. Shotwell *Aflatoxin in Corn*, Northern Regional Research Center, USDA, Peoria, J. Am. Oil Chemists, Vol. 54, (1974).
- [32] Samarajewa H., Sen A. C., Cohen M. D. and Wei C. J., *Detoxification on aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods*, J.Food Protect, 53, 489-501, (1989).
- [33] Gardner Jr., H.I.C, S.P. Koltun, F.G. Dollear, E.T. Rayner, *JAOCS*, 48:70, (1971).
- [34] Fraga ME, Curvello F, Cavaglieri LR, Dalcero AM, *Potential aflatoxin and ochratoxin A production by Aspergillus species in poultry feed processing*, Vet. Res. Com., 31:343-353, (2007).
- [35] Nina Bilandzic, Ivana Varenina, Bozica Solomun, *Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia*, Food Control, 21, 1279–1281, (2010).
- [36] Solmaz Alborzi, Bahman pourabbas, Mahmood Rashidi, Behrooz Astaneh, *Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Shiraz*, Food Control,17, 582–584, (2006).
- [37] Gurbay, S. Aydın, G. Girgin, A.B. Engin, G. Sahin, *Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara*, Food Control 17,1–4, (2006).
- [38] Smita Tripathi, H.N.Mishra, *A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder*, Food Control 20, 840-846, (2009).

- [39] Mycotoxin Sampling, Testing, and Test Kits, <http://www.ces.ncsu.edu/gaston/Agriculture/mycotoxins/mycotest.html>, (2008).
- [40] M. R. Hadianiyz, H. Yazdanpanah, M. Ghazi-Khansariy, A. M. Cheraghaliz and M. Goodarziz, *Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from northern Iran by thin-layer chromatography densitometry*, Food Additives and Contaminants, Vol. 20, No. 4, 380–385, (2003).
- [41] Mari'a Stella Medina-Martí'nez and Amaury J. Martí'nez, *Mold Occurrence and Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 Determination in Corn Samples in Venezuela*, J. Agric. Food Chem., 48, 2833-2836, (2000).
- [42] AOAC 2003.02-2006, *Aflatoxin B1 in Cattle Feed*, (2006).
- [43] Giray B., Girgin G., Engin A. B., Aydin S., Sahin G., *Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey*, Food Control, 18, 23–29, (2007).
- [44] Akiyama H., Goda Y., Tanaka, T., Toyoda M., *Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up*, Journal of Chromatography A, 932, 153–157, (2001).
- [45] Nawaz S., Coker R.D., Haswell S. J., *HPTLC – A valuable chromatographic tool for the analysis of aflatoxins*, Journal of Planar Chromatography, 8, 4–9, (1995).
- [46] O.G. Roch, G. Blunden, R.D. Coker, S. Nawaz, Food Chem., 52, (1995).
- [47] M. Holcomb, H.C. Thompson Jr., W.M. Cooper, *J. Supercrit*, Fluids 9, 118, (1996).
- [48] Oğuzhan Yavuz, Abdurrahman Aksoy, *Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu*, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, Cilt 20, Sayı 3, Sayfa(lar) 259-269, (2006).
- [49] H.P. Van Egmond, R.C. Schothorst, M.A. Jonker, Anal. Bioanal. Chem., 389, (2007).
- [50] F.S. Chu in, *Mycotoxins in Ecological Systems*, Handbook of applied mycology, p.87, (1992).
- [51] Jayabarathi P, Mohamudha Parveen R, *Biochemical and Histopathological Analysis Of Aflatoxicosis In Growing Hens Fed With Commercial Poultry Feed*, Department of Microbiology, Adhiparasakthi College of Arts and Science, Volume 3, Issue 2, Article 023, (2010).
- [52] Robert T. Rosen, Joseph D. Rosen, and Vincent P. DiProssimo, *Confirmation of Aflatoxins B1 and B2 in Peanuts by Gas Chromatography/Mass Spectrometry/Selected Ion Monitoring*, J. Agric. Food Chem., 32, 276-278, (1984).
- [53] M. L. Martins and Fernando Bernardo, *Aflatoxins in spices marketed in Portugal*, *Food Additives and Contaminants*, Vol. 18, No. 4, 315± 319, Polo Univers., (2001).
- [54] K.I. Tomlins, K. Jewers, R.C. Coker, M.J. Nagler, Chromatographia 27, (1989).
- [55] P. Colinski, J. Rabarkiewicz-Szcesna, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 1108, (1984).
- [56] J. Aschse, J. Chromatogr., 609, 349, (1992).
- [57] A. Visconti, M. Pascale, J. Chromatogr., A 818, 133, (1998).
- [58] P.M. Scott, Food Addit. Contam., 12, 395, (1995).
- [59] M.R.A. Morgan, Tetrahedron 45, 2237, (1989).
- [60] M.G. Smart, O.L. Shotwell, R.W. Caldwell, Phytopathol., 80, 38, (1990).

- [61] E.M. Binder, L.M. Tan, L.J. Chin, J. Handl , J. Richard., *Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients*, Animal Feed Science and Technology, 137, 265–282, (2007).
- [62] Elisabete Salay, Adriana Zerlotti Mercadante, *Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination*, Food Control,13 87–92, (2002).
- [63] Gülşen Altuğ, Gülsün Beklevik, *Balık Üretim İşletmeleri, Yem Fabrikaları ve Yurtdışı Kaynaklı Bazı Balık Yemlerinde Aflatoksin Düzeyleri*, Turk J.Vet. Anim. Sci.,27,1247-1252, (2003).
- [64] Yakup Karakaya, Mustafa Atasever, *Mısır Silajında Aflatoksin B1 Varlığının ve Süte Geçme Durumunun Araştırılması*, Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 16, S-123-127, (2010).
- [65] F. Nizamlıoğlu and H. Oguz, *Occurrence of aflatoxins in layer feed and corn samples in Konya province*, Food Additives and Contaminants, Vol. 20, No.7, 654–658, (2003).
- [66] Kaya S.,Yavuz H., Akar F., *Bazı yağlı tohum küspelerinde mikotoksin kalıntıları*, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 37 (1), 173-180, (1990).
- [67] Nural Karagözlü, *Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin-A ve Fungal Kontaminasyon*, Turk J. Biol. 24, 561–572, (2000).
- [68] A. Ayar, D. Sert, A. Hilmi Çon, *A Study On The Occurence Of Aflatoxin M1 in Raw Milk Due To Feeds*, Journal of Food Safety, 27, 199–207, (2007).
- [69] Abdellah Zinedine, Jordi Mañes, *Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco*, Food Control 20, 334–344, (2009).
- [70] Gıda, Tarım ve Hayv. Bak. *Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ*, Tebliğ No: 2005/3.
- [71] www.mycotoxin.info.
- [72] Thomas Buckley, Alan Creighton, Ursula Fogarty, *Analysis of Canadian and Irish forage, oats and commercially available equine concentrate feed for pathogenic fungi and mycotoxins*, Irish Veterinary Journal, Volume 60, Number 4.
- [73] *Yemlerin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma ve Analiz Metotlarına Dair Yönetmelik*, Yayımlandığı R.Gazete: 27.12.2011-28155,(2011).
- [74] E.Tuncel vd. *A.Ü.A.F. Zootekni Kitabı*, Yayın No: 485.
- [75] AOAC Official Method 990.03 *Protein (Crude) in Animal Feed (Combustion Method)*.
- [76] Lucia Decastelli, Jeanne Lai, Monica Gramaglia, Antonietta Monaco, *Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005*, Food Control, 18, ,1263–1266, (2007).
- [77] Saqer M. Herzalla, *Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors*, Food Chemistry 114, 1141–1146, (2009).
- [78] M. U. Beg, M. Al-Mutairi, K. R. Beg, H.M.Al-Mazeedi, L.N. Ali, T. Saeed, *Mycotoxins in Poultry Feed in Kuwait*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 50, 594–602, (2006).

- [79] Manuel Holcomb and Harold C. Thompson, Jr., *Analysis of Aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in Rodent Feed by HPLC Using Postcolumn Derivatization and Fluorescence Detection*, J. Agric. Food Chem, 39, 137-1, (1991).
- [80] Takashi Urano, Mary W. Trucksess, and Samuel W. Page, *Automated Affinity Liquid Chromatography System for On-Line Isolation, Separation, and Quantitation of Aflatoxins in Methanol-Water Extracts of Corn or Peanuts*, J. Agric. Food Chem., 41, 1982-1985, (1993).
- [81] James F. Lawrence and Peter M. Scott, *HPLC methods for the determination of mycotoxins and phycotoxins*, Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Chapter 10, p:413, (1999).
- [82] Ramon Asis, Romina D. Di Paola, Mario A. J. Aldao, *Determination of Aflatoxin B1 in Highly Contaminated Peanut Samples Using HPLC and ELISA*, Food and Agricultural Immunology, 14, 201–208, (2002).