

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

AFLATOKSİN M₁ İÇEREN SÜTLERİN KİL İLE DETOKSİFİKASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN : Hüseyin SAĞ
DANIŞMAN : Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER

VAN-2013

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

AFLATOKSİN M₁ İÇEREN SÜTLERİN KİL İLE DETOKSİFİKASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Hüseyin SAĞ

VAN-2013

Bu çalışma, YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2010-FBE-YL051 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER danışmanlığında, Hüseyin SAĞ tarafından sunulan “Aflatoksin M₁ İçeren Sütlerin Kil ile Detoksifikasyonu” isimli bu çalışma “Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği”nin ilgili hükümleri gereğince 29/11/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İsmail Sait DOĞAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER

İmza:

Üye: Prof. Dr. Kamil EKİCİ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/01/2014 tarih ve 2014/2-I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

AFLATOKSİN M₁ İÇEREN SÜTLERİN KİL İLE DETOKSİFİKASYONU

SAĞ, Hüseyin

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER

Kasım 2013, 64 sayfa

Aflatoksinler, esas olarak *Aspergillus flavus* grubu funguslar tarafından üretilen mikotoksinlerlerdir. Aflatoksinlerin bilinen 18 kimyasal formu bulunmakla birlikte, tarımsal ürünlerde daha çok Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ formları, sütte ise Aflatoksin M₁ (AFM₁) formu önemlidir. Sütte bulunan AFM₁'in tek kaynağı yemlerle alınan aflatoksin B₁'dir. Bu çalışmada, AFM₁ içeren sütlerin killer ile muamele edilerek detoksifikasyonu amaçlanmıştır. Çalışmada farklı oranlarda AFM₁ içeren süt örnekleri kullanılmıştır. Bunlar kil ile işlem gördükten sonra aflatoksin düzeyinde azalma olup olmadığı belirlenmiştir. Affinite kromatografi ile ekstrakt temizlenmiş, ters faz HPLC ve floresans dedektör ile AFM₁ teşhis ve miktar tayini yapılmıştır. Çalışmanın önemli sonucu olarak; 0.1 g kil, 10 ml tampon çözeltide bulunan 6.5 ppb AFM₁'in tamamını adsorbe ederken, 0.12 ppb AFM₁ içeren 100 ml sütteki AFM₁'in tamamını ancak 5 g kil adsorbe edebilmiştir. Sonuç olarak; killerin, AFM₁'i tampon çözelti ortamında adsorbe etmede başarılı oldukları, ancak süt ortamında AFM₁'i adsorbe etmede ise süütün kendine özgü bileşenleri nedeniyle yeterli başarının sağlanamadığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Süt, Aflatoksin M₁, Kil, Detoksifikasyon, HPLC.

ABSTRACT

DETOXIFICATION OF AFLATOXIN M₁ CONTAMINATED MILKS BY CLAY

SAĞ, Hüseyin

Msc Thesis, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER

November 2013, 64 pages

Aflatoxins are mycotoxins that are produced by *Aspergillus flavus* fungi group. There are 18 known chemical forms of aflatoxins; while aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ forms are more important for agricultural products, aflatoxin M₁ (AFM₁) form is important for milk. The only source of AFM₁ in milk is aflatoxin B₁ taken with feeds. In this study, detoxification of AFM₁ contaminated-milks by clay treatment was aimed. In study, milk samples with different ratios of AFM₁ contamination were used. After treated with clay it was determined whether or not aflatoxins levels decreased. Extract cleaned by affinity chromatography and AFM₁ was detected and quantified by reverse phase HPLC and fluorescence detector. Significant result of the study is; while 0.1 g clay adsorbed all 6.5 ppb AFM₁ in the 10 ml buffer solution, 5 g clay could hardly adsorb all AFM₁ in 100 ml milk containing 0.12 ppb AFM₁. In conclusion; clays were found successful in adsorbing AFM₁ in buffer solution medium, however not adequately successful in adsorbing AFM₁ in milk medium, due to the specific components of milk.

Key words: Milk, Aflatoxin M₁, Clay, Detoxification, HPLC.

ÖN SÖZ

Aflatoksinlerin killer tarafından tutulduğu bilinmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar dikkate alındığında sütte bulunan Aflatoksin M₁'in de killer ile muamelesi sonucunda tutulabileceği düşünülmüştür. Sütün killer yardımıyla toksinlerinden arındırılması amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Oldukça zorlu bir süreç olan tez çalışması süresince beni yönlendiren, çalışmamın her aşamasında ilgi ve desteğini benden esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER'e, analizlerin yapılması sırasında çok büyük yardımlarını gördüğüm Van İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Katkı-Kalıntı Laboratuvarı Birim Sorumlusu Gıda Yük. Mühendisi Adem ÇEÇEN'e, çalışmama teknik alt yapı desteği sunan Van İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne ve çalışmam süresince yanımda olan eşim ve kızıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca bu çalışmaya 2010-FBE-YL051 proje numarasıyla gerekli maddi desteği sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkürü de bir borç bilirim.

Hüseyin SAĞ

Van, 2013

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
EKLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	9
2.1. Aflatoksinlerin Yapısı ve Özellikleri	9
2.2. Sütte Aflatoksin M ₁ Varlığı	12
2.3. Killerin Yapısı ve Özellikleri	15
2.4. Sütte AFM ₁ Varlığı ve Detoksifikasyonda Kıl Kullanımıyla İlgili Çalışmalar	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler	28
3.2.2. Reaktifler	28
3.2.3. Standart kurvenin hazırlanması	28
3.2.4. Analiz örneklerinin hazırlanması	29
3.2.5. Sütlerde aflatoksin analizi	30
3.2.5.1. Yöntemin prensibi	30
3.2.5.2. Numunenin hazırlanması ve ekstraksiyon	30
3.2.5.3. HPLC (Sıvı kromatografisi)	31
3.2.5.4. Kalibrasyon grafiği	31
3.2.5.5. Aflatoksin M ₁ miktarının hesaplanması	32

3.2.5.6. Süt örnekleri için geri kazanım oranlarının hesaplanması	32
3.2.6. Süt ve tampon çözelti örneklerine aflatoksin M ₁ ekleme	33
3.2.7. Tampon çözeltide AFM ₁ analizi	33
3.2.8. Killerin AFM ₁ alıkoyma kapasitelerinin belirlenmesi	33
3.2.8.1. Tampon çözeltide killerin AFM ₁ alıkoyma kapasitelerinin belirlenmesi	33
3.2.8.2. Süt ortamında killerin AFM ₁ alıkoyma kapasitelerinin belirlenmesi	35
3.2.9. Kil dolgulu kolonların hazırlanması ve analizi	35
4. BULGULAR	38
4.1. Aflatoksin M ₁ Kromatografik Ayrımı	38
4.2. Kalibrasyon Grafiği	38
4.3. Sütte AFM ₁ İçin Geri Kazanım Oranları	39
4.4. Killerin AFM ₁ Adsorbsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi	41
4.5. Süt Örneklerinde Killerin AFM ₁ Adsorbsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi	42
4.6. Kil Dolgulu Kolonların Hazırlanması	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKLAR	54
EKLER	61
ÖZ GEÇMİŞ	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

	sayfa
Şekil 2.1. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları.	11
Şekil 2.2. İmmuno-affinite kolonun yapısı.	14
Şekil 2.3. İmmuno-affinite kolon uygulaması.	15
Şekil 2.4. Tetrahedron kil yapısı.	16
Şekil 2.5. Oktahedral kil yapısı.	16
Şekil 2.6. Bentonitin yapısı.	19
Şekil 4.1. 0.1 ng AFM ₁ standardına ait HPLC kromatogramı.	38
Şekil 4.2. 6 farklı noktadan çizilen kalibrasyon grafiği.	39
Şekil 4.3. AFM ₁ 'in çıkış zamanında pik vermeyen süt örneğine ait bir kromatogram.	40
Şekil 4.4. 0.1 g kil örneklerinin AFM ₁ adsorbsiyonu kapasiteleri.	41
Şekil 4.5. Standart AFM ₁ çözeltisinin kilden elue edilmesi ve analizine ait bir kromatogram.	42
Şekil 4.6. Killerin süt örneklerindeki AFM ₁ adsorbsiyonu kapasitelerinin belirlenmesi.	42
Şekil 4.7. 0.12 ppb AFM ₁ içeren süte eklenen farklı orandaki killerin AFM ₁ adsorbsiyonu.	43
Şekil 4.8. 0.101 ppb AFM ₁ içeren süte eklenen farklı orandaki killerin AFM ₁ adsorbsiyonu.	44
Şekil 4.9. Sütteki AFM ₁ 'in kilden doğrudan metanol ile elue edilmesine ait kromatogram.	45
Şekil 4.10. Destek materyalli cam borucuklu kolon dolgu maddesi hazırlama çalışmaları a) kil ile kaplanmış şekli, b) kil kaplamaların kopmaya başlamış şekli, c) kil kaplamaların kopmuş şekli.	46
Şekil 4.11. Kil-agar karışımı desteksiz kolon dolgu materyali hazırlama ve uygulama çalışmaları a) cam plakalar üzerinde kurutulmuş olan kil-agar karışımı, b) kil-agar karışımının cam plakalardan kazınmış şekli, c) kil-agar karışımının şırıngadan yapılan kolona doldurulması, d) kolonun işlem sırasında tıkanmış şekli.	47

Şekil 4.12.	Farklı şekillere sahip odun yongalarıyla işlem gören kil-agar karışımının kurutulmasıyla elde edilen destek materyalli kolon dolgu maddeleri a) ipliksi (söğüt) kıymıklar, b) küçük (kavak) kıymıklar c) spiral (çam) kıymıklar.	48
Şekil 4.13.	Spiral çam kıymık ve kil-agar karışımı dolgulu olan destek materyalli cam kolonun saf su ve aflatoksinli süt ile muamelesi a) kolonun saf su ile muamelesi, b) kolonun aflatoksinli süt ile muamelesi.	49
Şekil 4.14.	0.056 ppb AFM ₁ içeren sütün kil dolgulu cam kolondan geçirilmesi sonucu alınan örneklerin AFM ₁ analizi sonuçları.	49
Şekil 4.15.	Zeolit dolgulu destek materyalsiz kolon yapısı.	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

	sayfa
Çizelge 2.1. Aflatoksinler ve bunları sentezleyen bazı fungus türleri	9
Çizelge 2.2. Aspergillus soyuna bağlı küflerin gelişme değerleri	10
Çizelge 2.3. Önemli bazı aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	12
Çizelge 2.4. Süt ve süt ürünleri için Türk Gıda Kodeksi tarafından kabul edilen maksimum AFM ₁ limitleri	13
Çizelge 2.5. Klinoptilolit kimyasal bileşimi	17
Çizelge 2.6. Klinoptilolitlerin bazı fiziksel özellikleri	18
Çizelge 2.7. Bentonitin kimyasal bileşimi	19
Çizelge 3.1. Kalibrasyon kurvesinin hazırlanmasında kullanılan aflatoksin standart çözeltilerinin AFM ₁ konsantrasyonları ve enjekte edilecek hacim içindeki AFM ₁ miktarları	29
Çizelge 3.2. HPLC çalışma şartları	31
Çizelge 3.3. Tampon çözeltide bulunan killerin, AFM ₁ adsorbsiyonlarının belirlenmesi denemelerinde kullanılan AFM ₁ konsantrasyonları, çözelti miktarları ve kil miktarları	34
Çizelge 4.1. Sütte AFM ₁ için geri kazanım oranları	40
Çizelge 4.2. 0.1 g kil örneklerinin AFM ₁ adsorbsiyonu kapasiteleri	41

EKLER DİZİNİ

		sayfa
Ek 1.	1 litre sütün içerdđđ protein, yağ, karbonhidrat, vitamin, tuz ve suyun ortalama oranları	61
Ek 2.	Çeşitli ÷lkelerde s÷t ve s÷t ürünlerinde bulunmasına izin verilen maksimum AFM ₁ düzeyleri	62
Ek 3.	Mikotoksin çeşitleri, kaynakları, hedef hayvan, doku veya organlar	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

a_w	Su aktivitesi
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram (10^{-3} gram)
ml	Mililitre (10^{-3} litre)
μg	Mikrogram (10^{-6} gram)
μl	Mikrolitre (10^{-6} litre)
ng	Nanogram (10^{-9} gram)
ppm	Milyonda kısım (mg/L)
ppb	Milyarda kısım ($\mu\text{g/L}$)
ppt	Trilyonda kısım (ng/L)

Kısaltmalar

AFB ₁	Aflatoksin B ₁
AFB ₂	Aflatoksin B ₂
AFG ₁	Aflatoksin G ₁
AFG ₂	Aflatoksin G ₂
AFM ₁	Aflatoksin M ₁
AFM ₂	Aflatoksin M ₂
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
HSCAS	Hidrate Sodyum Kalsiyum Alüminyum Silikat
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IAK	İmmüno Affinite Kolon
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kurulu
TGK	Türk Gıda Kodeksi
UV	Ultra Viyole
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı

1. GİRİŞ

Gıda maddeleri, üzerlerinde doğal olarak bulunan veya sonradan bulaşan mikroorganizmalar nedeniyle, üretimden tüketime kadar geçen süre içerisinde koşullar uygun olduğu takdirde bazı olumsuz değişikliklere uğrayabilirler. Bu değişikliklere neden olan mikroorganizmaların bir kısmını küfler teşkil eder. Küfler çok geniş sıcaklık ve pH aralığında çalışabildikleri gibi diğer mikroorganizmalara nazaran daha düşük nispi rutubette üreyebilmektedirler. Bu özellikleri onların gıda maddeleri üzerinde yaygınlığını arttırmakta ve önemli gıda kayıplarına olanak sağlamaktadır. Bunun yanında küfler üzerinde gelişip çoğaldıkları gıda maddelerinde bir takım toksik metabolizma ürünleri meydana getirmektedirler. Küflerin ürettikleri bu toksik maddelere mikotoksin denilmektedir.

Mikotoksin kelimesi Yunanca fungus anlamına gelen “Mykis” ve Latince zehir anlamına gelen “Toxikon” kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur. Mikotoksinler küflerin ikincil metabolitleridir ve iz miktarda (mg/L ve µg/L seviyelerinde) meydana gelirler. Çok düşük miktarlarda bile insan sağlığını etkilerler. Mikotoksinleri belirli küf türleri üretir ve her birinin ürettiği toksin farklı yapıdadır. Küf mantarı gıda maddesinde gelişip toksin oluşturduktan sonra tamamen yok olsa da ürettiği toksin gıda maddesinin tüketilmesi sonucu toksik etkisini gösterir (Charles ve Hurburg, 1995).

FAO’nun 1985 yılı faaliyet raporuna göre, dünya yıllık tarımsal üretiminin yaklaşık % 25’i mikotoksinlerle kirlenmekte yani farklı düzeylerde küflenmektedir. Bu küflenmenin sonucu olarak, toplam üretimin % 1-2’si tüketilemez hale gelmekte ve ekonomik kayıplar olmaktadır (Şanlı, 2001).

Mikotoksinlerle bulaşmış gıda maddelerini tüketen insan ve hayvanlarda mikotoksikozis denilen hastalıklar, hatta ölümle neticelenen zehirlenmeler meydana gelmektedir. *Claviseps purpurea* ile kontamine olmuş tahıl tanelerinin tüketilmesiyle ortaya çıkan ergotizm ilk mikotoksikozis olayı olarak bilinmektedir. Organlarda çeşitli nekrozlara ve kangrene sebep olan bu hastalık Orta Çağ Avrupa’sında “Kutsal Ateş” olarak tanınmıştır (Duru ve Özgüneş, 1984). Öte yandan, ikinci Dünya Savaşı yıllarında küflü tahıl ürünlerinin tüketilmesi sonucu Rusya’nın bazı bölgelerinde nüfusun yaklaşık % 10’undan fazlası bu tip mikotoksikozislerden etkilenmiş ve çok sayıda ölüm meydana

gelmiştir. Bütün bunlar o yıllarda “ihmal edilen hastalıklar” olarak görülmüştür (Van Egmond, 1989a). Nihayet 1960’lı yıllarda İngiltere’de “Hindi X Hastalığı”nın ortaya çıkmasıyla, bu konudaki kanaatler değişmiştir. Ortaya çıkan bu hastalıktan binlerce hindi palazı ölmüş ve yapılan araştırmalarda hastalığın etkeninin hindilere verilen yemlerde protein kaynağı olarak kullanılan ve Brezilya’dan ithal edilen yer fıstığı küspesindeki toksik bir faktörün olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraları bu konuda yapılan çalışmalar bu bileşiğin *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından oluşturulan bir metabolit olduğu tespit edilmiş ve bundan sonra, toksine kendisini oluşturan fungusun adından dolayı “Aflatoksin” adı verilmiştir (Stoloff, 1980).

Aflatoksinler, *A.flavus* ve *A.parasiticus* türü küfler tarafından üretilen mikotoksin grubudur. Aflatoksin üreticisi küfler; tarımsal üretim, kurutma, depolama ve işleme aşamalarında, özellikle su aktivitesi ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak hemen her türlü tarımsal üründe ve gıda maddesinde gelişebilirler. Bu nedenle de, özellikle tropik ve subtropik ülkelerde olmak üzere; dünyanın birçok ülkesinde üretilen gıda maddelerinde aflatoksin sorunu yaşanmaktadır (Bullerman ve ark., 1984).

Aflatoksinler, bugüne kadar 18 türevi belirlenmiş olan, difuranokumarin yapısındaki maddelerdir. İlk olarak, ultraviyole (UV) ışık altında mavi renkli floresan veren iki bileşen aflatoksin B₁ (AFB₁) ve aflatoksin B₂ (AFB₂) olarak; sarı, yeşil renkte floresan veren diğer iki bileşen ise aflatoksin G₁ (AFG₁) ve aflatoksin G₂ (AFG₂) olarak adlandırılmıştır. Aflatoksinli yemle beslenen süt verici hayvanların metabolizmaları sonucu, AFB₁ ve AFB₂, monohidroksi türevleri olan aflatoksin M₁ (AFM₁) ve aflatoksin M₂ (AFM₂) 'ye dönüşmekte ve hayvanın vücudundan süt yoluyla atılmaktadır (Betina, 1989). AFM₁ ve AFM₂'ye, tropik ülkelerde yapılan araştırmalarda insan sütünde, yeni doğanın ve annenin kanında da rastlanmıştır (Wild ve ark., 1987; Maxwell ve ark., 1989).

AFB₁'in bir türevi olan AFM₁'in oluşumu, karaciğerde gerçekleşmekte ve süt veren memelilerin sütleri ile idrarda bulunmakta, özellikle karaciğerde tahribatlara sebep olmaktadır. Bugüne kadar ki yapılan etiyolojik ve moleküler laboratuvar çalışmalarında, AFM₁'in insanlar için de karsinogen ve genotoksik olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (Ueno, 1985; Ueno, 1986). AFM₁'in; en kuvvetli hepatotoksik etkiye sahip AFB₁'den 10 kat daha az toksik olduğu ileri sürülmektedir (Mayes ve MacDonald, 1995). 1993 tarihinde IARC (Uluslararası Kanseri Araştırma Kuruluşu)

tarafından AFB₁ birinci derecede, AFM₁ de ikinci derecede kanserojen maddeler grubuna alınmıştır (Dragacci ve ark., 1995).

AFB₁'in, sütte AFM₁'e dönüşümünün % 0.8 - 2.2 oranında olduğu, ancak bu oranın hayvandan hayvana; laktasyon periyoduna ve süt miktarına bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (Patterson ve ark., 1980; Smith, 1997). Buna göre 10 ppb düzeyinde AFB₁ içeren yemden 6 kg tüketen bir hayvanın sütünde, 20 kg süt üretmesi durumunda, 0.02 - 0.07 ppb AFM₁ bulunacaktır (Mayes ve MacDonald, 1995).

Halkın sağlığını yakından ilgilendiren bu konu üzerinde birçok ülkede uzun yılları kapsayan çeşitli kontrol ve izleme programları yürütülmekte ve elde edilen sonuçlara göre, ülke şartları da dikkate alınarak çeşitli gıda ve hayvan yemlerinde bulunmasına izin verilen aflatoksinler için maksimum tolerans limitleri belirlenmiş ve buna göre mevzuat hazırlanmıştır. Birçok ülkenin sütte bulunmasına izin verilen AFM₁ limitlerine bakıldığında; limitin iki düzeyde, 0.05 ve 0.5 ppb düzeylerinde yoğunlaştığı görülmektedir (Van Egmond, 1999). Ülkemizde ise Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (Anonim, 2002), sütlerde bulunabilecek AFM₁ sınırı 0.05 ppb olarak belirlenmiştir. Diğer ürünlerle karşılaştırıldığında süt ve süt ürünlerinde AFM₁ için müsaade edilen maksimum kalıntı düzeyi oldukça düşüktür. Bunun nedeni süt ve ürünlerini tüketen hedef kitlenin daha çok hassas bireyler olan çocuklardan oluşmasıdır.

Ülkemizde yapılan birçok çalışmada süt ve süt ürünlerinde AFM₁ düzeyinin çok yüksek olduğu belirtilmiş ve halk sağlığı açısından önüne geçilmesi gereken bir sorun olduğu ortaya konulmuştur.

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından ülke çapında yapılan kapsamlı bir araştırmada toplam 543 süt numunesi alınmış ve bunların 206'sının 0.01 ppb'den fazla ve 82'sinin 0.05 ppb'den fazla miktarda AFM₁ içerdiği belirlenmiştir (Özkaya ve ark., 2003a). Gürbay ve ark. (2006) tarafından Ankara'dan temin edilen 19 UHT tam yağlı süt, 5 UHT yağsız süt ve 3 günlük pastörize süt olmak üzere toplam 27 süt örneğinin % 59.3'ünde AFM₁ belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Ankara, Konya, Kayseri, Niğde ve Sivas illerindeki toplanan 129 UHT süt örneğinde AFM₁ düzeyi incelenmiştir. Analiz edilen örneklerin 75'inde (% 58.1) ortalama 108.17 ng/l düzeyinde AFM₁ tespit edilmiş ve örneklerin 61'inde (% 47) AFM₁ düzeyi Türk Gıda Kodeksinde belirtilen limit değerinin (0.05 ppb) üzerinde olduğu hesaplanmıştır (Unusan, 2006).

Türkiye’de yapılan bu ve benzeri çalışmalar sütlerde aflatoksinin yaygın olduğunu göstermektedir. Ayrıca bebek ve çocukların yetişkinlere göre daha fazla süt tüketmek zorunda oldukları ve bünyelerinin de yetişkinlere göre daha duyarlı olduğu dikkate alınacak olursa, süt ve süt ürünlerinde oluşabilen AFM₁’in sağlık açısından ne kadar önemli olduğu ortadadır. Bunun yanında ülke ekonomilerinde de her yıl ciddi kayıplar ortaya çıkmaktadır.

Aflatoksin oluşumuna en hassas ürünler kuru meyveler, bunun yanında yağlı tohumlar ve mısır olarak görülmektedir. Mısır ve yağlı tohum küspeleri dünyada ve ülkemizde en önemli hayvan yemi kaynaklarıdır. İşleme sırasında tohumda mevcut olan aflatoksinin bir kısmı ham yağa geçmektedir. Yağa geçen aflatoksin oranı genellikle işleme şekli, koşulları ve hammadde kalitesine bağlıdır. Rafinasyon sırasında bitkisel yağlarda bulunan aflatoksinin uzaklaştırıldığı belirtilmiştir. Bu nedenle yağlı tohumlar yağa işlendiğinde aflatoksinlerin neredeyse tamamına yakın bir kısmı küspede kalmaktadır (Parker ve Melnick, 1966). Mısır ise zaten hububatlar içinde hemen hemen aflatoksin oluşumuna hassas tek hububattır. Sonuçta süt veren hayvanların yüksek oranda mısır ve yağlı tohumları tükettikleri göz önüne alındığında, aflatoksin yönünden en riskli materyallerle beslendiklerini söyleyebiliriz. Yem kanunu bu konuda oldukça katı ve güvenilir limitler getirmiş olmasına rağmen, sütlerimizde aflatoksinin yaygınlığı yaptırımların ve limitlerin pek uygulanamadığı anlamına gelmektedir.

Yukarıda da belirtildiği gibi sütte aflatoksinin tek kaynağı yemle alınan aflatoksindir. Dolayısıyla da sütlerimizde aflatoksin probleminin azaltılması veya ortadan kaldırılması için çözüm de ya yemlerde aflatoksin düzeyinin azaltılması ya da yemlerle gelen aflatoksinin süte geçmesinin engellenmesi olabilir. Yemle alınan aflatoksinin süte geçmesinin engellenmesinde bir yöntem olarak yeme kil katılması ve aflatoksinlerin kil tarafından adsorbsiyonu nedeniyle bağırsaktan emiliminin azaltılması önerilmektedir (Jaynes ve ark., 2007).

Karma yem üretiminde kullanılan bitkisel kökenli yemlerin hasadından depolanmasına kadar ve karma yem üretimi sırasındaki değişik aşamalar (silolar, taşıyıcılar ve soğutucular vb.) mikrobiyal bulaşma açısından kaynak oluştururlar. Gerek mikroorganizma ve gerekse bunların toksinleri ile bulaşık yemlerin tüketilmesi sonucunda yem endüstrisi, hayvan yetiştiricileri ve gıda üreticileri önemli problemlerle karşılaşmakta ve ekonomik anlamda kayıplar ciddi boyutlara ulaşabilmektedir.

Yemlerin hasadından depolanması ve hatta hayvanın önüne gelinceye kadar tüm aşamalarda alınacak bir takım önlemlerle hijyenik açıdan kaliteli yem üretimine özen gösterilmesi mikotoksin kontrolünün temel ilkesidir. Ancak mikrobiyal bulaşma açısından gerekli önlemlerin alınamadığı ve toksin oluşumunun engellenemediği durumlarda toksinlerin yemden uzaklaştırılması veya toksinlerin zehir etkisinin giderilmesi ekonomik anlamda büyük önem taşımaktadır. Özellikle son yıllarda toksinli yemlere organik ve inorganik katkı maddeleri ilave edilerek bu açıdan etkili sonuçların alındığı görülmüştür. Söz konusu bu maddeler toksinleri bağlayıcı özellikleri sayesinde bileşiklerin oluşmasına neden olarak toksinlerin bağırsaklardan emilmeden dışarıya atılmasını sağlarlar.

Bu amaçla kullanılan inorganik maddelerden biri olan bentonit, alüminyum ve magnezyumca zengin volkanik kül, tuf ve lavların kimyasal ayrışması ile oluşmuş çok küçük kristallere sahip kil minarelerinden oluşan ve ağırlıklı olarak kollaidal silis yapıda, yumuşak, gözenekli ve kolay şekil verilebilir açık bir kayadır. Bentonit'in en önemli özelliği kendi ağırlığının 5-6 katı suyu absorbe ederek 12-15 kat hacim artışı gösterebilmesidir. Bentonit bir kil mineralidir ve esas olarak montmorillonitten oluşmuştur. Kil minerali suyu veya organik molekülleri emdiğinde şişer ve aynı zamanda önemli bir iyon değiştiricidir (Yalçın, 1997).

Son yıllarda hayvan sağlığını bozmayan, verimi artıran ve toksin adsorbsiyonu yapabilen yem katkı maddelerinin hayvan beslemede kullanımları üzerine çalışmalar artmış olup, bu anlamda kullanılan doğal kil türevlerinden birisi de zeolittir.

Zeolitler de bir kil grubudur. Volkanik küllerin su ortamında değişime uğraması sonucunda oluşurlar. Son 200 yılda 50 çeşit doğal zeolit ve 200'den fazla sentetik zeolit tanımlanmış ve 9 zeolit mineralinin doğada büyük miktarlarda ve oldukça saf rezervler olarak bulunduğu anlaşılmıştır. Bunlar; analsim, klinoptilolit, şabazit, eriyonit, ferriyonit, hölandit, lomantit, mordenit ve filipsittir. Dünyada rezerv olarak en çok bulunan ve teknolojik özellikleri en iyi olanlardan biri klinoptilolit olup, suyu, gazları ve metal iyonlarını bünyesinde değişebilir durumda tutabilen, zararlı elementler içermeyen, 750 °C kadar sıcaklığa, yüksek asit ve bazlara (pH:1.5-11) dayanabilen bir doğal mineraldir (Baran ve Kutay, 1999).

Zeolitlerin yapıları bal peteği veya kafese benzeyen, değişebilir katyonlar ve su ihtiva eden, 2-12 Å boyutlarında kanal ve boşluklardan ibarettir. Bünyesindeki

boşluklara kolayca girebilen ve yer değiştirebilen sıvı ve gaz molekülleri ile toprak alkali iyonlarından ileri gelen “moleküler elek” yapısındadır. İyon değişimi özelliği nedeniyle hayvanlarda bir katyonu adsorbe ederken diğerini desorbe etmek suretiyle bir tampon görevi yapar. Bazı kil minerallerinden farklı olarak suda çözünmeyen, bulundukları ortamda uzun süre bozunmadan kalabilen, katyon değişim kapasitesi yüksek minerallerdir (Çelebi ve ark., 2004).

Zeolitlerin 1965 yılından beri besi yemlerinde kullanımı konusunda yapılan çalışmalarda; % 1.5-15 arasında değişen düzeylerde karma yemlere katılmasının hayvan sağlığını bozmaksızın canlı ağırlıkları artırdığı kaydedilmektedir. Beside genellikle klinoptilolit ve mordenit çeşitleri kullanılmakta olup, yem katkı maddesi olarak kullanılan zeolitler % 75-85 oranında klinoptilolit içermeli ve bor içeriği 10 ppm’den düşük olmalıdır. Klinoptilolit yemlere katıldığında; toksinleri tutup, yemdeki besleyici maddeleri absorblamasıyla depolamada ortaya çıkabilecek besin kayıplarını engeller (yağların oksidasyonu vb.), daha etkin bir yem tüketimi sağlar, hazmı kolaylaştırır ve besin maddelerinin daha etkin bir şekilde tüketimini sağlar. Klinoptilolitin yem değerini arttırmasıyla üretim maliyeti düşmekte ve besi süresi kısalmaktadır. Keza sindirim sistemine girdiği andan atılincaya kadar devamlı iyon değişimi yapar ve aktif kalır. Alüminosilikat yapı bozulmadığından, sistemde birikmez, kana karışmaz ve tamamı vücut dışına atılır (Demirel ve ark., 2010).

Doğal zeolitler yem dönüşüm oranı, performans ve yem tüketimi üzerine aflatoksinin olumsuz etkilerini minimize ederler (Parlat ve ark., 1999; Oğuz ve Kurtoğlu, 2000b), hayvanların karaciğerlerindeki mikotoksin konsantrasyonlarını azaltırlar ve hayvan sağlığını iyileştirip, biomass (bağırsaklarda sindirilemeyen bir mannanoligosakkarit) üretimini arttırırlar (Papaioannou ve ark., 2004).

Klinoptilolit, yüksek oranda nem ve yağı bünyesinde depolayabilmektedir. Bu nedenle yemlerde depolama sırasında nemden kaynaklanabilecek oksidasyon ve küflenmeyi de engeller. Rasyon enerjisinin arttırılması için ilave edilen sıvı yağların yemden serbest bırakılmasını ve depoda okside olmasını engeller (Angulo ve ark., 1995).

Killerin aflatoksinleri çok iyi bir şekilde bağladıkları ortaya konulmuştur. Bu nedenle aflatoksine hassas hayvanların yemlerine karıştırılarak, yemle gelen aflatoksinin kil tarafından adsorbsiyonu ve dolayısıyla bağırsaktan emilmeyerek

dışkıyla atılışını gösteren çok sayıda bilimsel çalışma ve uygulama bulunmaktadır. Benzer yaklaşımlar süt veren hayvanların yemlerine de kil katılması ile sütte AFM₁'in azaltılması alanında da vardır (Edrington ve ark., 1996). Böylece aflatoksinlerin süte geçerek AFM₁ formuna dönüşmesi ve süt tüketen bireylere zarar vermesi kısmen de olsa engellenmektedir.

Süt ve süt ürünlerinde hem Türkiye'de hem de dünyada AFM₁'in denetimi, izlenmesi ve düzeyini takip ile ilgili tarama çalışmaları yaygın olarak yapılmaktadır. Yapılan tarama çalışmaları ülkemizde üretilen sütlerin çok önemli ölçüde aflatoksin M₁ ile kontamine olduğunu göstermektedir. Hem bu gıdaların yaygın tüketimi hem de tüketenlerin önemli bir kısmının çocuk ve bebekler gibi riskli bir grup olması nedeniyle, AFM₁ kontaminasyonu çok ciddiye alınmalıdır. Bu kontaminasyonun engellenmesi için en etkin önlem aflatoksinsiz yem veya limitlerin altında aflatoksin B₁ içeren yem kullanımıdır. Ancak bu bilinmesine rağmen ulaşılamamış bir hedeftir.

Bu izlemeler çiftçiden süt alımı aşamalarına kadar indirilmelidir. Ancak AFM₁ düzeyi limitlerin üzerinde bulunan sütlerin yine ekonomik değeri yüksek bir ürüne çevrilmemeleri durumunda işletme veya çiftçi sütü atmak yerine temiz sütlerle karıştırmak (AFM₁ düzeyini limitin altına indirecek şekilde) veya denetimin uygulanmadığı alanlara yöneltmek gibi (sokak sütü benzeri) yollara dönecektir. Toplum sağlığı alanında doğru strateji; AFM₁ miktarının yasal sınır seviyelerine düşürülmesiyle herkesin bu toksini alması yerine, mümkün olduğunca az ürün ile bu toksinin ana kitleden uzaklaştırılması olmalıdır. Çünkü bu toksinlerin zarar vermeyeceği bir alt limitleri yoktur. Kullanılan yasal limitler ekonomik nedenlerle kabul edilebilir ve analitik tekniklerle de saptanabilir olmaları ile belirlenmiş olan düzeylerdir. Başka bir deyişle limitler ne olursa olsun toplum mümkün olduğunca düşük düzeyde toksine maruz kalmalıdır. Bu da ekonomik olduğu sürece partinin yüksek toksin içeren bölümlerinin ayrılmasının daha doğru olduğu anlamına gelmektedir. Bunun teşvik edilebilmesi için ise aflatoksin içeren sütlerin atılmayıp detoksifiye edildikten sonra yine değeri olan farklı bir ürüne (hayvan yemi vb.) çevrilmesi gerekir.

Yapılması planlanan bu çalışmada yüksek miktarda AFM₁ içeren sütlerin böyle bir prosesten geçirilerek kullanılması yani katı bir faz olan kil ile sıvı bir faz olan süt çeşitli şekillerde karşılaştırılarak, sütteki AFM₁'in yaklaşık tamamının kil tarafından tutulmasını sağlayacak bir işlem basamağı geliştirilmeye çalışılacaktır. Böylece

kontamine sütün değerini tamamen ortadan kaldırmayan ve onun alternatif bir ürüne çevrilmesine olanak sağlanmış olacaktır. Bu sayede sütte bulunan AFM_1 miktarı azaltılarak AFM_1 düzeyi düşük sütler elde edilecektir. Ekonomideki kayıplar önlenecek ve sağlıklı süt ve süt ürünleri tüketme imkânı elde edilmiş olacaktır.

Kil kullanılarak sütte bulunan AFM_1 'in adsorbe edilip edilmediği belirlenecek ve AFM_1 adsorbsiyonunun gerçekleşmesi halinde ise hazırlayacağımız kil içerikli kolon prototipleriyle AFM_1 'in kolonlardaki adsorbsiyon düzeyi belirlenecektir. Eğer kolon prototiplerinde istenilen düzeyde başarı sağlanırsa, sütte bulunan AFM_1 'i tutacak endüstriyel amaçlı kil içerikli kolonların geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Aflatoksinlerin Yapısı ve Özellikleri

Aflatoksin terimi *Aspergillus*'un “A” ve *flavus*'un “fla” harflerinin birleştirilip toksin kelimesinin ilavesiyle oluşturulmuştur (Kaya, 1984).

Aflatoksinler hemen tüm hayvan türleri ve insanlar için zehirli olmaları, her çeşit yem ve gıda maddesinde yaygın kirlenmeye yol açmaları, birçok hayvan türünde ve insanlarda karsinogenik etkilerinin görülmesi, küflü yemleri yiyen hayvanların et, süt ve diğer ürünlerinde kalıntılarına rastlanması sebebiyle, halen üzerinde yoğun biçimde araştırma yapılan en önemli mikotoksin grubunu oluşturmaktadırlar (Kaya, 1989).

Aflatoksinler, özellikle *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* olmak üzere, yine bazı kaynaklarda belirtildiği şekilde diğer bazı *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri tarafından da uygun sıcaklık ve rutubet koşullarında sentezlenen toksik, mutajenik, teratojenik ve karsinogenik fungal metabolitlerdir (Başkaya ve Atasever, 2005).

Çizelge 2.1. Aflatoksinler ve bunları sentezleyen bazı fungus türleri (Özturhan, 2005)

Fungus Türleri	Aflatoksinler			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
<i>A. flavus</i>	+	+	+	+
<i>A. flavus</i> var. <i>Columnaris</i>		+		
<i>A. oryzae</i>	+	+		
<i>A. parasiticus</i>	+	+	+	+
<i>A. parasiticus</i> var. <i>Globosus</i>	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	+			
<i>A. ventii</i>	+			
<i>A. ruber</i>	+			
<i>A. ostianus</i>	+	+		
<i>A. ochraceus</i>	+			
<i>P. variable</i>	+			
<i>P. puberulum</i>	+	+	+	+

Aflatoksinin dört farklı bileşiği vardır. Ultra viyole ışık altında mavi renk veren iki bileşik aflatoksin B₁ (AFB₁) ve aflatoksin B₂ (AFB₂); sarı-yeşil renk veren iki bileşik ise aflatoksin G₁ (AFG₁) ve aflatoksin G₂ (AFG₂) olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda aflatoksin içeren yemleri tüketen hayvanların sütlerinde yeni bir aflatoksin bileşiği tespit edilmiş ve süt ile atılmasından dolayı adına aflatoksin M yani süt toksini (Milk toxin) denilmiştir. Aflatoksin M'in tespit edilmesinden sonra yapılan çalışmalarda, süt toksininin hayvanların yemleri ile aldıkları aflatoksin B₁ ve aflatoksin B₂'nin 4-hidroksi türevi olduğu ve aflatoksin M₁ (AFM₁) ve aflatoksin M₂ (AFM₂) şeklinde süt ile atıldığı ortaya konarak yeni iki bileşik bulunmuştur (Bakırcı, 1995).

AFB₁ ve AFB₂ süt veren hayvanların karaciğerinde metabolize olarak OH içeren türevlere dönüşür ve sütle salgılanarak ortaya çıkarlar (Wood, 1992). AFM₂ aynı zamanda dihidro-aflatoksin M₁'dir. AFM₁'in karsinojenik gücü AFB₁'den 10 kat daha düşüktür (Lopez ve ark., 2001). Aflatoksinlere verilen rakamlar ise, toksisite derecesini göstermektedir. Numara "1" ile simgelenenler yüksek toksisiteyi, numara "2" ile gösterilenler ise daha düşük toksisiteyi ifade etmektedirler (Tunail, 2000).

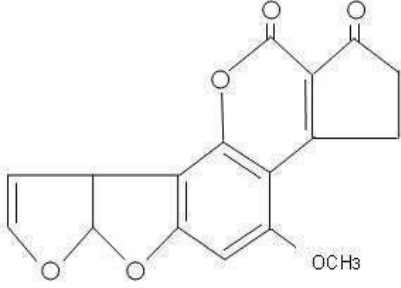
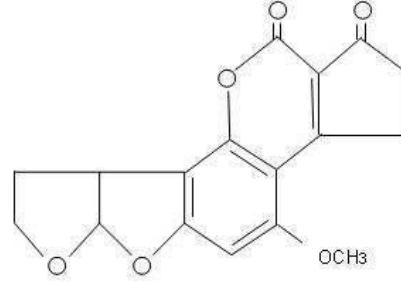
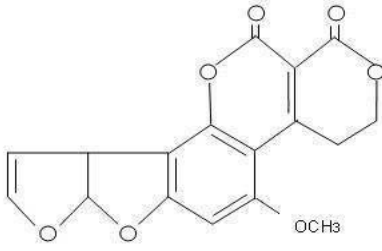
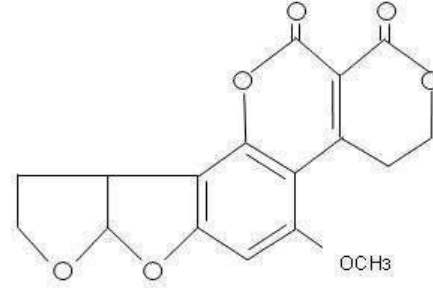
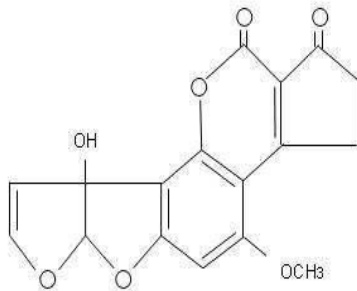
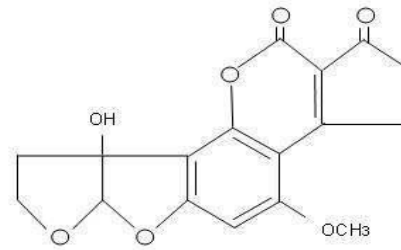
Günümüzde aflatoksinler, aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂ olmak üzere başlıca altı ana bileşikten oluşmaktadırlar. Bunlara ilave olarak, aflatoksinlerin sayıları gerek küflü kültürlerden gerekse hayvan vücudundan elde edilmiş metabolitleri ile (B₂a, B₃, G₂a, GM₁, GM₂, GM₂a, M₂a, P₁, Q₁, RO ve aflatoksikol gibi) 17'yi bulmaktadır (Pittet, 1998).

Aflatoksin sentezleyen toksijenik *Aspergillus* küfleri, bütün dünyada yaygın olarak bulunurlar. Bu küfler çevre sıcaklığının 25 °C civarında olduğu ortamlar ile a_w değeri 0.80 ve üzerinde olan bütün ürünlerde üreyebilirler. *Aspergillus* cinsine ait küf türleri Çizelge 2.2.'de gösterilen ortamlarda rahatlıkla gelişerek aflatoksin sentezleyebilirler (Jay, 1992).

Çizelge 2.2. *Aspergillus* cinsine ait küflerin gelişme değerleri (Jay, 1992)

Sıcaklık	10-45 °C
Su aktivitesi (a _w)	0.80 ve üzeri
pH	1.6-9.3
Nem	% 60 ve üzeri

Önemli bazı aflatoksin bileşiklerinden olan aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂'nin kimyasal yapıları Şekil 2.1'de, fiziksel ve kimyasal özellikleri ise Çizelge 2.3'de sunulmuştur.

Aflatoxin B₁Aflatoxin B₂Aflatoxin G₁Aflatoxin G₂Aflatoxin M₁Aflatoxin M₂

Şekil 2.1. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları (Betina, 1989).

Çizelge 2.3. Önemli bazı aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Reddy ve Waliyar, 2000)

Aflatoksin	Moleküler Formülü	Erime Noktası (°C)	Ağırlığı (g/mol)	365 nm UV ışık altında verdiği flüoresan renk
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	268-269	312	Mavi
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	286-289	314	Mavi
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	244-246	328	Yeşil
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	237-240	330	Yeşil
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	299	328	Mavi
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	293	330	Mavi

Aflatoksinler; renksiz ya da sarı renkli, iğne şeklinde kristallerdir. Orta polarlıktaki çözücülerde (kloroform, metanol, etanol ve dimetilsülfoksit gibi) kolayca çözünebilen aflatoksinler, suda en fazla 10-20 mg/L'ye kadar çözünebilmektedir. Aflatoksinler, kuvvetli alkali ve oksitleyici maddelerle (sodyum hipoklorid, amonyak ve potasyum permanganat gibi) reaksiyona girince çabukça parçalanırlar (Özkaya, 2003b).

2.2. Sütte Aflatoksin M₁ Varlığı

Sütler, laktasyon dönemindeki hayvanların AFB₁ içeren yemlerle beslenmesi sonucunda AFM₁ ile kontamine olurlar. Süt ürünleri ise AFM₁ ile kontamine süttten yapılmaları veya süt ürünlerinde aflatoksin üreten küflerin üremesine bağlı olarak birkaç aflatoksin çeşidi ile kontamine olabilirler (Van Egmond, 1989b).

Toksinin süte geçmesi için 0.02 ppm ve üzerinde toksin içeren yemin yenilmesi gerekir (Kaya, 1984). Süt ve ürünlerindeki aflatoksinin miktarlarının coğrafi bölgelere, ülkelere ve mevsimlere göre farklılıklar gösterdiği, bahar ve yaz mevsiminde kış mevsimine oranla sütlerde daha az miktarlarda AFM₁ bulunduğu, dolayısıyla bu mevsimlerde yapılan süt ürünlerinde AFM₁ miktarının önemsenmeyecek düzeylerde olduğu bildirilmiştir (Birdane ve ark., 2006).

Birçok ülkenin sütte bulunmasına izin verilen AFM₁ limitlerine bakıldığında; limitin iki düzeyde, 0.05 ve 0.5 ppb düzeylerinde yoğunlaştığı görülmektedir (Van Egmond, 1999). Ülkemizde ise Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen AFM₁'in maksimum düzeyleri belirlenmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Süt ve süt ürünleri için Türk Gıda Kodeksi tarafından kabul edilen maksimum AFM₁ limitleri (Anonim, 2008)

Gıda maddesi	Kabul edilebilir maksimum limit (ppb AFM ₁)
Peynir	0.25
Süt	0.05
Süt tozu	0.50
Bebek mamaları ve devam formülleri	0.025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0.025

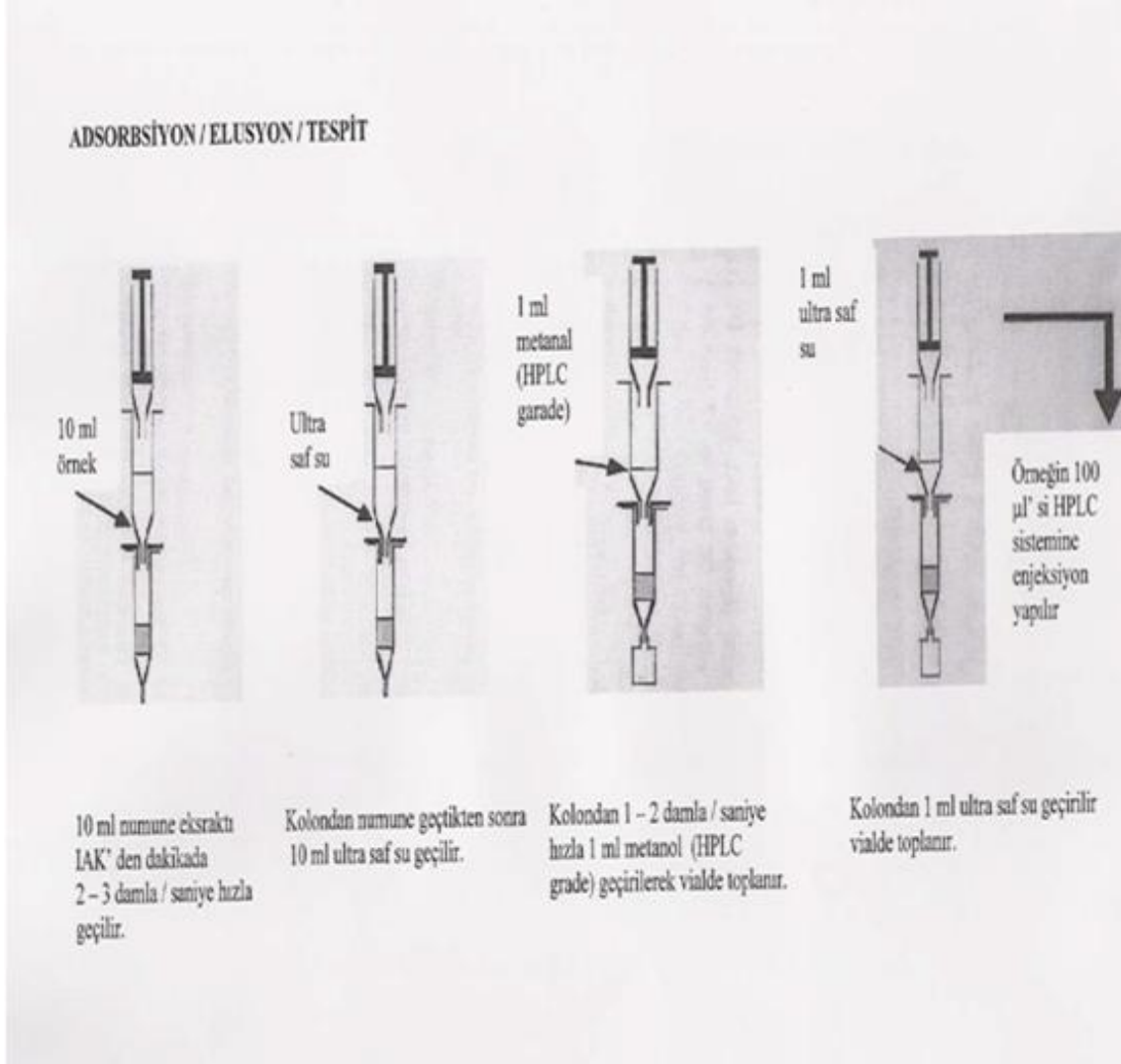
Tahıllar, yemler ve yağlı tohum küspeleri tüketen hayvanların sütlerinde bulunan AFM₁, insan vücudunda olumsuz gelişmelere neden olmaktadır. Karaciğer gelişme hızı ve veriminde azalma, karaciğer kanseri, sarılık ve bağışıklık sisteminin baskılanması gibi ciddi sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır (Kaya ve ark, 2002).

Sütte AFM₁ tayini yapılırken aflatoksine özgü monoklonal antikorlar içeren “immuno-affinite” kolonlar kullanılmaktadır. Aflatoksin içeren örnek ekstraktı kolondan geçirilirken, antikorlar aflatoksini tutarlar. Daha sonra kolondan saf su geçirilerek kolon temizlenir. Ardından metanol çözeltisi geçirilerek antikorlar denatüre edilerek, toksinin yapıdan ayrılması sağlanır. Metanol ile yapıdan ayrılan toksin, kolondan tekrar geçirilen saf su ile birlikte vialle alınarak HPLC sistemine enjekte edilir ve miktar analizi yapılır (Anonim, 1999).

İmmuno-affinite kolonun nasıl aflatoksin adsorbsiyonu yaptığı Şekil 2.2’de gösterilirken, immuno-affinite kolon tarafından tutulan toksinlerin HPLC’de analiz edilmek üzere kolondan nasıl alındığı ise Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



Şekil 2.2. İmmuno-affinite kolonun yapısı (Anonim, 1999).

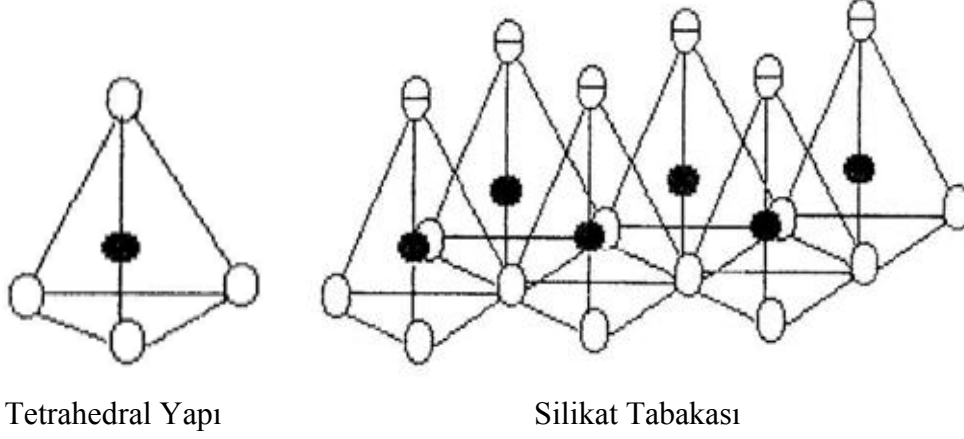


Şekil 2.3. İmmuno-affinite kolon uygulaması (Anonim, 1999).

2.3. Killerin Yapısı ve Özellikleri

Killer, taşların ve maden kütlelerinin fiziksel nedenlerle en ileri aşamada parçalanmalarıyla oluşan 4 µ veya daha küçük boyutlu taneciklerin bir araya gelmesiyle oluşan bir tortul kayaç türüdür. Kil mineralleri çoğunlukla alüminyum, silisyum, demir ve magnezyumdan meydana gelirler. Killer su ihtiva eden alüminyum silikatlarıdır. Bazıları alkali veya esas bileşenler olarak toprak alkalileri içerir. Kil mineralleri tetrahedron (düzgün dört yüzlü) ve oktahedron (düzgün sekiz yüzlü) olarak isimlendirilen kafes şeklinde kristal bir yapıda yaratılmıştır. Kil minerallerinin çoğu plaka veya tabakalı yapılıdır (Albayrak, 1990).

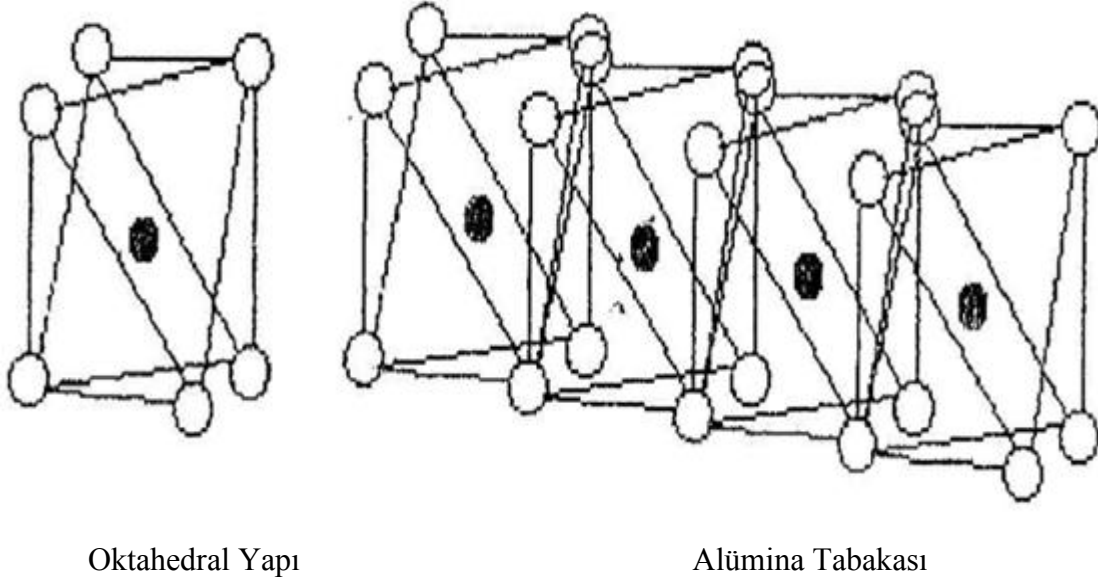
Kil mineral yapısında iki temel blok vardır. Bunlardan biri 4 oksijenli tetrahedron yapısıdır. Bu yapıda 4 oksijen atomu ortasında bir silika atomu vardır.



O Oksijen $\ominus$ Hidroksil • Silisyum

Şekil 2.4. Tetrahedron kil yapısı (Grim, 1968).

İkinci temel yapı olan oktahedral kil yapısında ise 6 oksijen atomu arasında bir alüminyum veya magnezyum atomu bulunur (Tetik, 2001).



O Hidroksil grubu • Alimünyum, magnezyum veya demir

Şekil 2.5. Oktahedral kil yapısı (Grim, 1968).

Killer çok nadir olarak saf halde bulunurlar. Diğer yabancı maddelerle karışık killerin fiziksel özellikleri, bu maddelerin etkisi sonucunda daha karmaşık bir hal alır. Fizikokimyasal özellikler bakımından alkali bazlar, toprak alkalileri ve asitler killerin karakterlerini değiştirirler. Killerin oluşturdıkları ortamın ısısı, basınç değeri ve ortamın asit dengesi meydana gelecek kil minerallerinin cinsini tayin etmektedir. Düşük ısı ve basınç altında ve asidik ortamda kaolinit tipi mineraller oluşmakta, hâlbuki alkali iyonu olarak potasyum mevcutsa ve bunun konsantrasyonu belli bir miktarın üzerinde ise montmorillonit meydana gelmektedir (Seyhan, 1972).

Killerin kimyasal analizleri nadiren kil minerallerini birbirinden ayırabilmektedir ancak X ışınları difraksiyonu ve diferansiyel termal analizler gibi yöntemlerle kil mineralleri birbirinden ayırt edilebilirler (Yalçın, 1997).

Killerin tabakalı yapıda olmalarından dolayı sıkı istiflenme, plâstiklik ve hacimce genişleyip daralma gibi özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikleri sayesinde su tutma kapasiteleri yüksektir. Ayrıca toprakta bol miktarlarda bulunan kil mineralleri yüksek kation değişim kapasitesine sahiptirler. Bu yüzden iç ve dış yüzeylerinin içine organik ya da inorganik moleküller girebilir (Lee ve ark., 2004).

Killer aflatoksinleri de bu kation değişim kapasiteleri sayesinde adsorbe ederler. Birçok kil çeşidi vardır. Adsorbsiyon kapasiteleri yönünden en iyi killer zeolitlerdir. En yaygın olarak kullanılan zeolit grubu ise klinoptilolittir. Klinoptilolitlerin yüksek kation değişimi, ağır metal giderimi, su tutma kapasitesi ve yüzey alanının büyüklüğü gibi önemli özelliklerinden dolayı yüzlerce kullanım alanı vardır. (Melenova ve ark., 2003).

Klinoptilolit potasyum-kalsiyum alumino-silikat yapısındadır. Kimyasal kompozisyonunda, eser elementler hariç ana oksit bileşenleri aşağıdaki gibidir.

Çizelge 2.5. Klinoptilolit kimyasal bileşimi

Oksit bileşeni	% (Ağırlıkça)
SiO ₂	67.11
Al ₂ O ₃	11.84
Fe ₂ O ₃	1.47
MgO	1.15
CaO	2.18
Na ₂ O	0.38
K ₂ O	3.44

Klinoptilolitinin bazı fiziksel özellikleri ise Çizelge 2.6.'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Klinoptilolitlerin bazı fiziksel özellikleri

Renk	Doğal kayaç; beyaz, bej, badem yeşili renklerinde
Sertlik (Mohs sertlik skalasına göre)	3
Özgül ağırlık	2.1 g/cm ³
Görünür porozite	% 35
Su adsorbsiyon kapasitesi	% 135
Su tutma kapasitesi	% 20-50
Yüzey alanı	40.79 m ² /g
Isı dayanımı	840 °C'ye kadar
Klinoptilolit kristal boyutu	5-15 µm
Ortalama gözenek çapı	0.041 µm

Killer kendine özgü yapıları ile birçok alanda kullanılmaktadırlar. Aflatoksinlerin detoksifikasyonunda da killer toksin bağlayıcı olarak görev yapmaktadırlar.

Çalışmalarımızda diğer bir kil çeşidi olarak bentonit kullandık. Bentonit en az %60 oranında montmorillonit içeren bir kil çeşididir. Kullandığımız bentonit sodyum içeriklidir ve en az %90 montmorillonit içermektedir. Tamamen doğaldır, hiçbir katkı maddesi içermez. Yüksek şişme kapasitesine sahiptir. Suya karıştırıldığında kolayca dağılır ve topaklaşma yapmaz. Alüminyum ve magnezyum içeriği zengin volkanik kül, tuf ve lavların kimyasal ayrışmasıyla veya bozulmasıyla oluşur. Yumuşak, gözenekli, şekillenebilir ve ağırlıklı olarak koloidal silis yapıdadır. Beyaz, sarı, yeşil, gri başta olmak üzere çeşitli renklere sahiptir. Çok değişik renklerde gözlenebilen bentonit yüksek biçimlenme özelliğine (plastisiteye) sahip, ısıya dayanıklı ve iyon değiştirme kapasitesi oldukça yüksek olan bir kildir. Bentonit, toksinleri mıknatıs gibi çeken bir sünger özelliğine sahiptir.

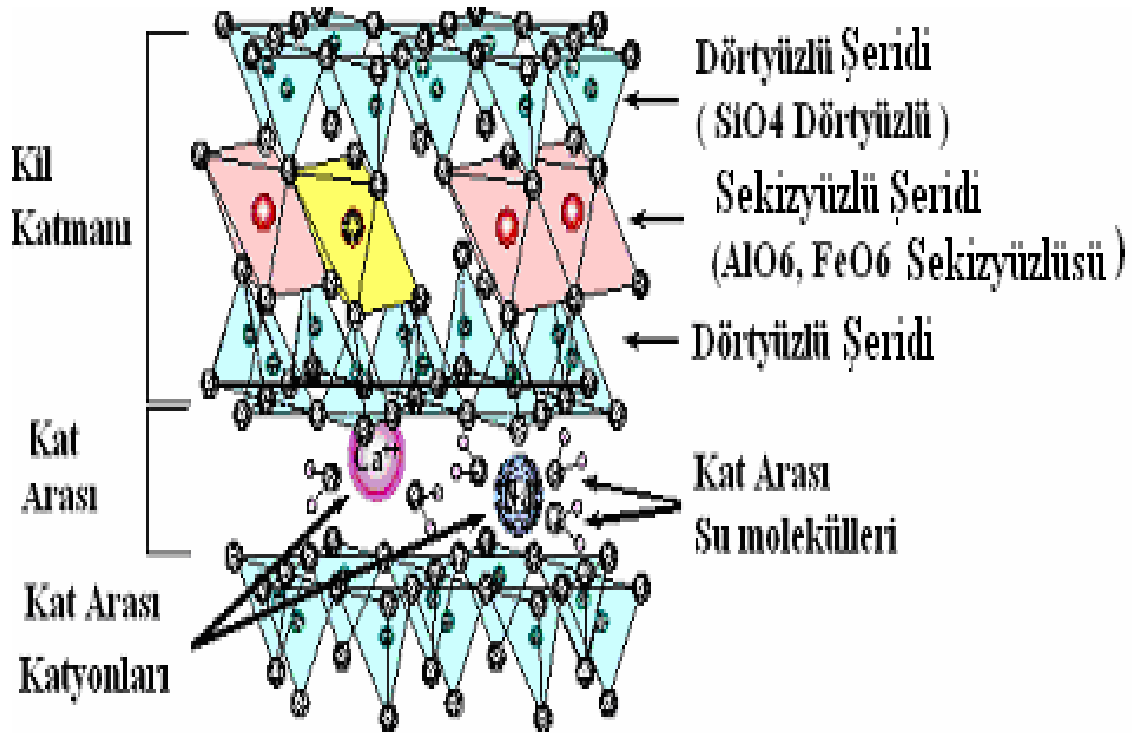
Bentonitin kimyasal bileşimi Çizelge 2.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. Bentonitin kimyasal bileşimi

Oksit bileşeni	% (Ağırlıkça)
SiO ₂	61.28
Al ₂ O ₃	17.79
Fe ₂ O ₃	3.01
MgO	2.10
CaO	4.54
Na ₂ O	2.70
K ₂ O	1.24

Bentonitin kristal yapısı, şerit şeklinde ve üç katlıdır. Bu katlar, dizilmiş sekizyüzlü ve dörtyüzlüden oluşmuştur. Dörtyüzlünün merkezinde Silisyum, sekizyüzlünün merkezinde ise Al, Mg, Na, Ca, Fe, Li gibi katyonlar bulunur. Tek bir bentonit kristalinin tane boyutu 2 mikrondan daha küçüktür. İnce taneli ve gözenekli bir yapıya sahiptir.

Bentonitin katmanlı yapısı ise Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Bentonitin yapısı.

2.4. Sütte AFM₁ Varlığı ve Detoksifikasyonda Kil Kullanımıyla İlgili Çalışmalar

Bitkisel ürünlere göre bulunma sıklığı ve miktarı az olmakla birlikte, hayvansal ürünler içinde en fazla aflatoksine süt ve süt ürünlerinde rastlanmaktadır. Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin bulunması iki kaynaktan köken almaktadır. Birincisi süt veren hayvanların yedikleri yemleri ile aldıkları aflatoksin B₁ ve B₂'nin süte aflatoksin M₁ ve M₂ şeklinde geçmesi ile olmaktadır. İkincisi ise sağımdan sonraki taşıma, işleme ve depolama işlemleri esnasında süt ve süt ürünlerine aflatoksin sentezleyen küflerin bulaşmaları ve aflatoksin üretmeleri ile olmaktadır (Van Egmond, 1983).

Piyasada bulunan ticari sütlerde aflatoksin M₁'in görülme sıklığı, ham çiftlik sütündeki sıklığına göre daha fazla olmaktadır. Çünkü farklı kaynaklardan toplanan aflatoksin M₁ ile bulaşık birkaç litre süt karıştığı diğer sütlerin tamamının kirlenmesine neden olmaktadır (Oruç, 2003).

Çeçen (2009) Van ilinin farklı noktalarında merada beslenen hayvanlardan 31 adet; Ankara ilinde farklı ahırlarda kesif yemle beslenen hayvanlardan ise 30 adet olmak üzere toplam 61 adet çiğ süt örneği alarak analiz etmiştir. Yapılan analizler sonucunda, merada beslenen hayvanlardan alınan süt örneklerinin sadece 1 tanesinde (% 3.22), ahırda kesif yemle beslenen hayvanlardan alınan süt örneklerinin ise 23 tanesinde (% 76.66) farklı düzeylerde AFM₁ tespit etmiştir.

Bostan ve ark. (2005) 2001 yılının Mayıs ve Ağustos ayı arasında, İstanbul'da çeşitli perakende satış noktalarından temin ettikleri pastörize ve UHT sütlerde yaptıkları çalışmada, 21 pastörize süt örneğinin 19'unda (% 90.47'sinde), 10 ile 144 ng/l arasında değişen seviyelerde, 46 UHT süt örneğinin 42'sinde (% 91.3'ünde), 10 ile 161 ng/l arasında değişen seviyelerde, toplamda ise 67 içme sütü örneğinin 61'inde (% 91.04'ünde), 10 ile 161 ng/l arasında değişen seviyelerde aflatoksin M₁ tespit etmişlerdir.

Mavuş (2003) 2002 yılının Şubat ayında Kayseri'nin dört farklı köyünden elde ettiği süt örneklerinde yaptığı çalışmada, 90 süt örneğinin 81'inde (% 90'ında) en az 5 ng/l olmak üzere değişik seviyelerde aflatoksin M₁ tespit etmiştir.

Birdane ve ark. (2006) Afyonkarahisar'da tüketime sunulan 310 adet süt örneğini AFM₁ konsantrasyonu yönünden analiz etmişler ve bunlardan 158 (% 51.05) adetinin değişik düzeylerde AFM₁ ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. Yaz

aylarında (Haziran, Temmuz ve Ağustos 2005) toplanan 158 (121 adet çiğ süt ve 37 adet UHT süt) adet süt örneğinin 74 (% 46.83) adedinin AFM₁ ile kontamine olduğunu ve bunların yalnızca 1 (% 0.63) adedinin yasal sınır olan 50 ppt'yi aştığı bildirilmiştir. Buna karşın kış aylarında (Aralık 2005-Ocak, Şubat 2006) toplanan 152 (119 adet çiğ süt ve 33 adet UHT süt) adet süt örneğinin 84 (% 55.27) adedinde değişik düzeylerde AFM₁ tespit edilmiş olup 5 (% 3.28) adedinin de yasal sınır olan 50 ppt'yi aştığı bildirilmiştir.

Özkaya ve ark. (2003a) tarafından Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan 543 adet çiğ süt örneğinde AFM₁ düzeylerini tespit etmek amacıyla yapılan çalışma kapsamında 6 ilden (Bursa, Erzurum, Kars, Kastamonu, Samsun ve Trabzon) gelen süt örneklerinin hiçbirinde tespit edilebilir düzeyde AFM₁'e rastlanmamıştır. 6 ilden (Ankara, Balıkesir, Bolu, Erzincan, Kırklareli ve Van) gelen süt örneklerinde ise Türkiye limitini aşan düzeylerde AFM₁ tespit edilememiştir. Bu illerin dışında kalan 18 ilde ise çeşitli düzeylerde AFM₁ sorunu görülmektedir. Bu illerdeki kontaminasyon % 16.7 ile % 100 arasında değişmekte ve örneklerin % 6.2 ile % 58.8'nin AFM₁ yönünden 50 ppt'lik limitin üzerinde olduğu görülmektedir.

Atasever ve ark. (2006) Erzurum'daki muhtelif satış yerlerinden halka satışa sunulan 127 adet çiğ süt örneğini AFM₁ yönünden incelemişler ve 73 (% 57.49) adet süt örneğinde değişik oranlarda AFM₁ tespit etmişlerdir. Çiğ süt numunelerinin 14 (%11.02) adedinde ise TGK'nın (Anonim, 2002) kabul ettiği üst sınır olan 50 ppt'lik düzeyi geçtiğini bildirmişlerdir.

Bakırcı (2001) Van ilinden toplanan 90 adet çiğ süt örneğinin % 44.30'unda Türkiye'de kabul edilen limitin (0.05 µg/l) üzerinde AFM₁ bulunduğunu bildirmiştir.

Türkiye'nin çeşitli illerinden alınan çiğ sütlerin analiz edildiği başka bir çalışmada da 360 örneğin 159'unda (% 44.3), en yükseği 1.4 µg/l olmak üzere AFM₁ bulunmuş ve 48 adedinin (% 13.3) Türkiye limitini aştığı bildirilmiştir (Özkaya, 2002).

Çelik ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada 85 adet pastörize süt örneği AFM₁ kontaminasyonu yönünden incelenmiş, 75 (% 88.23) adet örneğin değişik oranlarda AFM₁ ile kontamine olduğu, 48 (% 56.47) adet örnekte ise AFM₁ konsantrasyonunun yasal sınırın üzerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Akdemir ve Altıntaş (2003) HPLC yöntemini kullanarak Ankara’da yaptıkları bir çalışmada alınan 48 adet çiğ süt örneğinin % 72.9’unda 0.01 ppb’den yüksek düzeyde ve % 33.3’ünde yasal limit olan 0.05 ppb’nin üzerinde AFM₁ belirlemişlerdir.

Çoksöyler ve ark. (2005) tarafından Van yöresinde yapılan bir çalışmada, IAK ile temizleme, RP (ters faz) kromatografi ve floresans dedektörle tayinin kullanıldığı bir çalışmada 2 yıl yaz (hayvanlar merada) ve kış (hayvanlar ahırda) olmak üzere 4 dönemde alınan toplam 203 çiğ süt örneğinin sadece 8 adedinde 0.010-0.023 µg/l arasında AFM₁ belirlemişlerdir. Dolayısıyla 203 örneğin hiç birisinde 0.05 µg/l’yi aşan düzeyde AFM₁’e rastlanmamıştır.

Gürbay ve ark. (2006) tarafından Ankara’dan temin edilen 19 UHT tam yağlı süt, 5 UHT yağsız süt ve 3 günlük pastörize süt olmak üzere toplam 27 süt numunesinde HPLC yöntemi ile AFM₁ tayin etmişler ve örneklerin % 59.3’ünde AFM₁ belirlemişlerdir. Ancak sadece 1 örnekteki (% 3.7) miktar 0.05 ppb olan yasal limitlerin üzerinde bulunmuştur. Güvenilir, başka bir deyişle doğruluk, tekrarlanabilirlik ve teşhis limiti yeterli olan bu yöntemle yapılan çalışmalarda Türkiye sütlerinde AFM₁’in önemli bir problem olduğu görülmektedir. Özellikle işletmeye giren çiğ süt denetim altında tutulmalı ve yasal limitin üzerinde AFM₁ içeren hiçbir ürün işletmeye alınmamalıdır.

AFM₁ sadece çiğ ve işlenmiş sütlerde bulunmamaktadır. Aynı zamanda sütün işlenmesi sonucu elde edilen ürünlerde de AFM₁’e rastlanmaktadır. Günşen ve Büyükyörük (2002) Bursa’da yaptıkları bir çalışmada marketlerden rastgele toplanan 130 adet peynir örneğinin (35 tam yağlı beyaz peynir, 35 taze kaşar, 35 eski kaşar, 20 gravyer peyniri ve 15 krem peyniri) AFM₁ seviyelerini belirlemişlerdir. Yapılan incelemeler sonucu ortalama AFM₁ düzeyleri tam yağlı beyaz peynirde 178.4 ng/kg, taze kaşarda 184.4 ng/kg, eski kaşarda 91.2 ng/kg, gravyer peynirde 169.4 ng/kg ve krem peynirde 207.5 ng/kg olarak bildirilmiştir. AFM₁ tespit edilen örneklerden % 15.45’i TGK (Anonim, 2008)’nin üst sınırı olan 250 ng/kg’ın üzerinde olduğu bildirilmiştir.

Özmenteşe (2002) 1999 ve 2000 yılları arasında İstanbul’da değişik kaynaklardan elde ettiği süt, peynir, yoğurt ve süt tozu örneklerinde yaptığı çalışmada, 87 süt örneğinin 69’unda (% 79.3’ünde), 7 ile 567 ng/l arasında değişen seviyelerde, 15 adet peynirin tamamında (% 100’ünde), 16 ile 713 ng/kg arasında değişen seviyelerde, 15 adet yoğurt örneğinin tamamında (% 100’ünde), 14 ile 1041 ng/kg arasında değişen

seviyelerde ve bulabildiği 1 süt tozu örneğinde 21 ng/kg seviyesinde olmak üzere aflatoksin M₁ tespit etmiştir.

Ayçiçek ve ark. (2002) 2001 yılında İstanbul bölgesinde beyaz peynir ve tereyağında yaptıkları çalışmada, 183 beyaz peynir örneğinin 121'inde (% 65'inde), 40 ile 4890 ng/kg arasında değişen seviyelerde, 64 tereyağı örneğinin 52'sinde (% 81'inde), 10 ile 2200 ng/kg arasında değişen seviyelerde aflatoksin M₁'e rastlamışlardır.

Yaroğlu ve ark. (2005) 2001 yılı Ocak ayı ile 2002 yılı Şubat ayı arasında, ülkemizin değişik bölgelerinden elde ettikleri beyaz peynir, kaşar peyniri ve eritme peynirinin her birisinden 200'er adet olmak üzere yaptıkları toplam 600 örnekli çalışmada; 200 adet beyaz peynirin 10'unda (% 5'inde), 100 ile 600 ng/kg arasında değişen seviyelerde, 200 adet kaşar peynirin 12'sinde (% 6'sında), 120 ile 800 ng/kg arasında değişen seviyelerde, 200 adet eritme peynirinin 8'inde (% 4'ünde) , 100 ile 700 ng/kg arasında değişen seviyelerde aflatoksin M₁ tespit etmişlerdir. Toplamda ise 600 adet peynir örneğinin 30'unda (% 5'inde), 100 ile 800 ng/kg arasında değişen seviyelerde aflatoksin M₁ bulmuşlardır.

Sarımehmetoğlu ve ark. (2004) 2001 Eylül ayı ile 2002 yılı Temmuz ayları arasında, Ankara'da çeşitli marketlerden elde ettikleri beyaz peynir, tulum peyniri, kaşar peyniri ve eritme peynirlerinin her birinden 100'er adet olmak üzere toplam 400 adet peynir örneğinde yaptıkları çalışmada; beyaz peynirlerin % 82'sinde, tulum peynirlerin % 81'inde, kaşar peynirlerin % 85'inde, eritme peynirlerin % 79'unda, toplamda ise 400 adet peynirin 327'sinde (% 81.75'inde) değişik seviyelerde aflatoksin M₁ tespit etmişlerdir. Peynir örneklerinde bulunan aflatoksin M₁ seviyeleri 50 ile 800 ng/kg arasında değişmekle birlikte, sadece 1 tulum peyniri ve 4 kaşar peynirinde seviyenin 800 ng/kg'ı geçtiği görülmüştür.

Gürses ve ark. (2004) Erzurum ilinde tüketime sunulan 23 adedi beyaz peynir, 14 adedi kaşar peyniri, 11 adedi tulum peyniri, 9 adedi civil peynir ve 6 adedi lor peyniri olmak üzere toplam 63 adet örneği incelemişler, beyaz peynir örneklerinin % 28.08'inde ve toplam örneklerin % 44.44'ünde AFM₁ tespit ettiklerini bildirmişler, Türk Gıda Kodeksi yasal limitinin üzerinde AFM₁ içeren numune bulunmadığını belirtmişlerdir.

Tekinşen ve Tekinşen (2005), 2002 yılının Eylül ayı ile 2003 yılının Mayıs ayı arasında ülkemizin Van ve Hakkari illerinde Van otlu peyniri ve beyaz peynirlerde yaptıkları çalışmada, 60 adet otlu peynir örneğinin 52'sinde (% 86.7'sinde), 160 ile 7260 ng/kg arasında değişen seviyelerde, 50 adet beyaz peynir örneğinin 31'inde (% 62'sinde), 100 ile 5200 ng/kg arasında değişen seviyelerde aflatoksin M₁ tespit etmişlerdir.

Sarımehmetoğlu ve ark. (2003) 2002 yılının Şubat ayından Temmuz ayına kadar, Ankara'dan farklı marketlerden rastgele topladıkları yoğurtlarda yaptıkları çalışmada, 132 yoğurt örneğinin 49'unda (% 32.12'sinde), 50 ile 800 ng/kg arasında değişen oranlarda afatoksin M₁ tespit etmişlerdir.

Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında süt ve süt ürünlerinde AFM₁ düzeyinin izlenmesi ve denetlenmesinin gerekli olduğu ve sütlerimizde AFM₁ düzeyinin en azından yasal limitlerin altına indirilmesi için çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu görülmektedir. Yapılması gereken en sağlıklı çözüm, süt hayvanlarının aflatoksinden arı yemle beslenmesidir. Alternatif olarak yemdeki AFB₁'in hayvanın bağırsağından bünyeye geçişinin engellenmesidir. Bu alanda çok sayıda mikotoksin bağlayıcı kullanılmaktadır. Bunlar ticari preparatlar haline de getirilmişlerdir. Çeşitli killer hayvan (ev hayvanı) yemlerinde kekleşmeyi önleyici etken olarak % 2'ye varan miktarlarda yeme katılabilmekte ve bu düzeyde kullanımları FDA tarafından "GRAS" (Generally Recognized as Safe) güvenli olarak kabul edilmektedir (Diaz ve ark., 2003).

Jaynes ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada; diğer kaynaklara dayanarak bentonitin sulu çözeltide AFB₁'in % 94-100'ünü adsorbe ettiği, sodyum-kalsiyum bentonitin (hidrate sodyum kalsiyum alüminyum silikat, HSCAS) 7.5 mg/kg düzeyinde AFB₁ içeren yemin olumsuz etkilerini ortadan kaldırdığını, bentonitin aflatoksinlerin süte taşınmasını önemli ölçüde engellediği, %1 oranında bentonit ve aktif karbonun 100 µg/kg düzeyinde AFB₁ içeren yeme katıldıklarında keçi sütünde AFM₁ salımını sırasıyla % 65 ve % 75 oranında azalttığı, % 0.5-2 oranında yeme katılan çeşitli killerin (Ca²⁺-bentonit, HSCAS ve zeolit) domuzlarda aflatoksikosisi azalttığı ama bazılarının daha etkili olduğu, % 0.5 Ca²⁺-bentonit katılmasının 200 µg/kg düzeyinde AFB₁ içeren yemle beslenen piliçlerde aflatoksikozisi önemli ölçüde azalttığı belirtilmiş ve araştırmacıların yaptıkları çalışmada sulu ortamdan denedikleri birçok kilin ortalama olarak 200 mg AFM₁/1 kg kil oranında tutulduğunu göstermişlerdir.

Aflatoksinlerle bulaşık yemlerle beslenen yumurtacı tavukların yumurtalarındaki aflatoksin kalıntılarının incelendiği bir çalışmada kontrol grubu, AFB₁ ve AFB₁+toksin bağlayıcı olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Bu yemlerle 17 hafta süreyle beslenen tavuklardan 36. haftadan sonra alınan yumurtalardaki aflatoksin kalıntıları kontrol grubunda muamele grubuna oranla daha düşük bulunmuştur. Toksin bağlayıcının kullanıldığı muamele grubundaki yumurtalarda 0.016 ppb AFB₁ ölçülürken, kontrol grubunda 0.030 ppb AFB₁ ölçülmüştür (Begino,2003).

Keçeci ve ark. (1998) broilerlerde 3 hafta süren bir çalışmada 2.5 mg/kg aflatoksin ilave edilen rasyonlara 5 g/kg zeolit ve 5 g/kg bentonit eklenerek farklı gruplar oluşturmuşlardır. Aflatoksikozis ile mücadele etkinliklerini araştırdıkları bu çalışmada aflatoksin ilavesi ile ortaya çıkan olumsuzlukların killer tarafından giderildiğini göstermişlerdir.

100 ppb AFB₁ içeren yeme klinoptilolit ilavesinin civcivlerde aflatoksinin zararlı etkisini azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte civcivlerde aflatoksin bulaşmamış yemlere klinoptilolit katılmasında herhangi bir zararlı etkinin olmadığı görülmüştür (Oğuz ve ark., 2002).

Aflatoksikozis süresince klinoptilolitlerin broiler civcivlerinde biyokimyasal ve hematolojik karakterler üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada 1-21 günlük yaştaki broiler civcivlerde, kontrol, Aflatoksin, Klinoptilolit (%1.5), Aflatoksin+Klinoptilolit (% 1.5), Klinoptilolit (% 2.5) ve Aflatoksin (% 2.5 mg) + Klinoptilolit (% 2.5) olmak üzere toplam 6 deneme grubu oluşturulmuştur. Deneme sonunda kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında aflatoksin muamelesinin albumin, inorganik fosfor, ürik asit, T. kolesterol ve hemotokrit değerlerinde artışa neden olduğu görülmüştür. % 1.5 ve % 2.5 klinoptilolit ilave edilen diğer gruplarda aflatoksinin etkisinin azaldığı ve kanatlılarda aflatoksine karşı koruyucu olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir (Oğuz ve ark., 2000a).

Kanserojenik küf toksini AFB₁'i bağlayan farklı tiplerdeki toksin bağlayıcıların etkilerini saptamak amacıyla yapılan çalışmada; % 2 oranında bentonit, aktif kömür ve diatomit adsorbanları 250 mg/g AFB₁ içeren yemlerle karıştırılarak 36 gün süresince 125 Japon bıldırcınına yedirilmiştir. Deneme sonunda muamele gruplarında ortalama canlı ağırlıklar sırasıyla; 191.1, 182.8 ve 185.5 g olarak bulunmuştur. Aflatoksin

düzeyleri ve yem tüketimi bakımından muamele gruplarının kontrol grubuna oranla daha düşük ve önemli olduğu görülmüştür (Çelik ve ark., 1998).

Aflatoksin ve diğer mikotoksinlerin kil tarafından adsorbsiyonunu değerlendiren Phillips (1999) aflatoksinlerin kil partikülünün kenarında, bazal yüzeylerde ama en çok tabakalar arasında tutulduğunu göstermiştir. Yine Phillips (1999) 100 mg HSCAS yapısındaki killeri kum ile karıştırılarak immobilize edilip cam kolonlara doldurulmuş ve bunlardan AFB₁ içeren solüsyonlar geçirilerek solüsyondan AFB₁'i ayırma kapasitesi incelenmiş ve IAK (immüno-affinite kolon) ile karşılaştırılmış ve kil kolonla IAK'ya eşdeğer bir temizleme elde edildiğini göstermiştir.

Killer hayvan yemlerine katılarak aflatoksini tutmakta ve gözenekli yapıları sonucunda sindirimi kolaylaştırmaktadır. Bu sayede hayvanların canlı ağırlıklarında artış görülmektedir.

İncelenen kaynaklar arasında kilin aflatoksini adsorbe etme özelliğinin, sütte bulunan AFM₁'in temizlenmesinde kullanılmasına yönelik hiçbir kaynağa veya çalışmaya rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak süt, kil ve saf aflatoksin M₁ solüsyonu kullanılmıştır. Denemelerde kullanılacak olan süt örnekleri Van ve Şanlıurfa illerinden temin edilmiştir. Van'dan esas olarak merada beslenen, sütünde aflatoksin beklemediğimiz hayvanlardan süt temin edilmiştir. Bu çiğ süt örnekleri aynı gün analiz edilmişler ve kullanılana kadar buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmişlerdir. Şanlıurfa'da ahırda beslendiği bilinen ve beslenme koşullarına göre sütlerinde AFM₁ bulunduğunu düşündüğümüz hayvanlardan alınan süt örnekleri ise dondurulmuş vaziyette Van'a getirilmiş ve analiz anına kadar bu şekilde muhafaza edilmiştir. Dondurulmuş sütler çözündürülerek analiz edilmiş ve aynı gün çalışmada kullanılmıştır.

Çalışmada materyal olarak kullanılacak olan saf AFM₁ standart solüsyonu Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiş ve prospektüsünde belirtildiği şekilde muhafaza edilip, kullanım oranlarına metanol ile seyreltilmiştir.

Bu çalışmada aflatoksinleri adsorbe ettiği literatürde verilen, Türkiye'de doğal olarak bulunan killer (bentonit, zeolit, klinoptilolit) kullanılmıştır.

Bentonit Karakaya Bentonit Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den (Ankara) temin edilmiştir. Klinoptilolit Enli Madencilik Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den (İzmir) temin edilmiştir. Zeolit ise Sivas-Yavru bölgesinden elde edilmiş ve Prof. Dr. Hüseyin YALÇIN tarafından temin edilmiştir.

Killerin ilk ikisi toz halinde (bentonit ve klinoptilolit), sonuncusu ise (zeolit) granül halindedir ve granül olan bu form belli elek boyunda (1-2 mm) fraksiyonu elde edilerek sadece kolonda desteksiz kolon dolgusu hazırlanmasında kullanılmıştır. Bentonit ve klinoptilolit tampon çözelti ve süt ortamında aflatoksin tutma kapasiteleri ön denemelerde farksız bulunmuştur. Bu nedenle denemelerde (destek materyalsiz kolon denemesi hariç) sadece klinoptilolit kullanılmıştır.

Kolon hazırlama çalışmalarında killer dışında agar-agar, 5 mm çapında cam borucuklar, çeşitli şekillerde (spiral, ipliksi, küçük kıymık halinde) odun yongaları, 30*800'lük cam kolon ve şırıngalardan tasarlanan kolonlar kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Analiz örneklerinin hazırlık aşamasında, aynı anda birden fazla tüpü karıştırabilme özelliğe sahip olan tüp karıştırıcı ve 4000 dev/dk sağlayarak 100 ml hacmi santrifüj edebilme özelliğine sahip santrifüj cihazı kullanılmıştır. Numunelerin immuno affinite kolondan geçirilmesi için 10-50 ml hacminde plastik şırıngalar ve kolondan geçen numunenin doldurulması için 2-10 ml hacminde vialler kullanılmıştır. Enjektör, pompa, floresan dedektörü bulunan ve özel yazılımlı bir bilgisayara sahip olan Agilent 1100 serisi HPLC cihazı ile AFM₁ teşhis ve miktar tayini yapılmıştır. Agar-kil karışımlarının kurutulup kolon dolgu materyali hazırlanmasında ise Nüve FN500 serisi etüvden faydalanılmıştır. Çalışmada bunların dışında cam mezür, erlen, huni vb. laboratuvar cam malzemesi ile hassas terazi, filtre kağıtları, otomatik pipet ve mikro şırıngalar kullanılmıştır.

3.2.2. Reaktifler

Katı desteğe tutturulmuş monoklonal anti-aflatoksin M₁ antikorları içeren immuno-affinite kolonlar (İAK) ile çalışılmıştır. Çözücü olarak kromatografik saflıkta asetonitril ve metanol kullanılırken, mobil faz olarak metanol-asetonitril-su (20:30:50) kullanılmıştır. Tampon çözelti olarak ise 0.1 M fosfat buffer (pH 7) ile çalışılmıştır.

3.2.3. Standart kurvenin hazırlanması

Aflatoksin M₁ Standart Çözeltisi: Aflatoksin M₁ konsantrasyonu 1000 ng/ml olan standart çözelti mobil faz (metanol-asetonitril-su: 20:30:50) ile 1/40 oranında seyreltilerek 25 ng/ml konsantrasyonda aflatoksin M₁ stok çözeltisi hazırlanmış ve bundan da farklı konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlanarak HPLC'ye enjekte edilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon kurvesi standart çözeltilerinin son AFM₁ konsantrasyonları ve enjekte edilen aflatoksin miktarları Çizelge 3.1'de görülmektedir.

Standart Kurvenin Hazırlanması: Bu çözeltilerin örneklerde beklenen AFM₁ konsantrasyon aralığı dikkate alınarak 5-7 adetinden bir konsantrasyon serisi hazırlanmış ve serideki çözeltilerden 100'er µl olacak şekilde sırayla HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Çıkan kromotogramdan AFM₁ piklerinin alanları hesaplanmış ve konsantrasyona karşı pik alanının doğrusal regresyonu elde edilerek bu doğru veya denkliği kalibrasyon grafiği olarak kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği çalışmanın her günü tekrarlanmış olup bunlardan bir tanesi Şekil 4.1'de verilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında tamamen cihazın kendi programından yararlanılmıştır. Böylece konsantrasyonların da otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanması sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. Kalibrasyon kurvesinin hazırlanmasında kullanılan aflatoksin standart çözeltilerinin AFM₁ konsantrasyonları ve enjekte edilecek hacim içindeki AFM₁ miktarları

Vial no	Stok standart çözeltiden alınan miktarı (µl)	Mobil fazdan alınan miktarı (µl)	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml)	Enjekte edilen AFM ₁ miktarı (ng)
1	2	998	0.05	0.005
2	4	996	0.1	0.01
3	6	994	0.15	0.015
4	8	992	0.2	0.02
5	10	990	0.25	0.025
6	20	980	0.5	0.05
7	30	970	0.75	0.075
8	40	960	1	0.1
9	50	950	1.25	0.125
10	60	940	1.5	0.15
11	80	920	2	0.2
12	100	900	2.5	0.25
13	300	700	7.5	0.75
14	500	500	12.5	1.25

3.2.4. Analiz örneklerinin hazırlanması

Dondurulmamış çiğ süt örnekleri içerdiği AFM₁ miktarları belirlenirken, sütler su banyosunda 35-37 °C'ye kadar ısıtılmış, 2000 dev/dk'da 5 dk. santrifüj edilerek yağlarından arındırılmış ve filtre edilerek analize alınmıştır.

Dondurulmuş sütler ise bir gece önceden buzdolabında 4 °C'de bekletilerek pıhtılaşmadan çözülmeleri sağlanmıştır. 35-37 °C'ye kadar ısıtılmış, santrifüjle yağları uzaklaştırılmış ve filtre edilerek analize alınmıştır.

Aynı şekilde sütte bulunan AFM₁'i tutmak amacıyla kil ile muamele edilmiş olan süt örnekleri de 35-37 °C'ye kadar ısıtılmıştır ve muamele amacıyla çalkalandıktan sonra santrifüj ile killerinden arındırılmıştır. Kalan killer filtre kağıdından süzülerek uzaklaştırılmış ve süt örnekleri analize alınmıştır.

3.2.5. Sütlerde aflatoksin analizi

Aflatoksin M₁ analizleri, immuno-affinite kolon (IAK) ile temizleme ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (HPLC) ile kromatografik ayırım ve tayin şeklinde yapılmıştır (Dragacci ve ark., 1995).

3.2.5.1. Yöntemin prensibi

Sütte AFM₁ tayininde kullanılan yöntemde prensip olarak; AFM₁'e özgün monoklonal antikorların bağlanmış olduğu bir destek katıyla doldurulmuş olan "immuno-affinite" kolonla, numuneden toksin ekstrakte edilmiştir. Numune, bu kolondan geçirildiğinde, AFM₁ antikorlar tarafından tamamen tutulmuş ve bir antijen-antikor kompleksi oluşmuştur. Numuneye ait diğer bileşenler yıkamayla uzaklaştırıldıktan sonra, kolondan asetonitril veya metanol geçirilerek aflatoksin M₁ elue edilmiştir. Teşhis ve miktar tayini ise, floresan dedektörlü HPLC ile yapılmıştır.

3.2.5.2. Numunenin hazırlanması ve ekstraksiyon

Süt numunesi 35-37 °C'ye ısıtıldıktan sonra, filtre kağıdından geçirilerek süzme işlemi yapılmıştır. Ardından süt örneklerinden 50 ml analiz numunesi alınarak, immuno-affinite kolondan 2-3 ml/dk hızla geçirilmiştir. İmmuno-affinite kolonun üzerine yeni bir şırınga takılarak kolon, 10 ml saf su ile aynı hızda yıkanmıştır. Kolondan su tamamen geçirildikten sonra hava geçirilerek kolon iyice kurutulmuştur. Daha sonra aflatoksin M₁; 1.25 ml asetonitril: metanol (3:2) ve takiben 1.25 ml saf su geçirilerek elue edilmiştir. Eluat HPLC'ye enjekte edilmek üzere bir vialle toplanmıştır.

3.2.5.3. HPLC (Sıvı kromatografisi)

Vialde bulunan AFM₁ içeren karışım test tüp karıştırıcısında karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra mikro şırıngayla 100 µl alınarak HPLC'ye enjekte edilmiş, kromatografik ayrımı yapılmış ve kromatogram üzerinden miktar tayini yapılmıştır.

Standartların enjeksiyonundan önce HPLC'de AFM₁ analizi için uygun koşullar hazırlanarak (Çizelge 3.2), çalışma metodu oluşturulmuştur.

Çizelge 3.2. HPLC çalışma şartları

Kolon materyali	Spherisob ODS- 2, 250 x 4.6 mm, 5 µm
Kolon sıcaklığı	20 °C
Mobil faz	Metanol - Asetonitril - Su (20:30:50)
Akış hızı	1 ml/dk
Dedektör	FLD (exc:360 nm, emis: 430 nm)
Enjeksiyon hacmi	100 µl
Basınç	118 ± 2 bar

Hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki standartlar HPLC'ye enjekte edilerek Aflatoksin M₁ miktarına karşılık elde edilen pik yüksekliklerine (veya alanlarına) göre kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

3.2.5.4. Kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.1'e göre hazırlanan aflatoksin standart solüsyonları, HPLC'ye enjekte edilmiş ve kalibrasyon grafiği çizilerek doğrusalılık kontrol edilmiştir. Numunelerin kalibrasyon sınırları dışında kalmasını önlemek için alternatif kalibrasyon grafikleri çizilebilir.

3.2.5.5. Aflatoksin M₁ miktarının hesaplanması

Numune ekstraktından bir miktar enjeksiyon yapılmış ve numune kromatogramındaki piklerle standart piklerinin alıkonma zamanı karşılaştırılmıştır. Numunede toksin olduğuna karar verilmesi durumunda, standart grafikten enjekte edilen numunedeki aflatoksin M₁ miktarı bulunmuştur. Numune ekstraktına ait pik, en yüksek standarda ait pikten yüksekse, numune asetonitrille seyreltilip enjeksiyon tekrarlanır (Anonim, 1997).

Numunedeki aflatoksin M₁ miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (ISO 1998).

$$\text{Aflatoksin (ppb)} = (A/V) \times (V'/m) \quad (3.1)$$

Formülde yer alan;

A = Numune ekstraktına ait pikin kalibrasyon grafiğinden hesaplanan miktarı (ng)

V = Enjekte edilen numune ekstraktının hacmi (μl)

V' = Elde edilen eluatın çözöldüğü son hacim (μl)

m = Analiz numunesinin hacmi (ml) veya kütlesi (g) dir.

3.2.5.6. Süt örnekleri için geri kazanım oranlarının hesaplanması

Geri kazanım oranının belirlenmesi için, merada beslenen ve süt analizinde aflatoksin M₁'in çıkış zamanında hiç bir pik vermeyen 1 adet süt örneği kullanılmıştır. Süte belli miktarda AFM₁ eklenip HPLC'de standart kalibrasyon kurvesi kullanılarak AFM₁ miktarı hesaplanmıştır. Bulunan AFM₁ miktarının, başlangıçta süte eklediğimiz AFM₁ miktarına oranı geri kazanım oranını vermektedir.

Geri kazanım oranının olabildiğince yüksek olması istenir ve aşağıdaki formül kullanılarak bu oran hesaplanır.

$$\text{Geri kazanım oranı (\%)} = 100 \times \frac{\text{Bulunan}}{\text{Eklenen}} \quad (3.2)$$

3.2.6. Süt ve tampon çözelti örneklerine aflatoksin M₁ ekleme

AFM₁ içermeyen (tespit edilebilir düzeyde içermeyen) sütlere AFM₁ standart çözeltisi eklenerek farklı düzeylerde AFM₁ içeren süt örnekleri hazırlanmıştır. Bu düzeyler izin verilen maksimum limit ve onun 2 ve 4 katı olan düzeyler (0.05, 0.10 ve 0.20 µg AFM₁/L) şeklindedir. Aynı işlem tampon çözelti ortamında da yapılmıştır. Yukarıda belirtilen düzeylerde AFM₁'li süt veya tampon çözelti elde etmede;

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ ilişkisinden yararlanılarak eklemede kullanılacak olan standart miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$V_1 = (V_2 \times C_2) / C_1 \quad (3.3)$$

Formülde yer alan;

V_1 = Kullanılan standardın hacmi (ml)

C_1 = Kullanılan standardın konsantrasyonu (µg/ml)

V_2 = Aflatoksin eklenen süt miktarı (ml)

C_2 = İstenilen aflatoksin konsantrasyonu (µg/ml)'dur.

3.2.7. Tampon çözeltide AFM₁ analizi

Tampon çözeltisinde herhangi bir kirlilik maddesi bulunmadığından, bunlarda IAK ile temizleme yapılmamıştır. Ekstraktın HPLC'ye enjeksiyonu sonucu AFM₁ konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.2.8. Killerin AFM₁ alıkoyma kapasitelerinin belirlenmesi

3.2.8.1. Tampon çözeltide killerin AFM₁ alıkoyma kapasitelerinin belirlenmesi

Killerin AFM₁ adsorbsiyonu çeşitli konsantrasyonlarda AFM₁ içeren sulu çözeltilerin belli miktarda kille karıştırılıp çalkalamasını (30 dk.) takiben sulu fazda AFM₁ konsantrasyonunun azalmasından ve çözeltideki AFM₁ konsantrasyonuna karşı

adsorbe edilen miktarlar hesaplanmak suretiyle killerin AFM₁ adsorbsiyonu belirlenmiştir. Kilin tuttuğu AFM₁ miktarı aşağıdaki eşitlikle hesaplanabilir.

$$\text{Kilin tuttuğu AFM}_1 \text{ miktarı (ng)} = \text{Tampon çözeltiye eklenen toplam AFM}_1 \text{ miktarı (ng)} - \text{Kil ile muameleden sonra çözeltide kalan AFM}_1 \text{ miktarı (ng)} \quad (3.4)$$

Çalışmada kullanılan kil, tampon çözelti ortamında değişik konsantrasyonlarda aflatoxin ile muamele edilmiştir. Kil örneklerimizden 0.1 g tartılmış ve üzerlerine 0.1 M fosfat buffer (pH 7) çözeltisinden 10 ml eklenmiştir. AFM₁ adsorbsiyon kapasitesini belirlemek için sırasıyla 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ng toksin içerecek şekilde AFM₁ standart solüsyonları kullanılmıştır. Çözeltiler çalkalama işlemine tabi tutulmuş ve 30. dakikalarda numuneler alınmıştır. Hazırlanan bu farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler, kil örneği ile muamele edildikten sonra mikrofiltreden (0.20 µm) süzülmüştür. Ardından filtreden metanol-asetonitril geçirilmek suretiyle toksin elue edilmiştir. Elde edilen eluatlar viallere alınarak HPLC cihazında AFM₁ varlığı ve düzeyleri bakımından analiz edilmiştir.

Çizelge 3.3. Tampon çözeltide bulunan killerin, AFM₁ adsorbsiyonlarının belirlenmesi denemelerinde kullanılan AFM₁ konsantrasyonları, çözelti miktarları ve kil miktarları

Tampon çözeltideki AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml)	Tampon çözelti miktarı (ml)	Tampon çözeltisine eklenen AFM ₁ miktarı (ng)	Kullanılan kil miktarı (g)
0.5	10	5	0.1
1	10	10	0.1
2	10	20	0.1
3	10	30	0.1
4	10	40	0.1
5	10	50	0.1
6	10	60	0.1
7	10	70	0.1
8	10	80	0.1
9	10	90	0.1
10	10	100	0.1

3.2.8.2. Süt ortamında killerin AFM₁ alıkoyma kapasitelerinin belirlenmesi

Bu çalışmada 2 farklı konsantrasyonda AFM₁ içeren süt kullanılmıştır. Sütler farklı miktarlarda kil (klinoptilolit) ile muamele edilmiştir. Çalkalama ve santrifüj işleminden sonra, AFM₁ konsantrasyonunun azalmasından killerin kapasiteleri hesaplanmıştır.

Birinci denemede süt örneğinden 100'er ml alınarak sırasıyla 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 g şeklinde artan oranlarda kil ilave etmek suretiyle 30 dk. boyunca çalkalanmış ve aflatoksin M₁ analizi yapılmıştır.

İkinci denemede ise aflatoksinli süte eklediğimiz killerin oranları, düşük kil miktarlarında AFM₁ adsorbsiyonunun nasıl değiştiğini incelemek üzere 0.1 g ile 1 g arasında ayarlanmıştır. AFM₁ li süt miktarı yine 100'er ml alınarak sırasıyla 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 g kil ilave edilerek aynı şekilde 30 dk. boyunca çalkalanmış ve bu örneklerin de aflatoksin M₁ analizi yapılmıştır.

Kili tuttuğu AFM₁ miktarı aşağıdaki eşitlikle hesaplanabilir.

$$\text{Kilin tuttuğu AFM}_1 \text{ Miktarı (ng)} = \text{İşlem görmemiş sütün AFM}_1 \text{ miktarı (ng)} - \text{Kil ile muamele edilmiş sütte kalan AFM}_1 \text{ miktarı (ng)} \quad (3.5)$$

3.2.9. Kil dolgulu kolonların hazırlanması ve analizi

Kolonu dolduracağımız kil dolgu materyalini, kolonda tutabilmek için farklı denemeler yapılmıştır.

Killerin destek materyaline tutturulmasında polar bir polimer olan agar-agar kullanılmıştır. Agar-agar kaynar suda çözündürüldükten sonra kil süspansiyonuyla karıştırılmış ve kaplamada kullanılmıştır. Agarın katılaşmasıyla killer hidrofil olan bir yapı içinde hapsedilmişlerdir. Killeri en etkin biçimde tutucak agar/kil oranlarını belirlemek için 0/10 - 5/10 arasında denemeler yapılmıştır.

Destek materyali olmayan kil kolonu hazırlanmasında yine yukarıda belirtilen oranlarda agar ve kil içeren çözeltiler hazırlanmış, bunlar cam yüzeyler üzerine dökülerek orada film halinde kuruması sağlanmıştır. Etüvde tamamen kurutulduktan

sonra filmler camdan sökölerek veya kazınarak alınmış ve bunların özel bir dolgu olmaksızın kolon materyali olarak kullanılması denenmiştir. Şırıngadan yapılmış kolonların içine kil-agar karışımı (10 cm kolon dolgu boyu) doldurulmuştur (Bkz. Şekil 4.11).

İkinci bir destek materyali olmayan kil kolonu ise granöl halde bulunan zeolitler kullanılarak yapılmıştır. Yine küçük bir kolon prototipi olarak 1-2 mm çapındaki zeolitten 2 g tartılmış ve dolgu maddesi çıkarılarak filtre takılmış olan IAK'ya (6 cm kolon dolgu boyu) Şekil 4.15'te görüldüğü gibi doldurulmuştur. AFM₁ miktarı belirlenen süt örneği bu şekilde hazırlanan kil kolondan geçirilmiş ve kolondan geçen süt numunesinin tekrar aflatoksin M₁ analizi yapılmıştır.

Destek materyalli kil kolonların hazırlanmasında ise cam borucuklar ve hızar kaba yongaları kullanılmıştır.

İlk önce cam borucuklar üzerinde kili yapıştırarak tutturma denemeleri yapılarak kolon dolgu maddesi oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 5 mm çapındaki cam borucuklar üzerine kil çözelti halinde yapıştırılmaya çalışılmıştır (Bkz. Şekil 4.10).

Yine killer çeşitli şekillerde lifli materyal ile karıştırılmış ve sıvı geçirgenliği artırılarak cam kolona doldurulmuştur. Lifli materyal olarak çeşitli şekil ve boyutlarda odun kıymıkları kullanılmıştır. Spiral şekilli, ipliksi ve küçük kıymıklar şeklinde 3 farklı lifli materyal ile yapılan denemelerde kilin hangisinde en iyi tutulduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.12).

Bunun için 5 g agar tartılmış ve üzerine 500 ml su eklenerek belirli bir süre kaynatılmıştır. Daha sonra 10 g kil tartılmış ve üzerine 200 ml su eklenerek çalkalama işlemine tabi tutulmuştur. Kil-su karışımı, agar-su karışımına ilave edilmiştir. Elde ettiğimiz karışım kıymıklarla muamele edilmiş ve etüvde kurutma işlemi yapılarak karışımındaki su uzaklaştırılmıştır. Kurutma işleminden sonra yapılan tartım sonucunda ne kadar kıymığın ne kadar kil-agar tuttuğu belirlenmiştir. En başarılı olan kıymık çeşidi kolon dolgu maddesi olarak kullanılmıştır.

Kolon dolgu maddesi 30*800'lük cam kolonun içine doldurulmuştur. Kolon dolgu maddesinin, yukarıya doğru çıkmasını engellemek için üzerine 10 cm yüksekliğinde cam boncuklar ilave edilmiştir. Kolon cam boncukların 10-15 cm yukarısına kadar saf su ile doldurulmuştur. 5-10 dk. bekledikten sonra kolonun altındaki musluğu açılarak kolondaki su 10-15 ml/dk hızla boşaltılmıştır. Kolondan geçirilen su

bir erlene alınarak belirli bir süre bekletilmiş ve suda herhangi bir çökelme, bulanıklığın olup olmadığı tespit edilmiştir. Kolon tekrar su ile doldurarak 30 dk. daha beklenmiştir.

Sonra kolondaki su tamamen boşaltılarak kurummasına izin verilmeden AFM_1 içeren süt kolona doldurulmuştur. 10-15 dk. kadar aflatoksinli sütü kolonda beklettikten sonra 10-15 ml/dk hızla, belirli aralıklarla 100'er ml örnekler alınmıştır. Kolondan süt geçirildikçe azalan oranı tamamlamak için aflatoksinli sütle kolon sürekli beslenmiştir. Kolondan geçirildikten sonra alınan her 100 ml'lik porsiyon bir örnek kabul edilmiş ve örneklerin aflatoksin M_1 analizi yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.13).

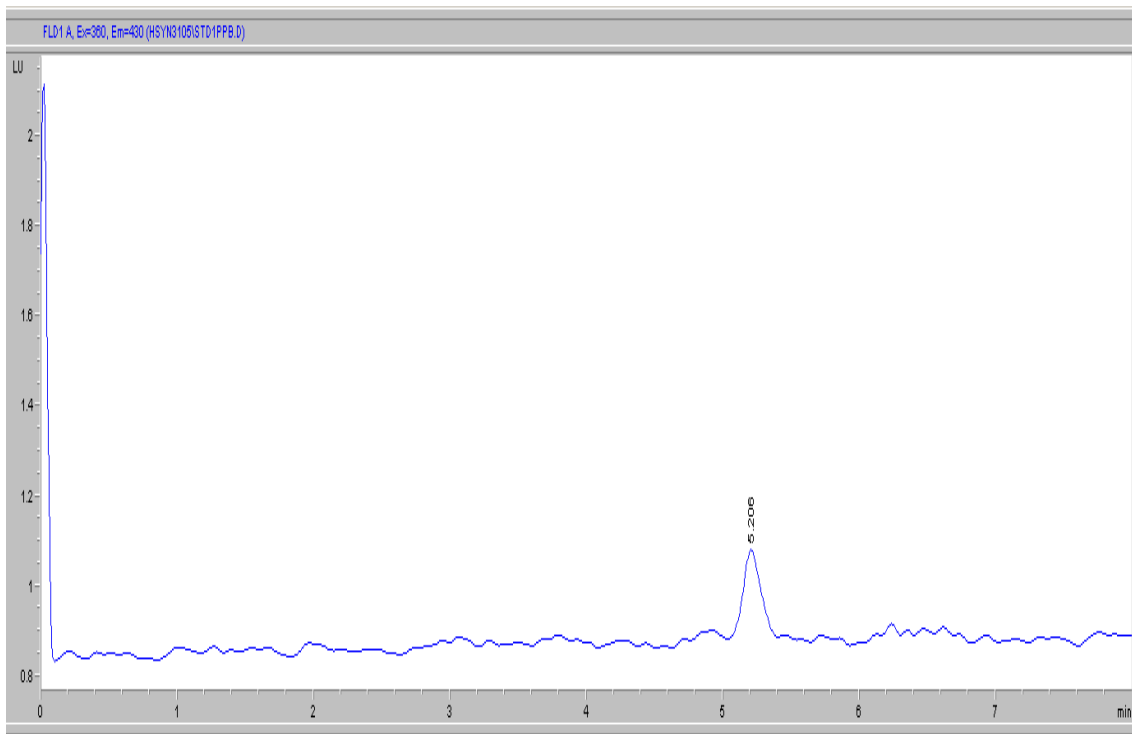
Hazırladığımız kil dolgu maddesine sahip kolonlar ile 50-100 ml gibi küçük örnek hacimlerine uygulanabilir bir düzenek oluşturulmuştur. Kolondan geçirilerek alınan sütlerin AFM_1 analizleri yapılmış ve kil kolonun ne kadar AFM_1 adsorbe ettiği (3.5) nolu formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Tüm kolon denemelerinde başarının ölçütü olarak, kolonun su ile yıkandığı zaman kili kaybetmemesi ve kolondan suyun belli bir hızda geçme kabiliyetinin olması şeklinde ele alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Aflatoksin M₁ Kromatografik Ayrımı

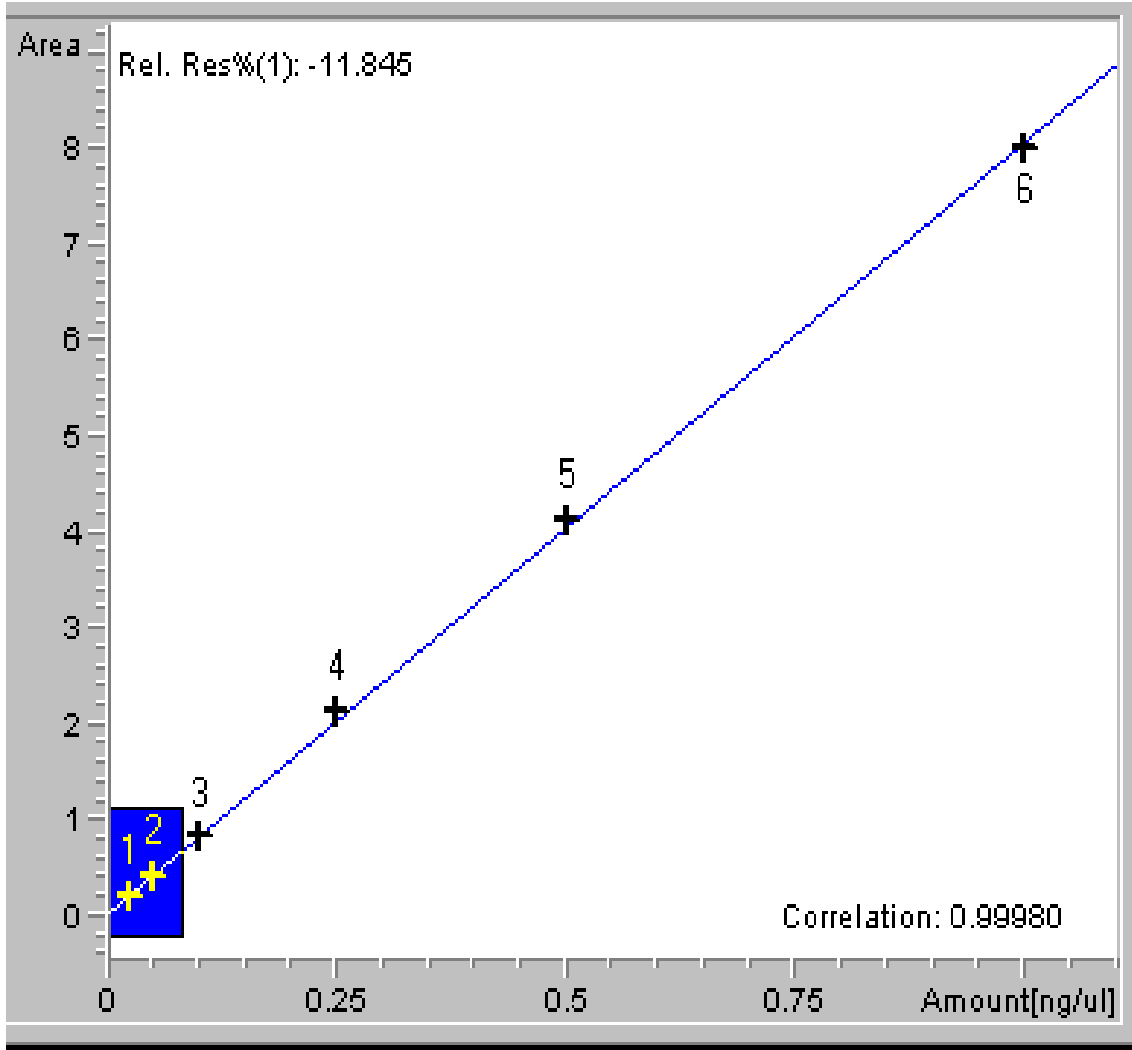
HPLC cihazına birkaç düzeyde AFM₁ standart çözeltisi enjekte edilerek pikler ve çıkış zamanı gözlenmeye çalışılmıştır. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi AFM₁ piki kullanılan şartlarda düzgün ve simetrik olup 5.20 dakikada çıkmıştır.



Şekil 4.1. 0.1 ng AFM₁ standardına ait HPLC kromatogramı.

4.2. Kalibrasyon Grafiği

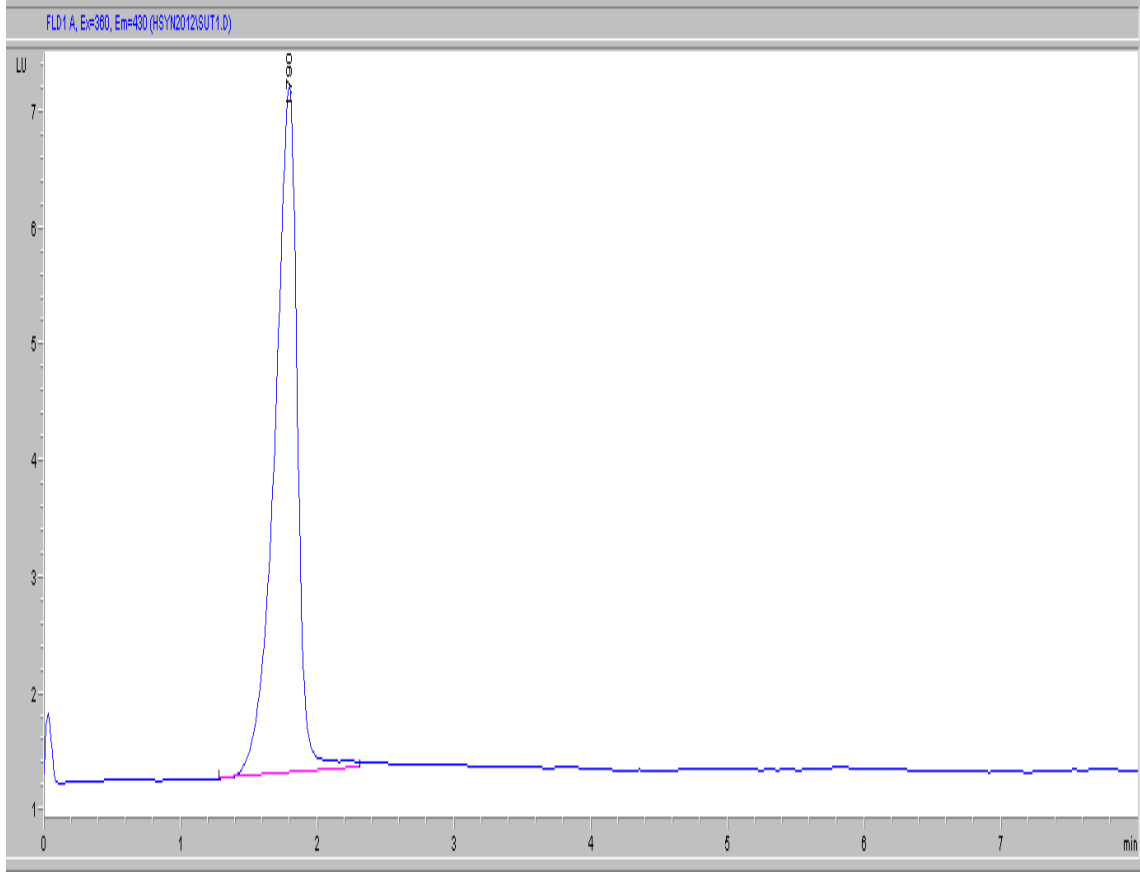
Miktar tayini hesaplamalarında kullanılmak üzere 0.025 – 0.05 – 0.1 – 0.25 - 0.5 ve 1 ppb düzeylerinde AFM₁ standart çözeltileri HPLC’ye enjekte edilerek, Şekil 4.2’de gösterilen 6 noktalı kalibrasyon kurvesi hazırlanmıştır. AFM₁ analizleri için yapılan tüm çalışmalarda bu kalibrasyon kurvesi kullanılmıştır.



Şekil 4.2. 6 farklı noktadan çizilen kalibrasyon grafiği.

4.3. Sütte AFM₁ İçin Geri Kazanım Oranları

Geri kazanım oranlarını belirlemek için süt analizinde aflatoksin M₁'in çıkış zamanında hiçbir pik vermeyen (Şekil 4.3) 1 adet süt örneği kullanılmıştır. Bu süttten alınan 3 adet 50 ml'lik analiz örneğine konsantrasyonu 0.5 ng/ml olacak şekilde aflatoksin M₁ standart çözeltisi eklenmiş ve diğer numunelerde olduğu gibi analize tabi tutulmuştur. Analiz sonuçları ve hesaplanan geri kazanım oranları Çizelge 4.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.3. AFM₁'in çıkış zamanında pik vermeyen süt örneğine ait bir kromatogram.

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi bu örnekte AFM₁'e ait pik bulunmamaktadır. Sütten teşhis edilebilir limitlerin altında bir düzeyde gelebilecek AFM₁ miktarının (< 0.01 ng/ml), süte katılan standart miktarına (0.5 ng/ml) oranla geri kazanıma olan etkisinin çok düşük kalabileceği (< % 2) söylenebilir. Bu nedenle süt analizinde bulunan aflatoksin miktarının tamamen katılan aflatoksinden geldiği kabul edilmiştir.

Yapılan çalışmada elde edilen geri kazanım oranları aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sütte AFM₁ için geri kazanım oranları

Numune no	Eklenen AFM ₁ miktarı (ng/ml)	Tespi edilen AFM ₁ miktarı (ng/ml)	Geri kazanım * oranı (%)
1	0.5	0.495	99.0
2	0.5	0.482	96.4
3	0.5	0.474	94.8
Ortalama ±Standart sapma		0.483 ±0.017	96.73±3.27

* Geri kazanım oranı (ng/ml) = 100 x (Tespit edilen AFM₁ miktarı / Eklenen AFM₁ miktarı)

4.4. Killerin AFM₁ Adsorbsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Madde 3.2.8.1’de belirtildiği üzere kil örneğimizden 0.1 g tartılmış ve farklı oranlarda AFM₁ standart solüsyonları kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

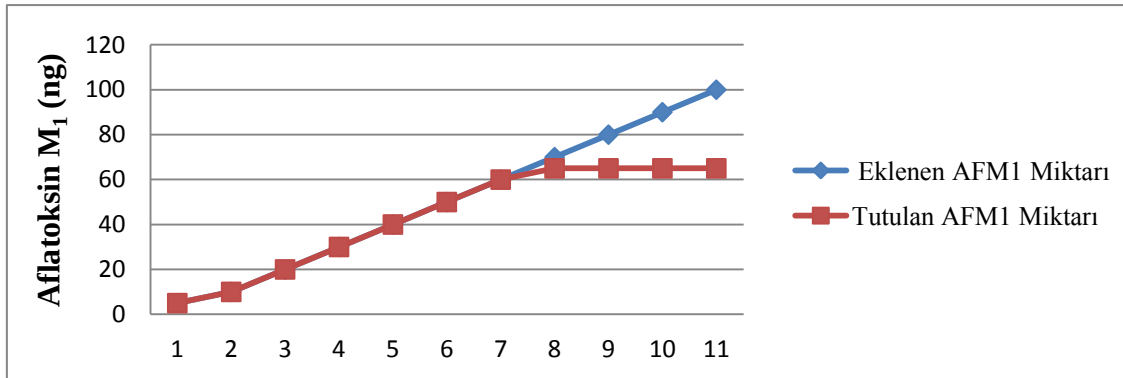
Çizelge 4.2. 0.1 g kil örneklerinin AFM₁ adsorbsiyonu kapasiteleri

Tampon çözeltideki AFM ₁ miktarı (ng)	Kullanılan kil miktarı (g)	Muameleden sonra çözeltide kalan AFM ₁ miktarı ve konsantrasyonu		Muameleden sonra kilde tutulan AFM ₁ miktarı ve konsantrasyonu	
		Miktar (ng)	Konsantrasyon (ng/ml)	Miktar (ng)	Konsantrasyon (ng/g)
5	0.1	*	*	5	0.5
10	0.1	*	*	10	1
20	0.1	*	*	20	2
30	0.1	*	*	30	3
40	0.1	*	*	40	4
50	0.1	*	*	50	5
60	0.1	*	*	60	6
70	0.1	5	0.5	65	6.5
80	0.1	15	1.5	65	6.5
90	0.1	25	2.5	65	6.5
100	0.1	35	3.5	65	6.5

* Tespit edilebilir limitin altında

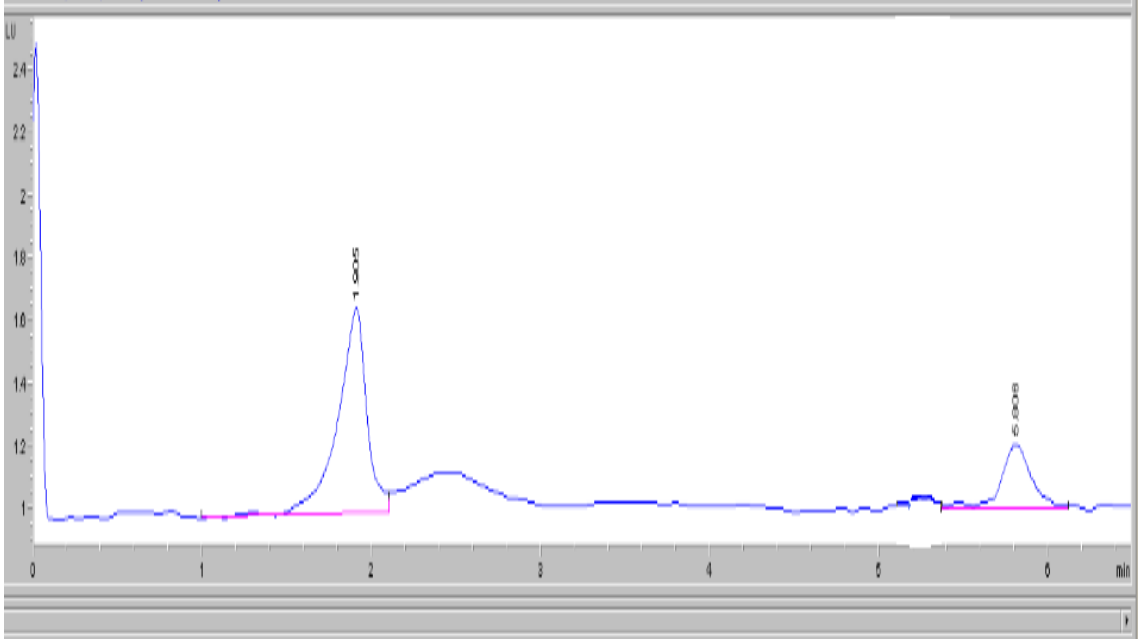
Analiz sonuçlarına göre 0.1 g oranında kullanılan kil örneğinin 10 ml tampon çözeltide bulunan yaklaşık olarak 65 ng AFM₁’i tamamen adsorbe ettiği Çizelge 4.2’de görülmektedir. Aynı durum aşağıdaki grafikte daha açık bir şekilde görülmektedir.

Kil örneklerinin AFM₁ adsorbsiyon kapasiteleri Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. 0.1 g kil örneklerinin AFM₁ adsorbsiyonu kapasiteleri.

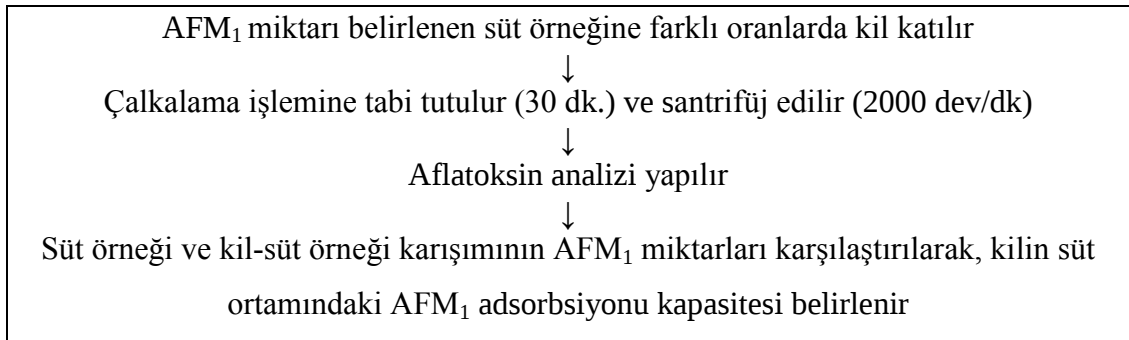
Kontrol amaçlı olarak aflatoksinin tutulduğu killer saf su ile yıkandıktan sonra metanolle ekstrakte edilmiş ve bu ekstraktta AFM₁ analizi yapılmıştır. Bu doğrulama amaçlı analizlerden birine ait kromatogram Şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5. Standart AFM₁ çözeltisinin kilden elue edilmesi ve analizine ait bir kromatogram.

4.5. Süt Örneklerinde Killerin AFM₁ Adsorbsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda aflatoksin M₁ içeren süt örneklerine değişik oranlarda killer katılarak 2 farklı çalışma yapılmıştır. Her iki çalışmada uygulanan işlemler Şekil 4.6'da özetlenmiştir.

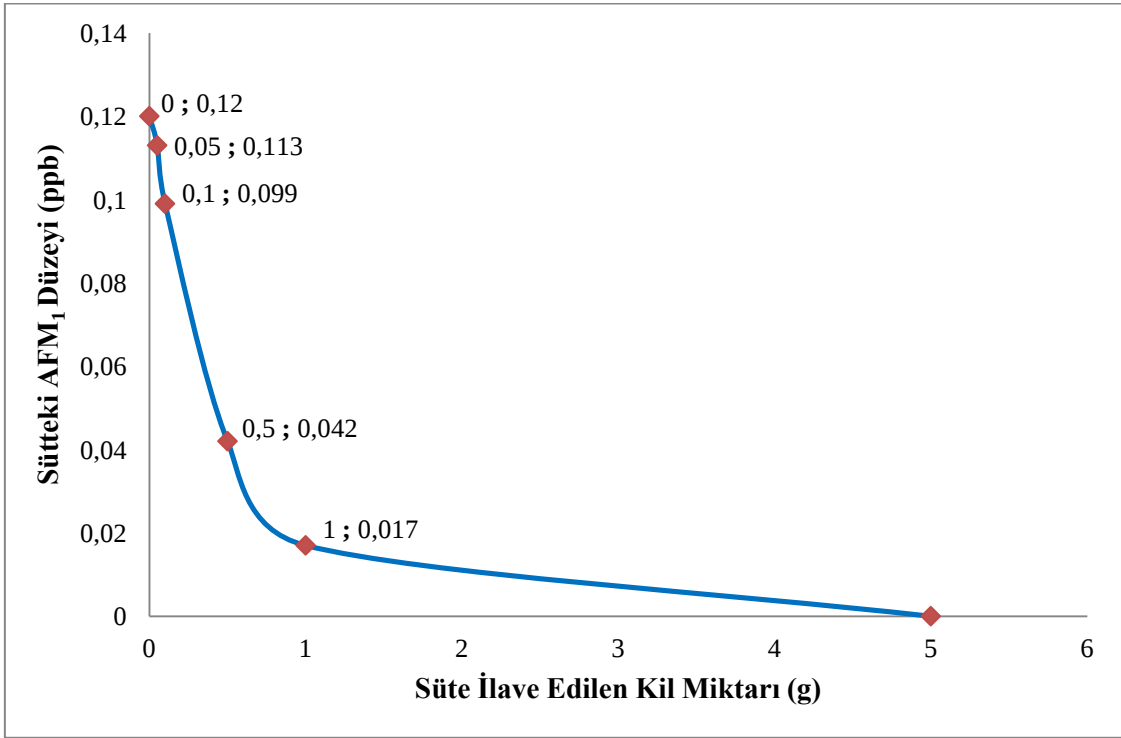


Şekil 4.6. Killerin süt örneklerindeki AFM₁ adsorbsiyonu kapasitelerinin belirlenmesi.

Birinci çalışmada kullanılan süt örneğinde yapılan analiz sonucunda AFM_1 konsantrasyonu 0.12 ppb olarak belirlenmiştir. Süt örneğinden 100'er ml alınarak sırasıyla artan oranlarda kil ilave etmek suretiyle Şekil 4.6'da belirtildiği gibi aflatoksin M_1 analizi yapılmıştır.

Yapılan analiz sonucunda sırasıyla 0.05 g kil eklenince 0.113 ppb, 0.1 g kil eklenince 0.099 ppb, 0.5 g kil eklenince 0.042 ppb, 1 g kil eklenince 0.017 ppb, 5 g ve üzeri kil eklendiğinde ise tespit edilebilir limitlerin altında AFM_1 miktarının olduğu belirlenmiştir. Kullanılan kil miktarının artırılmasına bağlı olarak aflatoksin M_1 miktarında azalma olduğu görülmüştür.

Şekil 4.7'de muamelede kullanılan kil miktarına bağlı olarak, 0.12 ppb AFM_1 içeren sütte kalan AFM_1 miktarı grafiksel olarak gösterilmiştir.

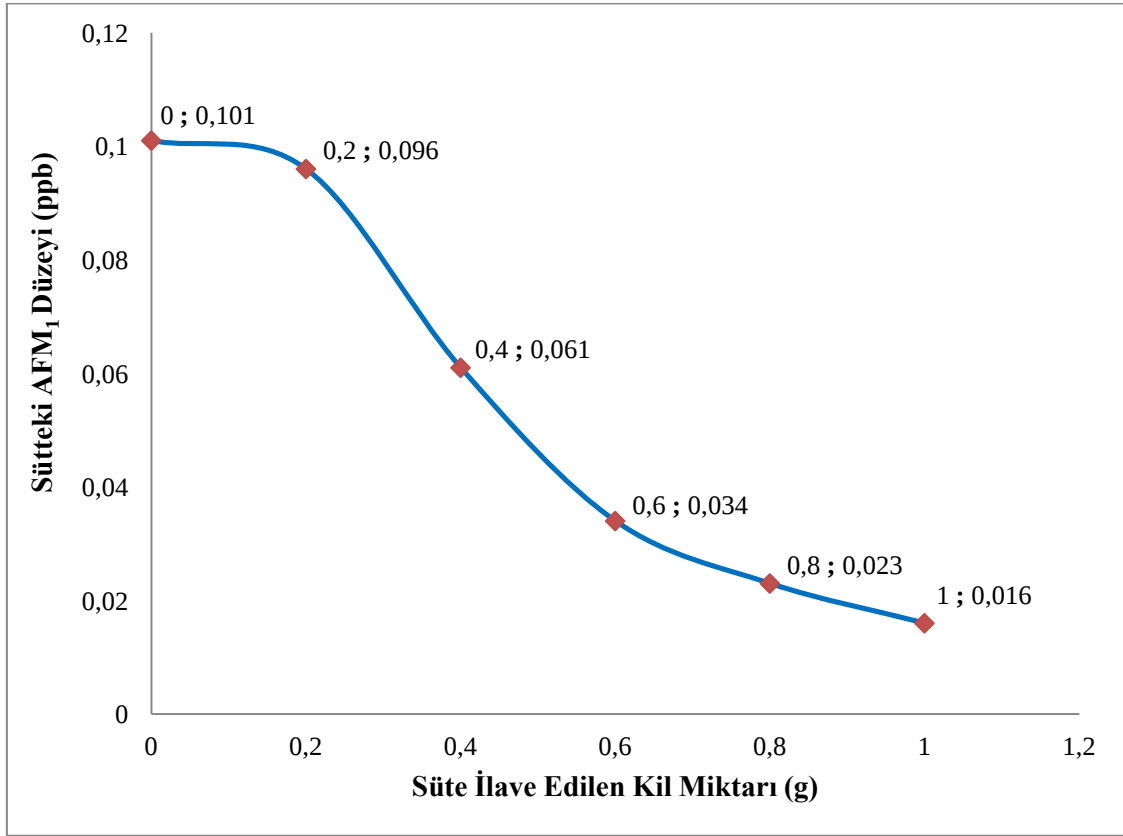


Şekil 4.7. 0.12 ppb AFM_1 içeren süte eklenen farklı orandaki killerin AFM_1 adsorbsiyonu.

İkinci çalışmada kullanılan süt örneğinde ise yapılan analiz sonucunda AFM_1 konsantrasyonu 0.101 ppb olarak belirlenmiştir. Aflatoksinli süte (100 ml) eklenen killerin miktarı 0.1 g ile 1 g arasında değişecek şekilde ayarlanmış ve Şekil 4.6'da belirtildiği gibi aflatoksin M_1 analizi yapılmıştır.

Yapılan analiz sonucunda sırasıyla 0.2 g kil eklenince 0.096 ppb, 0.4 g kil eklenince 0.061 ppb, 0.6 g kil eklenince 0.034 ppb, 0.8 g kil eklenince 0.023 ppb ve 1 g kil eklendiğinde ise 0.016 ppb AFM₁ miktarı belirlenmiştir. Kullanılan kil miktarı azaldıkça sütün ihtiva ettiği toksinin kil tarafından yeterince tutulamadığı görülmüştür.

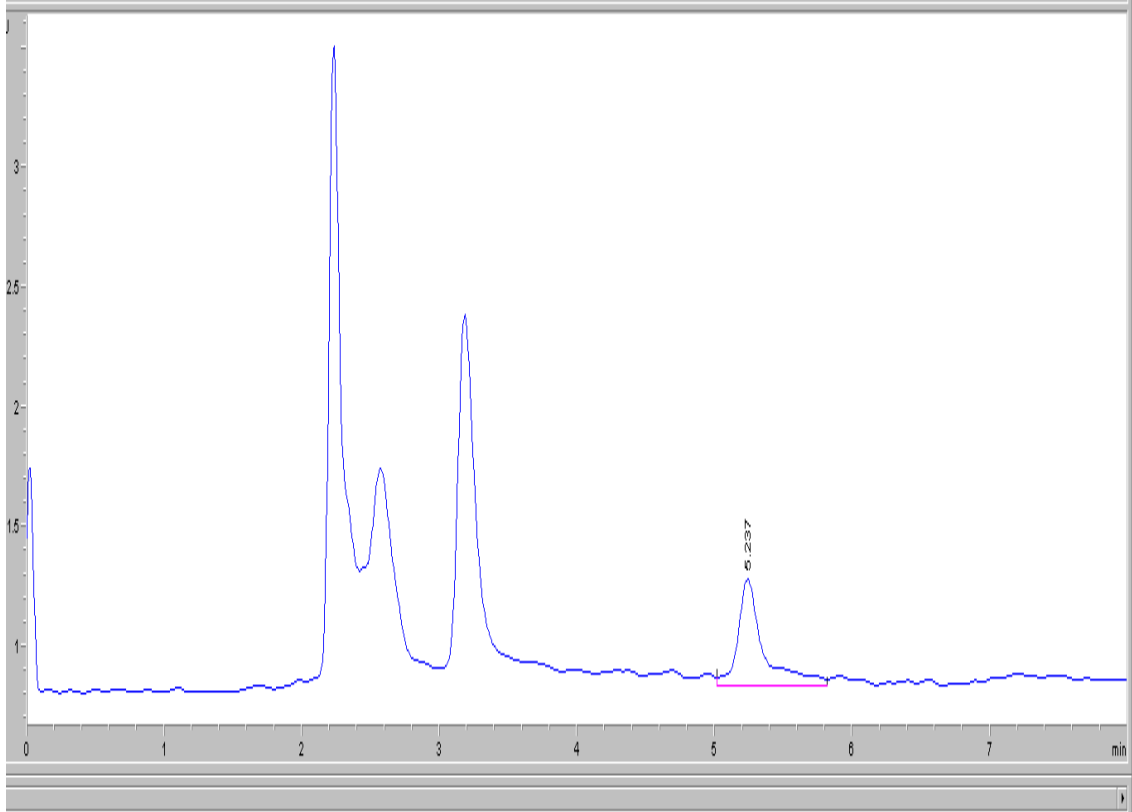
Şekil 4.8’de muamelede kullanılan kil miktarına bağlı olarak, 0.101 ppb AFM₁ içeren sütte kalan AFM₁ miktarı grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.8. 0.101 ppb AFM₁ içeren süte eklenen farklı orandaki killerin AFM₁ adsorbsiyonu.

Süt örneklerinde killerin AFM₁ adsorbsiyon kapasitelerini belirlemek amacıyla yapmış olduğumuz çalışmalarda iki farklı yol denenmiştir. Birincisinde, kil ile muamele edilmiş olan aflatoksinli süt örneğine İAK prosedürü uygulanmış yani kil ile muamelenin ardından aflatoksinli süt immuno-affinite kolondan geçirilmiş ve HPLC ile miktar analizi yapılmıştır. İkincisinde ise, aflatoksinli süt ile temas eden kil santrifüj ile çöktürülmüş ve kil tarafından adsorbe edilen aflatoksin doğrudan kilden metanol ile elue edilmiş ve HPLC ile miktar analizi yapılmıştır.

Yapılan analizlerde uygulanan bu tekniklerden ikincisinin kullanımının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Analiz sonuçlarına göre ikinci teknikle yapılan analizler sonucunda ortaya çıkan kromatogramlarda, uygulanan analizde IAK kullanılmadığı için çok yoğun kirlilik olduğu gözlenmiş (Şekil 4.9) ve geri alma çalışmaları istenilen düzeyde gerçekleştirilememiştir. Dolayısıyla kilin sütteki AFM₁ adsorbsiyon kapasitesi hesaplanırken çalışmalarımızda IAK yöntemi uygulanmış ve sütte kalan AFM₁ üzerinden analizler yapılarak sonuçlar hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Sütteki AFM₁'in kilden doğrudan metanol ile elue edilmesine ait bir kromatogram.

4.6. Kil Dolgulu Kolonların Hazırlanması

Kolonu dolduracağımız kil dolgu materyalini kolonda tutabilmek için farklı denemeler yapılmıştır. Cam borucukların kille kaplanması amacıyla litreye 15 g olacak şekilde kaynar agar-agar çözeltisi hazırlanmıştır. Borucuklar bu çözeltinin içine daldırılmış ve agar donmadan fazla agar çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra kil ile

kariştırılarak kaplanmıştır. Borucuklar tarafından kaplanan kil devamlı olarak kopmuş ve yıkama suyuyla akmaya devam etmiştir. Bu sebeple cam borucuklar üzerinde kili yapıştırarak tutturma denemeleri başarısız olmuştur.

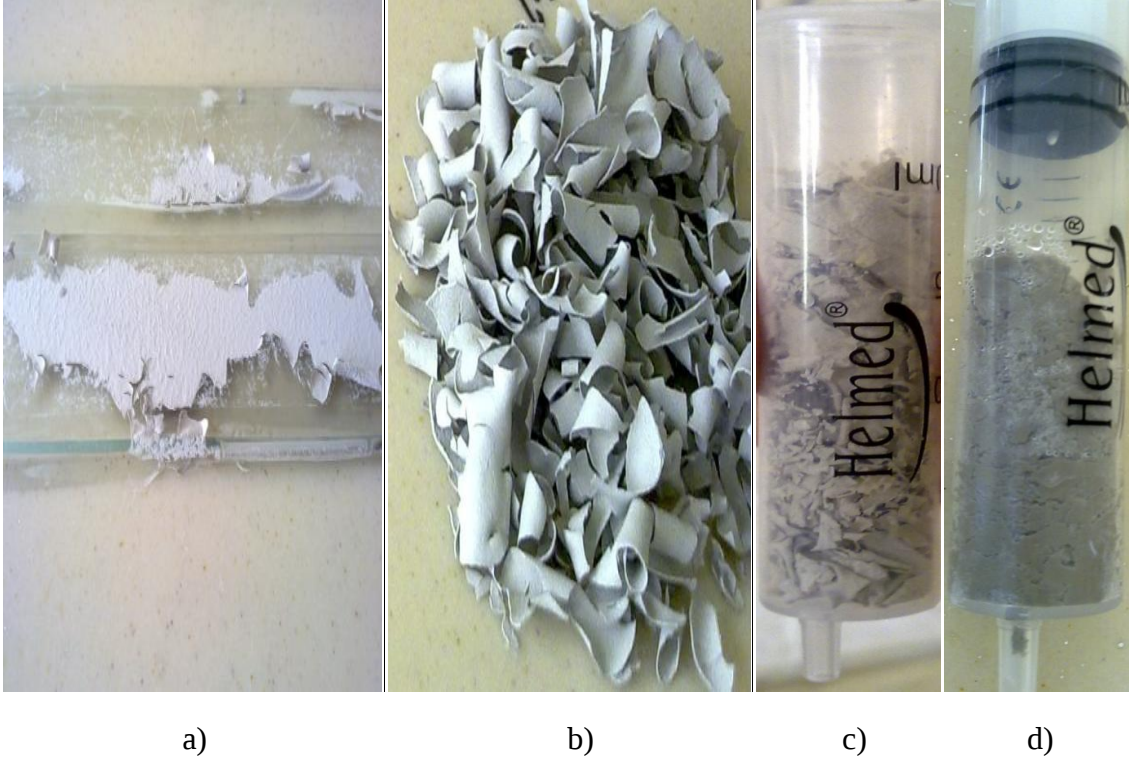
Cam borucuklar kullanılarak yapılan kil kaplama işlemi şekil 4.10’da gösterilmiştir.



şekil 4.10. Destek materyalli cam borucuklu kolon dolgu maddesi hazırlama çalışmaları
a) kil ile kaplanmış şekli, b) kil kaplamaların kopmaya başlamış şekli, c) kil kaplamaların kopmuş şekli.

Agar kullanarak destek materyalsiz kolon dolgu maddesi hazırlama işleminde ise Madde 3.2.9’da verilen yöntemle cam plakalar üzerine dökülen ve etüvde kurutulan agar-kil karişımları şekil 4.11’de görüldüğü gibi cam plakaların üzerinden kazılmış ve buruşuk levhamsı görünüme sahip bir dolgu maddesi elde edilmiştir. Bu materyal yeteri kadar sert ve sulu fazın kile ulaşmasına imkan verecek kadar ıslanabilen bir yapıda olmasına karşılık, kolonda kısmen yumuşaması ve levhaların aradaki boşlukları kapatarak kolonun geçirgenliğini azaltması veya kolonu tıkaması nedeniyle başarılı olamamıştır. şekil 4.11 (c)’de görüldüğü gibi uygun bir kolon meydana gelmesine rağmen, şekil 4.11 (d)’de kolondan ilerleyen su akımını takiben kil dolgu maddesinde çökme meydan gelmiş ve sonucunda kolon tıkanmıştır.

Cam plakalar üzerinde kil-agar karişımı kurutularak elde edilen, destek materyalsiz kolon dolgu maddesi hazırlama ve yapılan uygulama çalışmaları şekil 4.11’de gösterilmiştir.



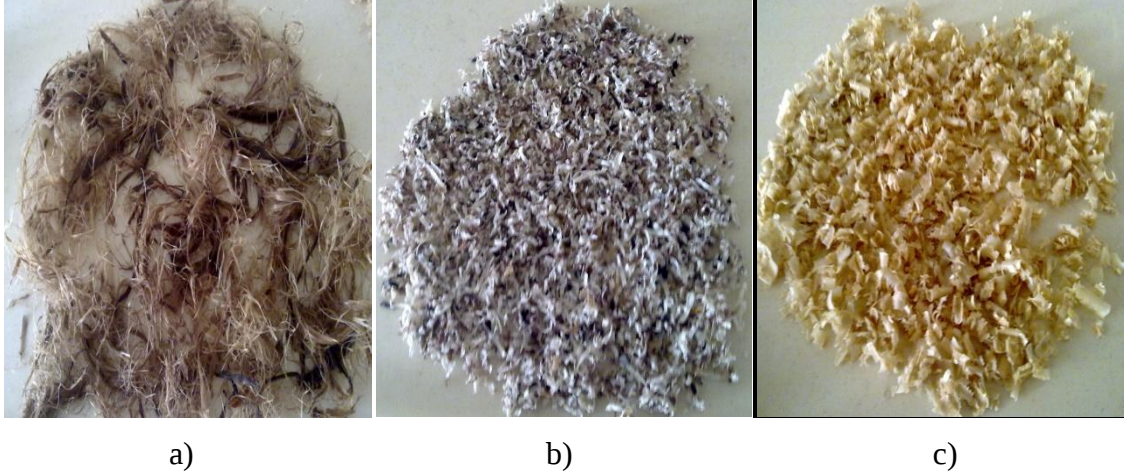
Şekil 4.11. Kil-agar karışımı desteksiz kolon dolgu materyali hazırlama ve uygulama çalışmaları a) cam plakalar üzerinde kurutulmuş olan kil-agar karışımı, b) kil-agar karışımının cam plakalardan kazınmış şekli, c) kil-agar karışımının şırıngadan yapılan kolona doldurulması, d) kolonun işlem sırasında tıkanmış şekli.

Bunun üzerine killer çökmeyecek ve kille bağlanabilecek yapıya sahip olan 3 farklı şekildeki lifli materyal (ağaç yongaları) ile Madde 3.2.9’da belirtilen şekilde muamele edilmiştir. Lifli materyal, kil ve kaynar agar çözeltisiyle karıştırılmış ve cam kolona doldurulmuştur. Spiral şekilli (çam ağacından elde edilmiş), ipliksi (söğüt ağacından elde edilmiş) ve küçük kıymıklar (kavak ağacından elde edilmiş) şeklinde 3 farklı lifli materyal ile yapılan denemelerde ne oranda kil-agar karışımı tuttuklarına dair elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

10 g ipliksi (söğüt) kıymıkların 0.7 g kil-agar karışımı, 10 g küçük (kavak) kıymıkların 1.15 g kil-agar karışımı ve 20 g spiral (çam) kıymıkların ise 2.57 g kil-agar karışımı tuttuğu yapılan tartımlar sonucunda belirlenmiştir.

Yapılan bu tartımlar sonucunda kilin en iyi spiral çam kıymıklar üzerinde tutulduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmalarımızda destek materyalli cam kolon dolgu maddesi olarak spiral çam kıymıklara agar yardımıyla tutturulmuş olan kil dolgu maddesi kullanılmıştır.

Destek materyalli kil kolonların hazırlanmasında kullanılan hızar kaba yongalarının, kil-agar karışımı ile muamele edilmiş ve etüvde kurutulduktan sonra elde edilmiş olan görüntüleri Şekil 4.12’te gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Farklı şekillere sahip odun yongalarıyla işlem gören kil-agar karışımının kurutulmasıyla elde edilen destek materyalli kolon dolgu maddeleri a) ipliksi (söğüt) kıymıklar, b) küçük (kavak) kıymıklar, c) spiral (çam) kıymıklar.

Kil tutturulmuş olan spiral çam kıymıklar 30 mm çapında ve 800 mm uzunluğundaki cam kolona doldurulmuş ve 39.5 cm yüksekliğinde kolon dolgu maddesi boyu elde edilmiştir. Madde 3.2.9’da belirtildiği şekilde kolonda belirli bir süre saf su bekletilmiş ve suyun kolondan boşaltılması sonucunda herhangi bir bulanıklık veya çökelmenin olmadığı görülmüştür. Kolon dolgu materyali aflatoksinli süt geçirilinceye kadar ıslak olarak bekletilmiştir. Sonra kolondaki su tamamen boşaltılmış ve kurumasına izin verilmeden 0.056 ppb’lik AFM₁ içeren süt kolona doldurulmuştur. 10-15 dk. aflatoksinli süt kolonda bekletilmiş ve 10-15 ml/dk hızla, belirli aralıklarla 100’er ml örnekler alınarak AFM₁ analizi yapılmıştır.

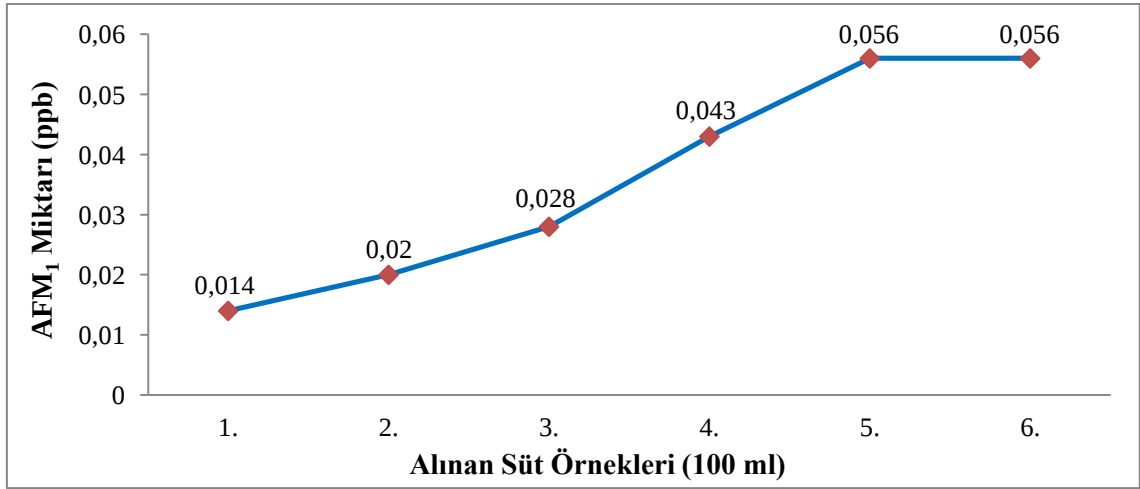
Kolondan geçirilen süt örneklerinin AFM₁ analiz sonuçları şöyledir. Sırasıyla ilk alınan süt örneğinde 0.014 ppb, ikinci alınan süt örneğinde 0.020 ppb, üçüncü alınan süt örneğinde 0.028 ppb, dördüncü alınan süt örneğinde 0.043 ppb, beşinci ve altıncı alınan süt örneklerinde ise 0.056 ppb AFM₁ miktarı belirlenmiştir.

Spiral çam kıymık ve kil-agar karışımı dolgulu olan destek materyalli cam kolonun saf su ve AFM₁ içeren sütle muamelesi Şekil 4.13’te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Spiral çam kıymık ve kil-agar karışımı dolgulu olan destek materyalli cam kolonun saf su ve aflatoksinli süt ile muamelesi a) kolonun saf su ile muamelesi, b) kolonun aflatoksinli süt ile muamelesi.

Kolondan geçirildikten sonra art arda elde edilen 100'er ml süt örneklerinin AFM₁ analiz sonuçları ise grafiksel olarak Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. 0.056 ppb AFM₁ içeren sütün kil dolgulu cam kolondan geçirilmesi sonucu alınan örneklerin AFM₁ analizi sonuçları.

Bu kolon denemelerinin yanı sıra granüllü yapıya sahip olan zeolitler kullanılarak, agar kullanılmadan destek materyalsiz bir kolon oluşturulmuştur. Zeolitler kendi granül yapısına bağlı olarak geçirgenlik sağlamıştır. Bu şekilde hazırlanan 2 g zeolit doldurduğumuz kolondan 0.056 ppb AFM₁ içeren 100 ml süt geçirilmiş ve AFM₁ analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda 0.039 ppb AFM₁ tespit edilmiştir.

Belirli granül büyüklüğüne sahip (1-2 mm çapında) zeolit dolgulu kolon yapısı Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Zeolit dolgulu destek materyalsiz kolon yapısı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaptığımız çalışmalarda AFM₁ içeren sütlerin killerle işlem görerek detoksifikasyonunun sağlanması amaçlanmıştır. Yani katı bir faz olan kil ile sıvı bir faz olan süt çeşitli şekillerde karşılaştırılarak, sütteki AFM₁'in yaklaşık tamamının kil tarafından tutulmasını sağlayacak bir işlem basamağı geliştirilmeye çalışılmıştır.

Ön çalışmalarımızda aflatoksin adsorbsiyonunda kullanımı literatürde yaygın olarak verilen ve başarılı olmuş olan kil çeşitleri (zeolit, klinoptilolit, bentonit) kullanılmıştır. Jaynes ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada bentonit, Keçeci ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada zeolit ve bentonit, Oğuz ve ark. (2002) ise yaptıkları çalışmada klinoptilolit kullanmışlardır.

Ön çalışmalarda farklı oranlarda killer yine farklı oranlarda AFM₁ içeren tampon çözelti ve süt numuneleriyle muamele edilerek adsorbsiyon kapasiteleri belirlenmiştir. Kullanılan kil çeşitlerinin AFM₁ adsorbsiyon kapasitelerinin birbirine çok yakın düzeylerde gerçekleştiği belirlenmiştir. İşlem kolaylığı sağlaması ve literatürde aflatoksin bağlayıcı olarak en yaygın kullanıma sahip kil çeşidi olması nedeniyle klinoptilolit, ön çalışmalar dışında yapılan tüm analizlerde kil çeşidi olarak kullanılmıştır. Baran ve Kutay (1999) klinoptilolitın dünyada rezerv olarak en çok bulunan killerden bir tanesi olduğunu ve teknolojik özelliklerinin de oldukça iyi olduğunu belirtmiştir.

Yapılan analizler sonucunda klinoptilolitın AFM₁'i tampon çözelti ortamında adsorbe etmede başarılı olduğu görülmüştür. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi 0.1 g klinoptilolit tampon çözeltide bulunan 6.5 ppb AFM₁'in tamamını adsorbe edebilmiştir. Yine sonuçlarda görüldüğü gibi metanol-asetonitril ile % 92-98 aralığında geri alma bildirilmiştir. Metodun bu hali yüksek oranda geri almaya bağlı olarak oldukça başarılı bulunmuştur. Klinoptilolit tampon çözeltide bulunan AFM₁'i yüksek seviyede tutabilmiştir.

Jaynes ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada; diğer kaynaklara dayanarak bentonitin sulu çözeltide AFB₁'in % 94-100'ünü adsorbe ettiği belirtilmiştir. Bulunan sonuçlar killerin tampon çözeltideki AFM₁ adsorbsiyonunun, literatürde verilen AFB₁ adsorbsiyon miktarına yakın düzeyde başarı sağladığını göstermektedir.

Çizelge 4.3’de verilen analiz değerlerinde görüldüğü gibi 0.12 ppb AFM₁ içeren 100 ml süttten AFM₁’in tamamını ancak 5 g klinoptilolit adsorbe edebilmiştir. Kullanılan klinoptilolit miktarı azaldıkça aflatoksin adsorbsiyonu da doğru orantılı olarak azalmıştır. Yine Çizelge 4.4’te verilen analiz değerlerinde görüldüğü üzere 0.101 ppb AFM₁ içeren 100 ml süttten AFM₁ adsorbsiyonunda 1 g veya daha düşük düzeylerde klinoptilolit kullanımında istenilen seviyede adsorbsiyonun gerçekleşmediği görülmüştür. Kullanılan klinoptilolit miktarı azaldıkça anlamlı bir adsorbsiyon oluşmamıştır. Yapılan analizlerde 1 g klinoptilolitin AFM₁’in tamamını adsorbe edemediği görülmüştür. Dolayısıyla AFM₁ adsorbsiyon kapasitesinin süt ortamında tampon çözelti ortamına göre daha düşük seviyede gerçekleştiği belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarında belirlenen adsorbsiyonun süt ortamında tampon çözelti ortamına göre çok düşük çıkmasının nedeninin, süttün kendine özgü ve çok bileşenli yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Muhtemelen killerin AFM₁ ile etkileşime girerek onu tutan bölgeleri, süttten gelen ve kile daha yüksek affinite gösteren diğer bileşenler tarafından doldurulmaktadır. Bu da kilin aflatoksinle olan etkileşimini zorlaştırmakta ve tampon çözelti ortamında gösterdiği başarının oluşmasını engellemektedir. Bu durum Şekil 4.5. ve Şekil 4.9’da gösterilen iki kromatogramda açıkça görülmüştür. Şekil 4.5’te gösterilen kromatogram tampon çözelti ortamında AFM₁ çözeltisinin kilden elue edilmesine aittir. Buradaki kromatogramda herhangi bir kirlilik pikinin yok denecek kadar az olduğu görülmüştür. Şekil 4.9’da gösterilen kromatogram ise süt ortamında AFM₁’in kil ile adsorbsiyonundan sonra kilden toksinin metanol-asetonitril karışımı ile alınan çözeltisine aittir. Burada ise AFM₁ varlığının yanında kromatogramdaki yabancı pikler bize ortamda önemli ölçüde kirliliğin olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada 0.12 ppb AFM₁ içeren 100 ml süttten aflatoksinin tamamının alınabilmesi için 5 g klinoptilolit kullanılması gerektiği görülmüştür. Bu 1 ton aynı düzeyde toksin içeren süt için 50 kg klinoptilolit kullanımı anlamına gelmektedir. Bu düzeyde büyük kil miktarının kullanımı anlamsız veya ekonomik olarak yararsızdır. Eğer killeri tekrar tekrar kullanabilmeyi düşünüyorsak, bu hacimdeki kilden toksini alacak olan solvent miktarı da kabul edilemez boyutlarda olacaktır.

Belirtilen bu nedenlerle killerin süt ortamında AFM₁ adsorbsiyonunun istenilen başarıyı sağlayamadığı görülmüştür. Yine de killer kullanılarak farklı şekillerde kolon

hazırlama çalışmaları yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda Şekil 4.12’de görüldüğü gibi spiral çam kıymıklara klinoptilolit tutturularak destek materyalli kolon dolgu maddesi oluşturulmuştur. Kil ihtiva eden bu dolgu maddesiyle oluşturulan cam kolondan aflatoksinli sütler Şekil 4.14’de gösterildiği şekilde geçirilerek analiz edilmiştir. Çizelge 4.5’te görüldüğü gibi 0.056 ppb AFM₁ içeren süt numunesi kil dolgulu destek materyalli cam kolondan geçirilmiş ve analiz edilmiştir. Analiz sonucunda cam kolondan alınan ilk süt numunesindeki toksin adsorbsiyonu miktarının, sırayla alınan diğer süt numunelerinde giderek azaldığı belirlenmiştir. Analiz sonuçları kil dolgulu destek materyalli cam kolonun da başarılı bir AFM₁ adsorbsiyonu gerçekleştiremediğini göstermiştir.

Uygulanan diğer kolon denemelerinde de istenilen başarı sağlanamamıştır. Şekil 4.15’te görüldüğü gibi tasarlanan zeolit dolgulu destek materyalsiz kolon denemesi de bize yeterli seviyede AFM₁ adsorbsiyonunun yapılmadığını göstermiştir. Yine Şekil 4.11’de görülen klinoptilolit-agar karışımı dolgulu destek materyalsiz kolon denemelerinde de istenilen düzeyde geçirgenlik sağlanamadığından kolonda tıkanmalar meydana gelmiştir. Şekil 4.10’da görüldüğü gibi cam borucuklar üzerinde klinoptiloliti tutturarak destek materyalli kolon oluşturma denemeleri de kilin borucukların yüzeyinde istenilen seviyede tutundurulamaması nedeniyle başarısız olmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar, kilin süt ortamından aflatoksin M₁’i uzaklaştırdığı gibi yeni ve önceden test edilmemiş bir bulguyu ortaya koyuyor olmakla birlikte, bunun endüstriyel olarak uygulanması mümkün görülmemektedir.

KAYNAKLAR

- Akdemir, Ç., Altıntaş, A., 2003. Ankara’da İşlenen Sütlerde Aflatoksin M₁ Varlığının ve Düzeylerinin HPLC ile Araştırılması. **Ulusal Mikotoksin Sempozyumu**. 18-19 Eylül 2003, İstanbul, 87-92.
- Albayrak, F., 1990. **Killerde Ağır Metal Adsorpsiyonlarının İncelenmesi ve Çözeltiden Adsorpsiyon Yöntemiyle Yüzey Alanı Belirlenmesi** (Yüksek lisans tezi). Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Angulo, E. J., Brufau., E. Esteve-Garcia. 1995. Effect of Sepiolite on Pellet Durability in Feeds Differing in Fat and Fibre Concent. **Animal Feed Science and Technology**, **53**: 223-241.
- Anonim, 1997. Gıdalarda Mikotoksin Tayini. **Türk Standardı TS 1229**, Nisan, ICS 67.220.20.
- Anonim, 1999. Easi-Extract™ Aflatoxin Simplified Procedure. Rhone-Diagnostic Technologies Ltd.
- Anonim, 2002. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. **Resmi Gazete**, 23.09.2002, Sayı: 24885.
- Anonim, 2008. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. **Resmi Gazete**, 17.05.2008, Sayı: 2008/6.
- Atasever, M., Nizamlioğlu, M., Özturhan, K., Karakaya, Y., Ünsal, C., 2006. Erzurum Bölgesinde Tüketime Sunulan Süt ve Ürünlerinin Aflatoksin M₁ Yönünden İncelenmesi. **2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi**. 18-20 Eylül 2006, s: 231-240, İstanbul.
- Ayçiçek, H., Yarsan, E., Sarımeahmetoğlu, B., Çakmak, O., 2002. Aflatoxin M₁ in White Cheese and Butter Consumed in İstanbul, Turkey. **Veterinary and Human Toxicology**, **44** (5): 295-296.
- Bakırcı, İ., 1995. **Sütlerde Aflatoksin M₁ Oluşumu ve Ürünlere Geçiş Üzerinde Bir Araştırma**. (Doktora tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

- Bakırcı, İ., 2001. A Study on the Occurrence of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products Produced in Van Province of Turkey. **Food Control**, 12: 47-51.
- Baran, S. M., Kutay H.C., 1999. Zeolitin Hayvan Beslemede Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılması. **Hayvancılık Dünyası**. Yıl:3, Sayı 25.
- Başkaya, R., Atasever, M., 2005. Civil Peynirinde Aflatoksin M₁ Düzeyinin Belirlenmesi. **II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu**. 23-24 Mayıs 2005, İstanbul.
- Begino, E.T., 2003. Production Performance of Poultry Layers Consuming Aflatoxin Contaminated Feed. <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/135369/2/PR100.pdf#page=536>. Erişim tarihi: 21.07.2013.
- Betina, V., 1989. Mycotoxins: **Chemical, Biological and Environmental Aspects**. Elsevier, Amsterdam - Oxford - New York, Tokyo, 437 p.
- Birdane, Y., Akaya, L., Başkaya, R., Cemek, M., Bulut, S., 2006. Afyonkarahisar’da Tüketime Sunulan UHT Sütler ile Çiğ Sütlerdeki AFM₁ Miktarının Belirlenmesi. **2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi**. 18-20 Eylül 2006, s:373-374, İstanbul.
- Bostan, K., Çetin, Ö., Büyükcinal, S.K., Ergün, Ö., 2005. İstanbul’da Satışa Sunulan İçme Sütü Örneklerinde Aflatoksin M₁ Düzeyleri Üzerine Bir Araştırma. **Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi**, 4(7): 15-20.
- Bullerman, L. B., Schroeder, L.L. Park, K.Y., 1984. Formation and Control of Mycotoxins in Food. **Journal of Food Protection**, 47(8): 637-646.
- Charles, R., Hurburg, J. R., 1995, “Mycotoxins in the Grain Market” **World Grain**, October, 23-26.
- Çeçen, A., 2009. **Ahırda ve Merada Beslenen Hayvanların Sütlerinde Aflatoksin M₁ Oluşumunun Karşılaştırılması** (Yüksek lisans tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Van.
- Çelebi, Ş., Macit, M., Karaca, H., 2004. Yumurta Tavuğu Rasyonlarına Geç Dönemde Zeolit İlavesinin Performans ve Bazı Önemli Yumurta Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. **4. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi**. 405-409, Isparta.
- Çelik, K., Dağlıoğlu, K., Doran, F., Öztürkcan, O., 1998. Experimental Induction of Chronic Aflatoxosis in Rats by Using Purified Aflatoxin B₁ (AFB₁) and Its Reversal by Activated Charcoal and Diatomaceous Earth. **Tuyem 4.Uluslararası Yem Kongresi**. Nevşehir.

- Çelik, H.T., Sarımeahmetoğlu, B., Kupulu, O., 2005. Aflatoxin M₁ Contamination In Pasteurised Milk. ***Veterinarski Archiv***, 75(1): 57-65.
- Çoksöyler, N., Aşkın, O., Andiç, S., Karadaş, F., Tuncel, M., Altıokka, G., Özkaya,Ş., 2005. Van Yöresinde Üretilen Sütlerde Aflatoksin M₁ Oluşumu ve Nedenlerinin Araştırılması, ***TÜBİTAK*** 101Y098 Nolu Projesi Kesin Raporu, Van, 17 s.
- Demirel, D. Ş., Demirel, R., Doran, İ., 2010. Doğal Zeolitlerin Hayvancılıkta Kullanım Olanakları. ***Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi***, 14(2): 13-20.
- Diaz, D. E., Hagler, W. M., Hopkins, B. A., Whitlow, L. W., 2003. Aflatoxin Binders I: In vitro Binding Assay for Aflatoxin B1 by Several Potential Sequestering Agents. ***Mycopathologia***, 156: 223–226.
- Dragacci, S., Glezies, E., Fremy, J. M., Candlish, A. A. G. 1995, “Use of Immuno Affinity Chromotography as a Purification Step Fpr the Determination of Aflatoxin M₁ in Cheeses” ***Food Additives and Cotaminants***, 12(1): 59-65.
- Duru, S., Özgüneş, H., 1984, “Mikotoksinlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi” ***Gıda Dergisi***, 9(6): 341-349.
- Edrington, T.S., Sarr, A.B., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Philips, T.D., 1996. Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS, and activated charcoal reduce urinary excretion of aflatoxin M1 in turkey poult. Lack of effect by activated charcoal on aflatoxicosis. ***Toxicology Letters***, 89: 115-122.
- Grim, R. E., 1968. ***Clay Mineralogy***, Mc-Graw Hill Book. Company, New York, p: 596
- Günşen, U., Büyükyörük, İ., 2002. Aflatoxins in Retail Food Products in Bursa, Turkey. ***Veterinary and Human Toxicology***, 44: 289-290.
- Gürbay, A., Aydın, S., Girgin, G., Engin, A. B., Şahin, G., 2006. Assessment of Aflatoxin M₁ Levels in Milk in Ankara, Turkey. ***Food Control***, 17: 1-4.
- Gürses, M., Erdoğan, A., Çetin, B., 2004. Occurrence of Aflatoxin M₁ in Some Cheese Types Sold in Erzurum, Turkey. ***Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences***, 28: 527-530.
- ISO 1998. ***International Organization for Standardization ISO-14501***, (E) Milk and Milk Powder–Determination of AFM1 Content–Clean-up by Immunoaffinity Coloumn and Determination by HPLC.
- Jay, J.M., 1992. Other Proved and Suspected Food Borne Agents: Mycotoxins, ***Modern Food Microbiology 4th Addition***, 641-651.

- Jaynes, W.F., Zartman, R. E., Hudnall, W.H. 2007. Aflatoxin B₁ Adsorption by Clays From Water and Corn Meal. ***Applied Clay Science***, **36**: 197–205.
- Kaya, S., 1984. Mikotoksinler Hayvan ve İnsan Sağlığı Yönünden Önemleri. ***Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi***, **31**: 388-409.
- Kaya, S., 1989. Yem ve Besinlerdeki Mikotoksinler: İnsan ve Hayvan Sağlığı İçin Önemleri. ***Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi***, **36**: 226-253.
- Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A., 2002. ***Mikotoksinler, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji***, 2.Baskı, (Editörler: Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A.) Medisan Yayınevi, Ankara, 537-574.
- Keçeci, T., Oğuz, H., Kurtoğlu, V., Demet, O., 1998. Effects of Polyvinilpolypyrrolidone, Synthetic Zeolite and Bentonite on Serum Biochemical and Haematological Characters of Broiler Chickens During Aflatoxicosis. ***British Poultry Science***, **39**: 452-458.
- Keskin, H., 1982. ***Besin Kimyası***. 4. Basım, 2. Cilt, Fatih Yayınevi ve Matbaası, İstanbul, s: 26-90.
- Lee, S.Y., Kim, S. J., Chung, S. Y., Jeong, C.H., 2004. “Sorption of Hydrophobic Organic Compounds onto Organoclays,” ***Chemosphere***, **55**: 781-785.
- Lopez, C.E., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., Perez, J., 2001. Distribution of Aflatoxin M₁ in Cheese Obtained from Milk Artificially Contaminated. ***International Journal of Food Microbiology***, **64**: 211-215.
- Mavuş, H., 2003. ***Kayseri Yöresinde Satışa Sunulan Sütlerden Aflatoxin Tayini*** (Yüksek lisans tezi), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Maxwell, S. M., Afeagyei, F., de Vries, H. R., Muranmut, D., Hendrickse, R. G. 1989. Aflatoxins in Breast Milk, Neonatal Cord Blood and Sera of Pregnant Women. ***Jurnal of Toxicology-Toxin Reviews***, **8**(1-2): 19-29.
- Mayes, J., Macdonald, S., 1995. Survey of Aflatoxin M₁ in Retail Milk and Milk Products. ***CSL Food Science Laboratory***. Norwich Research Park, Colney.
- Melenova, L., Ciahotny, K., Jirglova, H., Kusa, H., Ruzek, P., 2003. Removal of Ammonia from Waste Gas by Means of Adsorption on Zeolites and Their Subsequent Use in Agriculture (in Czech). ***Chemicke Listy***, **97**: 562–568.
- Oğuz, H., Keçeci, T., Birdane, Y. O., Önder, F., Kurtoğlu, V., 2000a. Effect of Clinoptilolite on Serum Biochemical and Haematological Characters of Broiler Chickens During Aflatoxicosis. ***Research in Veterinary Science***, **69**: 89-93.

- Oğuz, H., Kurtoğlu, V., 2000b. Effect of Clinoptilolite on Performance of Broiler Chickens During Experimental Aflatoxicosis. **British Poultry Science**, **41**: 512-517.
- Oğuz, H., Kurtoğlu, F., Birdane, Y.O., Kurtoğlu, V., 2002. Evalution of Biochemical Characters of Broiler Chickens During Dietary Aflatoxin (50-100 ppb) and Clinoptilolite Exposure. **Veterinary Sciences**, **73**: 101-103.
- Oruç, H.H., 2003. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M₁ (AFM₁) ve Türkiye'deki Durumu. **Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **22**: 121-125.
- Özkaya, Ş., Başaran, A., Kaymak, T., Dikmen, O., Kocabey, M., Altındış, N., Ramis, R., 2002. Türkiyede Üretilmekte Olan Süt ve Peynirlerde Aflatoksin M₁ Aranması. **Tarım ve Köyisleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıdalarda Katkı-Kalıntı ve Bulaşanlarının İzlenmesi II**. Bursa, 80-92.
- Özkaya, Ş., Başaran, A., Topuz, F., Akdemir, Ç., Kaymak, T., Gürer, Ö.F., Akbulut, C., Atak, M., Ergül, M., 2003a. Türkiyede Üretilen Sütlerde Aflatoksin M₁ Aranması. **Ulusal Mikotoksin Sempozyumu**. 18-19 Eylül 2003, İstanbul. 93-98.
- Özkaya, Ş., Temiz, A., 2003b. Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, **1**: 1-21.
- Özmenteşe, N., 2002. **İstanbul Piyasasından Sağlanan Süt ve Süt Ürünlerinin Aflatoksin B₁ ve M₁ İçerikleri Yönünden Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Araştırılması** (Doktora tezi). Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özturhan, K., 2005. **Süt ve Süt Ürünlerinde ELİSA Yöntemiyle Aflatoksin M₁ Aranması** (Yüksek lisans tezi). Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya.
- Papaioannou, D. S., Kyriakis, C. S., Alexopoulos, C., Tzika, E. D., Polizopoulou, Z. S., Kyriakis, S. C., 2004. A Field Study on the Effect of Dietary Use of a Clinoptilolite-Rich Tuff, Alone or in Combination with Certain Antimicrobials, on the Health Status and Performance of Weaned, Growing and Finishing Pigs. **Research in Veterinary Science**, **76**(1): 19-29.
- Parker, W.A., Melnick, D., 1966. Absence of Aflatoxin from Refined Vegetable Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, **43**: 635-638.

- Parlat, S.S., Yıldız, A.O., Oğuz, H., 1999. Effect of Clinopliolite on Performance of Japanese Quail (*Coturnix japonica*) During Experimental Aflatoxicosis. **British Poultry Science**, **40**: 495-500.
- Patterson, D. S. P., Glancy, E. M., Roberts, B.A., 1980. The "Carry Over" of Aflatoxin M₁ into Milk of Cows Fed Rations Containing a Low Concentration of Aflatoxin B₁. **Food and Cosmetic Toxicology**, **18**: 35-37.
- Phillips, T. D., 1999. Dietary Clay in the Chemoprevention of Aflatoxin-Induced Disease. **Toxicological Sciences**, **52**: 118-126.
- Pittet, A., 1998. Natural Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds-an Updated Review. **Revue de Medecine Veterinaire**, **149**(6): 479-492.
- Reddy, S.V., Waliyar, F., 2000. Properties of Aflatoxin and it Producing Fungi. <http://www.icrisat.org/aflatoxin/aflatoxin.asp>. Erişim tarihi: 14.08.2013.
- Sarımehmetoğlu, B., Kuplulu, Ö., Ayçiçek, H., 2003. Detection of the Aflatoxin M₁ in Yogurt by ELISA. **Milchwissenschaft**, **58**(11/12): 643-645.
- Sarımehmetoğlu, B., Kuplulu, O., Çelik, T. H., 2004. Detection of Aflatoxin M₁ in Cheese Samples by ELISA. **Food Control**, **15**: 45-49.
- Seyhan, İ., 1972. **Kaolin, Bentonit, Kil ve Tuğla-Kiremit Toprakları Jeolojisi**, MTA Yayınları, No: 13, 14-17, Ankara.
- Smith, J. E., 1997. **Aflatoxins. Handbook of Plant and Fungal Toxicants**. Edited by J.P. Felix D'Mello. CRC Press. 269-285.
- Some Provinces of Turkey. **Food Control**, **16**: 883-885.
- Stoloff, L., 1980. Aflatoxin M₁ in Perspective. **Journal of Food Protection**, **43**(3): 226-230.
- Şanlı, Y. 2001. **Yem Küflenmeleri, Mikotoksinlerle Bulaşma Sorunu ve Çözüm Yolları. Çiftlik Hayvanlarının Beslenmesinde Temel Prensipler ve Karma Yem Üretiminde Bazı Bilimsel Yaklaşımlar**, ISBN:975-97831-0-X. Farmavet İlaç San. ve Tic. A.Ş. Yayını, İstanbul.
- Tekinşen, K. K., Tekinşen, O. C., 2005. Aflatoxin M₁ in White Pickle and Van Otlı (herb) Cheeses Consumed in Southeastern Turkey. **Food Control**, **16**: 565-568.
- Tunail, N., 2000. **Funguslar ve Mikotoksinler**, 2. Baskı. Editör, Tunail, N. Medisan Yayınevi, 4-34.
- Ueno, S., 1985. The Toxicology of Mycotoxins. **Critical Reviews in Toxicology**, **14**(2): 99-132.

- Ueno, S., 1986. Toxicology of Microbial Toxins. *Pure and Applied Chemistry*, **58**(2): 339-350.
- Unusan, N., 2006. Occurrence of Aflatoxin M₁ in UHT Milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, **44**: 1897–1900.
- Van Egmond, H. P., 1983. Mycotoxin in Dairy Products. *Food Chemistry*, **11**(4): 289-307.
- Van Egmond, H. P., 1989a. *Aflatoxin M₁: Occurrence, Toxicity, Regulation* In: V. H. P. Egmond (Edit.), *Mycotoxins in Dairy Products*, Elsevier, London and New York, 11-54.
- Van Egmond, H. P., 1989b. Current Situation on Regulations for Mycotoxins. Overview of Tolerances and Status of Standard Methods of Sampling and Analysis. *Food Additives and Contaminants*, **6**: 139-188.
- Van Egmond, H.P., 1999. Worldwide Regulations for Mycotoxins. Third Joint FAO/WHO/UNEP *International Conference on Mcotoxins*. Tunisia. 3-6 March 1999.
- Wild, C.R., Pionneau, F.A., Montesano, R., Mutiro, C.F., Chetsanga, C.J. 1987. Aflatoxins Detected in Human Breast Milk by Immunoassay. *International Journal of Cancer*, **40**: 328-333.
- Wood, G.E., 1992. Mycotoxins in Foods and Feeds in the United States. *Journal of Animal Science*, **70**: 3940–3949.
- Yalçın, M., 1997. *Çevresel Kirlilik Şartlarının Bentonit Kilinin Şişme/Büzülme Özelliklerine Etkisi* (Yüksek lisans tezi). Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yaroğlu, T., Oruç, H. H., Tayar, M., 2005. Aflatoxin M₁ Levels in Cheese Samples from Some Provinces of Turkey. *Food Control*, **16**: 883-885.

EKLER

Ek 1. 1 litre sütün içerdđi protein, yağ, karbonhidrat, vitamin, tuz ve suyun ortalama oranları (Keskin, 1982)

Su	860-900 g
Yağ ve yağda çözünen maddeler	
Süt yağı	35-40 g
Lesitin	0.3-0.5 g
Kolesterolin	0.1-0.15 g
Karotenoidler	0.1-0.6 mg
A, D, E vitaminleri	1.5-2.0 mg
Proteinler	
Kazein	25-30 g
Laktalbumin	4-5 g
Laktoglobumin	0.5-1 g
Karbonhidrat	
Laktoz	45-50 g
Tuzlar	9-9.5 g
Suda çözünen maddeler	
B vitamini	1.9-3.6 mg
C vitamini	60-100 mg
Pantotenik asit	2.8-3.6 mg
Gazlar	
CO ₂	100 mg
N ₂	15 mg
O ₂	7.5 mg

Ek 2. Çeşitli ülkelerde süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen maksimum AFM₁ düzeyleri (Van Egmond, 1989a)

Ülkeler	Ürün	Maksimum Limit (µg/kg-l)
Belçika	Süt, süt tozu, kondanse süt	0.10
Romanya	Süt ve mamülleri	0
Avusturya	Çocuk ve bebekler için pastörize sütler	0.01
	Diğer sütler ve süt ürünleri	0.05
	Tereyağı	0.02
	Peynir	0.25
Çekoslovakya	Süt	0.05
ABD	Süt ve ürünleri	0.50
Brezilya	Süt ve ürünleri	0.50
İsviçre	Süt, süt tozu, kondanse süt	0.05
	Bebekler için süt	0.01
İsveç	Sıvı süt ürünleri	0.05
Hollanda	Süt ve diğer sıvı süt ürünleri	0.05
	Peynir	0.20
	Tereyağı	0.02
Almanya	Süt	0.05
	Bebek sütleri	0.01
Rusya	Süt ve süt ürünleri	0.05
	Çocuk gıdaları	0
Avrupa Birliği	Süt ve süt ürünleri	0.05
Türkiye	Süt	0.05
	Peynir	0.25
	Çocuk gıdaları	0.025

Ek 3. Mikotoksin çeşitleri, kaynakları, hedef hayvan, doku veya organlar (Kaya ve ark, 2002)

Mikotoksinler	Mantar çeşidi	Hedef organ, doku ve oluşan etki	Etkilenen hayvan
Aflatoksinler	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A.parasiticus</i> <i>P.puberulum</i>	Karaciğer; gelişme hızı ve veriminde azalma; sarılık, kanama, sürgün, karaciğer kanseri, bağışıklık sisteminin baskılanması	Tüm hayvan türleri, insanlar
Sitrinin	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Aspergillus terreum</i>	Sinirsel belirtiler sürgün gelişme geriliği, karaciğer ve böbrek nekrozu, kalp ve iskelet kasında rniyopati, karaciğer kanseri	Kanatlılar, dornuzlar
Okratoksin	<i>A. ochraceus</i> <i>P. viridicatum</i>	Karaciğer ve böbrek hasarı, iştah kaybı, sürgün, bağışıklık sisteminin baskılanması	Kanatlılar, insanlar
Patulin	<i>A. clavatus</i> <i>P. patulum</i>	Sinirsel belirtiler, beyin kanaması, deri kanseri	Sığırlar
Sterigmatosistin	<i>A. versicolor</i>	Karaciğer kanseri	Tüm hayvan türleri
Aspertoksin	<i>A. nidulans</i>		
Penisillik asit	<i>P. puberulum</i> <i>A. ochraceus</i>	Deri kanseri, kanamalar	Tüm hayvan türleri
Rubratoksin	<i>P. rubrum</i>	Aflatoksinlere benzer	Tüm hayvan türleri
Luteoskirin	<i>P. islandicum</i>	Karaciğer hasarı ve kanseri	Kanatlılar
Sikloklorotin	<i>P. rugulosum</i>		
Rugulosin			
Zearalenon (F-2 toksin)	<i>F. roseum ve diğer</i>	Ostrojenik etki	Gevişenler, domuzlar
Sporidesmin	<i>Fusarium türleri</i> <i>S. bakeri</i>	Karaciğer hasarı, safra kanalı tıkanması, ışığa aşırı duyarlılık	Gevişenler
Trikotesenler	<i>Fusarium</i> <i>Trikoderma</i> , <i>Sefalosporium vb.</i>	Dermatit, deride nekroz, kanamalar, anemi, granülositopeni vb.	Tüm hayvan türleri
Streoviridin	<i>P.citreoviridae</i>	MSS, kalp ve solunum felci, çarpınmalar	Tüm hayvan türleri
Butenolid	<i>F. tricinctum</i>	Bacaklarda gangren, kuyrukda nekroz	Sığırlar
Penitremler	<i>Penisilium türleri</i>	Kas titremeleri, felç, çarpınmalar	Tüm hayvan türleri
Lolitremler	<i>Acremonium loliae</i>	Tremorlar, hareket düzensizlikleri, çarpınmalar, şok, spazm gibi	Gevişenler, at
Fumonisinler	<i>Fusarium türleri</i>	Beyin ve akciğer yangısı	At, domuz, kanatlılar
4-ipomeanol	<i>Fusarium solanii</i>	Akciğer ödemi, pnömoni, amfizem	Sığırlar
Kojik asit	<i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i>	Çarpınmalar, ödem	Tüm hayvan türleri
Okzalik asit	<i>A. niger</i> <i>A. oxalicum</i>	Mide irkiltisi, MSS ve böbrek hasarı, kanama, kan kalsiyumunda azalma	Tüm hayvan türleri
Ergot alkaloidleri	<i>C. purpurea</i> <i>C. paspali</i>	Kuru gangren, aşırı uyarı, kanın pıhtılaşması	Tüm hayvan türleri
Satratoksinler	<i>Stachybotrys atra</i>	Kemik iliği, deri, mukozalar	Tüm hayvan türleri
Sitakalasanlar	<i>Aspergillus</i> , <i>Zygosporium</i> , <i>Nigrosabulum vb.</i>	Hücre zarları, pıhtılaşma, fagasitoz vb.	Tüm hayvan türleri
Territremler	<i>A. terreus</i>	MSS, tremorlar, nöro-musküler kavşaklar	Tüm hayvan türleri
Psoralenler	<i>S. sclerotiorum</i>	Deri yangısı	Tüm hayvan türleri

ÖZ GEÇMİŞ

Hüseyin SAĞ 1987 yılında Bingöl ili Kiğı ilçesinde doğdu. İlkokul öğrenimini Fatih İlköğretim Okulu, ortaokul öğrenimini Yusuf Ziya Değnekçi İlköğretim Okulu ve lise öğrenimini ise Fuat Dağıstan Çok Programlı Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimine 2004 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünde başladı. Bu bölümden 2008 yılında mezun oldu. Mezuniyet tarihinden itibaren özel sektördeki farklı gıda işletmelerinde gıda mühendisi olarak görev yaptı. 2012 yılında Fırat Üniversitesi, Karakoçan Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümüne öğretim görevlisi olarak atandı. Evli ve bir çocuk babasıdır.