

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

**KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ'NDE TÜKETİLEN SÜT
ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN M₁ DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Cengiz BEREKET

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2021

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

**KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ'NDE TÜKETİLEN SÜT
ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN M₁ DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Cengiz BEREKET

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Gözde GİRGİN**

ANKARA

2021

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ'NDE TÜKETİLEN SÜT
ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN M₁ DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ezc. Cengiz BEREKET

Danışman: Doç. Dr. Gözde GİRGİN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Gönül Şahin

Bu tez çalışması 22.01.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof.Dr. Aylin GÜRBAY*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Doç.Dr. Gözde GİRGİN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof.Dr. Ü.Pınar ERKEKOĞLU*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç.Dr. Hande SİPAHİ*
(Yeditepe Üniversitesi)

Üye: *Doç.Dr. Suna SABUNCUOĞLU*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

3/02/2021

Cengiz BEREKET

i

¹ “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Gözde Girgin danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Cengiz Bereket

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında değerli zamanını bana ayıran, bilgisini, deneyimlerini aktaran, gerek maddi gerek manevi yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın **Doç.Dr. Gözde Girgin**'e,

Yüksek Lisans eğitimimin deney aşamasında, özellikle de HPLC kullanımında hiçbir mecburiyeti yokken tüm bilgi birikimini benimle paylaşan ve değerli vaktini bana ayıran sevgili hocam Sayın **Prof. Dr. Müberra Koşar**'a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca emeğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımda her zaman destek olan değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Gönül Şahin**'e,

Yüksek Lisans eğitimimde karşıma çıkan çeşitli sebeplerden dolayı beklenen tarihte tezimi veremesem de, bu süreçte akıl sağlığımı koruyup, kendimi motive edebildiğim için **Kendim**'e,

Tez çalışmamın her aşamasında, tüm bu yorucu ve stresli süreçte bana destek olan, yardımlarını ve sabrını esirgemeyen başta partnerim **Fezile Osum** olmak üzere **Aile**'me,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Bereket C., Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde Tüketilen Süt Örneklerinde Aflatoksin M₁ Düzeylerinin Araştırılması, Hacettepe Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. AFM₁, sitokrom P450 enzimleri tarafından karaciğerde oluşan ve memelilerin idrar, dışkı ve sütüne salgılanabilen, AFB₁'in hidroksillenmiş metabolitidir. AFM₁ karsinojen, sitotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik bir ajan olduğundan, hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde önemli sağlık riskleri teşkil etmektedir. Bu çalışma, KKTC'de tüketilen çiğ ve UHT inek sütlerinde AFM₁ varlığını tespit etmek ve halk sağlığı açısından risk oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, KKTC'de üretilen ve piyasada tüketime sunulan 2 süt markasından toplam 20 UHT inek sütü ve farklı mandıralardan toplanmış 22 adet çiğ inek sütü örneği, immünoafinite kolon saflaştırmasından sonra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)-floresan belirleme ile AFM₁ varlığı yönünden analiz edilmiştir. Analiz edilen çiğ ve UHT inek sütü örneklerinin hiçbirinde AFM₁ tespit edilebilecek düzeyde bulunamamıştır. HPLC-FLD yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 1,038 ve 3,145 µg L⁻¹ olarak bulundu. Kör numunelerine üç farklı düzeyde AFM₁ standart çözeltisi ilave edilerek analiz edilmesi sonucu elde edilen yöntemin ortalama geri kazanım ve tekrarlanabilirlik değerleri sırasıyla, % 95,6 ve % 4,9 olarak bulundu. Bu değerler yöntemin güvenilirliğini kanıtlamaktadır. Sonuç olarak, KKTC'de tüketilen süt örneklerindeki AFM₁ içeriği, halk sağlığı açısından önemli bir risk teşkil etmese de, daha fazla sayıda süt örneğinin ve hayvan yeminin sürekli takibi, olası tüketici maruziyetini azaltmak için gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Mikotoksin, Aflatoksin, Aflatoksin M₁, Süt, HPLC-FLD

ABSTRACT

Bereket C., Investigation of Aflatoxin M1 Levels in Milk Samples Consumed in the Turkish Republic of Northern Cyprus, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Msc Thesis in Pharmaceutical Toxicology Program, Ankara, 2021. AFM₁ is the hydroxylated metabolite of AFB₁, and it is formed in the liver by cytochrome P450 enzymes and can be secreted into the urine, feces and milk of mammals. Since AFM₁ is a carcinogenic, cytotoxic, teratogenic, mutagenic and genotoxic agent, it poses a significant health risk to both humans and animals. This study was conducted to determine the presence of AFM₁ in raw and UHT cow milk consumed in the Turkish Republic of Northern Cyprus (TRNC) and to determine whether it poses a risk to public health. In the survey, a total of 20 UHT cow milk samples from 2 milk brands produced in the TRNC and offered for consumption in the market and 22 raw cow milk samples collected from the different dairies were analyzed for the presence of AFM₁ by high performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence detection after immunoaffinity cleanup. AFM₁ could not be detected in any of the analyzed raw and UHT cow milk samples. The LOD and LOQ values of the HPLC-FLD method were 1.038 and 3.145 µg L⁻¹, respectively. The mean recovery and repeatability values of the method, which obtained by spiking and analyzing blank samples at three fortification levels were 95.6% and 4.9%, respectively. These values prove the reliability of the method. Although AFM₁ content in milk samples consumed in the TRNC does not pose a significant risk to public health, continuous monitoring of more milk samples and animal feed is necessary to reduce possible consumer exposure.

Key Words: Mycotoxin, Aflatoxin, Aflatoxin M₁, Milk, HPLC-FLD

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikotoksinler	3
2.2. Aflatoksinler	7
2.3. AFB ₁ 'in Metabolizması ve Etki Mekanizması	10
2.3.1. Metabolizma	10
2.3.2. Etki Mekanizması	15
2.4. Aflatoksin M ₁	26
2.4.1. AFM ₁ Toksisitesi	27
2.4.2. Süt ve Süt Ürünlerinde AFM ₁ ile İlgili Düzenlemeler	28
2.5. Mikotoksin Kontaminasyonunun Önlenmesi ve Detoksifikasyon Yöntemleri	30
2.5.1. Mikotoksin Kontaminasyonunun Önlenmesi	36
2.5.2. Kontamine Olmuş Yemlerde Mikotoksinlerin Dekontaminasyonu	45
2.6. Sütte AFM ₁ Dekontaminasyonu	73
2.6.1. Kimyasal Dekontaminasyon Yöntemleri	73
2.6.2. Kil Bazlı Yem Dekontaminasyonu	74
2.6.3. Kil Bazlı Süt Dekontaminasyonu	75
2.6.4. Mikrobiyal Dekontaminasyon	75
2.6.5. Mikroorganizmaların İleriye Dönük, Muhtemel Endüstriyel Uygulamaları	78

2.6.6. Spesifik Antikorlar Tarafından Nötralizasyon	79
2.7. AFM ₁ Tespiti için Kullanılan Analitik Yöntemler	79
3. GEREÇ ve YÖNTEM	82
3.1. Gereç	82
3.1.1. Süt Örneklerinin Toplanması	82
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	82
3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	83
3.2. Yöntem	83
3.2.1. Analiz İçin UHT İnek Sütü Örneklerinin İmmünoafinite Kromatografisi ile Temizlenmesi	84
3.2.2. Analiz İçin Çiğ İnek Sütü Örneklerinin İmmünoafinite Kromatografisi ile Temizlenmesi	84
3.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Analizi	85
3.2.4. Metodun Doğrulanması	85
3.2.5. İstatistiksel Analizler	86
4. BULGULAR	87
4.1. Süt Örneklerinde AFM ₁ Düzeyleri	87
4.2. AFM ₁ Kalibrasyon Eğrisi Verileri	88
4.3. Yöntemin Geri Kazanım Oranları ve Hesap Limit Değerleri	90
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ	96
7. KAYNAKLAR	97
8. EKLER	116
EK-1. Turnitin Orjinallik Raporu	116
EK-2. Turnitin Dijital Makbuzu	117

SİMGELER ve KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADTZ	Aflatoksin-detoksifizim enzimi
AFAR	Aflatoksin aldehit redüktaz
AFB₁	Aflatoksin B ₁
AFB₁S	Aflatoksin B ₁ 15 α -sodyum sülfonat
AFB₁-FAPY	Aflatoksin B ₁ -formamidopirimidin
AFB₁-N⁷-Gua	8,9-dihidro-8-(N ⁷ -guanil)-9-hidroksiaflatoksin B ₁
AFB₂	Aflatoksin B ₂
AFB_{2a}	Aflatoksin B _{2a}
AFBO	Aflatoksin B ₁ -8,9-epoksit
AFG₁	Aflatoksin G ₁
AFG₂	Aflatoksin G ₂
AFH₁	Aflatoksin H ₁
AFL	Aflatoksikol
AFM₁	Aflatoksin M ₁
AFM₂	Aflatoksin M ₂
AFP₁	Aflatoksin P ₁
AFQ₁	Aflatoksin Q ₁
Akr	Akrolein
Anb	Antikor
An-AFB₁	Anaflatoksin B ₁
AP	Apuridik
A_w	Su aktivitesi

CAT	Katalaz
CYP	Sitokrom P450
DART-MS	Gerçek zamanlı doğrudan analiz- kütle spektrometrisi
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPEP	Dipeptidaz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBI	Elektron ışınlama
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EGM	Esterleştirilmiş glükomannan
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent analizi
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
ES	Elektrolize su
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FLD	Floresans dedektörü
GC	Gaz kromatografisi
GGT	Gamma-glutamiltanspeptidaz
GPx	Glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
HACCP	Tehlike analizi ve kritik kontrol noktaları
HBV	Hepatit B virüsü
HCl	Hidroklorik asit
HClO	Hipokloröz asit
HCV	Hepatit C virüsü
HNE	4-hidroksi-2-nonenal

HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLC-FLD	Floresans dedektörü ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLC-MS/MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HSCAS	Hidrate sodyum kalsiyum aluminosilikat
HSK	Hepatoselüler karsinom
IAC	İmmünoafinite kolonları
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
KKTC	Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti
LAB	Laktik asit bakterileri
LC	Sıvı kromatografisi
LOD	Tespit limiti
LPO	Lipid peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MOS	Mannanoligosakkarit
MS	Kütle spektrometrisi
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
NAT	N-asetiltransferaz
NQO1	Kinon oksidoredüktaz-1
ODH	Oksidatif DNA hasarı
ONE	4-okso-2(E)-nonenal
OS	Oksidatif stres

PBS	Fosfat tamponlu salin
Rib.	Riboflavin
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
ROT	Reaktif oksijen türü
SOD	Süperoksit dismutaz
SPI	Standart yağış indeksi
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
UGT	Üridin 5'-difosfo-glukuronosiltransferaz
UHT	Ultra yüksek ısı
UPLC-MS/MS	Ultra performanslı sıvı kromatografisi- tandem kütle spektrometresi
UV	Ultraviyole
UVC	Ultraviyole C
VDR	Vitamin D reseptörü
YCW	Maya hücre duvarı
8-okso-dG	7,8-dihidro-8-okso-2'-deoksiguanozin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Farklı aflatoksinlerin kimyasal yapısı.	8
2.2. AFB ₁ 'in P450 aracılı metabolik yolu.	11
2.3. AFBO'nun biyolojik yazgısı.	13
2.4. Oksidatif stres ve AFBO'nun aracılık ettiği başlıca AFB ₁ toksisite mekanizmaları.	16
2.5. Mikotoksin düzenlemeleri kapsamındaki dünya nüfusunun yüzdeleri.	29
2.6. 2003 yılı sonunda, sütte AFM ₁ için uygulanan dünya çapında limitler.	30
2.7. Tahıllarda küf birikmesine ve müteakip mikotoksin üretimine katkıda bulunan faktörler.	35
2.8. Mikotoksinler için alışıl gelmiş önleme ve dekontaminasyon stratejileri.	36
2.9. Silo yönetiminde silolamayı etkileyen faktörler.	41
2.10. Mikotoksin adsorbe edici ajanların sınıflandırılması.	54
4.1. AFM ₁ düzeyi tespit edilemeyen uht inek sütü numunesinin HPLC kromatogram örneği.	87
4.2. AFM ₁ düzeyi tespit edilemeyen çiğ inek sütü numunesinin HPLC kromatogram örneği.	88
4.3. AFM ₁ standart solüsyonlarının kalibrasyon eğrisi.	89
4.4. 20 ppb konsantrasyonda AFM ₁ standart çözeltisine ait kromatogram.	89
4.5. Standart ilave edilmemiş 17 no'lu süt örneğine ait kromatogram	91
4.6. 5 ppb AFM ₁ standartı içeren 17 no'lu süt örneğine ait kromatogram	92
4.7. 5 ppb konsantrasyonda AFM ₁ standardının kromatogramı	93

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Mantar türleri ve ilgili mikotoksinlerin listesi.	5
2.2. Süt ve süt ürünlerinde, ülkelere göre AFM ₁ 'in maksimum kabul limiti.	31
2.3. Yemlerde AFB ₁ için izin verilen maksimum seviyeler.	33
2.4. ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nin yemdeki toplam aflatoksinler için belirlediği önlem seviyeleri.	33
2.5. Termal gıda işleme yöntemleri ile AFB ₁ indirgeme çalışmaları.	50
2.6. Mikotoksinlerin farklı adsorbanlar tarafından adsorpsiyonu üzerine <i>in vitro</i> çalışmalar.	56
2.7. Mısır ve buğdaydaki aflatoksinlerin ozon tarafından indirgenmesi.	63
2.8. Aflatoksin dekontaminasyonuna yönelik sulu bitki ekstraktlarının kullanımı üzerine yapılmış yakın tarihli <i>in vitro</i> çalışmalar.	65
2.9. Gıda ürünlerinde veya hazırlanmış mediyumlarda aflatoksinin dekontaminasyonu için, mikroorganizmanın tek başına veya başka bir mikroorganizma ile kombinasyon halinde kullanılması.	69
2.10. Çeşitli bakteri, maya ve toksijenik olmayan mantar suşları kullanılarak, aflatoksinlerin bozunması.	70
2.11. Aflatoksin bozunmasına yönelik yakın zamanda çalışılmış enzimler ve diğer mikrobiyal ilişkili yöntemler.	72
2.12. Saflaştırılmış enzimler ile AFB ₁ bozunması.	73
2.13. Mikroorganizmaların, sütte AFM ₁ 'in çıkarılmasına yönelik etkinliği.	77
3.1. Eylül 2020 yılı için KKTC. Meteoroloji dairesi verileri.	82
4.1. Tekrarlanabilirlik ve geri kazanım verileri.	90

1. GİRİŞ

Küf mantarları, belirli nem ve ısı koşullarında, ham ve işlenmemiş materyalde çoğalarak bir yandan ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip bozulmasına neden olurken, diğer yandan da mikotoksin adı verilen toksik metabolitleri oluşturur (1). Bir ülkenin ekonomik durumunun kötü olması, genellikle küf gelişimi ve mikotoksin üretimi için uygun olan hatalı depolama koşulları nedeniyle mahsul kontaminasyonu riskini ve kapsamını artırır. Mikotoksinler, kimyasal olarak farklı yapılara sahip; hasat öncesi, hasat sırasında ve hasat sonrası, her aşamada çeşitli ekinlerin üzerinde oluşabilen, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* başta olmak üzere bazı mantarların oluşturdukları fungal sekonder metabolitlerdir. Mikotoksinler çeşit ve miktarlarına bağlı olarak oral, inhalasyon veya dermal yollarla maruz kalındığında insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir (2).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün tahminlerine göre, dünya çapında üretilen tarım ürünlerinin yaklaşık % 25'inde mikotoksin kontaminasyonu söz konusudur (3). Dolayısıyla, mikotoksinler insan sağlığına ek maliyet oluşturması ve kontamine tarım ürünlerinin tüketilememesi açısından dünya çapında her yıl milyonlarca dolar kayıp oluşturmaktadır (4). Bu nedenle, mikotoksinler, gıda güvenliğinin sağlanması ve insan ve hayvan sağlığı üzerinde oluşturabileceği risklerin azaltılabilmesi için kontrol altına alınması gereken önemli küresel sorunlardan biridir.

Aflatoksinler, başta *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* suşları olmak üzere, *Aspergillus* familyasına ait küf mantarları tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir (5). Aflatoksinler, çeşitli laboratuvar ve çiftlik hayvanlarında kanıtlanmış toksik ve kanserojen etkileri ve insanlarda akut toksikolojik ve kronik hepatokarsinojenik etkileri nedeniyle en yoğun şekilde araştırılan mikotoksin grubudur ve varlığı, tahıl ürünleri ve kuruyemiş başta olmak üzere çeşitli gıda ürünlerinde saptanmıştır (6). Aflatoksinler arasında aflatoksin B₁ (AFB₁), en iyi bilinen insan hepatokarsinojeni ve en güçlü hepatotoksindir (7,8). Aflatoksinlerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu akut ve kronik seyirli mikotoksikoz, aflatoksikoz olarak adlandırılmakta ve çok çeşitli olumsuz sağlık etkilerine neden olmaktadır (9,10). Aflatoksinlerin toksik etkileri hepatotoksisite, hepatokarsinojenite,

nefrotoksisite, mutajenite, teratojenite, immunotoksisite ve büyümenin gerilemesi ile ilişkilendirilmiştir (11,12).

AFB₁ ile kontamine olmuş yemlerle beslenen sağmal ineklerin sütünde rastlanan, AFB₁ metabolizmasının bir ürünü olan, fakat daha az biyolojik etki gösteren hidroksile metabolit aflatoksin M₁ (AFM₁), Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) tarafından “Grup I” karsinojen (insanlar için kesin karsinojen) olarak sınıflandırılmıştır (13–15). İnsanlar bu aflatoksin, özellikle en düşük kaliteli tahılın hayvan yemi için kullanıldığı bölgelerde, anne sütü dahil olmak üzere süt ve süt ürünleri yoluyla maruz kalabilmektedir. Kontamine olmuş bu ürünlerin insanlar tarafından tüketilmesi ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. AFM₁'in *in vivo* olarak, ana bileşik AFB₁'in yaklaşık % 10'u kadar kanserojenite ve *in vitro* olarak, AFB₁'in yaklaşık % 10'u kadar mutajenite potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (14,16). AFM₁ ve yan ürünlerinin sütteki varlığı dünya çapında bir endişe yaratmaktadır; çünkü bu metabolitlerin düşük düzeylerde bile olsa sütte bulunması, gerek çocuk gerekse de yetişkinler gibi büyük miktarlarda süt tüketicileri açısından, özellikle uzun süreli maruziyette önem taşımaktadır.

Süt ve süt ürünleri bebeklerin, çocukların ve yetişkinlerin beslenmesinde ana besin kaynağı olmasına rağmen, bilgimiz dahilinde, özellikle Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde (KKTC) tüketilen süt örneklerinde AFM₁ düzeylerinin saptanmasına dair herhangi bir literatür verisi bulunmazken, Kıbrıs geleneksel peyniri, Hellim örneklerinde AFM₁ düzeylerinin saptanmasına dair yalnızca bir araştırma Öztürk ve ark. (17) tarafından rapor edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında planlanan bu tez çalışmasında, KKTC'de üretilen çeşitli süt firmalarından toplanacak olan ultra yüksek ısı (UHT) inek sütü ve çiğ süt gibi farklı işlemlere tabi tutulmuş ve işlem görmemiş olan örneklerde AFM₁ düzeylerinin ölçülmesi ve mevcut limitler açısından değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, küf mantarlarının normal metabolizmalarında belirgin bir fonksiyonu olmayan, birçok toksik mantarın sekonder metabolizması ile doğal olarak oluşan, çeşitli kimyasal yapılarda, çoğunlukla küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerden oluşan bir toksin grubudur. Mikotoksinler, çok çeşitli gıda ve yemlerde yaygın olarak ortaya çıkabildiği için; tarladaki tarım ürünlerinden tüketicinin tabağına kadar tüm gıda zincirini kontamine edebilirler. Kümes hayvanları, balıklar ve memeliler dahil olmak üzere çok çeşitli hayvan türleri için toksiktirler (18–20).

Mikotoksin kelimesi Yunan ve Latince kelimelerin birleşiminden türetilmiştir. Yunancada "*mykes*" kelimesi "mantar" anlamına gelirken, Latince "*toxicum*" kelimesi "zehir" anlamına gelir (21). Mikotoksinler, 1800'lerden bu yana insanlık tarafından ergot alkaloitlerinin neden olduğu '*St. Anthony's Fire*' ve Rusya'da II. Dünya Savaşı sırasında T-2 toksinlerinin neden olduğu "*Alimentary Toxic Aleukia*" ile bilinmektedir. Fakat o tarihlerde bu hastalıklara mikotoksinlerin neden olduğu anlaşılmamış ve ancak 1960'larda İngiltere'de 'Hindi X hastalığı'nın patlamasıyla, mikotoksinler araştırmacıların ilgisini çekmiştir. 'Hindi X hastalığı' Brezilya'dan ithal edilen, mantarlarla kontamine olmuş yer fıstığı kuspesi tüketiminden dolayı 100.000 hindi civcivinin ölümüyle sonuçlanmıştır. Bu hastalığın ortaya çıkmasından sonra, aflatoksinlerin 'Hindi X hastalığı'na neden olan ajanlar olduğu tespit edilmiş ve mikotoksinler dikkate değer toksinler olarak bilim dünyasında yerini almaya başlamıştır (21,22).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün tahminlerine göre, dünya çapında üretilen ürünlerin yaklaşık % 25'i mikotoksinlerle kontamine olmakta ve bu da milyarlarca dolarlık ekonomik zarara yol açmaktadır (3). ABD'deki yıllık ekonomik kaybın, hayvan yemindeki mikotoksin kontaminasyonu nedeniyle yaklaşık 243 milyon dolar olduğu rapor edilmiştir (23). Mikotoksinlerin çiftlik hayvanlarının verimliliği üzerindeki etkileri, mahsul kayıpları ve mikotoksinlere yönelik düzenleyici programların maliyeti bu ekonomik kaybın ana nedenlerini oluşturmaktadır (24).

İzole edilmiş ve kimyasal olarak tanımlanmış 300'den fazla mikotoksin arasında, gıda maddelerinde önemli seviyelerde ve sıklıkta yaklaşık olarak sadece 20 mikotoksinin olduğu ve gıda güvenliği açısından endişe yarattığı bilinmektedir (18). Mikotoksinler esas olarak *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* gibi 5 mantar türü tarafından üretilirler. Tek bir mantar türü bir veya daha fazla mikotoksin üretebilir ve farklı mantar türleri de bireysel mikotoksinler üretebilirler; bu nedenle birlikte ortaya çıkan mikotoksinlerin gıdaları veya yemleri kontamine etme olasılığı daha muhtemeldir. En sık ortaya çıkan ve toksikolojik olarak bilinen mikotoksinler aflatoksinler, okratoksinler, fumonisinler, zearalenon, trikotesenler, patulin ve ergot alkaloidleridir (2,4,25). Çeşitli gıda ürünlerinde meydana gelen bazı ana mikotoksinler ve bunların önemli sağlık riskleri Tablo 2.1.'de listelenmiştir.

Tarım ürünlerinde küf mantarlarının gelişmesi ve mikotoksin üretimi, tarlada hasat öncesinde, hasat sonrasında, kurutma, işleme, depolama ve nakliye sırasında meydana gelebilmektedir (19). Sıcaklık, substrat tipi, nem içeriği, bağıl nem, su aktivitesi (a_w), pH, havalandırma, diğer mantarların ortamda bulunması, mikrobiyal etkileşimlerden kaynaklanan fiziksel hasar, böcek istilaları, fungusitlerin uygulanması, saklama şekli ve saklama süresi gibi çeşitli ekolojik ve çevresel faktörler mantar gelişimine ve toksin üretimine katkıda bulunurlar. Mikotoksinlerin kararlı yapıları sebebiyle, gıda ve yem zincirine bir kere girdikten sonra çıkarılması son derece zorlaşır. Bu nedenle, yukarıda bahsetilen faktörler dikkate alındığında, iyi tarım ve hasat uygulamaları, uygun kurutma, paketleme, yükleme işlemi, nakliye ve depolama koşulları mantar gelişimini önleyip, mikotoksin üretimi riskini bir dereceye kadar azaltabilir (2,23,25,26).

İnsan sağlığı riskine yol açan mikotoksinlere maruz kalma, genellikle kontamine bitki ürünlerinin doğrudan tüketimi veya kalıntı miktarlarda mikotoksin içeren et, süt ve yumurta gibi hayvan kaynaklı ürünlerin dolaylı olarak tüketiminden kaynaklanmaktadır. Mikotoksinler, fumonisin gibi bazı istisnalar dışında lipofilik özellikleri nedeniyle bitki ve hayvanların yağ fraksiyonunda birikme eğilimindedirler. Fakat bitki ürünlerinde bulunan mikotoksin konsantrasyonları, hayvan dokularında bulunanlardan önemli ölçüde daha yüksektir ve bundan dolayı hayvansal kaynaklı ürünlerdeki kalıntılar; yüksek derecede süt ve süt ürünü

tüketicileri olan bebekler ve çocuklar hariç, insanlarda mikotoksin maruziyetinin küçük bir yüzdesine katkıda bulunurlar (4,23,27).

Tablo 2.1. Mantar türleri ve ilgili mikotoksinlerin listesi.

Mikotoksinler	Kısaltma	Mantar Türleri	Gıda ürünleri	Toksik etki
Aflatoksinler (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂)	AFB ₁ AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂ AFM ₁ AFM ₂	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nominus</i> , <i>A. tamari</i>	Fıstık, mısır, buğday, pirinç, yağlı tohumlar, baharatlar, kuru meyveler, süt, peynir, incir, otlar	Mutajenik, kanser ojen, hepatotoksik, immünoşüpresif
Sitrinin	CTN	<i>P. citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i>	Buğday, arpa, mısır, pirinç	Nefrotoksik, kanserojen
Deoksinivalenol (tip B trikotesenler)	DON	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. cerealis</i>	Mısır, buğday, arpa, yulaf	Kusma, ishal, immünoşüpresif
Fumonisin (B ₁ , B ₂)	FB ₁ FB ₂	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. Avenaceum</i> , <i>F. nivale</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i>	Mısır, buğday	Böbrek ve karaciğer tümörleri
Okratoksin A	OTA	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. flavus</i> <i>P. viridicatum/verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Tahıllar, fasulye, fıstık, peynir, kahve, kurutulmuş meyveler, üzüm, şarap	Nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik, Kanserojenik
Patulin	PAT	<i>P. patulum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>B. nivea</i> <i>A. giganteus</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P.</i> <i>griseofulvum</i>	Üzüm, elma, elma suyu, diğer meyveler	Subkütan sarkomalar, kanama, kanserojenik
T-2 toksin (tip A trikotesenler)	T-2	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F.</i> <i>equiseti</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F.</i> <i>solani</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F.</i> <i>roseum</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. tricinatum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichiella</i> , <i>F.</i> <i>graminearum</i>	Mısır, buğday, arpa, yulaf	Emetik, sitotoksik, teratojenik
Zearalenone	ZEN	<i>F. graminearum</i> , <i>F.</i> <i>tricinatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F.</i> <i>equiseti</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F.</i> <i>verticillioides</i> , <i>F.</i> <i>incarnatum</i>	Mısır, saman	Hiper-östrojenik, çocuk düşürme

Mikotoksinlerin hem hayvan hem de insan sađlıđı üzerindeki olumsuz etkisi mikotoksikoz olarak adlandırılır ve Őiddeti; mikotoksinin toksisitesi, tűrű, dozu, maruz kalma derecesi, hayvan cinsi, cinsiyet, yaŐ, stres seviyeleri, bireyin beslenme durumu ve maruz kaldıkları diđer kimyasalların olası sinerjistik etkileri gibi faktűrlere bađlıdır (4,26). Mikotoksikozu karakterize eden tanı űzellikleri Őu Őekilde űzetlenebilir; (i) BulaŐıcı bir hastalık deđildir, (ii) İlaç ve antibiyotik tedavileri hastalıđın ortadan kaldırılmasında çok az etki gűsterir veya hiç etki gűstermez, (iii) Hastalık salgını genellikle mevsimseldir ve genellikle belirli bir gıda maddesi ile iliŐkilidir, (iv) Őűpheli gıdalar incelendiđinde mantar aktivitesi belirtileri sıklıkla gűrűlűr (2). Mikotoksinler hem akut hem de kronik toksisite oluŐturabilir. Akut toksisite, hızlı baŐlangıç ve ani űlűm dahil belirgin bir toksik yanıt ile karakterize edilen yűksek dűzeyde bir maruziyetten kaynaklanırken; kronik toksisite kanserler de dahil olmak űzere çeŐitli toksik yanıtlar ile karakterize edilen, uzun bir sűre boyunca dűŐűk dozda mikotoksinlere maruz kalmaktan kaynaklanır. Vűcűttaki tűm sistemler mikotoksinler için biyolojik hedef olabilmektedir. Mikotoksinler insanlarda hemorajik, hepatotoksik, nefrotoksik, nűrotoksik, űstrojenik, teratojenik, imműnosűpresif, mutajenik ve kanserojenik olmak űzere çeŐitli toksik etkiler gűsterirler. Toksik etkiler organizmada akciđerler, karaciđer, merkezi sinir sistemi, sindirim sistemi ve kardiyovaskűler sistem űzerinde komplikasyonlar meydana getirebilir (20,25). Mikotoksinlerin akut yűksek doz alımında hepatotoksisite, nefrotoksisite ve hatta bazı durumlarda űlűm gűzlenirken; genotoksisite, karsinojenite ve űreme bozuklukları kronik tűketimde gűzlenen baŐlıca toksik etkilerdir (23). Mikotoksinlere en sık maruziyet oral yolla olsa da, toksisite inhalasyon veya dermal yol ile maruziyet sonucu da ortaya çıkmaktadır (20). űte yandan, her ne kadar yem alımıyla mikotoksin maruziyeti hayvanlarda akut zehirlenmeye neden olsa da, semptomlarda bűyűk çeŐitlilik gűsteren subakut zehirlenmelere modern tarım uygulamalarında daha sık rastlanır. Subklinik etkiler akut etkilerin neden olduđu kayıplardan daha fazla ekonomik kayba neden olduđu için, hayvan yetiŐtiricileri mikotoksinlerin maruziyeti konusunda daha bilinçli olmalıdır. Semptomların ilerlemesi ve çeŐitliliđi kafa karıŐtırıcı olabilir ve teŐhisi zorlaŐtırabilir. DűŐűk dozlarda mikotoksine kronik maruziyet tespit edilmeyebilir ve hayvanlarda dűŐűk kilo alımı, űretkenlikte azalma veya dűŐűk sűt űretimi,

enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık ve düşük gebelik oranları dahil olmak üzere düşük üreme performansı ile sonuçlanabilir. Mikotoksinlerin etkilerini göstermede rol oynayan çeşitli mekanizmalar, (i) Azalmış besin Emilimi ve bozulmuş metabolizma, (ii) Azalmış yem alımı veya yem reddi, (iii) Endokrin ve ekzokrin sistemlerde değişiklikler (iv) Bağışıklık sisteminin baskılanması, (v) Antibiyotik etkileri ve (vi) Hücre ölüm şeklinde sıralanabilir. Geviş getiren hayvanların rumen (işkembe) mikrobiyotası ve bu bölmedeki yem partikülleri toksik molekülleri başarılı bir şekilde ayrıştırıp, deaktif edebildiği için, geviş getiren hayvanlar monogastriklerle kıyasla mikotoksinlere daha az duyarlıdır. Mikotoksinlerin ruminal degradasyonu bakteriyal aktiviteden ziyade protozal aktiviteye daha bağlı olsa da, hem rumen protozoa hem de rumen bakterileri çeşitli mikotoksinleri metabolize etme yeteneğine sahiptir. Dolayısıyla rumendeki mikotoksinlerin kısmi bozunması hayvanları mikotoksinlerin toksisitesine karşı korumaya yardımcı olmaktadır. Ancak geviş getiren hayvanlar çoğunlukla tahıl, yem ve yem yan ürünleri tüketmektedir; bu da daha az çeşitli diyetlere sahip domuz ve kümes hayvanlarına kıyasla mikotoksin maruziyet riskini artırmaktadır. Buna ek olarak, sağmal büyükbaş sürüsünde mikotoksikoz belirtileri; çok sayıda olası mikotoksin maruziyetine ve bu mikotoksinlerin hem kendi aralarında hem de diğer stres faktörleri ile etkileşimlerine bağlı olarak farklılık gösterebilir. Örneğin, sürüdeki genç inekler mikotoksikoz semptomlarından en çok etkilenen hayvanlardır. Bunun sebebi, sürüdeki diğer hayvanlara nazaran stres seviyelerinin daha yüksek olmasıdır. Bu ineklerin hassasiyeti önceden baskılanmış bağışıklık sistemlerinden de kaynaklanabilmektedir (27–29).

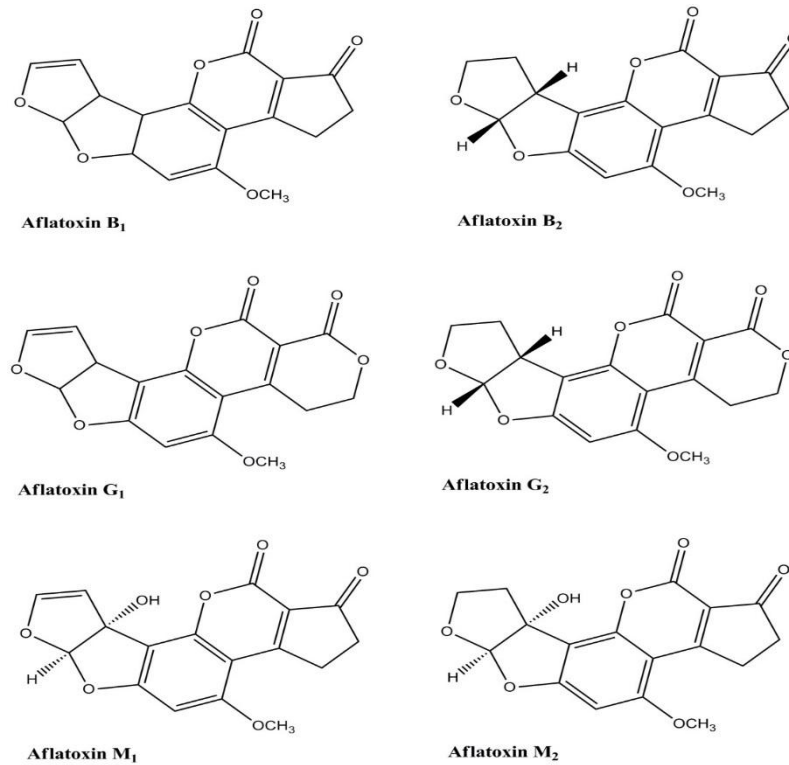
Mikotoksinlere olası maruziyeti ve dolayısıyla insan ve hayvan sağlığı üzerinde yaratacağı riskleri azaltmak için, gıdalar ve yemler ile ilgili sıkı yönetmelikler koyulmalı ve uygun halk sağlığı önlemleri alınmalıdır.

2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler en çok çalışılan mikotoksin grubu olup, *Aspergillus* familyasının farklı türleri tarafından üretilen, doğal olarak ortaya çıkan sekonder metabolitlerdir (31). Belirli koşullar altında genellikle *A.parasiticus*, *A.flavus* ve nadiren de olsa *A.nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A.ochraceoroseus* ve *A.*

australis suşları tarafından üretilen bu toksinler; gıda ürünlerinde doğal olarak gelişip, insanlar dahil olmak üzere birçok hayvan türünde çeşitli toksik etkiye neden olurlar (13,32). *Aspergillus* türleri için en uygun koşullar tropikal ve subtropikal bölgeler; yani sıcak ve nemli iklimlerdir (2,27).

“Aflatoksin” kelimesi *Aspergillus*'taki ilk harften ve ‘*flavus*’ içindeki ilk üç harften türetilmiştir (6). Tanımlanan 20'den fazla aflatoksin molekülü türü arasında en önemli olanları, aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin G₁ (AFG₁), aflatoksin G₂ (AFG₂), aflatoksin M₁ (AFM₁) ve aflatoksin M₂ (AFM₂)'dir (Şekil 2.1.) (33). Aflatoksinler, diğer birçok heterosiklik bileşik gibi, floresandır ve floresan özellikleri ile ayırt edilirler. Ultraviyole (UV) ışık altında, yaydıkları floresansa dayalı olarak, mavi floresans verenler AFB₁ ve AFB₂, yeşil-sarı floresans verenler ise AFG₁ ve AFG₂ olarak adlandırılmıştır (6). Oluşturdukları toksik etki gücüne göre sıralama AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂ şeklindedir (1).



Şekil 2.1. Farklı aflatoksinlerin kimyasal yapıları. (39).

AFB₁ ve AFB₂, genellikle *A.flavus* ve *A.parasiticus* tarafından üretilirken; AFG₁ ve AFG₂, *A.parasiticus* tarafından üretilmektedir (34). Aflatoksinler; hasat öncesi ve sonrası mantar kontaminasyonu nedeniyle, tahıllar, yer fıstığı, fındık, mısır,

pamuk tohumu, buğday, sorgum, arpa, baharat, incir, kuru meyve, kakao çekirdeği, pirinç, kopra, soya fasulyesi, ayçiçeği, pamuk çekirdeği ve ham sebze yağları gibi çok çeşitli gıda ürünlerinde ortaya çıkabilirken; bunların daha az biyolojik etki gösteren, AFM₁ ve AFM₂ gibi önemli metabolik ürünlerinin sütte ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Özellikle yer fıstığı unu, mısır ve pamuk tohumu unu, yemlerde ana aflatoksin kaynakları olarak bilinmektedir (5,33,35,36). Kontaminasyon oranı ve derecesi, sıcaklık, nem, a_w, eşzamanlı mikrobiota, fiziksel hasar ve diğer saklama koşulları gibi farklı faktörlere bağlıdır (2).

Aflatoxinler, kanserojen, mutajenik, teratojenik ve immünsüpresif etkiler göstermektedir (37). Aflatoxinler arasında AFB₁, en bilinen insan hepatokarsinojeni ve en güçlü hepatotoksindir (7,8). AFB₁ bir "pro-karsinojen" olduğundan, AFB₁'in toksik etkilerinden, enzimatik biyotransformasyonları sonucu oluşan toksik ana ürünlerin sorumlu olduğu bildirilmektedir (1,6). IARC, insanlarda AFB₁'in kanserojenliği için yeterli kanıt olduğu sonucuna varmış ve bu mikotoksini "Grup I" kanserojen olarak değerlendirmiştir (6).

İnsanlarda veya hayvanlarda aflatoxinlere maruziyet, oral, inhalasyon veya dermal temas yoluyla gerçekleşebilir. Aflatoxinler merkezi sinir sistemi, akciğerler, karaciğer, sindirim ve kardiyovasküler sistemde komplikasyonlar oluşturarak, aflatoksikoz olarak adlandırılan çok çeşitli olumsuz sağlık etkilerine neden olmaktadır. Aflatoksikozdan kaynaklanan ölüm oranlarının, % 39 ile % 50 arasında değiştiği bildirilmektedir. Aflatoxin dozuna ve maruz kalma süresine göre aflatoksikoz, akut veya kronik olarak tanımlanabilir (9,10,25). Akut aşırı doz alımında, ana toksik etkiler hepatotoksisite, nefrotoksisite ve hatta bazı durumlarda ölüm iken; kronik tüketimde toksik etkiler genotoksisite, kansinojenite ve üreme bozuklukları olarak ortaya çıkar (23). Ek olarak; çok çeşitli hayvan türlerinde azalmış büyüme hızı, immünosupresyon, azalmış süt ve yumurta üretimi, düşük üreme, düşük yem yararlanımı ve etkinliği ve anemi gibi çeşitli etkiler AFB₁'in toksisitesi ile ilişkilidir (6).

Ördekler, koyunlar, hindiler, köpekler, domuzlar ve sığanlar gibi hayvanlar AFB₁'e en duyarlıyken; maymunlar, tavuklar, fareler ve geviş getiren hayvanlar en dirençlilerdir (11). Kümes hayvanları aflatoxinlere memelire göre daha duyarlıdır. Kümes hayvanları içinde ise ördekler; hindi civcivlerine ve tavuklara kıyasla en

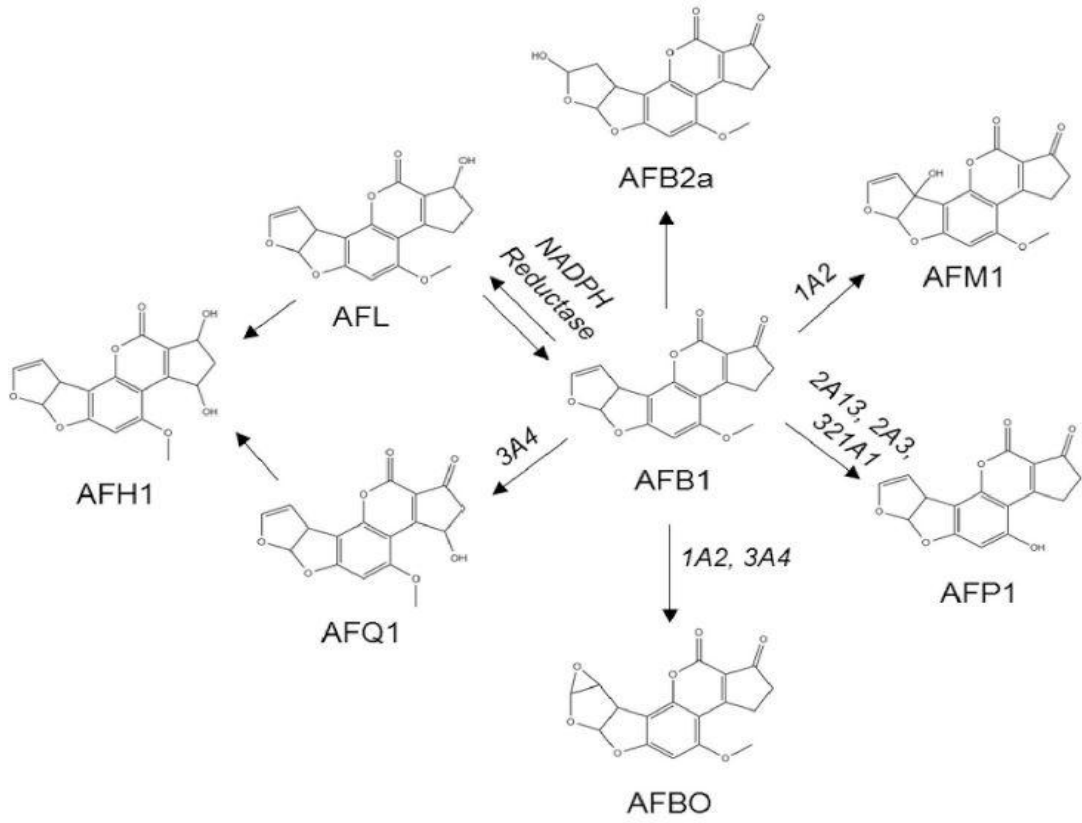
duyarlı türlerdir (37). Hengstler ve ark.(38), bazı spesifik türlere AFB₁ uygulayarak, bunların duyarlılıklarını kalitatif olarak değerlendirmişler ve çalışma sonucunda, karaciğerde AFB₁ -DNA bağlanma düzeylerini azalan sıralama ile sıçan > domuz > kobay > fare şeklinde tespit etmişlerdir.

2.3. AFB₁'in Metabolizması ve Etki Mekanizması

Genel olarak, AFB₁'in metabolizması iki faz ile ortaya çıkmaktadır. Faz I'de AFB₁, enzimatik işlemlerle hidrofilik bileşiklere dönüştürülür. Faz II'de ise uygun fonksiyonel grupları içeren metabolitler, Faz I aktivasyonundan sonra idrar ve safra yoluyla atılabilmesi için glukuronat, glutamat, sülfat, indirgenmiş glutatyon (GSH) veya üridin difosfat-glukuronik asit gibi maddelerle konjüge edilir (10,39). Konakçı, organ ve hücre içi bileşenine bağlı olarak AFB₁'in biyoaktivasyonundan farklı sitokrom (CYP) P450 izoenzimleri sorumludur. İnsanlarda 57 CYP450 tarafından tanımlanan izoenzimler arasında, mikrozomal CYP1A2, 3A4, 3A5, 3A7, 2A3 ve 2B7, hepatositik 3A3 ve akciğer CYP2A13, ilgili organlarda AFB₁ biyoaktivasyonundan sorumlu başlıca izozimlerdir. Karaciğerde biyoaktivasyon esas olarak hidrasyon, hidroksilasyon, epoksidasyon ve demetilasyon yoluyla, CYP1A2 veya 3A4 tarafından katalize edilir. Hayvanlarda ve böceklerde, CYP1A1, 1A, 1A2, 2A5, 2A6, 3A, 3A4, 3A13 ve 321A1 dahil olmak üzere çeşitli CYP450 izoenzimlerinin, üretildikleri türe ve organa bağlı olarak biyoaktivasyon aşamasını katalize ettikleri rapor edilmiştir (11,40).

2.3.1. Metabolizma

AFB₁'in metabolizması esasen CYP450 enzimleri tarafından gerçekleştirilir. CYP3A4 ve CYP1A2, bu metabolik reaksiyonların çoğunu gerçekleştirerek bir dizi hidroksile metabolit (AFQ1, AFP1 ve AFM1) oluşturur. Ultimat kanserojen AFBO oluşumuna da bu enzimler aracılık eder. Bununla birlikte AFL, indirgenmiş nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (NADPH) redüktazından oluşur ve AFB₁'e geri döndürülebilir. Her ne kadar spesifik bir CYP izoformu tanımlanmamış olsa da, AFB_{2a}'nın hepatik oluşumu rapor edilmiştir, ancak bu metabolit asidik ortamlarda kendiliğinden de oluşabilmektedir. AFH1 üretimi hakkında çok az şey bilinse de, muhtemelen AFL veya AFQ1'den oluşmaktadır (Şekil 2.2) (12).

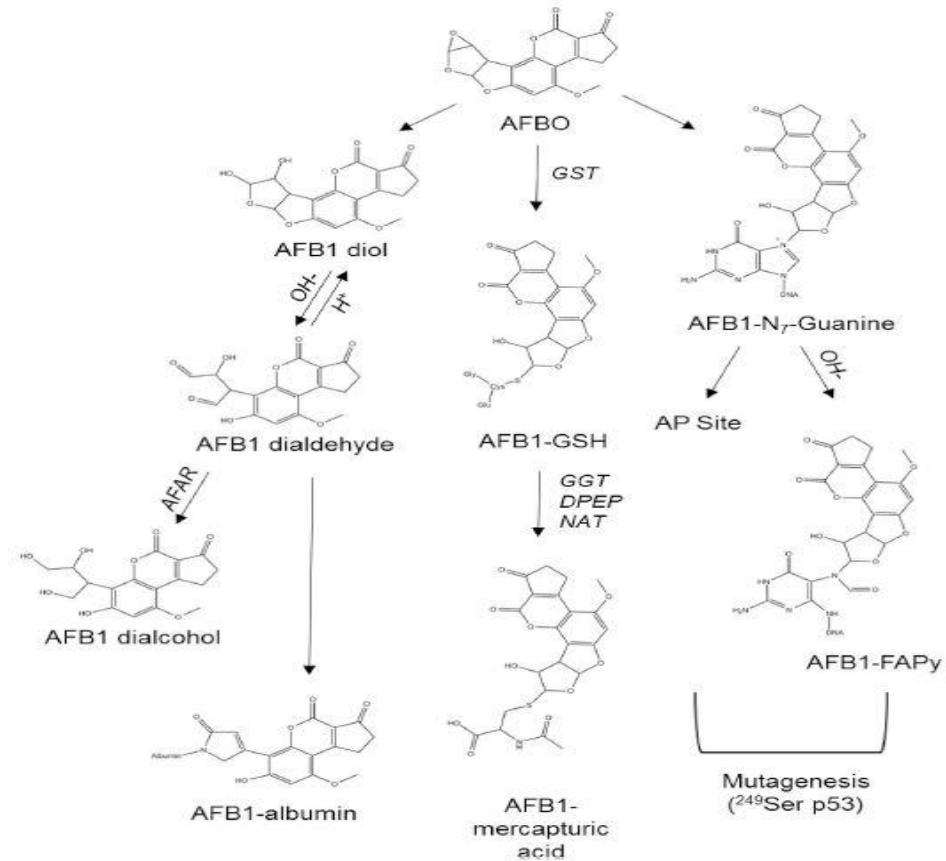


Şekil 2.2. AFB₁'in sitokrom P450 aracılı metabolik yolu

Aflatoxin B₁-8,9-epoksit (AFBO)

AFB₁ sindirim sisteminde duodenumda emilir ve karaciğere ulaşır ve burada çeşitli mikrozomal sitokrom enzimlerinin etkisiyle biyolojik olarak aktifleştirilir. Bunlar, furan halkasındaki C8 = C9 çift bağının oksidasyonunu katalize eden ve AFB₁-ekzo ve -endo 8,9 epoksit olmak üzere iki stereoizomere sahip olan aşırı kanserojen AFB₁-8,9-epoksiti (AFBO) oluşturan monooksijenazlardır. Önceki izomerin, ikincisinden 1000 kat daha fazla reaktif veya toksik olduğu bilinmektedir (11,12). Bu metabolik dönüşüm esasen insan karaciğerinde CYP3A4 ve CYP1A2 tarafından gerçekleştirilir. Yüksek AFB₁ konsantrasyonlarında CYP3A4, AFBO'nun ana üreticisidir ve oluşan ürün sadece ekzo izomer formundadır. Ancak düşük AFB₁ konsantrasyonlarında CYP1A2 ana AFBO üreticisi durumuna geçer. Ek olarak, CYP1A2'nin bu düşük konsantrasyonlarda CYP3A4'ten daha fazla ekzo izomeri ürettiği bulunmuştur. Bu ara ürünün yüksek derecede elektrofilik yapısı, hücresel makromoleküllerle reaksiyona girmesini ve kovalent olarak bağlanmasını sağlar. Protein ve nükleik asitlerdeki biyolojik aminler ile kendiliğinden reaksiyona

girebilmektedir. Deoksiribo nükleik asit (DNA) ile reaksiyonda AFBO, guanin üzerindeki N₇ pozisyonuna kovalent olarak bağlanır ve AFB₁-N₇-guanin eklentisini oluşturur. Ekzo izomerin, guanin kalıntıları için endo izomerden çok daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, AFB₁-ekzo-8,9 epoksit, ana karsinojen metabolit olarak kabul edilir. AFBO'nun son derece kararsız doğası nedeniyle, bu metabolit herhangi bir makromoleküle bağlanmadan önce kendiliğinden veya enzimatik olarak epoksit hidrolazlar ile hidrolize olabilir (12,41). Bu da, AFB₁ dihidrodiol oluşumuna neden olur. Bu diol, diğer AFB₁ sitotoksitelerinin bir mekanizması olduğu düşünülen hücrel proteinler üzerindeki N termini ve lizin yan zincirlerine kendiliğinden kovalent olarak bağlanabilen, halka açılmış bir dialdehit formu olan AFB₁ dialdehit ile dengededir (Şekil.2.3). Ancak, AFB₁ dialdehit, aflatoksin aldehit redüktaz (AFAR) ile AFB₁ dialkole metabolize edilerek protein bağlama kabiliyeti ortadan kaldırılabılır. AFBO'nun esas olarak glutatyon-S-transferaz A1 olmak üzere, glutatyon S-transferaz (GST) ile glutatyon konjugasyonu, ana detoksifikasyon yoludur ve hem endo hem de ekzo izomerleri ile ortaya çıkabilmektedir. Glutatyona konjugasyon (AFB₁-GSH), AFBO'nun DNA'ya bağlanma yeteneğini bozarak etkisiz bir metabolit oluşturur. Oluşturulduktan sonra, bu konjugat daha sonra polar ve daha az toksik metabolit olan, merkapturik asit eklentisine *in vivo* olarak γ -glutamiltanspeptidaz (GGT), dipeptidaz (DPEP) ve N-asetiltansferaz (NAT) içeren bir dizi enzimatik reaksiyon yoluyla dönüştürülür ve daha sonra idrarla atılır. Alternatif olarak, insan mikrozomal epoksit hidrolazı, GST aktivitesinin yokluğunda AFBO'nun detoksifikasyonunda da yer alabilir (12,41,42).



Şekil 2.3. AFB1'nin biyolojik yazgısı.

Hidroksilasyon ürünleri

AFB₁ ayrıca CYP450 enzimleri tarafından bir dizi hidroksilasyon ürününe metabolize edilir. Bunlar arasında AFM₁, aflatoksin Q₁ (AFQ₁), aflatoksin P₁ (AFP₁), aflatoksikol (AFL), aflatoksikol H₁ (AFH₁) ve aflatoksin B_{2a} (AFB_{2a}) bulunur.

AFM₁, AFB₁'e maruz kalan insanlarda ve hayvanlarda yaygın olarak tespit edilen ve CYP1A2 tarafından üretilen ana metabolittir. Hidroksile metabolitler arasında en karsinojen olanı AFM₁'dir. Bu, AFB₁'e benzer şekilde N₇ guanin eklentisi oluşturduğu tespit edilen AFM₁'in DNA bağlanma etkisi ile desteklenmektedir. AFM₁, üridin 5'-difosfo-glukuronosiltransferazlar (UGT) yoluyla glukuronik aside konjüge edilebilir ve daha sonra safra yoluyla atılabilir. Alternatif olarak, AFM₁ sistemik dolaşıma girebilir ve sağlıklı kadınların, süt ineklerinin ve diğer memelilerin idrarında veya sütünde modifiye edilmeden atılabilir. Ayrıca AFM₁, AFB₁'e maruz kaldıktan sonra idrarda yüksek seviyelerde atıldığı için, AFB₁'e maruz kalmanın iyi bir biyo-işaretidir (12,41).

AFQ₁, sadece CYP3A4 tarafından üretilen ilave bir hidroksillenmiş metabolittir. AFQ₁ bolluğu başlangıç AFB₁ miktarının % 1 ile % 11'i arasında değişmektedir; bu da insanlarda AFQ₁ üretiminin sıklıkla ve tespit edilecek kadar yüksek seviyelerde gerçekleştiğini gösterir (12). 2005 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, AFQ₁'in AFM₁ veya AFB₁-N₇-guanine kıyasla çok daha yüksek seviyelerde atıldığı bulunmuştur. Bu etki AFM₁'den yaklaşık 60 kat daha fazla AFQ₁ içeren fekal numunelerde daha belirgindi. Ek olarak, dışkı AFM₁ ve AFQ₁ konsantrasyonları idrardakinden daha yüksekti; bu da dışkıların AFB₁ maruziyeti için bir markör olarak yararlı olduğunu göstermiştir (43). Ayrıca AFQ₁'in DNA bağlama potansiyelinin AFBO'ninkinden önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur. Bu da AFQ₁'in AFM₁'in aksine bir detoksifikasyon ürünü olarak potansiyelini göstermektedir.

AFP₁, CYP2A13, CYP2A3 ve CYP321A1 gibi P450 enzimleri tarafından üretilir. AFP₁, AFB₁'e maruz kalan insanların idrarında ve muhtemelen AFB₁'e maruz kalmanın bir sonucu olarak hepatoselüler karsinom (HSK) geliştiren bireylerde bulunmuştur. Toksikolojik çalışmalar, AFP₁'in teratojenitesinin olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla, bu da detoksifikasyon ürünü olarak AFP₁'in rolünü göstermektedir. Ek olarak, AFP₁'in glukuronide edilip, safraya atılabildiği bilinmektedir (12).

AFL, diğer AFB₁ metabolitlerinin aksine, karaciğer preparatlarının sitosolik fraksiyonlarında bulunur ve genellikle sitozolde NADPH redüktaz tarafından oluşturulur. AFL, DNA bağlanma aktivitesini koruduğu için detoksifikasyon ürünü olarak kabul edilmez. Ek olarak, AFL, enzimatik olarak AFB₁'e yeniden dönüştürülebildiğinden, AFB₁ için rezervuar görevi görmekte ve toksik etkilerini uzatmaktadır. İlginç bir şekilde, AFL, insan plasentadan aktarılabilen ve ayrıca plasenta tarafından AFB₁'den oluşturulan tek metabolittir. Bu da AFL'nin AFB₁'in gelişimsel toksisitesinde büyük bir rol oynayabileceğini göstermektedir. AFB₁'e maruz kalan popülasyonlarda AFL, idrarda ve anne sütünde bulunmuştur.

AFH₁, yapısal olarak AFL'ye benzeyen bir metabolittir. AFH₁'in metabolik formasyonunun iki enzim sistemine bağlı olduğu bulunmuştur: mikrozomal hidroksilaz ve sitoplazmik redüktaz sistemleri. Ancak, AFH₁'in bir AFQ₁

indirgemesinden veya bir AFL hidroksilasyonundan oluşup oluşmadığı hala belirsizliğini koruyor.

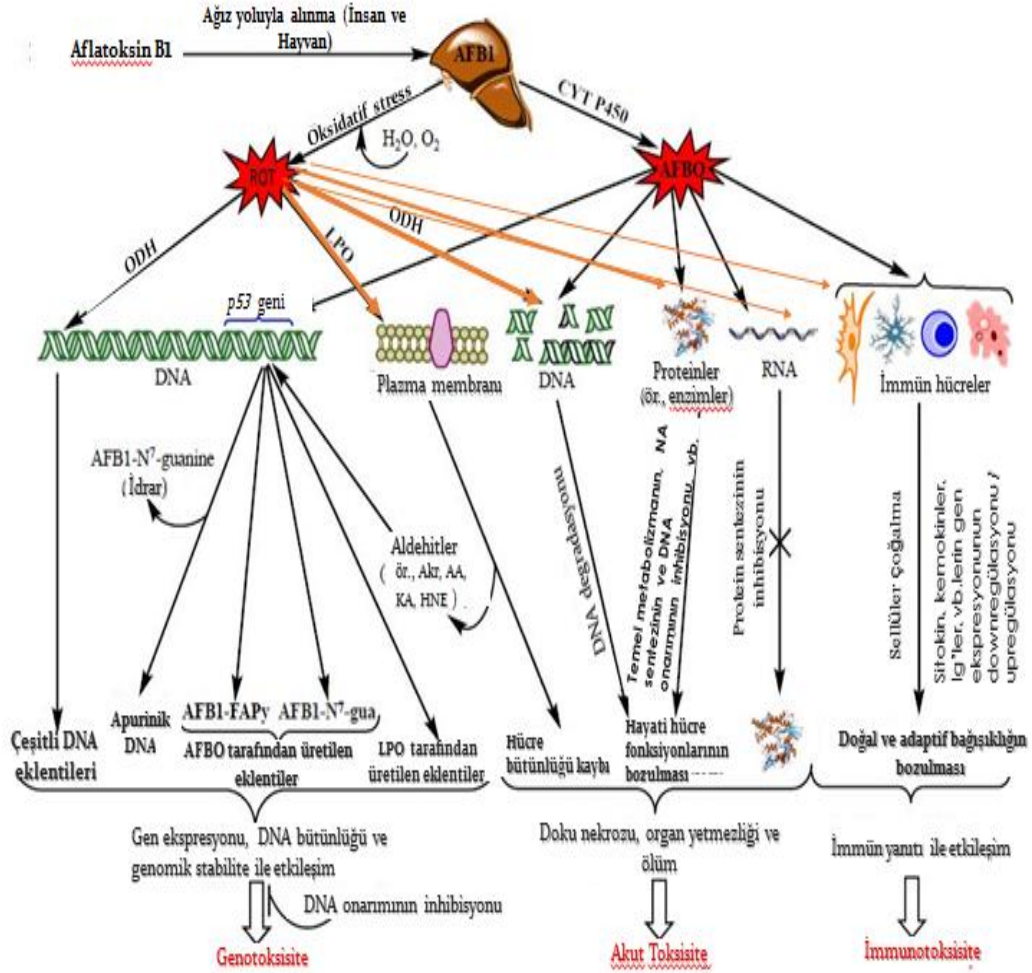
AFB₁'in, insanların mikrozomal preparasyonlarında NADPH'ye bağlı bir şekilde AFB_{2a}'ya metabolize olduğu gösterilmiştir. AFB_{2a}, AFB₁'in hemiasetal formudur. AFB_{2a}, insanlarda ve hayvanlarda, enzimatik veya enzimatik olmayan bir şekilde ortaya çıkar. AFB_{2a}, türler arasında büyük ölçüde farklılıklar gösterse de, genellikle toplam AFB₁ metabolizmasının % 50'sini oluşturur. Diğer metabolitlerin çoğuna kıyasla AFB_{2a}'nın özgün özelliği, hücrel proteinlere bağlanma kabiliyetidir. AFB_{2a}'nın protein bağlama kapasitesinin, potansiyel hücrel toksisitelere katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

AFB₁ metabolizmasında yer alan enzimleri modüle edebilen faktörler (örn. Diyet bileşenleri, çevresel kirlenmeler, vb.) toksik metabolitlerin üretilmesini/inaktivasyonunu etkileyerek toksik etkilere duyarlılığı dikte edebilir. Bazı doğal antioksidan bileşikler (örn., Curcuminoidler ve flavonoidler vb.), CYP enzimi aktivitesinin inhibisyonu yoluyla ve/veya faz II'nin (GST ve UGT) ve antioksidan enzimlerin (katalaz - CAT, glutatyon peroksidaz - GPx, kinon oksidoredüktaz-1 -NQO1 ve süperoksit dismutaz - SOD) indüksiyonu yoluyla, AFB₁ metabolitlerinin üretimini azaltma ve/veya inaktivasyonunu artırma potansiyeline sahip olabilir (41). Örneğin, oltipraz düşük dozlarda kemopreventatif ajan olarak kullanılmış ve idrarda aflatoksin-merkapturik asit atılımındaki artışın da kanıtlandığı üzere faz II metabolizmasını indükleyerek AFB₁ toksisitesine karşı koruyucu bir rol oynamıştır (12).

2.3.2. Etki Mekanizması

Aflatoksinlerin çoğunun mekanizması, henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, farklı mekanizmalarla çeşitli toksikolojik etkiler sergilemektedirler. AFB₁'in mutajenik etkileri, keşiflerinden bu yana çoğu çalışmanın odağı olmuştur ve esas olarak ara metabolit AFBO ile ilişkilendirilmiştir. Oldukça kararsız bir molekül olarak AFBO, çeşitli genetik, metabolik, sinyal ve hücre yapısı bozulmalarını indüklemek için nükleik asitler, proteinler ve fosfolipitler dahil olmak üzere hücrel makromoleküllerle reaksiyona girer. Bununla birlikte, oksidatif stresin (OS) indüklenmesi yoluyla AFB₁'in hücre fonksiyonu ve bütünlüğü üzerinde eşit derecede

dramatik veya daha yüksek etkilerini gösteren, artan çalışmalar bulunmaktadır. Şekil 2.4.; genotoksisite, immünotoksisite ve genomik DNA üzerinde etkili olarak akut zehirlenmeye neden olan farklı toksisite mekanizmalarını özetlemektedir (11).



Şekil 2.4. Oksidatif stres ve AFBO'nun aracılık ettiği başlıca AFB₁ toksisite mekanizmaları. (AFBO, Aflatoxin B₁-exo-8,9-epoksit; NA, Nükleik Asitler; ROT, Reaktif Oksijen Türleri; LPO, Lipid Peroksidasyonu; ODH, Oksidatif DNA Hasarı; Akrolein; AA, Asetaldehit; KA, Krotonaldehit; HNE, 4-Hidroksi-2-Nonenal; Ig'ler, İmmunoglobulinler) (11).

AFBO aracılı genotoksisite

AFBO serbest bırakıldıktan sonra DNA'da guanin kalıntısının N⁷ atomuna kovalent olarak bağlanarak, stereospesifik bir aflatoxin-DNA katım ürünü olan *trans*-8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroksi-AFB₁'i (AFB₁-N⁷-Gua) oluşturur. % 60-80 oranında bir sıklıkla, p53/PT53 tümör baskılayıcı gen üzerindeki kodon 249'un (5'-

AG*G-³) üçüncü guanin kalıntısında oluşur. AFB₁-N⁷-Gua katım ürünü son derece kararsız olduğundan, pozitif yükü nedeniyle, iki olası yazğıdan birine uğrar: (i) imidazol halkası, guanin kalıntısı üzerinde kararlı AFB₁-formamidopirimidin (AFB₁-FAPY) eklentileri oluşturmak için hafif alkalın koşullar altında açılabilir veya (ii) serbest AFB₁-N⁷-guaninin serbest bırakılmasıyla, guanin kalıntısı depürinasyona uğrayarak DNA zincirinde apürinik (AP) bölge oluşturabilir (11,12) Bu üç AFBO kaynaklı DNA lezyonu (AP, AFB₁-N⁷-Gua ve AFB₁-FAPY), AFB₁ aracılı genotoksik ve kanserojen etkilerin ana öncüleri olarak bilinmektedir (Bkz. Şekil 2.4.). Bunlar arasında AFB₁-FAPY'nin kalıcı DNA hasarı nedeniyle en mutajenik olduğu bildirilmiştir. Lezyonların stabilitesi ve onarım verimlilikleri üzerine çeşitli gözlem ve mutasyon çalışmaları, AFB₁ ile indüklenen mutasyonların büyük çoğunluğunda ortaya çıkan AFB₁-FAPY katım ürününün etkisini ortaya koymuş ve bundan dolayı AFBO ile indüklenen lezyonlarla karşılaştırıldığında daha yüksek genotoksisite meydana getirdiğini kanıtlamıştır. Yukarıda belirtilen lezyonlardan herhangi biri tarafından hasar gören DNA'nın onarılmamasının büyük bir çoğunlukla (%80) *p53* geni üzerindeki kodon 249'un üçüncü bazında G→T transversiyon mutasyona; birkaç durumda ise kodonun ikinci bazında veya G→A transversiyonuna yol açtığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak, 249 pozisyonundaki arginin yerine serin kalıntısı ile yer değiştirilen (249^{Arg} →249^{Ser}), fonksiyonel olmayan bir protein eksprese edilir. Elde edilen değiştirilmiş protein, pR249S, DNA moleküllerine bağlanamaz. Hücre siklusu arresti, senesans ve apoptoz gibi çeşitli hayati hücre sel işlevlerden sorumlu çok sayıda *p53*'e bağımlı gen promoterine doğru transaktivasyon kapasitesini kaybeder ve sonunda tümör oluşumuna yol açar. Bunun yanı sıra *p53* mutasyonları oksidatif fosforilasyon, glikoliz, kök hücre, sinyalizasyon, DNA onarımı, genomik stabilitenin korunması vb. gibi tümör baskılamada yer alan çeşitli diğer hücre sel fonksiyonları ve metabolik yolları kontrol eden çok sayıda genin genetik ekspresyonunu bozar (11).

Oksidatif Stres Aracılı Genotoksisite

Aflatoksinlerin mutajenitesi, esas olarak aflatoksin-N⁷-Gua DNA katım ürünlerinin oluşumuna bağlanmış olsa da, AFB₁ metabolizması tarafından üretilen OS'den de ortaya çıktığı giderek daha fazla anlaşılmaktadır. OS, doğrudan DNA

üzerinde, oksidatif DNA hasarını (ODH) indükleyerek veya dolaylı olarak membran fosfolipitlerinin lipid peroksidasyonundan (LPO) oluşan yan ürünler ile etki eder (Bkz. Şekil 2.4.). Karaciğerdeki AFB₁'in CYP 450 enzimleri tarafından biyotransformasyonu, DNA'nın azot bazlarına ve deoksiriboz parçalarına saldırarak 100'den fazla farklı DNA katım ürünü oluşturabilen aşırı miktarda reaktif oksijen türü (ROT) oluşumuna neden olur. Bu katım ürünleri arasında en iyi bilinen ve en çok incelenen, DNA guanin kalıntısının, hidroksil radikali ile oksidasyonundan sonucu oluşan 7,8-dihidro-8-okso-2'-deoksiguanozin (8-okso-dG)'dir ve oksidatif DNA hasarı için olarak bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Oksidatif DNA hasarının derecesinin; oluşan katım ürününe, DNA onarımındaki etkinlik ve hızına, türe, organa, dokuya, subsellüler bileşenlere ve hücre döngüsüne bağlı olduğu bildirilmiştir. OS tarafından 8-okso-dG üretimini, insanlarda ve hayvanlarda çeşitli organlarda kansere neden olduğu bildirilmiştir. Ancak akciğer, esas olarak mitokondri ve çekirdekte biriken 8-okso-dG tarafından kaynaklanan DNA hasarı için en yaygın hedef gibi görünmektedir. AFBO kaynaklı DNA eklentileri gibi, 8-okso-dG lezyonları da G→T transversiyon mutasyonlarına aracılık ederler, ancak spesifik olarak *p53* genini hedeflemezler ve farklı mekanizma ve DNA polimerazları içerirler. ROT miktarları hücresel antioksidan savunma mekanizmaları ile dengelenemeyecek kadar yüksek olduğunda, DNA hasarları zamanında onarılamaz. Dolayısıyla hatalı gen ekspresyonu, çoklu mutasyonlar ve genomik instabilite dahil olmak üzere çeşitli genetik anormallikler ve sonunda tümör oluşumuna yol açarlar.

Öte yandan AFB₁, oksidatif membran fosfolipidlerine saldıran ve farklı mutajenik aldehitler salan ROT üretimi yoluyla dolaylı olarak OS tarafından DNA hasarını indükleyebilir (Bkz. Şekil 2.4.). Bilinen 33 LPO türevi aldehit arasında malondialdehit (MDA), akrolein (Akr), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve 4-okso-2(E)-nonenal (ONE) en baskın olanlarıdır. Bu türevler DNA bazları ile reaksiyona girerek pro-mutajenik ekzosiklik DNA eklentileri üretimini gerçekleştirirler ve genomik instabilite ve karsinojeniteye yol açarlar. OS'nin AFB₁ aracılı mutajenitede AFBO'dan daha önemli bir rol oynadığı ve reaktif LPO kaynaklı aldehitlerin serbest radikallerden ve oldukça reaktif olan AFBO'dan daha mutajenik olduğu belirlenmiştir. Gerçekten de, reaktif aldehitler, kısa ömürlü ve son derece kararsız serbest radikaller ve epoksitlerin aksine, oluşum bölgelerinden uzakta etki edebilirler.

Bu ayrıca, AFB₁'in aktive olduğu ve metabolize olduğu karaciğerden uzak organlarda kansere aracılık etmesinin bir nedenini de açıklayabilir (11). Weng ve ark. (44)'na göre, OS'nin toksisitede oynadığı rol hafife alındığı için, daha fazla araştırma yapılmalıdır.

AFB₁ ile Hepatoselüler Karsinom (HSK) ilişkisi

En güçlü hepatokarsinojenlerden biri olan AFB₁, dünya çapında HSK oluşumuna önemli bir katkıda bulunur. AFB₁, dünya çapında kanser ölümlerinin üçüncü nedeni olan tüm küresel hepatoselüler karsinom veya karaciğer kanserinin % 4,6-28,2'sinde rol oynamaktadır (5). İnsanların aflatoksin maruz kalması çok sık meydana geldiğinden, büyük ölçüde izlenemeyen bu toksinin oral alımı ile kronik karaciğer hasarı meydana gelir. Çeşitli Asya ülkelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, AFB₁ maruziyetinin (idrarda AFB₁ atılımı veya serum aflatoksin-albümin katım ürünleri) ve hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonunun (hepatit B yüzey antijeni) biyolojik belirteçleri için binlerce kişiyi değerlendirmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, AFB₁'in, HSK gelişme riskini büyük ölçüde arttırmak için HBV ile sinerjik olarak etki ettiği bulunmuştur. HBV kadar kapsamlı bir şekilde karakterize edilememiş olsa da, bulgular, hepatit C virüsünün (HCV) de AFB₁ ile sinerjik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde HBV ve HCV'nin yüksek enfeksiyonu nedeniyle, bu bölgelerdeki birçok birey AFB₁'in hepatokarsinojenik etkilerine karşı oldukça hassas olabilir. Ayrıca, insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, yüksek aflatoksin riski olan bölgelerde HSK hastalarında belirli mutasyonlar gözlemlenmiştir (12). Aflatoksinle ilişkili HSK dahil olmak üzere insan malignitelerinin % 50'sinden fazlasında 249^{Ser}'i indükleyen p53 mutasyonları bulunmaktadır. Yüksek aflatoksin maruziyet riski olan bölgelerde, HSK'lı insanlar, daha sık görülen 249^{Ser} mutasyonunu sergilemektedirler (11). İlave olarak, insanlarda hepatoselüler karsinom ile serum AFB₁-albümin katım ürünlerinin pozitif bir ilişkisi olduğu da bulunmuştur (6).

İmmunotoksisite

Aşılama etkinliklerinin azalmasına ek olarak, bulaşıcı hastalıkların artan sıklığı, şiddeti ve uzun süreli iyileşmesi, aflatoksinlerin hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığı bozduğuna dair kanıt sağlamıştır. AFBO, immün yanıt

aracılarının çoğalmasını ve/veya üretimini etkilemek için vücuttaki immünokompetan hücrelerle etkileşime girerek doğal ve kazanılmış bağışıklığı bozar (Bkz. Şekil 2.4.). Ek olarak, düşük veya orta düzeyde AFB₁ maruziyetinin pek az immünotoksisiteye sahip olduğu veya hiç olmadığı ve hücre aracılı bağışıklığın, aflatoksinlere humoral bağışıklığa göre daha duyarlı olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır. İmmünomodülatör etkiler ile ilgili olarak, mevcut verilerin çoğu aflatoksinlerin esas olarak supresif etkiler uyguladıklarını göstermektedir. Bununla birlikte, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, aflatoksinlerin bağışıklık yanıtını, immunostimülatör etkiler yoluyla da bozabildiğini göstermiştir (11).

Doğal Bağışıklığın Baskılanması

Deri ve bağırsak epitel hücreleri gibi fiziksel bariyerlerin mikrobiyal ve toksin istilalarına karşı bariyer fonksiyonunda bozulma *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kanıtlanmıştır. AFB₁'in farklı hayvan türlerinde deri ile temasının, damar içi vezikül oluşumundan yassı hücreli karsinoma kadar çeşitli lezyon türlerine neden olduğu bildirilmiştir. Aflatoksinlerin, hücre döngüsü progresyonunu etkileyerek veya bağırsak epitel hücrelerini ve bunları birleştiren sıkı bağlantıları yok ederek bağırsakların mekanik bariyer bütünlüğünü ve işlevini bozduğu gösterilmiştir. Bu değişiklikler bağırsağın bariyer fonksiyonunu önemli ölçüde değiştirir ve sadece besin emilimine değil, aynı zamanda patojenlerin veya toksinlerin istilasına karşı koruyucu bir araç olarak doğuştan gelen bağışıklık yanıtını da etkiler. Moleküler düzeyde aflatoksinlerin, bağırsak mukozasını çeşitli dış tehditlere karşı koruyan mekanik, kimyasal ve bağışıklık bariyerlerini değiştirdiği gösterilmiştir. Monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, sitokinler ve kemokinler gibi bağışıklık hücrelerinin aflatoksinler tarafından canlılığının, fonksiyonunun veya genetik ekspresyonunun kısıtlanması iyice belgelenmiştir. Ayrıca AFB₁, AFB₂ ve/veya AFM₁'in makrofajların canlılığını, proliferasyonunu, sitotoksitesini, fagositik aktivitesini ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinlerin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Enfeksiyöz patojenlerin fagositozunu aktive eden ve doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir bileşeni olan tamamlayıcı sistemin, çeşitli hayvanlarda aflatoksinler tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (11).

Kazanılmış Bağışıklığın Baskılanması

Aflatoksinlere maruz kalındığında kazanılmış bağışıklığın baskılanması, maruz kalan konakçıların enfeksiyöz ajanlara karşı artan savunmasızlığının yanı sıra aşılamanın azaltılmış veya başarısız korumasını göstermektedir. Kazanılmış bağışıklığa katkıda bulunan ana bağışıklık hücreleri olarak lenfositlerin, insanlarda ve hayvanlarda azalan proliferasyonu, aktivasyonu ve/veya fonksiyonu gözlemlenmiştir. Örneğin, 10 mg/L veya daha yüksek bir AFB₁ konsantrasyonunun, sıgırlarda mitojen ile indüklenen T ve B lenfositlerinin diferansiyasyonunu inhibe ettiği ve bunun sonucunda hem T hücresine bağımlı hem de T hücresinden bağımsız humoral bağışıklığı ve dolayısıyla immünoglobulin üretimini bozduğu bulunmuştur. İnsanlarda, serumdaki AFB₁-albümin katım ürünü düzeyleri ile yüksek AFB₁ seviyeleri, D69 aktivasyon göstergesini (ör. CD3⁺ CD69⁺ ve CD19⁺ CD69⁺) taşıyan CD3⁺ ve CD19⁺ lenfosit alt gruplarındaki ve aşılama ve patojenlere karşı bağışıklık tepkisinde merkezi bir rol oynayan CD8⁺, T-hücrelerindeki azalma ile yüksek derecede korelasyon göstermiştir. İkinci sonuçlar, AFB₁'in insanlarda edinilmiş hücre aracılı bağışıklığı bozduğunu ve enfeksiyonlara karşı direncini azalttığını göstermiştir (11).

İmmünostimülasyon

İmmünostimülatör etkilerle ilgili olarak, aflatoksinlerin birinci aşamada uyarıcı bir etki ve ikinci aşamada baskılayıcı etki ile iki fazlı bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkardığına dair artan kanıtlar vardır (45). Valtchev ve ark.(46)'na göre, kısa süreli düşük doz aflatoksinlere maruz kalmak bağışıklık sistemini uyarırken, daha uzun süre yüksek dozlara maruz kalmak bağışıklık baskılayıcı etkiler göstermektedir. Örneğin, çok düşük seviyelerde aflatoksine maruz kalındığında, toll benzeri reseptörlerin ekspresyonunun upregülasyonu farklı organlardaki farklı bağışıklık hücrelerinde gözlemlenmiştir. Aflatoksin maruziyetine yanıt olarak uyarılan sitokin tiplerine ilişkin çelişkili verilere ve fikir birliği eksikliğine rağmen, bağışıklık tepkisinin gereksiz upregülasyonu dokuya zarar veren enflamatuar molekülleri ve serbest radikalleri stimüle ederek kronik inflamasyon, kanser ve sinir sistemi dejeneratif hastalıklarına yol açar (11).

Teratojenite

Hamile kadınların aflatoksinlere maruz kalması, rahimdeki embriyoları etkileyerek çeşitli olumsuz sağlık etkilerine ve gebelikte farklı patolojik sonuçlara neden olabilir (47). Memelilerde, aflatoksinlere yüksek düzeyde maruz kalan annelerde sistemik kan dolaşımı aflatoksinleri veya toksik metabolitlerini fetüslere taşır. Birçok çalışma hamile ve emziren kadınların sütü, serum veya kordon kanında ve ayrıca fetusların kordon kanında da aflatoksin metabolitleri veya aflatoksin-DNA ve aflatoksin-albümin katım ürünleri gibi biyobelirteçler bulunduğunu göstermiştir. Bu da fetüslerin ve yenidoğanların anne yoluyla aflatoksinlere maruz kalabileceğini kanıtlamaktadır (12). Bu nedenle, aşırı derecede aflatoksinlere maruz kalan annelerin hamileliği, fetal büyüme bozukluğu, fetal kayıp ve erken doğum dahil olmak üzere çeşitli sonuçlara yatkındır. Doğum ağırlığı ve kordon kanındaki biyobelirteçlerin miktarları arasında ters bir ilişkinin yoğun olduğu insanlarda ve hayvanlarda büyüme kısıtlaması belgelenmiştir (11). Abdulrazzaq ve ark. (48), AFM₁ düzeyleri ile doğum ağırlıkları arasında güçlü bir negatif korelasyon bulmuşlar ve bu Turner ve ark. (49)'nin maternal kandaki AFB₁-albümin'in, bebeklerin büyüme geriliğinin göstergesi olduğuna dair buldukları bulgular ile uyumaktadır. AFB₁-albümin düzeyleri ile kısa çocukların boy/kilosu arasında anlamlı bir negatif korelasyon bulunmuş ve bu çocuklar % 30-40 oranında daha yüksek AFB₁-albümin düzeyleri sergilemişlerdir (12). Ayrıca, aflatoksinlere maruz kalan hayvanlarda canlı doğum ve yavru büyüklüğünde azalma, organ gelişiminde bozulma ve yavrulardaki iskelet anomalileri belirlenmiştir. Bu, aflatoksinlerin DNA'ya bağlanması ve protein sentezinin engellenmesi ile açıklanmıştır. Hamile kadınların aflatoksin yönünden zengin beslenmesi sağlıklarını etkiler ve fetüslerini konjenital anormalliklerle dolaylı sonuçlara maruz bırakır. Örneğin, maternal pro-enflamatuar sitokinlerin upregülasyonu ve/veya anti-enflamatuar sitokinlerin downregülasyonu plasental büyümeyi bozan ve yetersizliğine neden olan sistemik inflamasyonu indükler. Dolayısıyla, zayıf fetal büyüme, düşük veya ölü doğum veya prematüre doğuma yol açar. Ayrıca, aflatoksinlerin sitotoksik aktivitesi, kırmızı kan hücrelerini parçalayarak anemiye neden olur veya demir, selenyum ve vitaminler gibi besinlerin emilimini değiştirerek, zayıf fetal büyüme ve/veya prematürite ile sonuçlanır. Ancak, çevresel

olarak ilgili aflatoksin seviyelerinin, insanlarda kırmızı kan hücresi lizisini ortaya çıkarabilecek dozların altında kaldığı görülmektedir (11).

Aflatoksinlere kronik maruziyet ile ortaya çıkan diğer toksik etkiler

Ömür boyu düşük dozlarda aflatoksinlere tekrarlayan maruziyet, kronik hastalıklara neden olur ve bunlardan en sık ve şiddetli olanı kanserdir. Aflatoksinlerin diyetle alımının primer karaciğer kanseri ile ilişkili olmasına rağmen, böbrek, pankreas, mesane, kemik gibi diğer iç organların da bu mikotoksinlere maruz kaldığında kanser geliştirdiği bildirilmiştir. Aslında, aflatoksinlere kronik maruziyet, memelilerde immüno-supresyon, teratojenite, mutajenite, sitotoksisite ve östrojenik etkiler dahil olmak üzere bir dizi ciddi hastalığa neden olur. Önceki bölümlerde bahsedilen başlıca toksikolojik etkilere ek olarak, aflatoksinler üst üste binen mekanizmalar ve risk faktörleri ile birlikte çeşitli diğer olumsuz sağlık etkileri göstermektedir. Bunlar yetersiz beslenme hastalıklarını (titreme ve bodurluk), fiziksel ve zihinsel gelişim geriliğini, üreme ve cinsellik problemlerini ve sinir sistemi hastalıklarını (nörodejeneratif hastalıklar ve nöroblastom) içermektedir (11,50,51).

Aflatoksinler ve yetersiz beslenme

Aflatoksinlere maruziyet selenyum, A, C ve E gibi vitaminlerin ve minerallerin emilimini etkileyerek zayıf beslenme durumunu şiddetlendirir. Böylelikle, çocuklar/tüketiciler hem bu temel mikro besinlerden mahrum kalır hem de aflatoksinlere olan duyarlılıkları artar. Sonuç olarak, maruz kalan çocuklar, yukarıda bahsedildiği gibi gestasyonel aşamadan yetişkinliğe kadar bodurluk, fiziksel ve zihinsel gelişim geriliği gibi büyüme bozuklukları yaşayabilir. Birçok Afrika ülkesinde, ciddi protein yetersizliği, marasmus, kwashiorkor ve marasmic kwashiorkor olan çocuklarda, sağlıklı akranlarına kıyasla yüksek AFB₁ biyobelirteçleri bulunmuştur. Aflatoksikol, kwashiorkor ve marasmic kwashiorkor gözlenen çocuklarda tespit edilen ana AFB₁ metabolitidir. Mekanik olarak, AFB₁'in besin seviyelerini nasıl değiştirdiği bilinmese de; *in vitro* çalışmalar, AFB₁'in vitamin D reseptörünü (VDR) downregüle etme ve insülin benzeri büyüme faktörü-2 sinyal eksenini modüle etme yeteneğini göstermiştir. Bu da, bunların AFB₁ kaynaklı yetersiz beslenmenin potansiyel mekanizmaları olabileceğini göstermektedir (11,12).

Aflatoksinler ve nörodejeneratif hastalıklar

Aflatoksinlere kronik maruziyetin, nörodejeneratif bozukluklardan da sorumlu olabileceğine dair artan kanıtlar bulunmaktadır. CYP450 enzimleri tarafından üretilen AFBO, ROT ve aflatoksin kaynaklı oksidatif stres, lipid ve protein sentezini inhibe ettikleri nöronal beyin hücrelerindeki fonksiyonel makromoleküllerle reaksiyona girebilir. Aflatoksinlerin ayrıca beyin hücrelerindeki mitokondrilerin yapısını ve işlevini bozarak, oksidatif fosforilasyonu engellediği ve hücre apoptozuna yol açtığı bildirilmiştir. Ek olarak, kwashiorkor'dan ölen bir çocuğun beyin dokularındaki aflatoksinlerin tespiti ve Reye sendrome (serebral ödem ve nöronal dejenerasyon) ile ilişkisi, aflatoksinlerin kan-beyin bariyerini geçebildikleri ve dejenere ettikleri sinir sistemine sızabildiklerinin güçlü bir göstergesidir (11). Ayrıca, oksidatif strese ek olarak, aflatoksinler, merkezi sinir sisteminde proinflamatuvar koşullar ile immünokompetan hücrelerin yanıtını bozarak nörodejeneratif bozuklukları indüklediği bilinmektedir (52).

Aflatoksinler ve Solunum ve Endokrin Sistemleri

Birçok insan, tahılın kabuğunun çıkarılması ve işlenmesi sırasında olduğu gibi aflatoksin ile kontamine olmuş tozları soluduğunda, aflatoksinlere, özellikle AFB₁'e mesleki olarak maruz kalabilir. Bunlara maruz kalan kişilerin üst solunum yolu ve akciğer kanseri insidanslarının daha yüksek olduğu ve AFB₁'in deney hayvanlarında % 100 pulmoner adenomu indüklediği bildirilmiştir. Aflatoksinlerin, çeşitli hormonların sentezinden sorumlu enzimleri ve substratlarını bozarak çeşitli endokrin bezinin işleyişine de müdahale ettiği bildirilmiştir. Aflatoksinler ve metabolitlerinin yanı sıra üretilen ROT'un hipofiz bezi, yumurtalık granüloza hücreli tümörleri, adrenal bezin adenomları ve adenokarsinomları, böbrekler, tiroid bezi, yumurtalıklar, testisler gibi farklı endokrin bezlerinde çeşitli kanserlere neden olduğu bildirilmiştir (39).

Akut toksisite

Aflatoksinlerin tek bir dozda veya kısa bir süre için tekrarlayan yüksek dozlarda oral alımı, insanlarda ve hayvanlarda sarılık, uyuşukluk, bulantı, ödem, vasküler kırılabilirlik, karaciğer dokularının hemorajik nekrozu, safra kanalı

hiperplazisi ve sonunda ciddi karaciğer hasarı ve ölüm (%10-60) gibi tipik semptomları içeren akut zehirlenmeye neden olur (39,53,54). İnsanlarda akut toksisiteyi tetikleyen spesifik aflatoksin dozu üzerinde bir fikir birliği olmamasına rağmen, böyle bir dozun yaş, cinsiyet, sağlık ve beslenme durumu, kronik viral hepatit, alkolizm, sigara içme, siroz, hepatotoksik mikrositine maruz kalma gibi faktörlerin varlığı veya yokluğuna bağlı olarak oldukça değişken olabilmektedir. Örneğin, iyi beslenmiş yetişkin kadınların aflatoksinlere, benzer sağlık ve beslenme durumuna sahip erkeklerden daha az duyarlı olduğu bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) dünya çapında aflatoksikoz salgınları ve *in vitro* testlerin kayıtlarına dayanan bir tahminine göre, kısa bir süre için 1 mg AFB₁/kg veya daha yüksek seviyelerde kontamine gıdaların düzenli olarak tüketilmesi insanlarda akut zehirlenmeye neden olmaktadır. Aynı rapora göre, AFB₁ ile kontamine gıdaların 1-3 hafta boyunca 0,02-0,12 mg/kg vücut ağırlığı dozunda günlük tüketimi, hayatı tehdit eden aflatoksikozu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, insanlarda kümülatif ölümcül dozun yetişkinler için 10 ila 20 mg ve çocuklar için 3 mg arasında değiştiği öngörülmektedir. Birçok araştırmacı, akut aflatoksikozu, aflatoksinler ve makromoleküller (proteinler, fosfolipidler ve nükleik asitler) arasındaki etkileşim ve sonuç olarak makromoleküllerin fizyolojik ve yapısal işlevlerinin bozulması ile ilişkilendirse de, akut aflatoksikoz mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Aflatoksin-protein eklentileri (özellikle de aflatoksin-albumin katım ürünü), akut zehirlenme ile sıklıkla ilişkilendirilmiştir (11). Ayrıca, aflatoksin-albümin katım ürünü oluşumunun yanı sıra AFB_{2a}'nın bir diyet kontaminantı veya bir AFB₁-faz I metaboliti olarak metabolizmasının da akut toksisite ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. AFB_{2a}'nın hücrel proteinler ve fosfolipidlerle kovalent olarak bağlanıp, lipid ve protein eklentileri oluşturarak, muhtemel akut aflatoksikoza yol açtığı da bildirilmiştir (12). Ek olarak, Şekil 2.4.'de gösterildiği gibi aflatoksin-fosfolipid eklentilerinin ve ROT kaynaklı LPO'nun, hücre, mitokondri ve endoplazmik retikulum zarlarının bütünlüğünün ve işlevlerinin bozulmasından başlıca sorumlu olduklarına dair artan bulgular vardır. Ayrıca, yüksek dozlarda aflatoksinlere maruz kalındığında, şiddetli DNA fragmantasyonu, akut aflatoksikozda rol oynayan diğer önemli bir etkidir.

Bununla birlikte, düşük dozlarda aflatoksinlere kronik maruziyet akut aflatoksikozda gözlenenlerle benzer etkiler üretebilirken, etkileri faz II enzimleri ve hücresel antioksidan savunma mekanizmaları ile detoksifiye edilerek veya mutasyonları önleme amaçlı DNA onarımı ile hafifletilebilir. Ancak, akut aflatoksikoz, dozun çok yüksek olduğu durumlarda yukarıda belirtilen hasarların çoğunun veya tamamının aniden ortaya çıkmasından kaynaklanır. Çok fazla miktarda aflatoksin kısa sürede, hücrenin detoksifikasyon kapasitesinin üstüne çıkabilir ve metabolizmayı ciddi DNA hasarına, hücre döngüsü progresyonunun bozulmasına, DNA parçalanmasına, metabolik bozukluklara, sitotoksositeye ve sonunda doku yetmezliğine yol açan toksik metabolitlerin üretimine doğru yönlendirebilir (11).

2.4. Aflatoksin M₁

AFM₁, CYP450 enzimleri tarafından karaciğerde oluşan, AFB₁'in hepatik hidroksillenmiş metabolitidir ve memelilerin idrar, dışkı ve sütü ile ıtrah edilebilmektedir (14,15). Bu metabolit, AFB₁ ile kontamine olmuş yemle beslenen emziren çiftlik hayvanlarının sütündeki ana atılım ürünüdür; bu nedenle de hayvancılıktan elde edilen süt ve süt ürünlerini kontamine edebilmektedir (55,56). AFM₁, sütte tespit edilen aflatoksinlerin % 95'ini temsil etmektedir. Farklı çalışmalardan elde edilen verilere göre, AFB₁'in sağmal ineklerin sütüne AFM₁ olarak taşınma oranı % 0,3 ile % 6,2 arasında değişiklik göstermektedir (9). AFB₁'in yemden süte taşınma oranını; beslenme rejimleri, yutma oranı, sindirim oranı, sağlık durumu, hepatik biyotransformasyon kapasitesi, laktasyon aşaması ve hayvanın gerçek süt üretimi gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Bu da, AFM₁'in süte ıtrah oranının; çeşitli fizyolojik ve beslenme faktörleri, mevsimsel değişim ve genetik polimorfizme bağlı olarak hayvanlar arasında değişebildiğini göstermektedir (9,16,57). Örneğin, laktasyonun başlangıcında ıtrah, geç laktasyon fazına kıyasla 3,3-3,5 kat daha fazladır. Bunun yanı sıra AFM₁ konsantrasyonunun kışın yaz mevsimine göre daha yüksek olduğu bildirilirken, sabah sütünün akşam sütünden daha yüksek bir toksin yüzdesine sahip olduğu bulunmuştur (35,58).

Sütteki AFM₁ ve hayvanlar tarafından tüketilen yemdeki AFB₁ miktarı doğrusal bir ilişki göstermektedir (59). AFM₁, AFB₁'in alınmasından sonraki 15 dakika içinde, süt ve idrara ıtrah edilmeden önce emziren hayvanın kanında tespit

edilebilir. Öte yandan, sütte AFM₁ ilk AFB₁ alımından 12-24 saat sonra tespit edilebilir ve konsantrasyonu alımdan sonraki 2-3 gün içinde daha yüksek bir seviyeye ulaşır. Benzer şekilde, AFB₁ ile kontamine olmuş yem maddeleri ile besleme kesilirse, sütteki AFM₁ konsantrasyonu 2-3 gün içinde tespit edilemez bir seviyeye düşer (35,55,60).

Yüksek stabiliteleri nedeniyle; pastörizasyon, ultra yüksek sıcaklık, sterilizasyon, pişirme, iyonlaştırıcı radyasyon, enzimlerin eklenmesi ve diğer sıradan gıda işleme yöntemleri ile veya depolanma sırasında süt ve süt bazlı ürünlerdeki AFM₁ miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir (15,40).

Süt ve süt ürünlerinde AFM₁ oluşumu en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir, çünkü çocuklar ve bebekler bu ürünlerin ana tüketicileridir ve aflatoksinlerin yetişkinlere göre olumsuz etkilerine karşı daha hassastırlar (61).

2.4.1. AFM₁ Toksisitesi

AFM₁'in toksisitesi ile ilgili bilimsel bilgi birikimi dahilinde AFM₁ insan sağlığı için potansiyel risk olarak kabul edilmiş ve IARC tarafından "Grup I" karsinojen (insanlar için kanserojen) olarak sınıflandırılmıştır (13).

AFM₁, esas olarak kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi veya karaciğerde AFB₁ metabolizması yoluyla hem akut hem de kronik toksikozlara yol açabilmektedir. İnsanlarda AFM₁'e maruz kalma esas olarak süt tüketimi yoluyla gerçekleşir (9). AFM₁ tarafından hedeflenen ana organ karaciğer olduğundan, hepatotoksik bir metabolit olarak kabul edilmektedir. AFM₁'in toksisitesi ve konakçı üzerindeki etkisi cinsiyet, yaş, tür ve beslenme tutumuna bağlıdır (60). AFB₁'in metabolizmasından kaynaklanan AFM₁ oluşumu, bazı yayınlarda detoksifikasyon işlemi olarak bahsedilse de; AFM₁'in karsinojen, sitotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik bir ajan olduğu kanısına varılmıştır. AFM₁'in, memeli hücrelerinde *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda DNA hasarına, gen mutasyonuna, kromozomal anomalilere ve hücre transformasyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca AFM₁ de, AFB₁ gibi kalıtsal *p53* geni üzerinde mutajenik etki gösterebilmektedir. AFM₁'in *in vivo* olarak, AFB₁'in yaklaşık % 10'u kadar karsinojenik ve *in vitro* olarak, AFB₁'in yaklaşık % 10'u kadar mutajenik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (1,14,16,35,58,62). AFB₁'e göre daha az DNA hasarı ve pre-neoplastik lezyon

oluşturmasının AFM₁'in DNA-reaktif epoksite metabolize olma yeteneğinin sınırlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

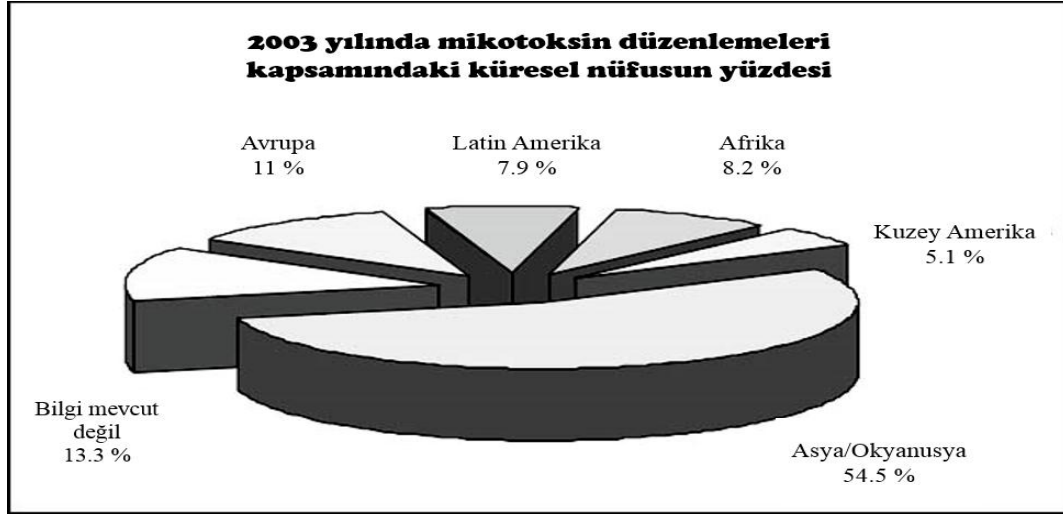
Farklı hayvan türlerinde yapılan uzun süreli çalışmalar, AFM₁'in hepatotoksitesini kanıtlamıştır (9). Hepatit ile AFM₁ bağlantısı üzerine yapılan çalışmalar, hepatit taşıyıcılarının, aflatoksinlerle kontamine gıdaları tükettikleri takdirde hepatoselüler karsinoma geliştirme eğilimlerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (35).

AFB₁'in proteine bağlanmak ve akut toksik etkiler ortaya koyabilmesi için reaktif epoksite dönüştürülmesi gerektiği kanıtlanmış olsa da; bu işlem AFM₁'in sitotoksitesini için önemli görünmemektedir. AFM₁, CYP450 enzimlerini eksprese eden veya eksprese etmeyen insan hücre hatlarında (MCL-5), AFB₁'in aksine metabolik aktivasyon olmadığında da doğrudan toksisite potansiyeli göstermiştir. Daha yakın zamanda, insan bağırsak enterosit kültürlerinde de AFM₁'in doğrudan sitotoksitesini ve hücre içi ROT üretimi ile ilişkili sitotoksik sonuçlar da gözlenmiştir (9). AFM₁ ve AFB₁, çeşitli türlerde hemen hemen aynı akut toksisiteye yol açmaktadır. AFM₁'in neden olduğu akut aflatoksikoz, yetersiz beslenme hastalıklarının patogenezi, enfeksiyonlara neonatal duyarlılıkta artış ve sarılık ile ilişkilendirilmiştir. Kronik aflatoksikozun ise nutrisyonel, immünolojik ve kanserojen sonuçları bulunmaktadır (63). Bunlar dışında ek olarak, bağışıklık baskılama, azaltılmış süt üretimi ve vücut dokularına daha az oksijen temini gibi diğer zararlı etkiler gözlenebilir (60). Magoha ve ark. (64), tarafından yürütülen çalışmada, AFM₁ maruziyeti ile bebeklerde ağırlık ve boy arasında anlamlı bir ters ilişki gözlenmiştir.

2.4.2. Süt ve Süt Ürünlerinde AFM₁ ile İlgili Düzenlemeler

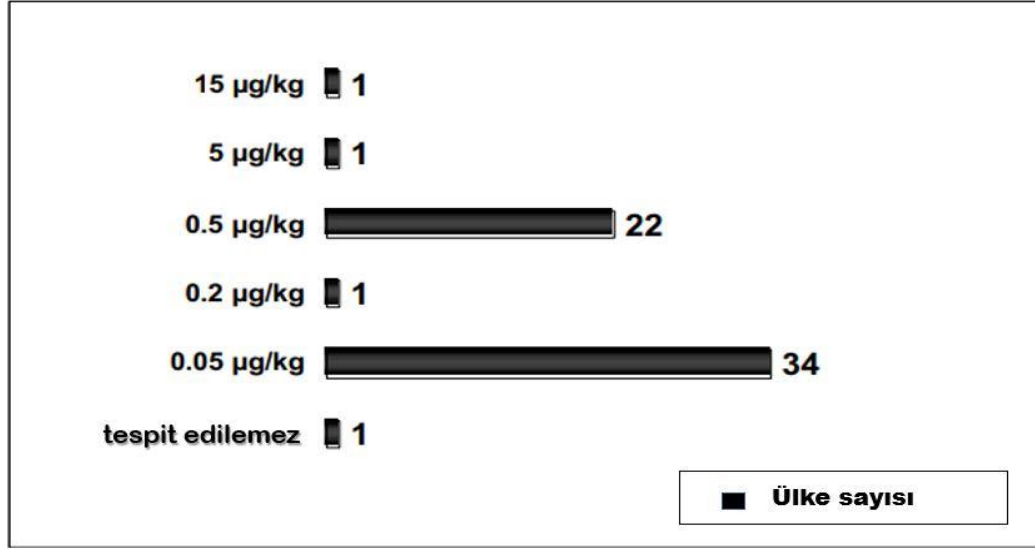
Yemlerde ve gıdalarda mikotoksinlerin birlikte bulunması, bazı uluslararası ve kamu otoritelerinin, olası mikotoksin maruziyetini kontrol etmek için yasal prosedürleri uygulamasına yol açmıştır. Gıda ve Tarım Örgütü tarafından mikotoksinler için dünya çapında düzenlemeler üzerine yapılan araştırmaya göre; 2003 yılı sonunda düzenlemeler yapan ülkelerdeki toplam nüfus, dünya nüfusunun yaklaşık yüzde 87'sini temsil etmektedir (3). Mikotoksin maruziyetinin insan sağlığı üzerindeki etkileri, dünya çapında endişe yaratmasına rağmen, bazı ülkeler bilinen

hiçbir mikotoksin düzenlemesine sahip değildir. Bu ülkelerdeki toplam nüfus dünya nüfusunun yaklaşık yüzde 13'ünü temsil ettiği bildirilmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Mikotoksin düzenlemeleri kapsamındaki dünya nüfusunun yüzdeleri (3).

2003 yılı sonunda 60 ülkede süt ve süt ürünlerinde AFM₁ için yönetmelikler kabul edilmiştir. Çoğunlukla Avrupa Birliği (AB) ve AB aday ülkeleri büyük oranda en geniş pike katkıda bulunurken; Amerika Birleşik Devletleri (ABD), birkaç Asya ülkesi ve Latin Amerika, Şekil 2.6.'de görüldüğü gibi ikinci en geniş pike katkıda bulunmuştur. Farklı ülkelerdeki süt ve süt ürünlerinde AFM₁'in maksimum kabul limitine yönelik uluslararası düzenlemeler, Tablo 2.2.'de özetlenmiştir. Örneğin, AB, yetişkinlerin tükettiği çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretimi için kullanılan sütteki kabul edilebilir maksimum AFM₁ limitini 0,05 µg kg⁻¹ olarak belirlemiştir. Fakat bebek sütü ve devam sütü dahil olmak üzere; bebek mamaları ve takip mamalarında AFM₁ için daha kısıtlayıcı olan 0,025 µg kg⁻¹, maksimum sınır olarak belirlenmiştir (65). Hem Türkiye hem de KKTC, Avrupa Birliği düzenlemelerine uyumlu olarak yetişkin ve bebek tüketimi için süt ve süt ürünlerindeki maksimum AFM₁ sınırını sırasıyla, 0,05 µg kg⁻¹ ve 0,025 µg kg⁻¹ olarak belirlemiştir (66). Bununlar birlikte sütte AFM₁ için daha yüksek düzenleyici seviye, ABD dahil olmak üzere bazı ülkelerde 0,5 µg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir.



Şekil 2.6. 2003 yılı sonunda, dünya çapında sütte AFM₁ için uygulanan limitler (3).

2.5. Mikotoksin Kontaminasyonunun Önlenmesi ve Detoksifikasyon Yöntemleri

Gıda zincirinde AFM₁'i kontrol etmenin en etkili yolu, tarımsal ürünlerde küf büyümesini ve hayvancılık yemlerinde müteakip AFB₁ üretimini önlemektir. Mikotoksinlerin tarladan beslenmeye kadar olan süreçte oluşumlarını tam olarak anlamak ve mikotoksin toksisitesini en aza indirmek için entegre stratejileri uyarlamak önemlidir. Hayvan yemlerinde, farklı hayvan türlerine ilişkin izin verilen maksimum AFB₁ seviyeleri, Avrupa Komisyonu tarafından belirlenmiştir (Tablo 2.3.) Bu nedenle, yemlerdeki AFB₁ konsantrasyonunun AB düzenlemelerine uygun olması beklenmektedir. Bununla birlikte, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından düzenlenen yemlerde aflatoksin için etki seviyeleri ise, Avrupa Komisyonu düzenlemelerine göre küçük bir farklılık göstermektedir (Tablo 2.4.). Yemlerdeki mikotoksin kontaminasyonu tüm koruyucu önlemlere rağmen kaçınılmaz olabilmektedir. Küf büyümesinin önlenmesi, tarlada hasat öncesi başarısız olduğunda, hasat sonrası yaklaşımlar ve mikotoksinlerin inaktivasyonu veya dekontaminasyonu gibi diğer alternatifler dikkate alınıp uygulanmalıdır (72).

Tablo 2.2. Süt ve süt ürünlerinde, ülkelere göre AFM₁'in maksimum kabul limiti.

Ülke	Ürün	Maksimum AFM ₁ seviyesi (µg/kg)
AB ^a	Çiğ süt , ısıtılmış süt ve süt bazlı ürünlerin üretimi için süt Bebek sütü ve devam sütü dahil olmak üzere; bebek ve devam maması	0.05 0.025
ABD ^b	Süt	0.5
Ermenistan ^b	Süt	0.5
Avustralya ^b	Çocuk sütü	0.02
Arjantin ^b	Sıvı süt Süt tozu	0.5 5
Brezilya ^b	Sıvı süt Süt tozu	0.5 5
Uruguay ^b	Sıvı süt Süt tozu	0.5 5
Paraguay ^b	Sıvı süt Süt tozu	0.5 5
Bahamalar ^b	Süt	Düzenleme yok
Barbados ^b	Süt	0.5
Belarus ^b	Süt protein konsantresi, tereyağı Süt esaslı bebek besini	0.5 İzin verilmiyor
Bolivya ^b	Süt	Düzenleme yok
Bulgaristan ^b	Çiğ süt Süt tozu, yoğunlaştırılmış süt	0.05 0.4
Burkina Faso ^b	Süt	Düzenleme yok
Kamerun ^b	Süt	Düzenleme yok
Şili ^b	Süt	0.05
Çin ^c	Süt ve süt ürünleri ^h Bebek maması süt tozu	0.5 Tespit edilemez
Hırvatistan ^b	Süt ve süt ürünleri	0.5
Estonya ^b	Süt ve süt ürünleri Ham yağ, don yağı, tereyağı, süt proteininin hidrolizatları, kazein ve kazeinatlar, peynir altı suyu konsantreleri Süt ve süt ürünlerine dayalı gıda takviyeleri	0.05 0.5
Gana ^b	Süt	Düzenleme yok
Almanya ^b	Çiğ süt, ısıtılmış süt ve süt bazlı ürünlerin üretimi için süt Bebekler ve küçük çocuklar için gıda	0.05 0.01

Tablo 2.2. (Devam) Süt ve süt ürünlerinde, ülkelere göre AFM₁'in maksimum kabul limiti.

Honduras ^b	Süt ve süt ürünleri	0.05
	Bebek maması	0.02
İzlanda ^b	Süt ve süt ürünleri	0.05
Endonezya ^d	Süt, süt içecek ürünü, fermente süt, renin hidrolize süt ürünleri	0.5
	Konsantre süt ve benzeri	0.5
	Kuru süt ve ilgili ürünler	5
Kore ^e	Çiğ süt ve işleme öncesi süt	0.5
İran ^b	Sütlü tahıllara dayalı bebek maması	0.02
	Süt [çiğ, pastörize, sterilize edilmiş]	0.05
	Süt tozu	0.5
	Bebekler için süt tozu (sulandırıldıktan sonra)	0.01
	Diğer süt ürünleri	0.05
İsrail ^b	Süt ve süt ürünleri	0.05
İtalya ^b	Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretimi için süt	0.05
	Bebek maması	0.01
Japonya ^f	Süt	0.5
Letonya ^b	Süt ve süt ürünleri	0.5
Pakistan ^b	Süt ve süt ürünleri	Düzenleme yok
Fas ^b	Süt ve süt ürünleri	0.05
	3 yaşın altındaki bebekler için süt ve süt ürünleri	0.03
	Süt tozu	0.5
	3 yaşın altındaki bebekler için süt tozu	0.3
Rusya ^b	Süt ve süt ürünleri	0.5
Slovakya ^b	Süt ve süt ürünleri	0.5
	Bebek maması ve çocuklar için süt bazlı gıdalar	0.1
Tayvan ^b	Süt	0.5
	Süt tozu	5
Türkiye ^g	Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretimi için süt	0.05
	Bebek sütü ve devam sütü dahil olmak üzere; bebek ve devam maması	0.025
KKTC	Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretimi için süt	0.05
	Bebek sütü ve devam sütü dahil olmak üzere; bebek ve devam maması	0.025
Ukrayna ^b	Süt ve süt ürünleri, yoğunlaştırılmış süt, süt tozu, bebek maması için süt ürünleri	0.5
Venezuela ^b	Sıvı süt	0.5
	Süt tozu	5

^a (67), ^b (3), ^c (68), ^d (69), ^e (70), ^f (71), ^g (66)

^h Süt tozu, çiğ süte göre hesaplanmıştır

Tablo 2.3. Yemlerde AFB₁ için izin verilen maksimum seviyeler.

Hayvan yemi amaçlı ürünler	Maksimum AFB ₁ içeriği (mg / kg ^a)
Tüm yem malzemeleri	0.02
Siğir, koyun ve keçiler için tam hayvan yemi	0.02
aşağıdakiler hariç olmak üzere:	
- Süt hayvanları için tam yem	0.005
- Buzağı ve kuzu için tam yem	0.01
Diğer tam hayvan yemleri	0.01
Siğir, koyun ve keçiler için tamamlayıcı yemler	
(süt hayvanları, buzağılar ve kuzular için tamamlayıcı yemler hariç)	0.02
Diğer tamamlayıcı yemler	0.005

^a Nem içeriği % 12 olan bir hayvan yemine göre (77)

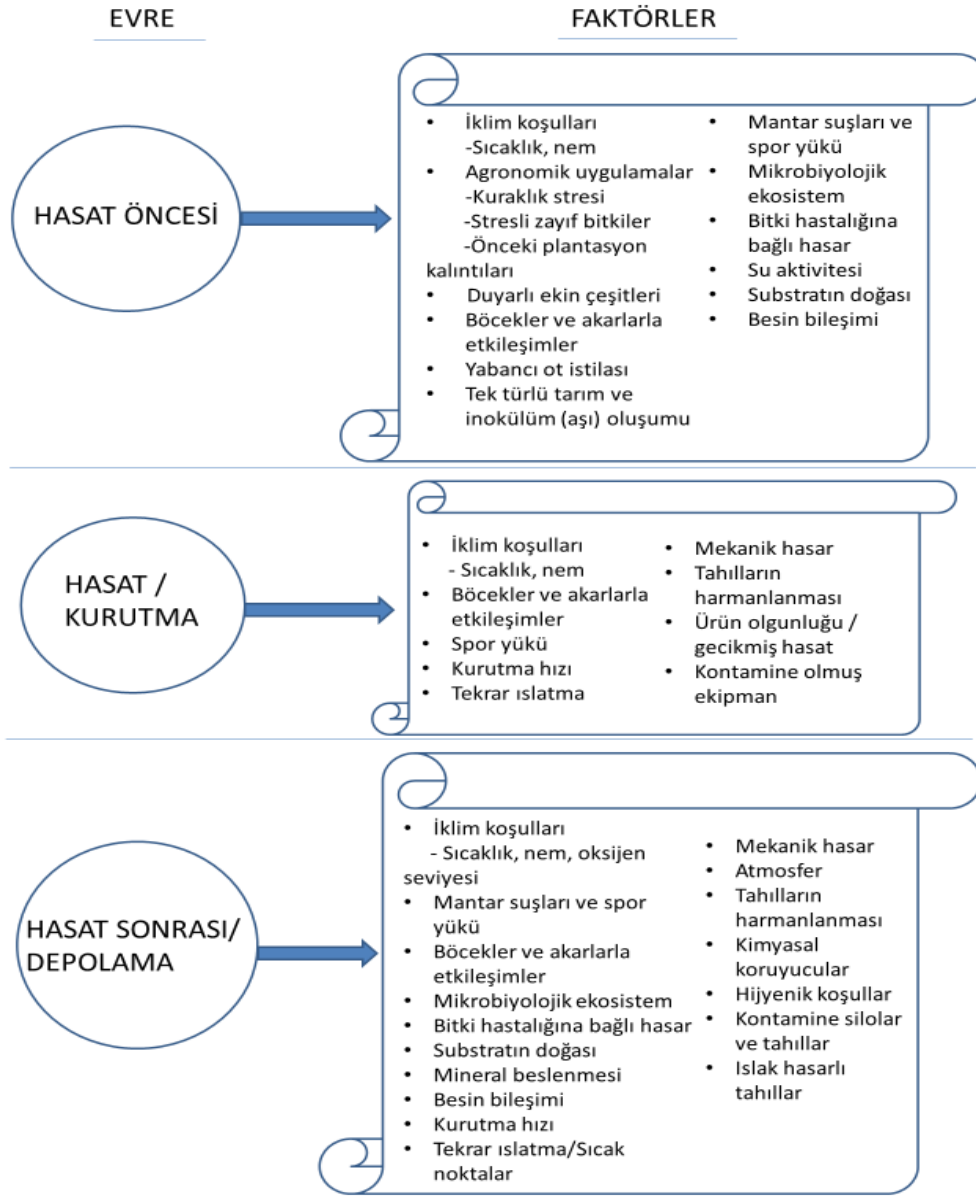
Tablo 2.4. ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nin yemdeki toplam aflatoksinler için belirlediği önlem seviyeleri.

Yem malzemesi	Aflatoksinlerin mg / kg olarak konsantrasyonu
Olgunlaşmamış hayvanlar ve süt siğirleri için mısır	0.02
Damızlık et siğiri için mısır ve yer fıstığı ürünleri	0.1
Kesim için hazırlanan damızlık et siğiri için mısır ve yer fıstığı ürünleri	0.3
Pamuk tohumu küspesi (yem maddesi olarak)	0.3
Diğer tüm yem maddeleri	0.02

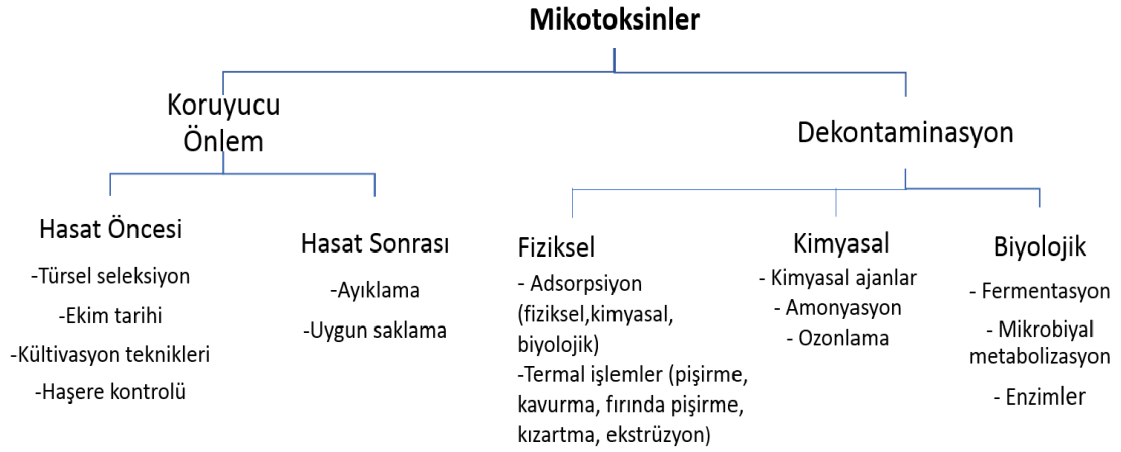
(28)

Küf büyümesi ve mikotoksin üretimi temel olarak çevresel faktörlere, hasat (mahsul olgunluğu, sıcaklık ve nem) dahil olmak üzere tarım ve silaj yapım uygulamalarına, depolama (yapı, nem, sıcaklık), işlenme ve yükleme-boşaltma koşullarına bağlıdır (5,73). D'Mello ve MacDonald (74), gıdalarda ve yemlerde mikotoksinlerin ortaya çıkmasını veya üretimini etkileyen çeşitli faktörleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırmıştır. Kuraklık, sıcaklık artışı, bağıl nem,

nem mevcudiyeti, mekanik yaralanma ve böcek / kuş hasarı gibi çevresel koşullar fiziksel faktörler olarak kabul edilir ve bu faktörler mikotojenik mantarların kolonizasyonunu değiştirebilir. Mevsim için normal olmayan hava koşulları ekinleri ve yemleri modifiye edip, mikotoksin üretimine duyarlı hale getirebilir. Mikotoksin üretimini etkileyen diğer faktörler ise fungusitlerin ve/veya gübrelerin kullanımını içeren kimyasal faktörlerdir. Biyolojik faktörler ise kolonize edici toksijenik mantar türleri ve substrat arasındaki etkileşimlere dayanır. Ayrıca biyolojik faktörler kendi içinde mantar türleri, suş spesifikliği, suş varyasyonu ve toksijenik özelliklerin değişkenliği gibi iç faktörlere ayrılır (31). Tahıllarda, sıcaklık ve nem içeriği küf oluşumunu ve müteakip mikotoksin üretimini uyaran en kritik faktörlerdir. Nem içeriğine bağlı nem etki eder ve bu da küf gelişimi için su mevcudiyetine neden olur. Tahıllarda küflerin büyümesine ve müteakip mitoksin üretimine elverişli veya baskılayıcı olabilen faktörler Şekil 2.7.'de özetlenmiştir. Genel olarak hububatlarda küfler, 10°C-45°C sıcaklık aralığında, > %70 bağlı nem ve 4-8 pH aralığında büyüebilirken, aflatoksin üretimi için gerekli olan optimum sıcaklık ve a_w sırasıyla 33°C ve 0.99'dur (5). İdeal olarak, mikotoksinler tarafından kontamine olan gıda ve yemlerin zararlı etkilerinden kaçınmak için üç strateji vardır: 1) küf kontaminasyonu ve büyümesinin önlenmesi 2) mikotoksin içeren gıda ve yemlerin dekontaminasyonu, 3) tüketilen gıda / yemlerin mikotoksin içeriğinin sindirim sistemine emiliminin engellenmesi (75). Mikotoksin zehirlenmesinin önlenmesi için bazı geleneksel stratejiler genellikle hasat öncesi ve sonrası yaklaşımları ve hasat sırasında özel yaklaşımları gerektirir. Öte yandan, gıda ve yem mikotoksinler tarafından kontamine olduğunda; kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemleri içeren çeşitli dekontaminasyon stratejileri uygulanır (Şekil 2.8.). Şekil 2.8.'de özetlenen alışılmış stratejilere ek olarak, araştırmacılar mikotoksinlerin degradasyonu için mikrodalga ısıtma, elektron ışını ve gama ışınlanması, UV ve darbeli ışık, elektrolize su ve soğuk plazma gibi yeni teknikleri de araştırmaktadır (76).



Şekil 2.7. Tahıllarda küf birikmesine ve müteakip mikotoksin üretimine katkıda bulunan faktörler (5,75).



Şekil 2.8. Mikotoksinler için alışılmış önleme ve dekontaminasyon stratejileri (73).

2.5.1. Mikotoksin Kontaminasyonunun Önlenmesi

Tarla yönetiminin tüm aşamalarında (ekimden önce bile) iyi tarım ve üretim uygulamaları, depolama izleme, sıralama, ayırma ve temizleme prosedürleri mikotojenik mantar büyümesini ve müteakip mikotoksin üretimini önlemenin en temel ve etkili yoludur (23). Mikotoksin dekontaminasyon stratejilerinin kontrolü, tehlike analizi ve kritik kontrol noktaları (*HACCP*) yaklaşımının kriterleri ile sağlanabilir. Gıda yönetiminde mikotoksin tehlikeleri de dahil olmak üzere gıda zehirlenmesini önlemek için tasarlanmış olan bu yaklaşım, tarlalardan gıdalara/yemlere mikotoksinlerin oluşumunu kontrol etmek için proaktif yöntemler sunmaktadır (78).

Mantar Oluşumunu ve Mikotoksin Üretimini En Aza İndirmek İçin Hasat Öncesi Yöntemler

Kuraklık stresi, mantar ve böcek istilası gibi çeşitli abiyotik ve biyotik faktörler ve yanlış ekim teknikleri hasattan önce tahıllarda mikotoksin üretimine esas olarak sebebiyet verir (79). Tarla yönetiminde hasat öncesi önlemler, tohumlama yatağının hazırlanması, ürün rotasyonu, çeşit seçimi, toprak işleme, uygun ekim zamanı, sulama, toprak gübrelerinin ve atoksijenik mantar türlerinin kullanımı, böcek öldürücülerin kullanımı ve fungusitlerin kullanımı gibi etkili tarımsal uygulamaları içerir (29,35). Ekimden önce tarla yönetimi mikotoksinlerin kontrolü için çok önemlidir. Örneğin, önceki mahsul bitkilerinin kalıntılarını gidermek için derin çift sürme, konakçı olmayan bitkilerle mahsul rotasyonu, geç olmayan ekim tarihleri ve

yüksek kırpma yoğunluğundan kaçınmak, tarlada mikotoksijenik mantar inokülüm birikimini önlemek için proaktif uygulamalardandır. Mısır ve diğer hububat çeşitlerinin seçimi ile ilgili olarak, çekirdek vaksı bileşimindeki farklılıklardan dolayı melez çeşitler arasında *Aspergillus* türlerine karşı duyarlılıkta önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu nedenle, uygun melez seçimi ve yumuşak çekirdek melezlerinin kullanımından kaçınılması dikkate alınmalıdır. Mantar birikimine dirençli bitki çeşitlerin yetiştirilmesi ve katabolizma yeteneğine sahip veya toksin üretimine müdahale edebilen transgenik çeşitlerin daha da geliştirilmesi saha yönetiminde potansiyel olarak etkili yöntemler olabilir. Ayrıca, uygun sulama yöntemleri kuraklık stresini önlemek ve bitkilerin mantar kontaminasyonuna duyarlılığını azaltmak için çok yararlı olabilir (29,72,80,81). Gübreleme; N, P₂O₅ ve K₂O arasında denge elde edildiğinde, bitki sağlığının iyileştirilmesi, canlılığı ve direncinin sürdürülmesi açısından önemli bir uygulama olarak bilinmektedir. Yüksek oranda azot kullanıldığında ve denge sağlanmamış gübreleme yapıldığında, güçlü vejetatif gelişir ve bu "bitkilerin yumuşamasına" yol açar. Sonuç olarak, ürünler böcek ve küf saldırılarına ve müteakip aflatoksin üretimine daha duyarlı hale gelir (35,81). Yabancı ot ve böceklerin mantar enfeksiyonunu arttırdığı bilindiğinden; pestisitlerin ve fungusitlerin kullanımı ve ayrıca bunların kullanımlarında uygun zamanlama, mikotoksijenik mantar kontaminasyonunun engellenmesi için alınabilecek kritik önlemlerdir (81). Fernando ve Bean (82), çalışmada fungusit trisiklazolün *in vitro* testte *A.flavus* ve *A.parasiticus*'un büyümesini ve müteakip aflatoksin üretimini inhibe etmede etkili olduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışmada ise, dikloran, iprodione ve vinclozolin gibi fungusitler *A.flavus*'un misel büyümesini inhibe etmiş ve aflatoksin üretimini baskılamıştır (81). Ayrıca El-Kady ve ark. (83), mısır tanelerinde aflatoksin üretiminin, vitavax-captan ve rizolex-T mantar öldürücüler gibi güçlü inhibitörler tarafından inhibe edildiğini rapor etmişlerdir.

Ek olarak, besleyici kaynaklar için rekabet ve ekolojik niş istilası mekanizmasını içeren toksijenik olmayan mantar suşlarının saha yönetiminde uygulanması önemli bir biyokontrol yöntemi olarak kabul edilir. Toksijenik olmayan bu suşlar, toksijenik mantar suşları ile aynı ekolojik niş için rekabet eder, böylece toksijenik mantar kontaminasyonu ve mikotoksin üretimi seviyesini azaltırlar. Bu nedenle, toksijenik suşların rekabetçi bir şekilde dışlanması için, toksik olmayan

suşların ağırlıklı olarak toksijenik suşlar tarafından kontamine olmaya duyarlı olan gıda veya yem maddelerinde bulunması gerekmektedir (29,84). Tarladaki kolonize buğday tohumları için toksik olmayan *A.flavus* suşu AF36'nın test edilmesi, pamuk tohumlarının olgunluk döneminde aflatoksin seviyesinin azalması ile sonuçlanmıştır (85). Brown ve ark. (86), tarafından yapılan bir başka çalışma, toksik olmayan suşlar eş zamanlı olarak veya tarla deneylerinde toksijenik suştan 1 gün önce aşılandığında, mısırdaki aflatoksin kontaminasyonunun % 95'e kadar azaldığını göstermiştir. Ayrıca, toksik olmayan bir suş olan *A.flavus* NRRL 21882 saha testinde kullanılmış ve hasat zamanı ve hatta depolamadan sonra bile aflatoksin seviyelerini etkili bir şekilde azaltmıştır. *A.flavus* ve *A.parasiticus*'un toksik olmayan suşlarının tarla toprağına uygulanmasıyla aflatoksinlerin kontrolü için başarı elde edilmiş olsa da, toksijenik olmayan suşların diğer mikotoksin türlerinin üretimini indükleyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (81).

Ekim

Genetik tekdüzelik, bitki patojenleri, böcekler ve abiyotik faktörlerde kırılganlığa yol açabilir. Bu da gıda güvenliği için yüksek riskle sonuçlanabilir. Üretime yönelik riskleri en aza indirmek amacıyla yararlı genetik çeşitlilik sağlamak ve gelişmiş özgün özellik performansını sunmak için, uygun olmayan, egzotik germplazma ile yetiştirme yapılır. Genetik kırılganlığın azaltılması ve genetik iyileştirmelerin sağlanması, gıda ve yemlerin verimliliğini veya kullanımını artırabilir. Dolayısıyla bu da üreticilere tedarik edilecek mahsulün değerini artırmış olur.

Mısırdaki ürün çeşitlendirme ile ilgili önemli ilerlemeler katedilmiştir. Tarımsal üretimin küresel sürdürülebilirliği, ekonomik istikrar ve beslenmeye katkıda bulunmak için egzotik, kamusal ve tescilli mısır germplazmından yararlanılmasını amaçlayan Mısır'ın Genetik Geliştirilmesi programı ve Mısır Derneği Haritalama Paneli projesi verilebilecek örneklerdendir. Bunlar aflatoksin birikimine dirençli bir germplazma tanımlamışlardır. Elde ettikleri hatlar şu anda uygun mısır çeşitleri üretmek için testlere tabi tutulmaktadır (87,88). Williams (89)'a göre, tahıllarda aflatoksin azaltılması için en etkili yöntemlerden biri olan mısır yetiştiriciliği ile *A.flavus* ve aflatoksin birikimine karşı direnç elde edilebilir. Tarla testinde aflatoksin

içeriğinin % 30-73 oranında azaltılması, tescilli üç adet mısır germplazm hattı olan Tx736, Tx739 ve Tx740 ile elde edilmiştir (90).

Ekin Biçme

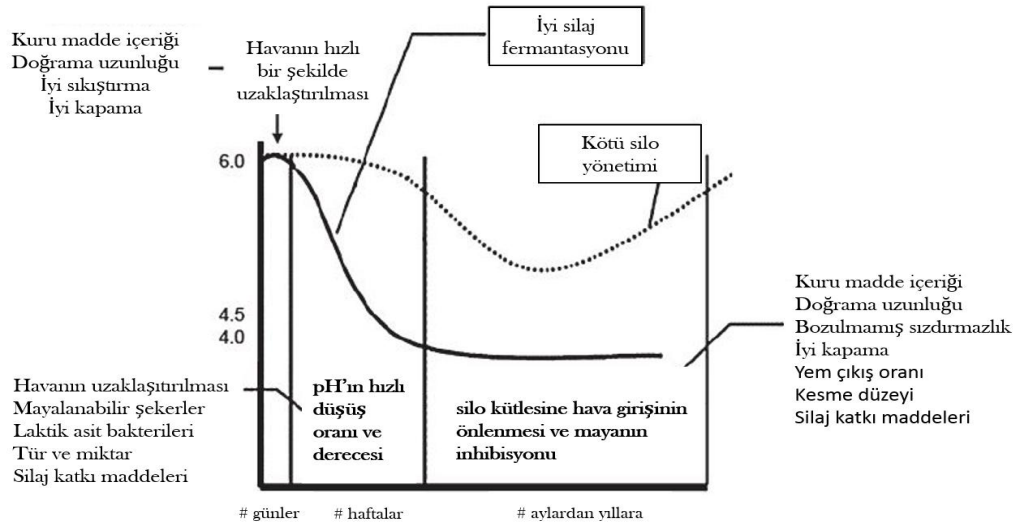
Olgunluğa ulaşmış tarla ekinlerinin hasat zamanlaması; nem veya su aktivitesini (a_w) ve buna bağlı olarak mikotoksin kontaminasyonunu azaltmak için en kritik faktördür (72). Mahsul stresine neden olan gecikmeli veya erken hasattan kaçınılmalıdır. Örneğin, Kaaya ve ark. (91), tarafından bildirildiğine göre, gecikmiş hasat mısırdaki aflatoksin seviyesini önemli ölçüde artırmaktadır. Yem ekinlerinin hasatında büyüme aşaması, biçme yüksekliği ve solma gibi faktörlere de dikkat edilmelidir (29). Tarım üreticilerinin hasat sırasında kaçınması gereken bir diğer faktör ise, hasarlı çekirdekleri toplamaktır. Yabancı maddeleri ve hasarlı çekirdekleri çıkarmak için yeni hasat edilmiş ürünler temizlenmelidir. Mahsulün mantar büyümesine duyarlılığının artmasına neden olan mekanik hasardan ve hasat aşamasında toprak ile tahıl temasından, mantar kontaminasyonunu en aza indirmek için kaçınılmalıdır. Son olarak, hasat edilmiş tahılları toplamak ve taşımak için kullanılan konteynerlerin yanı sıra, hasat ekipmanları da kontaminasyondan arındırılmış olmalı ve uygun şekilde sterilize edilmelidir (5).

Mantar Oluşumunu ve Mikotoksin Üretimini En Aza İndirmek İçin Hasat Sonrası Yöntemler

Hasat sonrası kontaminasyon, çoğunlukla hasat öncesi aşamada mantar büyümesinin ve kontaminasyonunun sonucudur. Mantar kontaminasyonunu önlemek pratik olarak kaçınılmaz olsa da, hasat sonrası prosedürler gıdalarda ve yemlerde mikotoksin üretimi ile ilişkili tehlikeleri en aza indirebilir (72). Mikotoksin üretiminin azaltılması, hızlı ve uygun kurutma, uygun taşıma ve paketlenme, ayıklama, temizleme, böcek kontrolü ve depolama koruyucu olarak botanik veya sentetik pestisitlerin kullanımını içeren hasat sonrası uygun silo yönetimi ile elde edilebilir (5).

Silo Yönetimi

Uygun silaj yapım uygulamaları ve iyi silo yönetimi, silaj örneklerindeki mikotoksijenik mantarların seviyelerini ve türlerini azaltabilir. İyi yönetim, tarladaki silajların uygun sıkıştırma, sızdırmazlık ve boşaltma uygulamalarını içerir. Anaerobik veya mikroaerofilik koşullar ve organik asitlerin varlığı, iyi korunmuş silajda mantar büyümesinin kısıtlanmasını sağlar. Depolama sırasında veya besleme sırasında uygun olmayan sızdırmazlık nedeniyle silolanmış malzemede artan oksijen mevcudiyeti, mayalar ve asetik asit bakterileri koruyucu asitlerin ve artık su karbonhidratlarının oksidasyonuna ve böylece aerobik bozulmaya yol açar. Aerobik bozulma; sıcaklık ve pH artışına neden olur ve mantarların silajlarda çoğalmasına sebebiyet verir. Bu nedenle, pH'ı ve oksijenin elimine edilmesini hızlı bir şekilde azaltmak ve ayrıca tüm toplama süresi boyunca bozulmadan kalması için silajların en kısa sürede silolanması tavsiye edilir. Ayrıca, silolanmış malzemenin kuru madde içeriği ile yakından alakası olan sıkıştırma; silo yönetiminde oksijenin silaj kütesine dağılımını etkileyen bir başka uygulamadır. Yem bitkilerinin optimum kuru madde içeriğinde silolanması çok önemlidir. Örneğin çim ve tam ürün mısırın optimum kuru madde içeriğinde silolanması sırasıyla, 350–450 g kg⁻¹ ve 300–350 g kg⁻¹'dir. Silajın aerobik stabilitesinin iyileştirilmesi ile ilgili olarak, organik asitler (asetik asit, propionik asit, formik asit, benzoik asit, sorbik asit, sitrik asit, vb.) ve bunların tuzları, inorganik asitler (sülfürik asit, fosforik asit, sodyum bikarbonat, vb.) ve bunların tuzları, antagonistik bakteriler ve mayalar, heterofermentatif laktik asit bakterileri ve kombinasyon ürünleri içeren inokulantlar, çeşitli bitki özleri ve uçucu yağlar gibi çeşitli silaj katkı maddeleri tarım üreticileri tarafından kullanılabilir (29,92,93). Asit bazlı katkı maddelerine ekonomik ve pratik alternatifler olarak, *L. plantarum* ve *L. fermentum* gibi laktik asit bakterileri, siloj üretiminde aerobik stabiliteyi geliştirmek veya garanti etmek ve yemlerin güvenli bir şekilde depolanmasını uzatmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (9). Silolamayı ve dolayısıyla iyi silo yönetimini etkileyen faktörler Şekil 2.9.'da özetlenmiştir.



Şekil 2.9. Silo yönetiminde silolamayı etkileyen faktörler. (29)

Kurutma

Hasattan sonra, tarımsal üreticilere süreçteki hızlılığı artırabilmeleri açısından hasat ve kurutma arasındaki süreyi en aza indirmeleri önerilir (80). Pitt ve ark. (94)'na göre, yavaş kurutma mikotoksin konsantrasyonunun artmasına neden olurken, hızlı kurutma hububat tanelerinde mikotoksin konsantrasyonunu düşük seviyelere indirmektedir. Bunun yanı sıra, uygun kurutma işleminde nem seviyesi, ürünlerde mikotoksin üretimini en aza indirmek için çok önemli bir faktördür. Genellikle, tahılların % 14 nem içeriğinin altına ve $0,7 a_w$ 'den daha azına hemen kurutulması, mantar büyümesi ve müteakip mikotoksin birikimi için uygun olmayan bir koşul oluşturmaktadır (5). Örneğin, Magan ve Aldred (80)'e göre, mikotoksin birikimini önlemek için kurutma ile mısır, pirinç ve arpadaki nem seviyeleri sırasıyla % 14, % 13-14 ve % 14-14,5'e düşürülmelidir.

Saklama

Tahıllarda diğer yaşam formlarının enerji ve besin maddeleri kullanarak neden olduğu bozulma, depolama sırasında kalite kaybına yol açar (5). Kabak ve ark. (95)'nin, çalışmasında tahıl tanelerinin depolama ortamlarında *Aspergilli* büyümesine özellikle yatkın olduğu gösterilmektedir. Bu nedenle, depolama sırasında mantarların büyümesi ve tahıl kalitesi bozulmasının önlenmesi için nem,

sıcaklık ve bağıl nem gibi kritik faktörler akıllıca yönetilmelidir. Örneğin; buğday, arpa ve yulaf için % 14-14,5; mısır için % 14 ve pirinç için % 13-14 nem içeriğinin depolama sırasında güvenli olduğu bulunmuştur (96). *A.flavus* büyümesi için en az 0,82 a_w gerekli olsa da; aflatoksinlerin üretilmesi için 0,95 ila 0,99 arasında değişen daha yüksek a_w değerlerine ihtiyaç vardır. Genel olarak, aflatoksin üretimi için daha yüksek a_w 'ye ihtiyaç duyulduğundan $\leq 0,70 a_w$ 'ye eşdeğer nem içeriğinde uygun depolama ile tahılda bozulma önlenir. Ayrıca, nem içeriği % 70 veya daha düşük bağıl nem ile dengede olduğunda *A.flavus*'un tahılda birikmeyeceği bildirilmiştir. Öte yandan, aflatoksinlerin 12 ile 40 °C arasındaki sıcaklıklarda üretildiği bilinirken, *A.flavus* büyümesi için sıcaklık 38,5 °C civarındadır. Bu nedenle, sıcaklığın uygun şekilde yönetimi, depolanmış ürünlerde mantar büyümesini önlemek için kritik parametrelerden biridir. Kurutulduktan sonra, tahıllar yaz aylarında 10 °C ile 15 °C arasında ve ayların geri kalanında depolama süresi boyunca 1°C-4°C sıcaklıkta korunursa, mantarların büyümesini ve metabolizmasını en aza indirmek mümkün olur (5). Sıcaklıktaki küçük dalgalanmaların (2-3°C'lik bir artış) bile küf büyümesini veya böcek istilasını tetikleyebileceği bir gerçektir (97). Bu nedenle, silolarda sıcaklığı kontrol etmek ve nemi buharlaştırmak için tahılların havalandırılması, mikotoksin üretimini önlemek için bir zorunluluktur.

Uygun taşıma ve paketleme işlemlerine, hasarlı tahılların çıkarılmasına, metabolik suya neden olan ve ısınmayı başlatabilen böcek ve haşere kontrolüne, hijyenik koşullara, etkili yönetim ve iyi yapılandırılmış siloların sürekli gözetimine mikotoksin kontaminasyonunu en aza indirmek için daha fazla dikkat edilmelidir (5,80). Ayrıca Channaiah ve Maier (98), sanitasyon, yükleme, havalandırma ve izlemenin (SLAM) tahılların depolanması için kritik derecede etkili uygulamalar olduğunu belirtmiştir.

Modifiye Atmosfer Depolaması

Modifiye atmosferler veya alternatif gazlar tahılların orta ve uzun süreli depolanması için günümüze kadar birçok kez araştırılmıştır. Nemli depolanmış tahıllarda hem mantarları hem de böcekleri kontrol etmek için modifiye atmosfer depolaması gereklidir. Genel olarak, nispeten düşük oksijen konsantrasyonu (< % 0.14) ve nispeten yüksek CO₂ (>% 50) ve N₂ konsantrasyonları, mantar büyümesini

önlemeye ve mikotoksin üretimini engellemeye katkıda bulunur (23,80). Bununla birlikte Paster ve Bullerman (99), çalışmasında mantar büyümesini engellemek için; mikotoksin üretiminin inhibisyonundan daha yüksek CO₂ konsantrasyonuna ihtiyaç olduğunu bildirmiştir. Tahılların kuruluğu ne kadar yüksek olursa, bu işlemin de etkinliği o kadar artar. Unutulmamalıdır ki, düşük O₂ ve yüksek CO₂ seviyeleri ile inhibisyon derecesi, tahıl tipi, su mevcudiyeti, besin maddesi ve bağıl nem ve sıcaklık gibi diğer çevresel faktörlerle etkileşime bağlıdır (5,80). Sülfür dioksit (SO₂), tahılların orta vadeli depolanmasındaki etkinliğinin araştırıldığı bir başka alternatif gazdır. Eckhoff ve arkadaşları, farklı nem içeriği seviyeleri ve farklı SO₂ ve NH₃ konsantrasyonları ile nemli mısırın depolanması üzerine iki önemli çalışma yaptılar. Önceki çalışma, mısırın % 24 nem içeriği ile % 0.3 SO₂'nin işleminin, mikrobiyal kolonizasyonda önemli bir azalmaya neden olduğunu ve kalite kaybı açısından tahıl üzerinde herhangi zararlı bir etkiye neden olmadığını ortaya koymuştur Nemli mısırın % 26.5 nem içeriği ile hem % 0.066 SO₂'nin yalnız, hem de % 0.018 NH₃ ile birlikte işlemini içeren daha sonraki çalışma, 60 gün boyunca küf bulunmamasıyla sonuçlanmıştır (100,101). En az % 4,4 SO₂ g kg⁻¹'in 5 aylık orta vadeli depolama için koruma açısından etkili olduğu bulunmuştur (80). Ayrıca, başka bir çalışmada, *Aspergillus* türlerinin (*A.flavus*, *A.ochraceus*, *A.terreu*) büyümesinin inhibisyonu, malt ekstraktı bazlı bir ortamda 0.95 ve 0.995 a_w'de 50 mg L⁻¹ çözülmüş SO₂ kullanılarak elde edilmiştir (102). Tahılların depolanmasında SO₂'nin verimliliğine ilişkin çeşitli bulgulara rağmen; depolanan tahıllara SO₂, boru tesisatı ile temin edildiği için, SO₂'nin aşındırıcı özelliği özellikle borularda sorunlara neden olmaktadır (80).

Koruyucular ve Fungisitler

Yemlerde bozulmaya neden olan mikotoksijenik mantarların ve böceklerin kontrol edilmesi için alternatif yöntemlerin kullanımına yönelik ilgi artmasına rağmen, çeşitli organik asitler ve mantar öldürücüler olarak sentetik kimyasalların, hasattan sonra alışıl gelmiş yöntemler olarak uzun süredir kullanıldığı bilinmektedir. Herting ve Drury (103), çalışmasında asetik, formik, propiyonik, bütirik ve izobütirik asitlerin kullanımının mısır, sorgum, buğday, yulaf ve arpada mantar büyümesinin önlenmesine yol açtığını belirtmiştir. Sauer ve Burroughs (104), tarafından yapılan

benzer bir başka çalışmada, kullanılan organik asitler arasında propionik asidin, mısır ve sorgum tahılında mantar kontaminasyonunun inhibisyonunda etkinliği daha belirgin bir organik asit olduğu belirtilmiştir. Kimyasallardan biri olan potasyum sorbat'ın hem *A.flavus* hem de *A.parasiticus* büyümesini inhibe ettiği, potasyum benzoat'ın ise sadece *A.parasiticus* büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu kimyasalların kullanılması sonucunda aflatoksin üretimi azalmıştır (105,106). Ayrıca fungusit iprodionun doza bağlı yönetiminde, *A.parasiticus*'un misel ağırlığının ve müteakip AFB₁ seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (107). Dahası, *A.flavus* miselyumunun neredeyse tamamen inhibisyonu, daha yüksek iprodion konsantrasyonu kullanılarak elde edilmiştir (108). Son zamanlarda, mantar büyümesini ve mikotoksin birikimini önlemek için çeşitli antioksidan kullanımı yeni bir alternatif yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Tüm tahıllarda bulunan benzoik ve sinamik asitlerin türevleri olan fenolik asitlerin kullanımına artan ilgi; bunların antioksidan aktivitesine atfedilmektedir (109). Nesci ve Etcheverry (110)'e göre, a_w azaldığında fenolik asitlerin ve bunların karışımlarının artan etkinliği, *A.flavus* ve *A.parasiticus* büyümesi ve aflatoksin üretimini azaltmaktadır. Öte yandan, depolanan mısırın korunmasına ilişkin, Nesci ve ark. (111), propil paraben, (antimikrobiyal koruyucu) ve bütillenmiş hidroksianisol (antioksidan) karışımı kullanarak bu karışımın verimliliğini incelemiştir. Sonuçlar 6 aylık depolama süresince *Aspergillus* türlerinde önemli bir azalma olduğunu göstermiştir.

Kimyasal kontrol yöntemlerinin kullanımı, mantar büyümesi ve mikotoksin üretimi için bir dereceye kadar kontrol etkinliği sağlasa da, yüksek verimlilik, düşük ilaç direnci, toksik olmayan yapı ve parçalanabilirlik açısından çevre dostu alternatifler gereklidir. Bu nedenle, doğal sulu bitki özleri ve uçucu yağların kullanımı, tahıl mantarlarını önlemek için yeni ortaya çıkmış alternatiflerdir. Çeşitli bitki ekstraktlarının ve uçucu yağların mantar türleri üzerindeki inhibitör etkilerini *in vitro* test etmek için yapılan birçok çalışma olmasına rağmen, bu çalışmaların çok azı bitki ekstraktlarının tahıl mantarları ve mikotoksin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır (81). Bu çalışmalardan bazı örnekler, aşağıda bahsedilecektir.

Örneğin, Paster ve ark. (112), tarafından yapılan çalışmada *A.flavus*, *A.niger* ve *A.ochraceus*'un büyümesinin inhibisyonu, depolanmış buğdayda kekik ve keklik otundan ekstrakte edilen iki esansiyel yağın fumigasyonu ile elde edildiği

bildirilmiştir. Bitki esansiyel yağları ve bileşenleri ile mısır çekirdeğinin *A.flavus*'a karşı korunmasına ilişkin bir başka önemli çalışma Montes-Belmont ve Carvajal (113) tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmaya göre tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*), nane (*Mentha piperita*), fesleğen (*Ocimum basilicum*), keklikotu (*Origanum vulgare*), karanfil (*Syzygium aromaticum*), epazot (*Telexys ambrosioides*) ve kekik (*Thymus vulgaris*)'in % 3 ila % 8 arasında değişen optimum dozajı , mısırdaki *A.flavus* kontaminasyonunu % 100 azaltmıştır. Bu esansiyel yağlar arasında timol ve *o*-metoksisinnamaldehit ağırlıklı olarak mısır tanesi kontaminasyonunu azaltmıştır. Reddy ve ark. (114)'nin çalışması; *Syzygium aromaticum*'un pirinç tanelerinde *A. flavus*'a karşı tam inhibisyon ve aflatoksin üretiminin azaltılması açısından oldukça etkili olduğunu kanıtlamaktadır. Nar ve limonun toz formu 9 ay boyunca pirinç tanelerinde *A.flavus*'u inhibe ederken, limon kabuklarının ve nar kabuklarının depolanan pirinç tanelerinde sırasıyla, 3 ve 4 ay boyunca aflatoksin üretimini tamamen bastırdığı bildirilmiştir (115). Zerdeçal esansiyel yağının, mısırdaki *A.flavus* kontaminasyonuna karşı baskılama etkisinin araştırıldığı daha yakın tarihli bir çalışmada; zerdeçal esansiyel yağının potansiyel antifungal ajan olarak kullanılabileceği sonucu çıkmıştır (116).

Esansiyel yağların antifungal etkiye ilişkin mekanizması, membran ve mantar hücresi kolonizasyonun bozulmasına dayandırılır. Ek olarak, karbonhidrat katabolizması ve mikotoksin üretimi ile ilgili bazı önemli enzimlerin esansiyel yağlar tarafından inhibe edilebildiği bilinmektedir (117).

2.5.2. Kontamine Olmuş Yemlerde Mikotoksinlerin Dekontaminasyonu

Tarlada ve depolama sürecinde mikotoksin oluşumunun kontrolü için alınan tüm önleyici tedbirlere rağmen; bu oluşuma katkıda bulunan çeşitli faktörler bulunmasından dolayı, mikotoksin oluşumunun kontrolü ancak bir dereceye kadar sağlanabilmiştir. Bu, mikotoksinleri kontamine gıda/yemden inaktive etmek veya çıkarmak için dekontaminasyon yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Gıda işleme hammaddedeki mikotoksinleri (i) fiziksel olarak uzaklaştırma, (ii) daha düşük veya daha yüksek toksisite metabolitleri ile sonuçlanabilen kimyasal dönüşüm, (iii) biyoyararlanımı artırabilecek maskelenmiş veya tutturulmuş formlardan salıverme , (iv) enzimatik detoksifikasyon ve (v) katı

yüzeyle adsorpsiyon ile etkileyebilir (36). Genel olarak, mikotoksinlerin degradasyonuna yönelik yaklaşımların güvenli standartlarda olabilmesi için bazı gereksinimler karşılamalıdır: 1) toksini etkisiz hale getirmeli, uzaklaştırmalı veya yok etmeli, 2) gıdada / yemde toksik kalıntı üretmemeli veya bırakmamalı, 3) gıda/yemlerin besleyici değerini korumalı, 4) ürünün kabul edilebilirliğini veya teknolojik özelliklerini değiştirmemeli ve eğer mümkünse 5) mantar sporlarını yok etmelidir (84). Bu yaklaşımların ekonomik ve teknik olarak pratikte uygulanabilir olması gerektiği unutulmamalıdır. Mikotoksinlerin dekontaminasyonu, kontamine olmuş ürünlerin uzaklaştırılması veya mikotoksinlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle inaktivasyonu ile mümkün olabilir (118). Toksik olmayan ve çevre dostu özellikler sağlama yolunda, mikotoksin detoksifikasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal yöntemlerden biyolojik yöntemlere doğru gelişmektedir. Bu yöntemlerin aşağıda özetlenmesi amaçlanmaktadır.

Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemlerle mikotoksin dekontaminasyonu, seçme, ayırma, temizleme, yıkama, kabuk çıkarma, ıslatma, öğütme, kaynatma, pişirme, nixtamalizasyon (alkali ortamda pişirme), fırında pişirme, kavurma, kızartma, mikrodalga ısıtma, ekstrüzyon, çözücülerle ekstraksiyon, ışınlama ve adsorpsiyon gibi çeşitli prosedürleri içerir (21,36,119).

Seçme, Yıkama ve Ayırma

Parçalanmış ve hasarlı çekirdekler genellikle mikotoksin kontaminasyonuna duyarlı olurlar. Aflatoksin kontaminasyonunun yaklaşık % 80'i çeşitli boyutlarda, küçük, buruşmuş tohumlar, renksiz/lekeli tohumlar ve görünür küf büyümesi ile ilişkilendirilir. Hasarlı çekirdekler görünüm ve yoğunluk açısından tanımlanabilir olduğundan, aflatoksin kontaminasyonunu azaltmak için tahıldaki hasarlı çekirdeklerin seçilip ayrılması önerilir. Aflatoksin kontaminasyonu çoğunlukla heterojendir. Bu heterojenlik sayesinde hasarlı çekirdekler çıkarılarak aflatoksin düzeylerini en aza indirmek mümkün olur. Örneğin Pearson ve ark. (120), yürüttükleri çalışmada aflatoksinleri % 81 azaltarak mısırdaki ayıklamanın etkinliğini göstermiştir. Ancak, yüksek düzeyde toksinler çekirdeğin iç kısımlarına yayılırsa ve son üründe yüksek seviyelerde kalıntı kontaminasyon bulunursa mikotoksinlerin

tamamen uzaklaştırılması için başka prosedürler gerekebilir (72,95,121,122). Mikotoksin dekontaminasyonuna yönelik diğer bir yaklaşım ise yüzer ve yoğunluk ayrışmasına dayanmaktadır. Yoğunluk farkından dolayı kontamine olmuş tahılları suya batırmak ve yüzen fraksiyonlardan kurtulmak, bir dereceye kadar aflatoksinleri azaltmaya yardımcı olabilir (23). Patenti, Bethke ve ark. (123)'ne ait olan yüzer teknikle ilgili özel bir aparat, aflatoksin seviyelerini % 80'e kadar düşürebilir. % 22'lik bir kütle kaybında, aflatoksin seviyelerinin % 60 oranında azaltılması, suda yüzen mısırın uzaklaştırılması ile gözlenmiştir (124). Aflatoksinler suda düşük çözünürlüğe sahip olmalarına rağmen Hwang ve Lee (125), kontamine buğdaydaki AFB₁'in yaklaşık % 40'ını yıkayarak uzaklaştırmayı başarmıştır. Bunun aflatoksinlerin buğday yüzeyine bağlanmasından ötürü olabileceği düşünülmektedir. Fakat aflatoksinler, gıdanın iç dokusuna güçlü bir şekilde yapıştığında veya bağlandığında, bunları uzaklaştırmak çok zor olur (121).

Kabuk Çıkarma

Bir başka fiziksel teknik olan kabuk çıkarma veya ayırma, hububatların dış katmanlarının çıkarılmasını içerir. Mikotoksin dekontaminasyonuna yönelik başarılı bir kabuk çıkarma işlemi için mantar kolonizasyonu ve mikotoksin birikiminin, çekirdek yüzey katmanlarında sınırlı olması gerekmektedir. Mısırdaki aflatoksin birikimi yüzey tabakalarda sınırlı olduğu takdirde, mısır kabuklarının çıkartılması aflatoksin seviyelerini % 93'e kadar azaltabilir (126,127).

Islatma

Islatma, mısırın yaş öğütülmesinde birincil adımdır. Hücre ayrışmasının kolaylaştırılması ve protein matrisinin parçalanması için, mısır, % 0.1-0.2 SO₂ içeren 50°C'lik suda 36-50 saat boyunca bekletilir. Aly (128)'e göre, bu yaklaşım sonucu mısırın aflatoksin içeriğinin % 50'si demlenmiş likörde bulunmuştur. Leyfedi ve Taylor (129), tarafından yapılan bir başka çalışma, sorgum tanelerinin % 0.2'lik NaOH içerisinde ıslatılması sonucu, aflatoksin konsantrasyonunun saptanamayan seviyelere düştüğünü göstermiştir.

Öğütme

Öğütme prosedürü genellikle ıslak öğütme ve kuru öğütmeyi içerir. Mısırın ıslak öğütülmesi, farklı mikotoksinlerin demlenmiş su, lif, gluten, hücre ve nişasta gibi farklı kısımlara dağıtılmasına yol açar. Bu da farklı mikotoksinlerin, farklı fraksiyonlarda birikmesine neden olur. Islak öğütme sonucu, aflatoksinlerin % 40-50'si mısırdan demlenmiş suya dağılmış, % 28-38'i lifte, % 11-17'si glütende, % 6-11'i hücrede ve % 1'i nişasta fraksiyonunda kalmıştır. Belirli bir fraksiyondaki mikotoksin konsantrasyonu risk yönetimini kolaylaştırır. Öte yandan, Bullerman ve Bianchini (130), mısır tanesinin kuru öğütülmesi sonucu mikotoksinlerin hücre ve kepek fraksiyonunda biriktiğini bildirmiştir. Doğal bir şekilde kontamine olmuş mısırın kuru öğütülmesi ile ilgili bir başka çalışma, en yüksek AFB₁ seviyelerinin, kontaminasyon seviyesine bağlı olarak değişen dağılım derecesi ile hücre ve kabuk fraksiyonlarında görüldüğünü ortaya koymuştur (36,72).

Çözücü Ekstraksiyonu

Fiziksel yöntemlerden biri olarak kabul edilen çözücülerle ekstraksiyon, küf hasarlı ürünlerde aflatoksinlerin uzaklaştırılması için kullanılabilir. Ancak çözücülerin bu amaç için kullanılması hem avantajlara hem de dezavantajlara sahiptir. Çözücü ekstraksiyonunun avantajları şu şekilde sıralanabilir; (a) Aflatoksinler uygun koşullar altında uygun çözücülerle tamamen uzaklaştırılabilir. (b) Aflatoksinlerin çeşitli çözücüler ile ekstraksiyon yoluyla uzaklaştırılması, aflatoksinlerin kimyasal olarak inaktivasyonunun aksine; çoğunlukla ürünlerde diğer toksik bileşiklerin / artefaktların oluşumunu engeller. (c) Düşük işlem sıcaklıkları ile çözücü ekstraksiyonu, birçok durumda besin kaybı olmadan sonuçlanır.

Öte yandan, çözücü ekstraksiyonunun dezavantajları ise şu şekilde sıralanabilir; (a) Özel çözücü ekstraksiyon ekipmanına ihtiyaç vardır. (b) Aflatoksinler ile birlikte arzu edilen çözünen bileşenlerin bir kısmı da, çözücü solventi ile istenmeden ürünlerden çıkabilir. (c) Toksik ekstraktların ortadan kaldırılması ile ilgili problemler ortaya çıkar. (d) Çözücü ekstraksiyonun yüksek maliyeti nedeniyle sınırlı sayıda büyük ölçekli uygulama yapılabilir. (e) Ürünlerde, olası istenmeyen lezzet ortaya çıkabilir.

Aflatoksinlerin uzaklaştırılması için kontamine olmuş ürünlerde; ekstraksiyonun etkinliği üç önemli faktöre bağlıdır; 1) Uygun polar çözücünün kullanılması; 2) Aflatoksinlerin serbest bırakılması için ekstraksiyon sisteminde yeterli nem ihtiyacının sağlanması ve 3) Yeterince yüksek çalışma sıcaklıklarının kullanılması (119,131). % 95 etanol, % 90 sulu aseton, % 80 izopropanol, heksan-metanol, metanol-su, asetonitril-su, heksan-etanol-su ve aseton-heksan-su, aflatoksinlerin ekstraksiyonu için kullanılan çözücülere örnektir. Çözücü: örnek oranının, toksinlerin geri kazanılmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ek olarak, çözücü ekstraksiyonuyla işlenmiş ürünler sadece hayvan besleme için uygun olabilir (132). Araştırmacılar fıstık yağlı tohum, pamuk tohumu ve yer fıstığından çözücü ekstraksiyonu ile aflatoksinlerin uzaklaştırılmasını araştırmışlardır. 60°C'de % 80 sulu izopropanol ile 6 kez tekrarlanan ekstraksiyon, hem pamuk tohumlarında hem de yer fıstıklarında aflatoksinlerin tamamen çıkarılmasıyla sonuçlanmış ve sulu izopropanolün etkinliği kanıtlanmıştır (133). Gardner ve ark. (134) çalışmalarında, pamuk tohumu ve yer fıstığı gevreğinde aseton-heksan-su (54:44:2) ile ekstraksiyonun aflatoksinlerin önemli ölçüde azalmasına neden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, kontamine pamuk tohumu küspesinin daha büyük ölçekli ekstraksiyonları için aseton-su (90:10), 2-propanol-su (80:20) ve 2-propanol-suyun azeotropu (87.7:12.3) kullanılmıştır. Kullanılan çözücüler arasında aseton-su (90:10), AFB₁ konsantrasyonunu 448 ppb'den 3 ppb'ye düşürerek AFB₁ seviyelerinde en önemli azalmayı ve % 4.4 oranında da diğer çözücülerin en düşük ekstraksiyonunu sağlamıştır (131). Sulu asetonun aflatoksinlerin ekstraksiyonu için etkili bir çözücü olduğu bilinse de, aseton kullanımı sonucu mesityl oksit ürünü ortaya çıktığından yağlı tohum küspesinde bazen kötü koku ve istenmeyen lezzete neden olabilmektedir. Bu nedenle uygulayıcılar için ürünlerdeki koku ve aroma önem teşkil ediyor ise, aflatoksinlerin uzaklaştırılması için aseton dışındaki ekstraksiyon çözücüleri tercih edilmelidir (135).

Alışlagelmiş Termal İşlemler

Aflatoksinler, yemek veya yemlere uygulanan pişirme, kavurma, fırınlama, kızartma, nixtamalizasyon/alkali ortamda pişirme, ekstrüzyon ve mikrodalga ısıtma gibi geleneksel termal işlemlere karşı büyük direnç gösterirler. Ayrışma sıcaklıkları

237° C ile 306° C arasında değişmekte olan aflatoksinler, ısıya çok dayanıklıdır. AFB₁ ayrışma noktasının altındaki sıcaklıklarda kararlı olduğu ve ayrışma noktasının üzerinde ısıtıldığında dışarıya keskin bir duman yaydığı için, AFB₁'i ürünlerden tamamen uzaklaştırmak çok zordur. Aflatoksinlerin ısı stabilitesine rağmen, ısı işlemlerle bunların bir dereceye kadar dekompozisyonu sağlanabilir. Isıl işlemlerin verimliliği genellikle ısıtma sıcaklığı, maruz kalma süresi, yiyecek tipi ve nem içeriği gibi faktörlere bağlıdır (76,119,136). Bazı gıdalarda/yemlerde çeşitli ısı işlemlerle aflatoksin azaltılmasına yönelik çalışmalar Tablo 2.5.'te özetlenmektedir.

Tablo 2.5. Termal gıda işleme yöntemleri ile AFB₁ indirgeme çalışmaları.

Substrat	İşlem metodları	İndirgeme	Referans
Kuru	150°C'de 30 dakika ısıtma	AFB ₁ 'de % 50 azalma	(125)
Buğday	200°C'de 30 dakika ısıtma	AFB ₁ 'de % 90 azalma	(125)
Pirinç	Normal pişirme	AFB ₁ 'de % 34 azalma	(137)
	Pilav pişirme makinesinde pişirme	AFB ₁ 'de % 25 azalma	(138)
	Basıncılı pişirme (0.1 Mpa)	AFB ₁ 'de % 78-88 azalma	(139)
	Aşırı suda pişirme	AFB ₁ 'de % 87.5 azalma	(140)
Mısır	Alkali ortamda pişirme	AFB ₁ 'de % 94 azalma	(141)
Mısır	Kavurma	AFB ₁ 'de % 40-80 azalma	(142)
Mısır çöreği	Fırınlama	AFB ₁ 'de % 13 azalma	(143)
Yem	Sıcak hava üfleyen fırın kurutma	AFB ₁ 'de % 57.6 azalma	(144)

Ekstrüzyon ve mikrodalga ısıtma

Ekstrüzyon ve mikrodalga ısıtması, mikotoksinleri azaltabilen ısı işlemlere yönelik, gıda endüstrisinde kullanılan en yaygın işlemler arasındadır. *Ekstrüzyon* ısı, nem ve mekanik gücün kombinasyonuna dayalı bir işlem olduğundan, uygulayanlar

için yüksek sıcaklık ve kısa kullanım süresi sağlar. Hammaddeyi derinliğine modifiye ettiğinden, yapılarda ve şekillerde değişikliklere neden olur ve farklı fonksiyonel ve beslenme özelliklerine yol açar (33). Aflatoksin dekontaminasyonu için ekstrüzyonun kullanılması, sıcaklığa ve neme bağlı olarak aflatoksin seviyelerinin % 50-80 oranında azalmasıyla sonuçlanabilir (130). Elias-Orozco ve ark. (141), tarafından bildirildiğine göre, mısırın % 0, % 0,3 ve % 0,5 kireçle ekstrüzyonu, AFB₁ seviyelerinin sırasıyla % 46, % 74 ve % 85 azalmasına neden olmuştur. Diğer başka bir çalışmada da tahılların ekstrüzyonla pişirilmesi, aflatoksin seviyelerinin % 95 oranında azalmasıyla sonuçlanmıştır (145).

Mikrodalgalar, dalga boyları yaklaşık bir metreden bir milimetreye kadar değişen ve 300 MHz (1 m) ile 300 GHz (1 mm) arasındaki frekanslara sahip bir elektromanyetik radyasyon şeklidir. Mikrodalgaların, aflatoksinlerin azaltılmasında faydalı olabilecek ısıtmayı da içeren çeşitli uygulamaları vardır. Mikrodalgalar hızlı ısıtma ve nispeten yüksek kurutma verimliliği gibi avantajlar sağlasa da, mikrodalga kurutmanın homojen olmayan ısıtma, mikrodalga radyasyonunun sınırlı penetrasyon derinliği ve nihai ürüne olası dokusal hasar gibi bazı dezavantajları olduğu bir gerçektir (76). Perez-Flores ve ark. (146), alkalize mısırı 1.65 kW güç seviyesinde 5.5 dakika boyunca mikrodalga ile ısıttıktan sonra aflatoksin seviyelerinde % 68-84 azalma olduğunu bildirmiştir. Daha yakın tarihli bir çalışmada buğdayın 6 dakika boyunca mikrodalgada ısıtılması, aflatoksin düzeylerini % 54 oranında düşürmüştür (147).

Güneş Işığı ile Fotodegradasyon

Aflatoksinler ışığa duyarlı olduklarından, güneş ışığı AFB₁'in etkili bir şekilde bozunması için kullanılabilir (21). Herzallah ve ark. (148), tarafından aflatoksinlerin doğrudan güneş ışığıyla fotodegradasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada, tahıllar 3 saat ve 30 saat doğrudan güneş ışığına maruz bırakıldıktan sonra aflatoksin seviyeleri sırasıyla, yaklaşık % 40 ve % 75'e kadar azalmıştır.

Işınlama

Radyasyon; iyonlaştırıcı radyasyon (X-ışınları, ultraviyole ışınları, gama ışınları, elektron ışını) ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon (radyo dalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi dalgalar, görünür ışınlar) olarak iki kategoriye ayrılabilir.

İyonlaştırıcı radyasyon, sıcaklık artışı az olan veya olmayan enerji sağlayıp, moleküler yapılarda tehlikeli değişikliklere neden olurken; yeterli yoğunlukta iyonize olmayan radyasyon sıcaklıkta artışa ve genellikle moleküler yapıda tehlikeli olmayan değişikliklere neden olabilir (76,84). İyonlaştırıcı radyasyon yaklaşımı olarak *gama ışınları* birçok araştırmacı tarafından aflatoksinlerin bozunması için araştırılmıştır. Gama ışınları sıvı ve katı ortamlarda nispeten iyi penetrasyon derinliği sağlamasına rağmen, aflatoksinler doğrudan gama radyasyon işlemine direnç gösterirler ve bu nedenle gama ışınlanması genellikle daha iyi bozunma verimliliği için diğer işleme teknolojileri ile birleştirilir. Aflatoksin degradasyonuna yönelik gama ışınmasının mekanizması, suyun veya diğer bileşenlerin radyolizine bağlı serbest radikal reaksiyonu gibi dolaylı etkileri içermektedir. Serbest radikaller terminal furan halkasındaki AFB₁'e saldırır ve daha düşük biyolojik aktiviteye sahip ürünler ortaya çıkarır (76). Aquino ve ark. (149) ve Ghanem ve ark. (150), tarafından ayrı ayrı yapılan mısırdaki AFB₁ bozunmasına yönelik 10 kGy dozaj seviyesi ile gama ışınlanması çalışmaları, AFB₁ seviyelerinde sırasıyla, % 100 ve % 81.1 oranında azalmaya sonuçlanmıştır. Mohamed ve ark. (151), tarafından yapılan daha yeni bir çalışmada, AFB₁ konsantrasyonu 8 kGy dozaj seviyesi ile % 60.3 azaltılmıştır.

Elektron ışınlama (EBI) kompleks organik moleküllerin doğrudan veya dolaylı oksidasyon yoluyla bozunmasında potansiyel göstermiş, yeni bir işleme teknolojisidir (152). Gama ışını ile EBI arasında penetrasyon ve uygulama yöntemleri açısından bazı farklılıklar olmasına rağmen, her ikisi de gıdalar üzerinde benzer etkiler gösterir (76). Örneğin, 25 kGy dozaj seviyesinde, mısırdaki gama ışınlanması ile AFB₁ konsantrasyonunda % 69 azalma gözlemlenmiş ve benzer şekilde, aynı dozaj seviyesinde, EBI ile mısırdaki AFB₁ konsantrasyonunda % 67 azalma gözlemlenmiştir (153). Son zamanlarda EBI, mikotoksinlerin parçalanması için yeni bir yaklaşım olarak ilgi görse de, AFB₁'in elektron ışınlama tarafından oluşturulan beş parçalanma ürününden biri mutajenik ve sitotoksik özelliklere sahip olduğu için bu yeni yaklaşımın etkinliğini kanıtlamaya yönelik daha fazla çalışma yapılmalıdır (154).

Ultraviyole (UV), dalga boyu 10 nm ila 400 nm arasında olan elektromanyetik radyasyondur. AFB₁'in UV ışınlanması ile dekontaminasyonu mümkün olabilir ve bozunma verimliliği farklı ışınlama koşullarına göre değişebilir

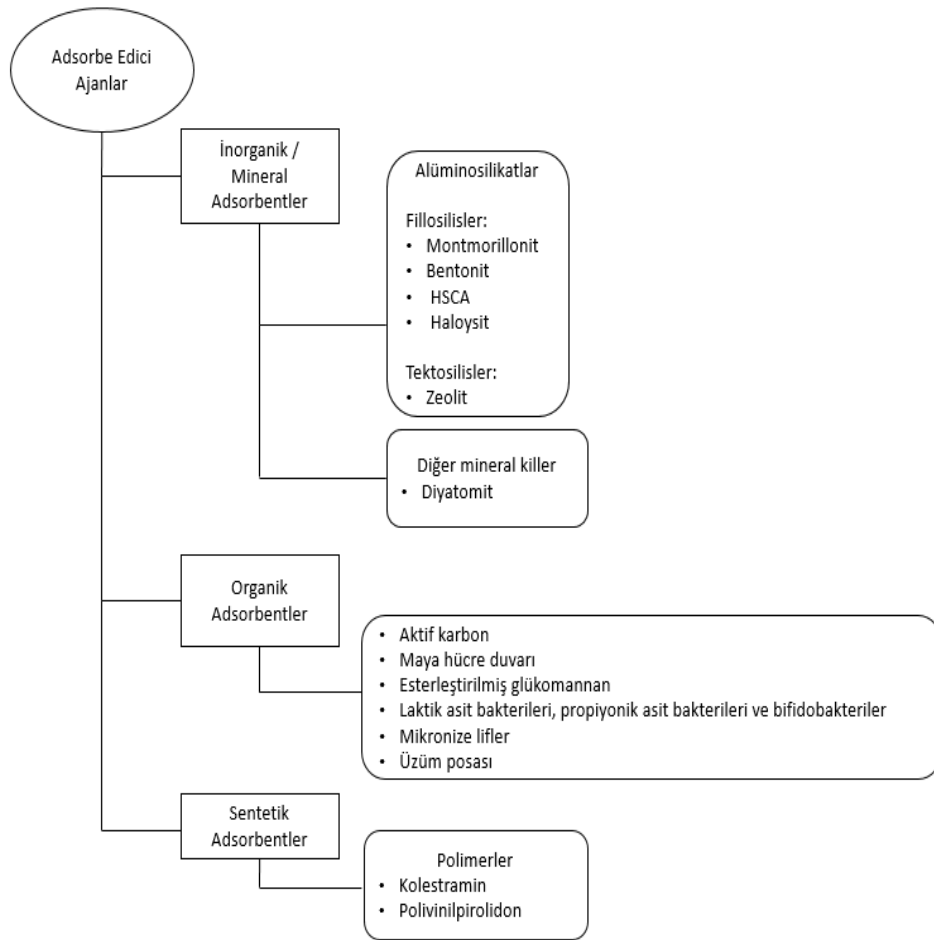
(155). AFB₁, 222, 265 ve 362 nm'de ultraviyole radyasyonunu emer. En büyük emilim 362 nm'de meydana gelir ve bu AFB₁'in aktivasyonuna ve bozulmaya karşı artan duyarlılığa yol açar (156). Buğdayın ultraviyole C (UVC) radyasyonu (100-280 nm) 160 dakika işlenmesi, ham protein içeriği üzerinde herhangi bir etki yaratmadan % 80 AFB₁ konsantrasyonunun azalması ile sonuçlanmıştır (157). UV işleminin umut verici sonuçlarına rağmen; düşük penetrasyon derinliği, dar dalga boyu ve bozunmuş ürünler tarafından kalıntı toksisite tutulması; işlemin gıdalarda aflatoksin dekontaminasyona yönelik uygulamasını kısıtlamaktadır (76).

Aflatoksin yıkımı için yeni ortaya çıkmış termal olmayan bir teknoloji olan *darbeli ışık*; ultraviyole, görünür ve kızılötesi ışınlar dahil olmak üzere geniş spektrumlu beyaz ışığın kısa ve yüksek yoğunluklu flaşlarını oluşturarak işlemi gerçekleştirmektedir (158). Wang ve ark. (159)'na göre, pirinç kepeğinin 15 saniye boyunca darbeli ışıkla işlenmesi (0.52 J/cm²/pals), AFB₁ seviyesini % 90.3 azaltmaktadır. Aflatoksinin degradasyon ürünlerinde kalıntı toksisite bulunmasa da, daha iyi degradasyon etkinliği sağlamak ve diğer çeşitli ürünlerde test edilmek üzere darbeli ışık teknolojisinin daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Adsorpsiyon

Adsorpsiyon; kontamine yemlere adsorbanlar veya mikotoksin bağlayıcı ajanlar ilave edilerek, mikotoksinlerin alımından sonraki biyoyararlanımlarını azaltmak için yaygın olarak kullanılan mikotoksin dekontaminasyonuna yönelik bir işlemdir. Adsorpsiyon işlemi prensibi, mikotoksinlerin gastrointestinal sistemdeki yüksek molekül ağırlığına sahip adsorbe edici ajanlara bağlanmasını içerir, bu da mikotoksin alımını ve bunların kana ve daha sonra hedef organlara dağılımını önler. Hem mikotoksinlerin hem de adsorbanların çeşitli özellikleri, adsorpsiyon işleminin etkinliğini açısından önemli rol oynamaktadır. Adsorbanlar için bu özellikler dozaj, toplam yük ve yük dağılımı, gözenek boyutu ve erişilebilir yüzey alanını içerirken, mikotoksinler için bu özellikler polarite, çözünürlük, moleküler boyut, şekil, yük dağılımı ve ayrışma sabitleridir. Mikotoksin adsorbanlarının geniş bir pH aralığında stabil olması, bunların etkinliklerinin değerlendirilmesinde önemli bir hususdur. Çünkü mikotoksin adsorban kompleksinin, tüm gastro-intestinal sistem boyunca pH değişikliklerinde stabil olması beklenir, böylece bağlı mikotoksinlerin desorpsiyonu

önlenebilir ve daha sonra idrar ve dışkı ile atılabilir (26,160,161). Genel olarak, adsorbe edici ajanlar Şekil 2.10.'da gösterildiği gibi organik adsorbanlar, inorganik (mineral) adsorbanlar ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilir. Aktif kömür, alüminosilikatlar (kil, bentonitler, montmorillonitler, smektitler, zeolitler, hidratlı sodyum kalsiyum alüminosilikat), diyatomit (kil yığınları içerdiğinde diatomlu toprak olarak adlandırılır), maya hücre duvarı, laktik asit bakterileri, mikronize lifler ve sentetik polimerler (reçine kolestramin, divinilbenzen-stiren polimerleri, polivinilpirolidon, hümik asit) adsorbanların bazılarıdır (26,29).



Şekil 2.10. Mikotoksin adsorbe edici ajanların sınıflandırılması. (164,175)

Aflatoksin adsorbanları kontamine yemdeki aflatoksinleri bağlayıp hayvanların sindirim sisteminde emilimi engelleyebildiğinden, çiftlik hayvanlarının yemindeki aflatoksin düzeylerini düşürmek için bunların yem katkı maddesi olarak kullanılmasının mikotoksin dekontaminasyonuna yönelik umut verici bir yaklaşım olduğuna inanılmaktadır. Bu yaklaşım sayesinde hayvanların vücudunda gerçekleşen başka toksik reaksiyonlar da inhibe edilebilmektedir (162). Birçok araştırmacı seyrelticiler, intestinal fragmanlar veya kültürlenmiş hücreler kullanarak hem *in vitro*, hem de doku artıkları veya biyokimyasal paramaterlerdeki değişiklikler gibi biyolojik markörleri veya performans yanıtları baz alarak *in vitro* olarak aflatoksinlerin adsorpsiyonu için çeşitli adsorbanların etkinliği üzerinde çalışmıştır (26,163). *In vitro* çalışmaların bazıları Tablo 2.6.'da özetlenmiştir. Her ne kadar domuzlar dahil olmak üzere farklı hayvan türlerinde ve özellikle de piliçler gibi kümes hayvanlarında çeşitli adsorbe edici ajanların verimlilikleri üzerine *in vivo* çalışmalar yapılmış olsa da; ruminantlarda çok az *in vivo* çalışmaları yapılmıştır (26,164). Ruminantların mikotoksinlere monogastriklerden daha dirençli olduğu ve bu direncin, rumen mikroflorasının ve mikroorganizmaların toksik molekülleri degrade etme, deaktive etme veya bağlamasındaki etkinliğinden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, mevcut *in vivo* çalışmalar, AFB₁-kontamine yem varlığında olası AFM₁'in süte aktarılmasına odaklanmıştır (165–167). Literatürde farklı hayvanlarda adsorbe edici ajanların etkinliği ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunsa da, bu bölüm ruminantlarda AFB₁ adsorpsiyonu dışındaki çalışmaları incelemeyi amaçlamamaktadır.

İnorganik Adsorbanlar

Alüminosilikatlar, fillosilikatlar (bentonitler, montmorillonitler, smektitler, kaolinitler ve illitler) ve tektosilikatlar (zeolitler) dahil olmak üzere iki ana alt sınıfa sahip, üzerinde en çok çalışılan inorganik adsorban grubudur. Düşük polar bileşikler ve özellikle de aflatoksinler için yapıları ve bileşimleri açısından etkili adsorbanlardır. Yüksek afinite, seçicilik ve katyon değişim kapasitesi ile ilgili adsorpsiyonda avantajlar sağlarlar. Bentonitler (montmorillonitler) ve hidrate sodyum kalsiyum alüminosilikat (*HSCAS*), bu grup içerisindeki en verimli bileşikler olarak bilinmektedirler (26,160). *HSCAS*, genellikle hayvan yemlerinde

topaklanmayı engelleyici ajanlar olarak kullanılır. HSCAS ayrıca hayvanların gastrointestinal sistemindeki aflatoksinlere sıkı ve seçici bir şekilde bağlandığı için enterosorbent görevi görmektedir. Bundan dolayı, hayvan yemlerinde HSCAS kullanımı, aflatoksinlerin biyoyararlanımlarını ve ilişkili aflatoksikozunu azaltabilmektedir (168,169).

Tablo 2.6. Mikotoksinlerin farklı adsorbanlar tarafından adsorpsiyonu üzerine in vitro çalışmalar.

Adsorban	Mikotoksin (konsantrasyon)	Adsorban (mg)	Dilüent	pH	Adsorpsiyon kapasitesi (%)	Referanslar
Aktif kömür	AFB1 (0.821 µg/ml)	82	Deiyonize su	7.0	>99	(185)
	AFB1 (0.821 µg/ml)	82	Tampon çözeltisi	2.0 ve 7.0	>99	(185)
Bentonit	AFL (0.2 µg/ml)	50	0.1 M K ₂ HPO ₄	3.0	96.9	(186)
	AFL (0.2 µg/ml)	50	0.1 M K ₂ HPO ₄	6.9	96.9	(171)
	AFB1 (0.821 µg/ml)	82	Deiyonize su	7.0	48–99	
	AFB1 (0.821 µg/ml)	82	Tampon çözeltisi	2.0 ve 7.0	97–99	(185)
Diyatomit	AFL (0.2 µg/ml)	50	0.1 M K ₂ HPO ₄	3.0	95	(170)
	AFL (0.2 µg/ml)	50	0.1 M K ₂ HPO ₄	6.9	95	(170)
HSCAS	AFB1 (20 µg/ml)	75	PBS	6.0 ve 8.0	sırasıyla, 100 ve 98	(187)
	AFB1 (2 µg/ml)	100	0.1 M PBS	3.0	1	(169)
	AFB1 (2 µg/ml)	10	0.1 M PBS	3.0	91.1	(169)
	AFB1 (2 µg/ml)	1	0.1 M PBS	3.0	81.8	(169)
	AFB1 (2 µg/ml)	0.5	0.1 M PBS	3.0	75.4	(169)
	AFB1 (2 µg/ml)	0.25	0.1 M PBS	3.0	40.1	(169)
	AFB1 (2 µg/ml)	0.05	0.1 M PBS	3.0	8.8	(169)
Montmorillonit	AFB1 (4 µg/ml)	5.0, 10.0, 100.0	0.1 M PBS	3.0 ve 7.0	96–100	(188)
Zeolit	AFL (0.2 µg/ml)	50	0.1 M K ₂ HPO ₄	3.0	95	(186)
	AFL (0.2 µg/ml)	50	0.1 M K ₂ HPO ₄	6.9	95	(171)
	AFB1 (0.821 µg/ml)	82	Deiyonize su	7.0	80	(185)
	AFB1 (0.821 µg/ml)	82	Tampon çözeltisi	2.0 ve 7.0	<10	(170)

PBS, fosfat tampon çözeltisi; AFL, aflatoksinler; AFB₁, aflatoksin B₁; HSCAS, hidratlanmış sodyum kalsiyum alüminosilikat; K₂HPO₄, dipotasyum fosfat

Bentonitler, volkanik külden köken alan ve ana bileşen olarak esas olarak montmorillonitten oluşan bir başka mineral fillosilikat kildir. Bentonitlerin verimliliği montmorillonit içeriğine ve birbiriyle değiştirilebilir katyonlara bağlıdır. Bentonitler, özellikle aflatoksinler için mikotoksin adsorpsiyonuna yönelik büyük bir etkinlik gösterirler. Hem katyonların hem de polar moleküllerin penetrasyonu, organik maddelerin etkili adsorpsiyonuna yol açmaktadır. Etkin adsorpsiyonun, yüksek katyon değişim kapasitesi ve bentonitlerin geniş yüzey alanı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (161,170). Bentonitin, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından yem katkı maddesi olarak güvenlik ve etkinlik açısından değerlendirilmesinden sonra, bentonitlerin genotoksik olmadığı ve yem katkı maddesi olarak kullanımlarının hayvan için doğrudan toksikolojik riske neden olmadığı bulunmuştur (171). Avrupa Birliği'nin mikotoksin adsorbanları kullanılmasına yönelik talep ettiği katı zorunluluklara rağmen, bentonitin AFB₁'e yüksek bağlanma kapasitesi, talep edilen gereklilikleri yerine getirmiş ve AFB₁ tarafından kontamine olmuş hayvan yemi kontaminasyonunun azaltılması için adsorban olarak kullanılacak ilk ürün olarak Avrupa Komisyonu tarafından onaylanmıştır. Dahası, çok sayıda yayınlanmış *in vitro* çalışma ve ayrıca ineklerin sütünde AFM₁ transferinin % 40 oranında azaldığını gösteren iki *in vivo* çalışma incelendikten sonra, bentonitin süt inekleri için aflatoksin bağlayıcı olarak etkili olma potansiyeli olduğu kabul edilmiş ve böylece bentonitin kullanımını tüm ruminantlar için geçerli sayılmıştır (172,173).

Alüminosilikatlar arasında, *zeolitlerin* sığır rumen suyunda % 100 AFB₁ adsorpsiyonu ile etkili olduğu bulunmuştur (174).

Organik Adsorbanlar

Aktif kömür, mikotoksinlerin yanı sıra çeşitli ilaç ve toksik ajanlar için en yüksek verimliliği sağlayan toksik olmayan organik adsorbanlardan biridir. Geniş yüzey alanı ve gözenekliliği aflatoksin için yüksek afinite sağlamakta ve bu mekanizmanın hidrofobik bağlanma nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, aktif kömürün spesifik olmayan adsorptivitesi; özellikle konsantrasyonu mikotoksinlerden daha yüksek olduğunda, minerallerin ve vitaminlerin bağlanmasına bağlı olarak olumsuz nutrisyonel etkilere yol açabilir (163). Maya hücre duvarı

(YCW), laktik asit bakterileri (LAB), mikronize lifler ve biyo-sorbentler gibi organik adsorbanlar da mikotoksinlerin adsorpsiyonunda potansiyel göstermektedirler. Bu adsorbanlar farklı kaynaklarda biyolojik adsorbanlar olarak da sınıflandırılabilirler (161,175). Ancak bu adsorbanlar, bu incelemede organik adsorbanlar olarak ele alınacaktır.

Maya hücre duvarı (YCW): Saccharomyces cerevisiae oluşumu gıdalardaki doğal mikrobiyal popülasyonların bir parçası olarak ortaya çıkar. Bazı mikotoksinleri adsorbe etmek için *saccharomyces cerevisiae* gibi mayalar veya maya hücre duvarları kullanılabilir. YCW esas olarak polisakkaritler (glukanlar, kitin ve mannanlar), proteinler ve lipitlerden oluşur. *Saccharomyces cerevisiae* mannanlarının ve maya hücre duvarlarının β -D-glukan fraksiyonunun çeşitli mikotoksinleri bağlama işleminde etkili olduğu düşünülmektedir (29,164). AFB₁'in adsorpsiyonu dikkate alındığında; *saccharomyces cerevisiae* 'in AFB₁'i bağlamada ve bazı hayvanlarda AFB₁'in zararlı etkilerini azaltmada etkili olduğu bulunmuştur (176,177). Ayrıca, YCW'den ekstrakte edilmiş *esterleştirilmiş glukomannanların (EGM)* AFB₁'e bağlandığı ve toksik etkilerini yok ettiği kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, süt ineklerinin aflatoksin kontamine diyetlerinde esterlenmiş glukan polimerin kullanılması, süt aflatoksin kalıntılarını önemli ölçüde azaltmıştır (161,178). Bazı *laktik asit bakterileri (LAB)*, *propiyonik asit bakterileri* ve *bifidobakteriler* de mikotoksinleri bağlayabilirler. LAB, genellikle karbonhidrat fermantasyonunun metabolik süreci sonucunda laktik asit üreten çürümüş bitkilerde ve süt ürünlerinde bulunan, gram-pozitif, aside toleranslı bir grup bakteridir. El-Nezami ve ark. (179,180), çalışmalarında LAB ve propiyonik asit bakterilerinin aflatoksinleri sekestüre edebildiğini vurgulamıştır. *Lactobacillus rhamnosus* gibi bazı LAB suşlarının, ince bağırsakta AFB₁'i bağladığı kanıtlanmıştır. Hücre duvarı peptidoglikanlarının, polisakkaritlerin ve teikoik asidin bağlama işleminde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Dikkat çekici bir not olarak belirtmek gerekirse; AFM₁ ve AFB₁'in bağlanması yapılan çalışmalara göre geri dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, ölü veya yaşayan bakterilerle gerçekleştirilebilir. Ek olarak, laktik asit bakterilerinin asit veya ısıyla inaktivasyonu ile artan adsorpsiyon verimi elde edilebilir (161,164).

Mikronize lifler, buğday, arpa, alfafa, yulaf, bezelye kabuğu veya tahıl içeren baklagiller gibi farklı bitki bileşenlerinden elde edilebilir ve uygun bağırsak adsorpsiyonu ve gelişmiş dışkı atılımı nedeniyle mikotoksin adsorbanları olarak kullanılabilirler. Mikronize lifler esas olarak selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşur. Mikronize lifler mikotoksinler için adsorpsiyon potansiyeli gösterse de, selüloz ürünlerinin AFB₁ için adsorpsiyon kapasitesi diğer inorganik adsorbanlara göre daha azdır (181,182).

Fenolik bileşikler açısından zengin olan *dehidrate üzüm posası*'nın, sıvı bir ortamda yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda, AFB₁'in uzaklaştırılması için mükemmel bir adsorban olduğu kanıtlanmıştır (183).

Buna ek olarak, karmaşık organik adsorbanlar olarak bilinen hümik asitlerin de AFB₁ için adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu, Jansen van Rensburg ve ark. (184), tarafından bildirilmiştir.

Birçok adsorbe edici ajan *in vitro* çalışmalarda etkinlik göstermesine rağmen, hayvanlar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar, adsorbe edici ajanların hayvan yemindeki besin kalitesini değiştirmeden mikotoksinlerin toksisitesini azaltmadaki etkinliğini kanıtlamalıdır.

Soğuk Plazma

Soğuk plazma ile aflatoksin redüksiyonu, termal olmayan, çevre dostu teknoloji sağlama açısından yeni bir yaklaşımdır. Ayrıca soğuk plazma yaklaşımının gıda endüstrilerinde, gıdaların kırılğan veya sıcaklığa duyarlı yüzeylerini sterilize etmek için de kullanıldığı bilinmektedir (36,76). Soğuk plazma; mikrobiyal dekontaminasyon, enzim inaktivasyonu ve yüzey modifikasyonları için dikkate değer bir potansiyel göstermektedir (189–192). Soğuk plazma üretiminde kullanılan güçlü elektrik alanının bir sonucu olarak oluşan iyonlar (H⁺, H₃O⁺, O⁺, H⁻, O⁻, OH⁻, N₂⁺), moleküler türler (N₂, O₂, O₃, H₂O₂) ve reaktif radikallerden (O•, H•, OH•, NO•) dolayı; soğuk plazma kullanımı aflatoksin degradasyonu için birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir (76). AFB₁'in soğuk plazma tarafından ortaya çıkan ana bozunma mekanizması, furan halkasının hidrojenasyon, hidrasyon ve oksidasyonunu içerdiğinden, aflatoksin bozunma mekanizması, çalışma gazı ve reaktif plazma gazı türlerine bağlıdır (193). AFB₁'in cam substrat üzerindeki indirgenmesi, 5 saniye

boyunca atmosfer basıncında mikrodalga argon plazması ve 15 dakika boyunca azot gazı plazması kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlara göre, AFB₁ seviyesi sırasıyla, tamamen ve % 90 oranında indirgenmiştir (194,195). AFB₁ ile spayklanmış ıslak damıtık tahılın, yoğunlaşmış çözümlerin ve kurutulmuş damıtık tahılın 10 dakika boyunca 90 kV'de soğuk atmosferik hava plazma işlemini içeren bir başka çalışma, AFB₁ seviyelerinin sırasıyla % 52, % 20 ve % 35 azalması ile sonuçlanmıştır (116). Diğer yeni alternatif aflatoksin dekontaminasyon işlemleri gibi, soğuk plazma teknolojisinin de indirgeme verimliliğini artırmak ve toksik kalıntı bırakmaması açısından gıdalarda/yemlerde yapılan daha fazla araştırmalar ile güvenilirliği değerlendirilmelidir.

Elektrolize Su

Elektrolize su (ES), gıda ürünleri, ekipman yüzeyleri ve gıda ile temas etmeyen yüzeyler dahil olmak üzere, gıda endüstrisinde mikrobiyal indirgeme için temizleyici ve dezenfektan olarak kullanılmıştır. Suzuki ve ark. (196), *Aspergillus parasiticus*'un sterilizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada ES kullanmış ve hipokloröz asit (HOCL) kaynaklı OH radikali oluşumunun sonucu olarak AFB₁'in mutajenitesi ortadan kaldırmıştır. Fan ve ark. (197), tarafından bildirildiğine göre, yenilebilir bitki yağlarında AFB₁'in tamamen azaltılması, bazik ES kullanılarak ve ardından 220 rpm'de 5 dakikalık salınım ile elde edilmiştir. ES kullanımı, tasarım basitliği, düşük işletme maliyeti, yerinde üretim, toksik kalıntı bırakmama ve çevre dostu olması nedeniyle ticari uygulamalar için önemli bir potansiyele sahip olabilir. Fakat, bildiğimiz kadarıyla, gıda ürünlerinde ve ayrıca çiftlik hayvan yemlerinde ES ile aflatoksin dekontaminasyonuna yönelik az sayıda yapılmış çalışma bulunmaktadır, bu nedenle ES etkinliğini kanıtlamak için farklı ve çok sayıda gıda ürünlerinde daha fazla araştırma yapılmalıdır (192).

Kimyasal Yöntemler

Kimyasal yöntemler; asitler, bazlar, oksitleyici ajanlar ve indirgeyici ajanlar gibi kimyasalların kullanılarak mikotoksin yapısının bozulması esasına dayanır. Son zamanlarda, aflatoksinlere karşı kimyasal olarak aktif özelliklere sahip olan bitki özlerinin ve gıda maddelerinin kullanımı, yeni gelişmekte olan kimyasal yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Kimyasallar mikotoksinleri başka bileşiklere

dönüştürdüğü için, kimyasal yöntemin güvenilirliği açısından toksisite değerlendirmesi muhakkak yapılmalıdır (33,36). Kimyasalların bir kısmı mikotoksinleri toksik olmayan veya daha az toksik bileşiklere dönüştürürken; çoğu yem dokusunun bozulması, lezzetliliğin azalması, besin değerinin önemli ölçüde azalması, veya yan ürünlerin oluşumu gibi istenmeyen yan etkiler üretir (72,84). Kimyasal ajanlar, mikotoksinlerin detoksifikasyonu için tek başlarına veya karıştırma, daldırma, fumigasyon ve sıkıştırma yoluyla fiziksel yöntemlerle kombinasyon halinde uygulanabilir. Genel olarak, kimyasal yöntemlerin kullanımı, ek temizlik işlemleri gerektirdiği için kullanışsız, güvenilmez, maliyetli ve zaman alıcıdır. Belirtilmelidir ki, bu bölümde kimyasal işlemlerin gıda / yemdeki aflatoksinler üzerindeki etkisi, bu işlemlerin düzenleyici kurumlar tarafından izin verilmiş standart gıda işlemi olup olunmamasına bakılmaksızın gözden geçirilecektir (36,37).

Asitler ile İşleme

Mikotoksinlerin çoğu zayıf asitlere karşı dirençli olsa da, Ciegler ve Peterson (198) ve Dutton ve Heathcote (199) aflatoksinlerin güçlü asitlerle işleminin; AFB₁'i hemiasetal form olan AFB_{2a}'ya dönüştürerek biyolojik aktivitesini yok ettiğini bildirmişlerdir. Sitrik asit AFB₁'i AFB_{2a}'ya indirgerken; laktik asidin AFB₁'i hem AFB₂ hem de AFB_{2a}'ya indirgediği bilinmektedir (198,200). Hwang ve Lee (125)'nin yürüttüğü çalışma, 1N sulu sitrik asidin mısır tanesinde AFB₁ seviyelerinin % 96.7 oranında azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir. Ayriyetten, pH değeri 2 olan hidroklorik asit (HCl) kullanımı, 24 saat içerisinde AFB₁ seviyelerini % 19 oranında azaltmıştır (201). Buna ek olarak, AFB₁'in HCl ile yüksek sıcaklıklarda işlenmesi, AFB₁'i toksik kalıntılar oluşturmadan tamamen bozmuştur (202,203). Sorgumda AFB₁'in % 90'ı aşan etkili bozunması; salisilik, sülfamik, sülfosalisilik, antranilik, benzoik, borik, oksalik ve propiyonik asitler gibi diğer asitlerin kullanımı ile elde edilmiştir (204).

Bazlar ile İşleme

Aflatoksinler alkalın koşullar altında kararsız oldukları için, gıdaların ve yemlerin bazlarla işlenmesi aflatoksinlerin azaltılmasında etkinlik göstermektedir (205). Müller (206), sodyum hidroksit, kalsiyum hidroksit, sodyum karbonat,

trisodyum fosfat, metilamin, etilendiamin, etanolamin içeren çeşitli alkalin çözeltilerin kullanılması sonucu pamuk tohumu küspesi, yerfıstığı küspesi ve mısırdaki aflatoksinlerin parçalanmasını gözden geçirmiştir. Çoğu alkalin çözeltisi ile kısmi detoksifikasyon sağlanmıştır. Amonyak kullanımının aflatoksinlerin parçalanması için kapsamlı bir şekilde incelenmesi sonucunda, amonyaklaştırma günümüz dahil olmak üzere hayvan besleme amaçlı mısır, yerfıstığı küspesi ve pamuk tohumu içindeki aflatoksinleri parçalamak için ana endüstriyel işlemi olarak kullanılmaya başlanmıştır (84). Sıvı veya gazlı amonyak, yemdeki aflatoksinin yaklaşık % 95'ini azaltmaktadır (207). Weng ve ark. (208)'nin çalışması, mısırdaki aflatoksin düzeylerinin % 75'ten fazla azaltılmasının amonyaklaştırma ile sağlanmış olduğunu gösterirken; Prudente ve King'in (207), çalışması kirlenmiş mısırın % 1 amonyak ile işlenmesi dört aflatoksin tipi düzeylerinin % 98 oranında azaltılması ile sonuçlandığı göstermiştir. Amonyaklaştırma işleminde uygun sıcaklık, basınç, nem ve süre kullanımı ve ayrıca substratın uygun koşulları; kontamine gıda ve yemdeki aflatoksin seviyelerinin azaltılmasında iyi bir etkinlik sağlamaktadır (208). Örneğin, aflatoksinlerin yok edilmesinde amonyaklaştırma işleminin yüksek basınç altında uygulanması, atmosferik veya düşük basınç altında uygulanmasına göre daha iyi etkinlik göstermiştir (209). Hayvan yemlerinde aflatoksinleri azaltmak için amonyaklaştırma işlemine, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından izin verildiği bilinmektedir (84).

Oksitleyici Ajanlar ile İşleme

AFB₁, AFG₁ ve AFM₁ gibi aflatoksinler, kimyasal yapılarında dihidrofuran halkasında çift bir bağa sahip oldukları için oksitleyici ajanların saldırısına karşı duyarlıdırlar. Güçlü oksitleyicilerden biri olan ozon aflatoksin ile reaksiyona girdiğinde, aldehitler, ketonlar ve organik asitler gibi monozonid türevlerinin oluşumuna neden olur (210). Ozon; gıda işleme, imalat ve depolamada antimikrobiyal ajan olarak kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır (211,212). Nötr pH ve ortam sıcaklığında ozonun, kısa bir yarılanma süresi ile işlenmiş ürünlerde mikroorganizmaları etkisiz hale getirebildiği ve toksik metabolitlerini herhangi bir ozon kalıntısı bırakmadan parçalayabildiği gözlenmiştir (213). Ayrıca, çeşitli gıda ürünlerinin ozon kullanılarak işlenmesi sonucunda,

aflatoksin bozunmasına yönelik de umut verici sonuçlar ortaya çıkmıştır. Yakın tarihli bir çalışmada belirtildiğine göre, uygulanan ozon konsantrasyonu ve maruz kalma süresi aflatoksinlerin azaltılmasını olumlu yönde etkilemiştir (214). Prudente ve King (215), çalışmalarında ozon işlemi yoluyla hayvan yemindeki AFB₁'in % 90'dan fazlasının degrade edildiğini vurgulamışlardır. Mısır ve buğdaydaki aflatoksinlerin ozon tarafından indirgenmesine yönelik umut verici sonuçlar, Tablo 2.7.'de gösterilmiştir. Ozonlama, gıda ürünlerinde ve özellikle de mısırdaki AFB₁ yıkımına ve toksisitesinin azaltılmasına yönelik hızlı, etkili ve güvenli bir yöntem olsa da; ozonlama koşulları nedeniyle bu yöntem geliştirmekte olan ülkeler için uygun maliyetli değildir. Ayrıca ozon işleminin diğer bir dezavantajı ise ürünlerin besin değerini değiştirebilmesinden kaynaklanmaktadır (216,217).

Diğer bir oksidan olan hidrojen peroksit (H₂O₂), aflatoksinlerin detoksifikasyonu için ticari ölçekte kullanılmıştır. Mısır ve yer fıstığı küspesinin H₂O₂ ile işlenmesiyle, aflatoksin konsantrasyonlarının azaldığı gözlemlenmiştir (36). Ek olarak, pirinç yemeğinde oksitleyici ajanlar olarak % 16.5 NaCl ve % 1 NaClO'nun 24 saat boyunca kullanımı, aflatoksinleri tamamen ortadan kaldırmıştır (218).

Tablo 2.7. Mısır ve buğdaydaki aflatoksinlerin ozon tarafından indirgenmesi.

Substrat	İşlem parametreleri	Sonuçlar	Referanslar
Mısır	ozon konsantrasyonu: 50 mg /l, maruz kalma süreleri: 60, 120 saat	AFB ₁ 'de 89-91 % azalma	(219)
	ozon konsantrasyonları: 40-90 mg/l, maruz kalma süreleri: 5-40 dakika	AFB ₁ 'de 88 %'e kadar azalma	(216)
	ozon konsantrasyonları: 20-40 mg/l, maruz kalma süreleri: 5-40 dakika	AFB ₁ 'de 84-97% azalma	(220)
Buğday	ozon konsantrasyonları: 40-60 mg/l, maruz kalma süreleri: 30-180 dakika	Aflatoksinde 81-95 % azalma	(221)

İndirgeyici Ajanlar ile İşleme

İndirgeyici bir ajan olan sodyum bisülfid, AFB₁'in detoksifikasyonu için araştırılmış ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, kalıntı bisülfidin gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verildiği bilinmektedir (36,222). Sodyum bisülfid AFB₁ ile reaksiyona girdiğinde; AFB₁'in 15 α -sodyum sülfonatu (AFB₁S) ana ürün olarak oluşur ve AFB₁ molekülünü ana DNA bağlanma bölgesine bağlanmaktan mahrum eder (223). Düşük ve yüksek seviyelerde aflatoksin ile kontamine olmuş mısırın sodyum bisülfid ile işlenmesi sonucu, aflatoksinlerin etkili bir şekilde yok edilmesi Moerck ve ark. (224) ve Hagler ve ark. (225) tarafından kanıtlanmıştır. Yürütülen bu çalışmalarda dekontamine edilmiş mısır; gelişmiş renk, daha iyi lezzetlilik, daha iyi kullanım ve gelişmiş ekonomi özelliklerine sahip idi. Günümüzde sodyum bisülfid, hayvan yemi olarak kullanılan mısır, yer fıstığı küspesi ve pamuk tohumu içindeki aflatoksinleri indirgemek için ana endüstriyel işlemi olarak kullanılmaktadır (84).

Bitki Özleri ile İşleme

Bitki özlerindeki bileşikler çevre dostu, biyoçözünür, biyolojik olarak güvenli, yenilenebilir ve uygulaması düşük maliyetlidir. Bu yüzden sulu bitki özlerinin, aflatoksinlerin dekontaminasyonuna yönelik kullanılması yeni bir yaklaşım olarak büyük bir potansiyele sahip olmaktadır. Aflatoksinlerin bozunmasında çeşitli bitki ve baharatların etkinliği son yıllarda sıkça araştırılmaktadır (226). Velazhahan ve ark. (118), çalışmalarında Asya yemeklerinde baharat olarak kullanılan *Trachyspermum ammi* (mısır anason) tohumlarından elde ettikleri ekstraktı AFB₁ ile inkübe etmiş ve AFB₁ seviyelerini önemli ölçüde azaltmayı başarmışlardır. Diğer başka bir çalışmada, aflatoksinler *Ocimum tenuiflorum* özleri kullanılarak oda sıcaklığında bile önemli ölçüde detoksifiye edilmiştir (227). Çeşitli bitkilerin yapraklarından ve tohumlarından elde edilen ekstraktlar araştırmacılar tarafından *in vitro* çalışmalarda test edilmiştir ve bu *in vitro* çalışmalar arasında ekstraktların sağladığı en önemli AFB₁ redüksiyonları Tablo 2.8.'de gösterilmiştir. Aynı zamanda,

bitki ekstraktları ile aflatoksin arasındaki daha uzun temas süresinin, ekstraktların indirgeme etkinliğini olumlu etkilediği de bulunmuştur. Bildiğimiz kadarıyla, kontamine gıda veya yemlerde aflatoksinlerin detoksifikasyonuna yönelik bitki ekstraktlarının uygulanmasına ilişkin çalışmaların olmamasına rağmen; *in vitro* çalışmalardan elde edilen veriler, bitki ekstraktlarının kullanımının gıdalarda veya yemlerde aflatoksinlerin dekontaminasyonunda büyük bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir (33).

Tablo 2.8. Aflatoksin dekontaminasyonuna yönelik sulu bitki ekstraktlarının kullanımı üzerine yapılmış yakın tarihli *in vitro* çalışmalar.

Bitki türleri (bilinen isim)	Ekstraktın hacmi (µL)	Aflatoksin seviyesi (µg/L)	İşlem parametleri	İndirgeme (%)	Referanslar
<i>Justicia adhatoda</i> (adulsa)	500	100 (AFB ₁)	37 °C, 24 saat	98.4	(226)
<i>Corymbia citriodora</i> (okaliptüs)	250	100 (AFB ₁)	30 °C, 72 saat	95.2	(228)
<i>Cassia fistula</i> (altın duş)	250	100 (AFB ₁)	30 °C, 72 saat	54.4	(229)
<i>Ocimum basilicum</i> (fesleğen)	250	100 (AFB ₁)	30 °C, 72 saat	92.8	(229)

Özetlemek gerekirse, bazı fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon yaklaşımlarına endüstriyel ölçekte kullanılmak üzere izin verilmiş olsa da; sınırlı etkinlik, güvenlik sorunları, beslenme kalitesinde olası kayıplar ve uygun maliyetli olmama endişeleri nedeniyle çoğunun, hayvan yemi veya insan gıdası olarak kullanılma amacı ile üretilen tarım ürünlerini dekontamine etmesine izin verilmez. Bu nedenle, hayvan yemi ve insan gıdası olarak kullanılacak çeşitli tarım ürünleri için daha yeni detoksifikasyon yöntemleri, güvenlik konuları göz önünde bulundurularak incelenmeli ve geliştirilmelidir (23,164).

Biyolojik Yöntemler

Bakteriler, küfler ve mayalar gibi çeşitli mikroorganizmalar ve enzimler gibi ilgili ürünlerinin kullanılmasıyla sağlanan biyolojik bozunma; yem ürünlerinde hem

hasat öncesi hem de hasat sonrasında aflatoksin kontaminasyonunu azaltmak için umut verici ve alternatif bir yaklaşım olabilir. Aflatoksinin dekontaminasyonu için mikroorganizmaların kullanılması, biyo-bozunurluk, özgünlük, maliyet etkinliği ve yüksek verimlilik sağlar. Ayrıca, mikroorganizmalar büyüme için gıda matrisini kullanmadıklarından, kontamine yemlerin besin değerini ve lezzetini azaltmazlar (29,230). Biyolojik sistemler mikotoksinlerin detoksifikasyonuna yönelik işlevlerini, iki temel mekanizma ile gerçekleştirirler. Bu iki temel mekanizma, adsorpsiyon ve enzimatik bozunmadır. Adsorpsiyon mekanizmasında hem canlı hem de canlı olmayan hücreler mikotoksinleri hücre duvarı bileşenlerine bağlayarak uzaklaştırırlar. İkinci mekanizmada ise, hücre dışı veya hücre içi enzimler enzimatik bozunmanın gerçekleştirilmesinde rol alırlar (33,75).

Probiyotikler ve özellikle laktik asit bakterilerinin (LAB) süt suşlarını içeren bakteriler, *Saccharomyces cerevisiae*'nin maya suşları ve *A.flavus*'un aflatoksjenik olmayan suşları gıdalardan ve yemlerden aflatoksinlerin uzaklaştırılması için çoğunlukla incelenen ana mikroorganizmalardır (84). Aflatoksinlerin LAB ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak azaltılması, literatürdeki çalışmaların çoğunda biyolojik detoksifikasyon yöntemleri altında geçse de; bu derlemede bu mikroorganizmalardan, fiziksel olarak mikotoksinleri bağladıkları için adsorbe edici maddeler olarak fiziksel detoksifikasyon yöntemleri altında bölüm 2.5.2.1'de de bahsedilmiştir. Ayrıca, mikroorganizmaların hasat öncesi dönemde de mikotoksinlerin detoksifikasyonu için kullanılabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, toksik olmayan *Aspergillus* mantarlarının kullanımı, mantar oluşumunu ve mikotoksin üretimini en aza indirmek için hasat öncesi yöntemler adı altında, daha önce bölüm 2.5.1.'de de belirtilmiştir.

Bakteriler

Bacillus, *Lactobacilli*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* ve *Burkholderia* spp. gibi çeşitli bakteri türleri incelenmiş ve laboratuvar koşulları altında bakteriler mantar büyümesi ve aflatoksin üretimini inhibe etme kabiliyeti göstermiştir (75). Dahası, İsmail ve ark. (33)'nin belirttiğine göre, hem kültür ortamlarında hem de gıdalarda aflatoksinlerin uzaklaştırılmasında sağlanan mükemmel verimlilik; *Bacillus licheniformes*, *Streptomyces cacaoi*, *S. lividans*, *Rodococcus eritropolis*,

Lactobacillus debrueckii gibi bakteriler kullanılarak elde edilmiştir. 1960'larda, test edilen çok sayıda mikroorganizma arasından sadece *Flavobacterium aurantiacum* NRLL B-184 adındaki bir bakteri çözeltilerden aflatoksinini geri dönüşümsüz olarak uzaklaştırmıştır. Yıllar sonra, bulgular afatoksinin *Flavobacterium aurantiacum* tarafından detoksifikasyonunun enzimatik olduğunu, ancak mekanizmanın hala tam olarak bilinmediğini göstermiştir (36,75). Ek olarak, *Flavobacterium aurantiacum* NRLL B-184, gıdalarda ve yemlerde de aflatoksinlerin detoksifikasyonu için çok yüksek bir kabiliyet göstermiştir. Antibiyoz yeteneği olan birkaç laktik asit bakterisi (LAB) suşunun, aflatoksinini bağladığı ve biyosentezini inhibe ettiği veya aflatoksinini ortamdaki uzaklaştırdığı bildirilmiştir (75,84). El-Nezami ve ark. (231) tarafından AFB₁'in çıkarılması üzerine yapılan çalışmada, araştırılan 7 bakteri türü arasından *L.rhamnosus*, mediyumdan mikotoksinleri % 80'e kadar çıkarmıştır. Ayrıca, kontamine mısırdaki AFB₁'in % 44.5 oranında en belirgin azalması, test edilen *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, ve *L. plantarum* bakterileri arasından *L. plantarum* kullanımı ile sağlanmıştır (232). Öte yandan, *Bacillus subtilis*'in aflatoksin üretimini azaltmada önemli etkinlik gösterdiği de bilinmektedir (84). *Bacillus licheniformis*, *B.subtilis* suşu 168 ve *Bacillus natto* CICC 24640 gibi *Bacillus* suşlarının bazıları, laktik asit bakterileri gibi genellikle güvenli olarak kabul edilir (GRAS). Bu nedenle, güvenli olarak kabul edilen mikroorganizmalar, hayvan yemlerinde aflatoksinlere yönelik biyo-detoksifikasyon ajanları olarak kullanılabilir (29,84). Bazı bakteri suşları *in vitro* çalışmalarda, mantar büyümesi ve müteakip aflatoksin üretiminin azaltılması için yüksek etkinlik gösterse de; tarlada aflatoksinlerin azaltılmasında benzer etkinlik, bakteriyel hücrelerin yem ürünlerinde *Aspergillus* ile kontamine olmuş bölgelere saha koşulları altında rahatça uygulanamadığı için gözlemlenememiştir (233).

Mayalar

Maya suşlarının aflatoksinleri bağlama işlemi, bakteri suşlarındaki gibi hızlı ve geri dönüşümlüdür, ancak bağlama kabiliyeti genellikle bakteri suşlarına kıyasla daha düşüktür. Aflatoksinlerin uzaklaştırılmasında *S. cerevisiae* kullanımı, birçok araştırmacı tarafından araştırılmış ve araştırmalar sonucunda *S. cerevisiae*'in kayda değer bir etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Belirli bir maya cinsi veya türünün çeşitli

suşları, mikotoksinlerin uzaklaştırılmasında değişken verimlilik ile farklı bağlanma yetenekleri gösterebilir. Örneğin, ilgili bir çalışmada tampon çözelti içerisinde test edilen 18 farklı *S.cerevisiae* suşu arasında; sadece 3 suş, AFB₁'in % 40'tan fazlasını uzaklaştırabilmiştir (33,84). Bueno ve ark. (234), *S. cerevisiae* tarafından sıvı ortamda AFB₁ bağlanmasının, AFB₁ ve maya hücre duvarı arasında geri dönüşümlü bir kompleks oluşmasına neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Bağlanma mekanizmasından sorumlu olan bileşiklerin, maya hücre duvarındaki mannanoligosakkarit (MOS) ve esterleştirilmiş glükomannan (EGM) olduğu düşünülmektedir (84). Ayrıca, *S.cerevisiae*'nin fiziksel, kimyasal ve enzimatik tedaviler gibi diğer yöntemlerle kombinasyon halinde uygulanması, ortam içerisinde aflatoksinlerin uzaklaştırılmasını artırabilir. Canlı maya hücrelerinin tek başlarına kullanılmasının aksine, *S. cerevisiae* hücrelerinin 60 °C ve 120 °C'de ısıtılması ve ayrıca hidroklorik asit (2 M) ile işlenmesi, AFB₁'in ortamdan uzaklaştırılmasını artırmıştır (33). Son olarak belirtmek gerekir ki, *Aspergillus* büyümesinin inhibisyonunda maya suşları; tarla koşullarına nazaran laboratuvar koşulları altında daha iyi etkinlik göstermektedir (84).

Toksijenik Olmayan Mantar Suşları

Daha önce bölüm 2.5.1.'de de bahsedildiği gibi, biyo-rekabetin mantar saldırısına duyarlı tarım ürünlerinde aflatoksin kontaminasyonunu önlemek için en faydalı girişimlerden biri olabileceği düşünülmektedir. *Aspergillus* suşları (özellikle *A.parasiticus* ve *A.niger*), *Trichoderma viride* ve *Mucor ambiguus* gibi toksik olmayan mantar suşları AFB₁ degradasyonunda, dikkate değer etkinlik göstermişlerdir. Özellikle, toksik olmayan *Aspergillus* suşlarının birçok saha deneyinde hem hasat öncesi hem de hasat sonrası, ürünlerde aflatoksin kontaminasyonunu etkili bir şekilde önlediği bildirilmiştir (84). 2003 yılında, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA), Amerika'nın Teksas ve Arizona eyaletinde pamuğun işlenmesi için, *Aspergillus flavus*'un atoksijenik izolatu olan AF36'nın biyokontrol ajanı olarak kullanılmasını tescillemiştir (233). Mısır ve yer fıstığında aflatoksin önemli ölçüde azaltan Aflasafe® (IITA) ve ayrıca yer fıstığında kullanımı onaylanmış Afla-guard® (Syngenta); aflatoksinlere karşı piyasada bulunan iki yeni biyokontrol sistemidir. Aflatoksin kontrolünün %

90'ından fazlasının, bu ürünlerin kullanımı ile sağlanabileceği bildirilmiştir (33,235). Daha önce farklı yazarlar tarafından incelenmiş olan bakteri, maya ve toksijenik olmayan mantar suşları dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların aflatoksin bozunmasındaki etkinliği, Tablo 2.9. ve Tablo 2.10.'da gösterilmiştir. Bu iki tablonun yanı sıra, AFB₁'in çeşitli mikroorganizmalar ile mikrobiyal bozunması, Verheecke ve ark. (87)'nin, kapsamlı incelemesinde açıkça bahsedilmektedir.

Tablo 2.9. Gıda ürünlerinde veya hazırlanmış mediyumlarda aflatoksinin dekontaminasyonu için, mikroorganizmanın tek başına veya başka bir mikroorganizma ile kombinasyon halinde kullanılması.

Mikroorganizma	Yiyecek türü veya mediyum	AFB ₁ (µg/kg veya L)	Analiz koşulları	İndirgeme (%)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	LB mediyum	AFB ₁ (2000)	72 saat boyunca 28 °C'de bir çalkalayıcıda (170 rpm) bakteri kültürü ile inkübasyon	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (N-17-1)	Nutrition Broth (Besleyici buyyon)	AFB ₁ (0.1)	Bakteri kültürü ile karanlıkta, 37 °C'de 72 saat boyunca inkübasyon	83
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ve <i>S. lividans</i>	ISP mediyum	AFB ₁ (20,000)	24 saat boyunca 30 °C'de bakteri kültürleri ile inkübasyon	88
<i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>L. bulgaricus</i>	Yer fıstığı küspesi	AFB ₁ (10.5)	10 dakika boyunca yer fıstığı küspesinin ısı işleme (100–121 °C) (pH: 10), ardından 3 gün boyunca 37 °C'de anaerobik kavanozlarda <i>S. thermophilus</i> (10 ⁸ hücre / mL) ve <i>L. bulgaricus</i> (10 ³ hücre / mL) ile inkübasyon.	100
<i>Bacillus licheniformis</i> CFR1	Nutrition Broth (Besleyici buyyon)	AFB ₁ (500)	37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyon	95
<i>Zygosaccharomyces roxii</i> suşları	Yer fıstığı küspesi	AFB ₁ (115)	Maya kültürünün (10 ⁹ hücre / mL) 30 °C'de 3 gün boyunca inkübasyonu	57–84

Tablo 2.10. Çeşitli bakteri, maya ve toksijenik olmayan mantar suşları kullanılarak, aflatoksinlerin bozunması.

Biyolojik yöntem	Mikroorganizmalar	Yiyecek türü veya mediyum	Mikotoksin	İndirgeme (%)
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LBGG), <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LC-705)	Sıvı mediyum	AFB ₁	80
Bakteriler	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i>	PBS solüsyonu	AFB ₁	5.6-59.7
	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Sıvı mediyum	AFB ₁	25-61
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PBS solüsyonu	AFB ₁	40
Mayalar	<i>Saccharomyces</i> ve <i>Candida</i> suşları	PBS solüsyonu	AFB ₁	15-60
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücre duvarı bileşeni esterlenmiş glukomannan(EGM)	Kontamine yem	AFB ₁	81.6
Toksik olmayan mantar suşları	K94	Mısır	Aflatoksinler	83-98
	Afla-guard	Mısır	Aflatoksinler	9-75
	Afla-guard	Mısır	Aflatoksinler	85-88

(84)

Enzimler ve Mikrobiyal İlişkili Diğer Yaklaşımlar

Mikotoksinlerin parçalanmasında rol oynayan enzimlerin mekanizması, detoksifikasyon işleminin karmaşıklığı nedeniyle hala bilinmese de; araştırmacılar, 1990'ların başından beri mikotoksinlerin mikrobiyal enzimler tarafından biyodönüşümünü incelemektedirler. Buna rağmen, farklı kaynaklardan elde edilen çeşitli enzimler gıda maddelerindeki aflatoksinin azaltılmasında, verimlilik göstermektedir. *Phoma glomerata* ve *A.niger* gibi mantar türlerinden elde edilen aflatoksin degrade edici enzimler, detoksifiye edici ajanlar olarak kullanılma potansiyelini göstermiştir

(33). Hem *Pleurotus ostreatus* hem de *Rhodococcus erythropolis*'ten izole edilmiş ekstraselüler enzimlerin AFB₁'i dönüştürdüğü ve toksisite kaybına yol açtığı gözlemlenmiştir (161). Ayrıca, lakkazlar ve peroksidazlar gibi enzimlerin, çeşitli organik bileşikleri degrade edebildiği bilinmektedir. Wang ve ark. (236), aflatoksinlerin *Phanerochaete sordida* kaynaklı peroksidaz enzimi ile oluşan bozunma ürünlerini aydınlatmışlardır. Bazı farklı mantar türlerinin lakkazları tarafından AFB₁'in bozunmasına yönelik yapılan çalışmada, AFB₁'in bozunma ürünlerinin mutajeniteye sahip olmadığı kanıtlanmıştır. Ancak bu bozunma ürünlerinin yapıları tam olarak belirlenememiştir (36). *Armillaria tabescens*'ten izole edilen ve saflaştırılan, aflatoksin-detoksifizim (ADTZ) adındaki bir enzim ve *Raphinus sativa* bitkisinden izole edilen yabanturpu peroksidaz enzimi, AFB₁ üzerinde detoksifikasyon aktivitesi göstermiştir (21,75). Aflatoksinlerin degradasyonu için kullanılan çeşitli enzimler ve diğer mikrobiyal ilişkili yöntemler, hem Tablo 2.11.'de hem de Tablo 2.12.'de gözden geçirilmiştir. Şu ana kadar hiçbir enzimin kullanımı AB tarafından tescillenmese de, geliştirilmekte olan enzimler gelecekte mikotoksin düzeylerini veya bunlarla ilişkili toksisiteyi azaltmak için gıda ve yemlerde potansiyeli olan bir uygulama olarak kullanılabilir (36).

Aflatoksinlerin dekontaminasyonu için mikroorganizmaların ve enzimlerin kullanımı, potansiyel biyolojik yöntemler olarak yeni yeni ortaya çıkmış olsa da; bu biyolojik ajanların hayvan yemine uygulanabilmesi için belirli şartlar sağlanmış olmalıdır. Örneğin, mikroorganizmalar patojenik olmamalı ve ürünlerin toksisitesini değerlendirmek için bozunma ürünleri belirlenmelidir. Bozunma ürünleri toksik olmamalı ve dönüşümün verimliliği *in vivo* çalışmalarda değerlendirilmelidir. Bu nedenle, biyolojik ajanların saha koşulları altında aflatoksin kontaminasyonunu azaltmadaki etkilerini test etmek için, ileri saha deneyleri gereklidir (161).

Tablo 2.11. Aflatoksin bozunmasına yönelik yakın zamanda çalışılmış enzimler ve diğer mikrobiyal ilişkili yöntemler.

Prencip	Mediyum	Analiz koşulları	Sonuçlar
Enzimatik detoksifikasyon	Sitrat tampon (0.1 M)	% 20 dimetil sülfoksit ve lakkaz enzimi (30 U/mL) içeren mediyum (pH 4.5) 35 ° C'de inkübe edildi.	Enzim başlangıç aflatoksin seviyesinin % 67'sini azalttı.
Mantar metabolitleri ile detoksifikasyon	Besin mediyumu	Depolanan fasulyelerden (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>) toplanan <i>Phoma glomerata</i> 'dan kültür sıvı filtratı (CLF) ve hücresiz ekstrakt (CFE), 27 °C'de 72 saat süreyle AFB ₁ (2 µg / mL) ile inkübe edildi.	CLF ve CFE'nin aflatoksin bozunma verimliliği sırasıyla % 78 ve % 66'ya ulaşmıştır.
Mantar metabolitleri ile detoksifikasyon	Besleyici buyyon ve pamuk tohumu küspesi	Mutasyonlar için yabancı bir <i>A. niger</i> (FS-Z1) suşu UV radyasyonu ile indüklendi ve mutant suşların hücreleri, hidratlı sodyum kalsiyum alüminosilikat tabanında immobilize edildi. Ardından 30 °C'de 48 saat boyunca AFB ₁ ile inkübe edildi.	Bir mutant türünün (FS-UV1) hareketsizleştirilmiş hücreleri, besleyici buyyonda başlangıç aflatoksin seviyesinin % 95'ini azalttı. Sonuçlar kontamine pamuk tohumu küspesinde % 93-97 aflatoksin yıkımı ile çoğaltılmıştır.

Tablo 2.12. Safılaştırılmış enzimler ile AFB₁ bozunması.

Enzim	Familya	Üreten organizma	Analiz koşulları	Sonuçlar
FDR-A, FDR-B	F ₄₂₀ H ₂ bağımlı redüktaz	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	30 µM AFB ₁ , 24 saate kadar 10 µM F ₄₂₀ ile inokule edildi.	% 100 indirgenme
MnP	Mn peroksidaz	<i>Phanerochaete sordida</i> YK-624	50 mg/l AFB ₁ , 5 nkat MnP ile inokule edildi.	% 86 indirgenme
42 kDa protein	Mn peroksidaz	<i>Pleurotus ostreatus</i>	312 mg/l AFB ₁ , 1.5 U/ml 42 kDa proteini ile inokule edildi.	% 90 indirgenme
Lakkaz	Lakkaz	<i>Trametes versicolor</i>	1.4 mg/l AFB ₁ , 1 U/ml lakkaz ile inokule edildi.	% 89 indirgenme

Mn: manganez; MnP: manganez peroksidaz (87)

2.6. Sütte AFM₁ Dekontaminasyonu

Süt kontaminasyonu, kontamine sütteki AFM₁ içeriğinin doğrudan azaltılmasıyla veya dolaylı olarak süt hayvanlarının yeminde AFB₁ kontaminasyonunun azaltılmasıyla kısmen giderilebilmektedir (9). Tarlada veya yem bitkilerinin depolanması sırasında hasat öncesi ve hasat sonrası müdahaleler, ve yemdeki AFB₁ seviyelerinin konsantrasyonunu azaltmak için detoksifikasyon yöntemleri, önceki bölümlerde detaylı bir biçimde belirtildiği için; bu bölüm daha çok sütteki AFM₁'in doğrudan dekontaminasyonuna odaklanmayı amaçlamaktadır. Araştırmacılar, sütteki AFM₁ düzeylerini düşürmek için uygulanabilir ve yaygın olarak kabul gören dekontaminasyon stratejilerini uyarlamaya yönelik çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemleri değerlendirmişlerdir. (58).

2.6.1. Kimyasal Dekontaminasyon Yöntemleri

AFB₁, AFG₁ ve AFM₁'in oksitleyici ajanların etkilerine karşı hassas olduğu bilindiğinden, birçok araştırmacı AFM₁'in süttten kimyasal inaktivasyon ile yok edilmesini araştırmıştır. Applebaum ve Marth (237), doğal olarak kontamine olmuş

çiğ süttten AFM₁ inaktivasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, H₂O₂, H₂O₂ artı riboflavin (Rib.) ve H₂O₂ artı laktoperoksidazın (LPO) etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, AFM₁ düzeylerindeki azalma % 0 ile % 98 arasında değişiklik göstermiştir. % 98 ile maksimum etkinlik; % 1 H₂O₂'nin 0.5 mM Rib. ile birlikte 30 dakika boyunca 30 °C'de kullanılması ve ardından 63 °C'de 30 dakika boyunca ısıtılmasıyla elde edilmiştir. 3 gün boyunca 4°C sıcaklıkta, 5 ünite LPO ve % 0.1 H₂O₂'nin birlikte kullanımı, AFM₁'in önemli ölçüde yok edilmesini sağlamıştır. AFM₁'in inaktivasyonuna yönelik kullanılan bu kimyasalların mekanizması tam olarak bilinmese de, AFM₁'in inaktivasyonundan reaktif türlerden olan tekli oksijenin (¹O₂) ve / veya hipokloröz asidin (HClO), sorumlu olduğu düşünülmektedir. Aynı yıl, Doyle ve diğerleri (1982) tarafından yayınlanan bir başka çalışmada, 10 ml süt başına 0.04 g potasyum bisüfit (indirgeyici ajan) ilave edilmesinin, AFM₁ seviyelerinin % 45'ten fazla azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Daha yakın tarihli bir çalışmada, süütün 80 mg/dk ozon gazına 5 dakika boyunca maruz bırakılması, AFM₁ konsantrasyonunu % 50 azaltmıştır (238).

2.6.2. Kil Bazlı Yem Dekontaminasyonu

Süt hayvanlarının diyetinde enterosorbent kullanımı, hayvan vücudunda AFB₁ emiliminin azalmasına yol açar. Bundan dolayı, yemin kil bazlı dekontaminasyonu, süt hayvanlarının sütünde AFB₁ metaboliti olan AFM₁'in azaltılmasına yönelik dolaylı bir yaklaşım olarak kabul edilir. AFB₁-kontamine yemlerle beslenen laktasyon dönemindeki sığırların ve keçilerin diyetine kil bazlı adsorbanların dahil edilmesi sonucunda, sütteki AFM₁ konsantrasyonunda kayda değer bir azalma gözlemlenmiştir. Örneğin, sağmal ineklerin yemine % 2 aktif karbon ve % 2 HSCAS eklenmesinin, AFB₁'in süte AFM₁ olarak taşınmasındaki etkisi araştırılmış ve bu adsorbanların taşınmayı sırasıyla, % 50 ve % 36 oranında azalttığı bulunmuştur (9,239). Aflatoksin ile kontamine yemler tüketen sağmal ineklerin diyetine EGM'nin % 0.05 oranında takviye edilmesi, sütteki AFM₁ seviyelerinin %58 oranında azalmasına neden olmuştur (31). Adsorbanlar arasından aktif karbon, kalsiyum bentonit, esterleştirilmiş glukomannan ve üç adet HSACS ürünü aflatoksin ile kontamine yem tüketen ineklerin diyetine eklenmiş ve bu ürünler süütün AFM₁ konsantrasyonlarında sırasıyla % 5.4, % 31, % 59, % 65, % 50 ve % 61

azalma sağlamışlardır. Benzer bir çalışmada, sağmal ineklerin diyetinde, % 0.5 oranında takviye edilmiş Novasil Plus®, Solis® ve esterleştirilmiş glukomannan ürünü olan MTB-100'ün etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre, MTB-100 AFM₁ seviyelerini % 4 oranında düşürüp, en düşük redüksiyon verimliliğini sağlarken; Solis® sütteki AFM₁ seviyelerini % 48 azaltarak en yüksek redüksiyon verimliliğini sağlamıştır (9). Ayrıca bir başka çalışmada, aflatoxin ile kontamine yem tüketen laktasyon dönemindeki ineklerin diyetinde bentonit (AB-20) kullanımı, sütteki AFM₁ konsantrasyonlarını % 60.4 oranında azaltmıştır (240).

Özetlemek gerekirse, AFB₁'in kontamine yemlerden süte AFM₁ olarak taşınması, kil bazlı adsorbanlar kullanılarak en aza indirilebilir ve bunun sonucu olarak süt hayvanlarında aflatoksikoz hafifletilebilir.

2.6.3. Kil Bazlı Süt Dekontaminasyonu

Adsorbanların etkinliği, AFM₁ ile kontamine olmuş sütün, doğrudan dekontaminasyonu için de araştırılmıştır. Bentonitin etkinliği üzerine, geçmişten günümüze kadar yapılmış olan deneyler, bentonitin sütteki AFM₁'in çıkarılması için etkili bir kil malzemesi olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca, bentonit kalıntıları sütte düşük miktarda (% 0.4) kalmasına rağmen, bentonit kullanımının sütün besin özelliklerini değiştirmedeği ve insan sağlığı üzerinde önemli bir etki yaratmadığı ortaya çıkmıştır. Ancak, süt kalitesinin diğer parametreleri hakkında çok az veri bulunmaktadır. Son olarak belirtmek gerekirse, adsorbana bağlı AFM₁ toksininin süttten ayrılmasına yönelik yapılan araştırmalar halen devam etmektedir (9,241,242).

2.6.4. Mikrobiyal Dekontaminasyon

Daha önceki bölümlerde bahsedilmiş olan ısıtma ve ışınlama gibi hem fiziksel yöntemler hem de amonyaklama ve ozon tedavisi gibi kimyasal yöntemler, mikrobiyal yöntemlere kıyasla daha yüksek maliyet, daha fazla zaman alıcı ve daha olası beslenme kayıpları nedeniyle sütte AFM₁'in çıkarılmasına yönelik birçok kısıtlamaya sahiptir. Bundan dolayı, AFM₁'in mikrobiyal dekontaminasyonu, daha etkili, çevre dostu ve son derece spesifik olduğu için yeni, umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Mikroorganizmaların, mikotoksinlere bağlanmadaki yüksek kabiliyetlerine ek olarak, genelde güvenli olarak kabul edilen (GRAS) statüleri, araştırmacıları sütteki AFM₁ için mikroorganizmaların bağlanma kabiliyetini daha

fazla araştırmaya teşvik etmiştir (60). Bu amaç doğrultusunda, bakteri suşlarının, maya suşlarının ve bunların karışık havuzlarının bağlanma verimlilikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Sonuç olarak, AFM₁'in mikrobiyal hücreler tarafından bağlanmasının hızlı bir işlem olduğu ve sonuçta ortaya çıkan değişken bağlanma yüzdelерinin; hücre duvarlarının ve membranların yapısındaki farklılıklar, inkübasyon süresi, sıcaklık, AFM₁ ve mikrobiyal konsantrasyonlar gibi bazı faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (60,243). Bazı mikrobiyal adsorbanlar tarafından AFM₁ bağlanmasının etkinliği bu bölümde belirtilecektir.

Ticari *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* suşlarının, fosfat tamponlu salin (PBS) ve süt içerisinde, AFM₁ konsantrasyonunu değişen derecelerde azalttıkları bulunmuştur. Özellikle *L. bulgaricus* CH-2 ve *S. thermophilus* ST-36'nın süt örneklerinde bulunan AFM₁'in sırasıyla, % 28'ini ve % 39'unu bağladığı bildirilmiştir (9,60). Pierides ve ark. (244), AFM₁'in çıkarılmasında ısı ile öldürülen *L. rhamnosus* GG'nin yaşayabilir hücrelere göre daha verimli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu çalışmaya göre, ısı ile öldürülen hücrelerin yağsız süte kıyasla tam yağlı süte AFM₁'i uzaklaştırması daha etkili olmuştur. İlginç bir şekilde, *L. rhamnosus* LC-705'in canlı hücrelerinin, AFM₁'in hem tam yağlı süten hem de yağsız süten çıkarılmasında, ısı ile öldürülen hücrelere kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur. Ek olarak, önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlar, toprak bakterisi, *N.corynebacterioides*'in kontamine süte toksik molekül üretmeden aflatoksinleri (AFB, AFG ve AFM) tamamen detoksifiye ettiğini göstermiştir (9). Farklı maya suşlarının da kontamine süte bulunan AFM₁'in azaltılmasına yönelik etkinlik gösterdiği bilinmektedir. Örneğin, kontamine olmuş UHT yağsız süte *Saccharomyces cerevisiae* kullanımı, AFM₁ konsantrasyonunu % 92.7'ye kadar azaltmıştır (60). Ayrıca, Abdelmotilib ve ark. (245), tarafından AFM₁'in çıkarılmasına yönelik yapılan çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar; *Kluyveromyces lactis* ve *S. cerevisiae* gibi cansız maya suşlarının kombinasyonunun, tek başına maya suşlarının kullanımına kıyasla daha etkili olduğunu göstermiştir. Süte AFM₁ çıkarılmasına yönelik tek veya kombine olarak bakteri suşlarının ve bakteri suş havuzlarının maya suşları ile birlikte kombine halde kullanılmasındaki verimlilik Tablo 2.13.'te özetlenmiştir. Ek olarak, çeşitli mikroorganizmaların farklı solüsyonlarda AFM₁'e bağlanma verimlilikleri Assaf ve ark (60), tarafından kapsamlı

olarak belirtilmiştir. Belirtmekte yarar vardır ki; farklı konsantrasyonlarda canlı LAB, maya veya her ikisinin karışımının süte eklenmesi, üründe kontrolsüz çoğalmaya neden olup, bozulmaya yol açabilir. Bu yüzden süt dekontaminasyonu için ısı ile öldürülmüş mikrobiyal hücrelerin kullanımı, canlı mikrobiyal hücrelerin kullanımına nazaran daha elverişlidir (246). Örneğin, *Kluyveromyces* ve *Saccharomyces* türleri genellikle süt laktozunu fermente ederek, süt bozulmasına neden olur.

Tablo 2.13. Mikroorganizmaların, süte AFM₁'in çıkarılmasına yönelik etkinliği.

Mikroorganizma	Süt çeşitleri	Aflatoksin (µg/kg veya L)	Analiz koşulları	İndirgeme (%)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	UHT süt	AFM ₁ (0.5)	Isıyla öldürülmüş bakteri hücreleri (10 ¹⁰ hücre/mL) ile 4°C veya 37°C'de 15 dakika boyunca inkübasyon	13–33 20–24 32–38
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> Laktik asit bakterileri (LAB) ^b <i>S. cerevisiae</i> +LAB ^b	UHT süt	AFM ₁ (0.5)	Isıyla öldürülen maya (10 ¹⁰ hücre/mL) ve / veya LAB hücreleri (10 ⁹ hücre/mL) ile 37 °C'de 30–60 dakika inkübasyon	11–12 90–93 92–100
<i>S. cerevisiae</i> (LAB) ^d <i>S. cerevisiae</i> +(LAB) ^d	Süt	AFM ₁ (0.05 ve 0.1)	Isıyla öldürülmüş maya ve / veya bakteri hücreleri (10 ⁷ -10 ¹⁰ hücre/mL) ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübasyon	100 73–100 92–100
<i>L. acidophilus</i>	Fermante edilmiş süt	AFM ₁ (0.5)	4.2 ± 0.02 pH değerine ulaşılan kadar 40°C'de inkübasyon	98

^b *Lactobacillus rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Bifidobacterium lactis*'den oluşan havuz.

^d *Lactobacillus plantarum* (NRRL B-4496), *L. helveticus* (ATCC 12046) ve *L. lactis* (JF 3102)' den oluşan havuz.

UHT, ultra yüksek ısı

(33)

Mikrobiyal adsorbanların endüstriyel ölçekte kullanımına ilişkin sınırlamalardan biri, AFM₁ ve mikrobiyal adsorbanlar arasında kısmen geri dönüşümlü bağlanmanın oluşmasıdır. Mikrobiyal adsorbanların geri dönüşümlü

bağlanmasının, Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan bağların etkileşiminden kaynaklandığına inanılmaktadır. Dolayısıyla, maksimum tolere edilebilir sınırlarda olması beklenen gerekli mikrobiyal adsorban miktarlarının hesaplanması, bu tip bağlamanın kısmi tersinirliği nedeniyle kolay değildir. Sabit ve dayanıklı bir AFM₁/mikrobiyal kompleksi, AFM₁'in insan vücudundan güvenli bir şekilde atılmasını sağlamaktadır. Bu yüzden, dekontaminasyona yönelik mikrobiyal adsorbanlar kullanıldığında, serbest AFM₁ miktarlarının ve mikrobiyal adsorbanların konsantrasyonlarının sürekli olarak izlenmesi gerekmektedir (60).

2.6.5. Mikroorganizmaların İleriye Dönük, Muhtemel Endüstriyel Uygulamaları

Mikrobiyal adsorbanlar kullanılarak sütte AFM₁'i azaltmaya yönelik büyük çabalar sarf edilse de, araştırmacılar tarafından henüz ticari olarak uygulanan güvenilir bir yöntem bulunamamıştır. Destek veya membran üzerinde mikrobiyal sabitleme, mikrobiyal biyofilm oluşumu ve özelleştirilmiş dönen karıştırıcı kullanımı gibi birtakım ileriye yönelik yöntem, gelecekte sütte AFM₁'in azaltılmasına yönelik çözüm sağlayabilir. Örneğin, *S.cerevisiae*'nin perlit desteği üzerinde immobilizasyonu ve sütün 80 dakika bu perlit desteği üzerinde sirkülasyonundan sonra, ürünün fizikokimyasal özelliklerinde herhangi bir değişiklik olmadan AFM₁ konsantrasyonu % 81.3 oranında azalmıştır. Bu nedenle, LAB, maya veya karışımlarının sabitlenmiş olduğu destek veya membran üzerinden kontamine süt ürünlerini geçirmek, AFM₁'i detoksifiye etmek için endüstriyel ölçekte olası bir yöntem olabilir. Mikrobiyal biyofilm oluşumu, sütte AFM₁ dekontaminasyonu için kullanılan mikrobiyal ajanların retansiyonunun önlenmesine dayanmaktadır. *L.rhamnosus* GG tarafından oluşturulan biyofilm, süt protein içeriğini önemli ölçüde değiştirmeden tam yağlı sütte AFM₁'i % 60.74'e kadar uzaklaştırarak verimlilik göstermiştir. Dolayısıyla bu çalışma, prospektif yöntemlerden biri olan biyofilm oluşumunun, gelecekte mikotoksin dekontaminasyonuna yönelik kullanılabileceğini göstermektedir (60). Assaf ve ark. (247)'ne göre, AFM₁'in mikrobiyal adsorbanlara artan maruziyeti, AFM₁ bağlanma miktarını etkileyebilir. AFM₁'in ısı ile öldürülen *L.rhamnosus* GG tarafından bağlanmasının, pipetleme gibi karıştırma işlemi ile arttığı bulunmuştur. Dolayısıyla, bu bulgu, özelleştirilmiş döner karıştırıcı

kullanılarak AFM₁ ve mikrobiyal adsorbanlar arasında artan temasın, serbest AFM₁'in bağlanmasını arttırmak için endüstride yeni bir uygulama olarak ortaya çıkabileceğini öngörmektedir (60).

2.6.6. Spesifik Antikorlar Tarafından Nötralizasyon

Sağmal hayvanların aşılınması, aflatoksinler tarafından kontamine olmuş yemlerin tüketilmesine bağlı toksisiteyi azaltmak için yenilikçi bir yaklaşımdır. İndüklenen antikorlar (Anb) spesifik olarak aflatoksinlerin biyoaktivasyonunun ilk emilimini ve daha sonra sütün içine taşınmasını engeller. Bu strateji, serbest aflatoksinlerin immüno-engellenmesine (nötralizasyon) dayanır (9). AFB₁'in kimyasal olarak detoksifiye edilmiş bir formu olan anaflatoksin B₁'in (An-AFB₁), ana molekül ile reaktif olan antikoru indükleme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. AFB₁'in süt üretiminin farklı aşamalarında (orta ve geç laktasyon aşaması) AFM₁ olarak taşınmasının azaltılmasında, sağmal ve yavru ineklerin sistemik aşılmasının etkinliği ile ilgili iki önemli çalışma, Polonelli ve ark. (248) ve Giovatı ve ark. (249), tarafından yürütülmüştür. Her iki deneyde, sağmal hayvanlar, formülünde An-AFB₁'in protein-konjüгатlarını içeren mikotoksid aşısı ile sistemik olarak aşılınmıştır. Bu çalışmalara göre aşılınmış ineklerin sütünde AFM₁ düzeyleri aşılınmamış kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, aşılamanın AFM₁ konsantrasyonlarını azaltma açısından tüm süt üretim döngüsü üzerinde bir koruma sağlayabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, süt hayvanlarının aşılınması, hem sütte AFM₁ seviyelerinin önemli ölçüde azalmasını hem de aflatoksikozun neden olduğu sağlık tehlikesine karşı çiftlik hayvanlarının korunmasını sağlayabilir.

2.7. AFM₁ Tespiti için Kullanılan Analitik Yöntemler

Süt ve süt ürünlerinde AFM₁ miktarını analiz etmek için dünya çapında en yaygın ve sık kabul edilen tekniklerden biri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) 'dır (58,60). Bununla birlikte, floresans dedektörü (FLD) ile sıvı kromatografisi (LC), ince tabaka kromatografisi (TLC), florometri, ultra performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS), lateral akış immünoanalizleri ve jel bazlı immünoanalizler süt ve süt ürünlerinde AFM₁ tespiti için kullanılmıştır (16). TLC,

operasyon basitliği, yüksek hızı, dedeksiyon ve miktar belirleme kabiliyeti, maliyet etkinliği ve düşük solvent kullanımı ile yüksek numune verimi nedeniyle aflatoksinleri ayırmak, tanımlamak ve miktar belirlemek için yaygın olarak kabul edilmiş çok eski bir yöntemdir (16,63,250). Fakat, sıvı kromatografisinin gelişmesiyle TLC kullanımını bırakılmış ve floresans dedeksiyon ile birlikte HPLC gibi yöntemler TLC kullanımını devralmıştır. Ayrıca, floresans dedektörü ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-FLD), sütteki AFM₁'in belirlenmesinde uluslararası resmi bir yöntem olarak onaylanmış, hassas ve önerilen yöntemlerden biridir. Sütte AFM₁ analizi için hem normal hem de ters fazlı HPLC'nin de yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. HPLC'nin yüksek ayırma kalitesi, düşük tespit limiti (LOD) ve çoklu tespit sistemini (floresan, UV) birleştirmedeki esnekliği; araştırmacıların bir örnekten çok çeşitli bileşikleri tespit etmelerini sağlar. Ayrıca kütle spektrometrisi (MS) veya gaz kromatografisi (GC) gibi diğer araçların HPLC ile kombinasyonu, daha gelişmiş özellikler sağlamaktadır. Örneğin, HPLC-MS/MS, HPLC'nin ayırma kabiliyetinin, MS'nin duyarlılığı ve özgülüğüyle birleştirildiği analitik bir tekniktir. Bundan dolayı, bu teknik gelişmiş tespit limitleri ve ayırma açısından avantajlar sağlar. Bununla birlikte, HPLC-MS/MS, AFM₁'in rutin analizleri için pratik bir teknik olmayabilir çünkü cihazın karmaşıklığı, masrafı ve büyük miktarlarda organik çözücü gereksinimi, kullanımında sınırlamalara neden olabilir. Busman ve ark. (251)'nin belirttiği gibi, kütle spektrometrisi alanında yeni geliştirilen bir yöntem olarak kabul edilen gerçek zamanlı doğrudan analiz- kütle spektrometrisi (DART-MS) de araştırmacıların sütteki AFM₁ miktarını belirlemelerini sağlamaktadır. ELISA, kullarımdaki basitliği ve uygun fiyatı nedeniyle süt ve süt ürünlerinde AFM₁'i ölçmek için en çok kullanılan, popüler analitik yöntemlerdendir. HPLC'nin aksine, AFM₁'in süttten immünoafinite kolonları (IAC) kullanılarak temizlenmesi, ELISA yönteminde gerekli değildir. ELISA kitleri AFM₁'in analizinde portatif, hızlı ve oldukça spesifik olmasına rağmen; kitler tek kullanımlık olduğundan, toplu tarama maliyetinin artmasına yol açabilir. ELISA'nın en büyük dezavantajı, potansiyel çapraz reaktivitesinden ve spesifik matrisle bağımlılığından kaynaklanmaktadır (16,60,63). Ancak, Guan ve ark. (252)'nin çalışmasında, AFM₁'e yüksek afinite için ultra hassas ve spesifik monoklonal antikor bazlı rekabetçi ELISA'nın gelişmesiyle, AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂'ye çapraz

reaktivite gözlenmemiştir. AFM₁ için yakın zamanda geliştirilen tespit ve kantifikasyon tekniği olan elektrokimyasal immünosensörler, 1-100 pg/ml aralığında olan düşük AFM₁ konsantrasyonları için yüksek düzeyde geri kazanım sağlamaktadır (253). Ayrıca, portatif ve tek kullanımlık enstrümanlar olarak daldırma çubuğu ve yanal akış immüno tahlilleri, büyük numune boyutlarında AFM₁'in kalitatif tayininde kullanılabilir. Bununla birlikte, bu tahlillerin test başına maliyeti ELISA'ya nazaran daha yüksektir (63).

İmmünokimyasal teknikler genellikle bir mikotoksin veya küçük benzer yapılandırılmış bileşik grubu için spesifik olduğundan, bu tekniklerin kısıtlı sayıda bileşikleri ayırabildiğini belirtmekte yarar vardır. Diğer yandan ise, kromatografik yöntemlerin çok çeşitli farklı kimyasal maddeleri ayırabildiği bilinmektedir (253).

Yukarıda belirtilen bu yöntemlerin uygulanmasında; numune hazırlamadan ekstraksiyona, ekstraktın sonraki işlenmesine, rezidüel AFM₁'in saptanmasına veya miktarının belirlenmesine kadar herhangi bir aşamada çeşitli deneysel varyantlar meydana gelebilir (60). Deneysel sonuçlarda daha yüksek doğruluk elde etmek için; bu uygulamalı tekniklerde çeşitli derecelerde geliştirilmiş hassasiyet ve güvenlik ile birlikte hız ve maliyet etkinliği gerekmektedir (58).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Süt Örneklerinin Toplanması

Bu tez çalışmasında, KKTC’de üretilen ve piyasada tüketime sunulan 2 süt markasından 10’ar adet olmak üzere toplam 20 UHT inek sütü ve farklı mandıralardan toplanmış 22 adet çiğ inek sütü AFM₁ varlığı yönünden analiz edilmiştir. Hepsi farklı tarihlerde üretilmiş olan 20 adet UHT inek sütü Eylül ayında çeşitli marketlerden orjinal ambalajlarında (200 ml veya 1L) alındı ve analize kadar +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi. 22 adet çiğ inek sütü ise Gazimağusa bölgesine bağlı 3 köyde bulunan mandıralardan, yine Eylül ayında 22 ayrı inekten toplandı. Çiğ inek sütü numunelerinin alımında 50 ml’lik falkon tüpleri kullanıldı ve analize kadar -20°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

KKTC Meteoroloji Dairesi’nden alınan verilere göre, numunelerin toplandığı Eylül ayı 2020 yılındaki ortalama sıcaklık ve standart yağış indeksi (SPI) değerleri Tablo 3.1.’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Eylül 2020 yılı için KKTC. Meteoroloji Dairesi verileri.

Ay	Ortalama Hava Sıcaklığı (°C)	SPI ^a
Eylül	28	0,50 ile -0,50

^aKKTC. Meteoroloji Dairesi hafif nemli ve hafif kurak arasında olan SPI değerini (0,50 ile -0,50), “normal civarı” olarak sınıflandırmıştır. (254,255)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetonitril içinde 0,5 µg/ml AFM₁ standart (2 ml), (Trilogy Analytical Lab. Inc., ABD)
- Asetonitril (Sıvı Kromatografi için Gradyan Derecesi, Merck, Almanya)
- Metanol (HPLC için Gradyan Derecesi ≥ 99,9 % ; Sigma-Aldrich, İsrail)
- Fosfat Tamponlu Salin (pH 7,2- 25°C; Sigma-Aldrich, ABD)
- Ultra Saf Su (Millipore Elix 35/Milli-Q Advantage A10 system; Millipore, USA)

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC (SEM Lab Inc., Türkiye)
- Buzdolabı (-20°C ve +4°C; ARÇELİK)
- Cam Test Tüpü Kapaklı (Orlab, Türkiye)
- Easi-Extract Aflatoxin (Aflatoxin M₁ IAC, 50 kolon; R-Biopharm Rhone Ltd.,İskoçya)
- Enjektör 5 ml (Dorhan Medical, KKTC)
- Enjektör Ucu (Dorhan Medical, KKTC)
- Falkon/Santrifüj Tüpü (50 ml; ISOLAB)
- Filtreleme Hunisi (Fisher Scientific)
- Otomatik Numune Alma Şişeleri, Amber Cam 2 ml (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Otomatik Pipet (10-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml; Eppendorf, Isolab)
- Otomatik Pipet Uç (10-200 µl,100-1000 µl, 1-5 ml; Eppendorf, True- Line)
- Pastör Pipeti (3 ml'lik, Biosigma, İtalya)
- Paslanmaz Çelik Laboratuvar Spatulası (Fisher Scientific)
- RC 0.45 µm filtreleri (Phenomenex, Torrance, CA, ABD)
- Santrifüj Cihazı (BOECO C-28A, Almanya)
- Ultrasonik Banyo (Ultrasons H-D, J.P. SELECTA, İspanya)
- Rocker Chemker 300 Vakum Pompası (Sterlitech, ABD)
- Mixer Uzusio VTX-3000 L (Laboratory & Medical Supplies, Japonya)
- Whatman Filtre Kağıdı No.4, 125 mm ø (Merck, Almanya)
- Yan Kollu Buchner Filtre Şişesi 250 ml (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Kauçuk flakon tıpası (Thomas Scientific, İspanya)

3.2. Yöntem

Süt örneklerinde AFM₁ düzeyi, floresan dedektörlü HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Numunelerin hazırlanmasında ve immünoafinite kolon ile temizlenmesinde üretici firmanın (R-Biopharm Rhone LTD.) belirttiği protokoller uygulanmıştır (256).

3.2.1. Analiz İçin UHT İnek Sütü Örneklerinin İmmünoafinite Kromatografisi ile Temizlenmesi

100 ml'lik süt numuneleri homojenleştirilip, ultrasonik banyoda 37°C'ye ısıldı ve 4,000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası, yüzeyde kalan yağ tabakası spatula yardımı ile alınarak uzaklaştırıldı. Yağın tamamen uzaklaştırılması için süt numuneleri whatman No:4 filtre kağıdından süzüldü. Hazırlanan süt örneklerinden 50'şer ml alınarak, yan kollu buchner filtre şişesi ve vakum sistemi yardımı ile dakikada 2 ml akış hızında immünoafinite kolondan geçirildi. Sütün tamamı kolondan geçirildikten sonra kolon, dakikada yaklaşık 5 ml'lik bir akış hızında 20 mL fosfat tamponlu salin (PBS) geçirilerek yıkandı. Kalan sıvıyı gidermek için kolondan hava geçirildi. AFM₁'i kolondan elue edebilmek için 1.25 ml metanol: asetonitril (40:60 v/v), kolondan saniyede 1 damla akış hızında geçirildi ve cam test tüp içerisinde toplandı. Bu işlem sırasında ters yıkama yapıldı ve 2-3 kez tekrarlandı. Elüsyonun ardından 1.25 ml saf su kolondan geçirilip aynı cam test tüp içerisinde toplandı ve toplamda 2.5 ml eluat elde edildi. Eluat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 2 ml'lik amber şişeye transfer edildi. Amber şişe içinde toplanan numunelerden 100 µl, HPLC sistemine enjekte edildi.

3.2.2. Analiz İçin Çiğ İnek Sütü Örneklerinin İmmünoafinite Kromatografisi ile Temizlenmesi

UHT inek sütü örneklerine kıyasla, çiğ inek sütü örneklerinin immünoafinite kromatografisi ile temizlenmesinde ufak değişiklikler yapılmıştır. Buna göre, 100 ml'lik süt numuneleri homojenleştirilip, 4,000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası, yüzeyde kalan yağ tabakası spatula yardımı ile alınarak uzaklaştırıldı. Hem filtrasyonu artırmak hem de immünoafinite kolonlarının tıkanmasını engellemek için süt numuneleri ultrasonik banyoda 37°C'ye ısıldı ve yağın tamamen uzaklaştırılması için süt numuneleri whatman No:4 filtre kağıdından süzüldü. Hazırlanan süt örneklerinden 50'şer ml alınarak, yan kollu buchner filtre şişesi ve vakum sistemi yardımı ile dakikada 2 ml akış hızında immünoafinite kolondan geçirildi. Sütün tamamı kolondan geçirildikten sonra kolon, dakikada yaklaşık 5 ml'lik bir akış hızında 20 mL PBS geçirilerek yıkandı. Kalan sıvıyı gidermek için kolondan hava geçirildi. AFM₁'i kolondan elue edebilmek için 1.25 ml metanol: asetonitril (40:60 v/v), kolondan saniyede 1 damla akış hızında geçirildi ve

cam test tüp içerisinde toplandı. Bu işlem sırasında ters yıkama yapıldı ve 2-3 kez tekrarlandı. Elüsyonun ardından 1,25 ml saf su kolondan geçirilip aynı cam test tüp içerisinde toplandı ve toplamda 2,5 ml eluat elde edildi. Eluat vorteks ile karıştırıldıktan sonra RC 0,45 µm filtrelerde filtrelendi ve 2 ml'lik amber şişeye transfer edildi. Amber şişe içinde toplanan numunelerden 100 µl, HPLC sistemine enjekte edildi.

3.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Analizi

Otomatik örnekleyici ve floresans dedektörü (Agilent FLD cell 8 µl, Almanya) ile donatılmış Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC (SEM Lab Inc., Türkiye) sistemi AFM₁'nin analizleri ve kantifikasyonu için kullanıldı. Floresans dedektörü sırasıyla 365 ve 435 nm'lik eksitasyon ve emisyon dalga boylarında ayarlandı. Inertsil ODS-3V 4,6x150 mm kolon kullanıldı ve kolon sıcaklığı 25 °C'de tutuldu. 1,0 mL dk⁻¹ akış hızına sahip izokratik mobil faz (asetonitril / su, 25:75, v / v) kullanıldı. Hem AFM₁ standardı hem de numune için HPLC sistemine enjeksiyon hacmi 100 µL idi. Kantifikasyon, toplam altı konsantrasyon noktası için (2, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg L⁻¹) asetonitril içinde standart AFM₁ çözeltilerinin kullanılmasıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisine dayalı olarak gerçekleştirildi.

3.2.4. Metodun Doğrulanması

Yöntem, doğrusallık, algılama sınırı (LOD), miktar belirleme sınırı (LOQ), tekrarlanabilirlik (repeatability) ve geri kazanım (recovery) için Avrupa Birliği Komisyonu'nun 657/2002 (Avrupa Komisyonu, 2002) kararına göre bir kurum içi modelle doğrulanmıştır. Doğrusallık, standart çözeltilerin 6 konsantrasyon noktasında (her biri için üç tekrar) enjeksiyonu ile değerlendirildi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, Formül 3.1. ve Formül 3.2. kullanılarak hesaplandı:

$$\text{LOD} = 3.3 \frac{S_a}{b} \quad (3.1.)$$

$$\text{LOQ} = 10 \frac{S_a}{b} \quad (3.2.)$$

s_a , kesişimin standart sapmasıdır; ve b , kalibrasyon eğrisinden elde edilen regresyon çizgisinin eğimidir (257).

Tekrarlanabilirlik ve geri kazanım, kör numunelerin (AFM₁ varlığını göstermeyen süt numuneleri) üç takviye seviyesinde (eluat içerisinde 2,5; 5 ve 7,5 µg kg⁻¹'e karşılık gelen 12,5; 25 ve 37,5 µg kg⁻¹) spayklanıp, analiz edilmesiyle hesaplanmıştır. Analizler her konsantrasyon seviyesi için 6 kez tekrarlanmıştır.

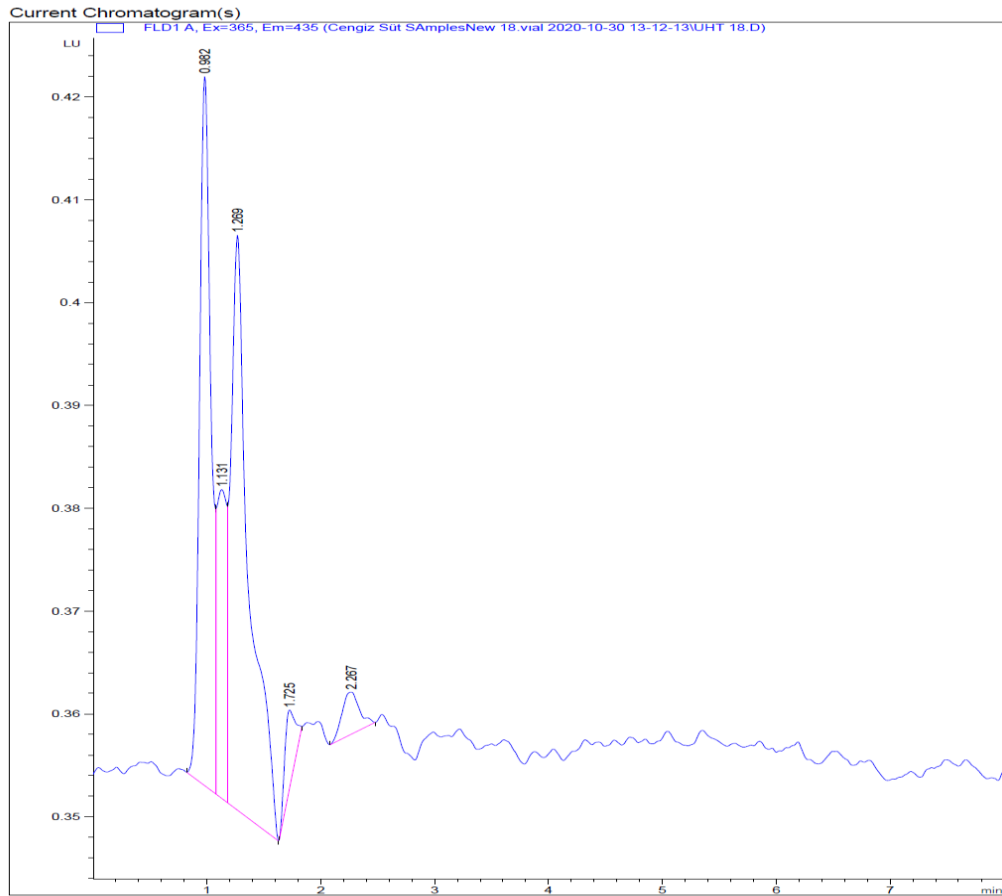
3.2.5. İstatistiksel Analizler

Veriler tek yönlü ANOVA ile analiz edildi. Yapılan tüm testlerde güven düzeyi % 95 olarak alındı. Tüm istatistiki analizler Microsoft Excel istatistik programı ile yapıldı.

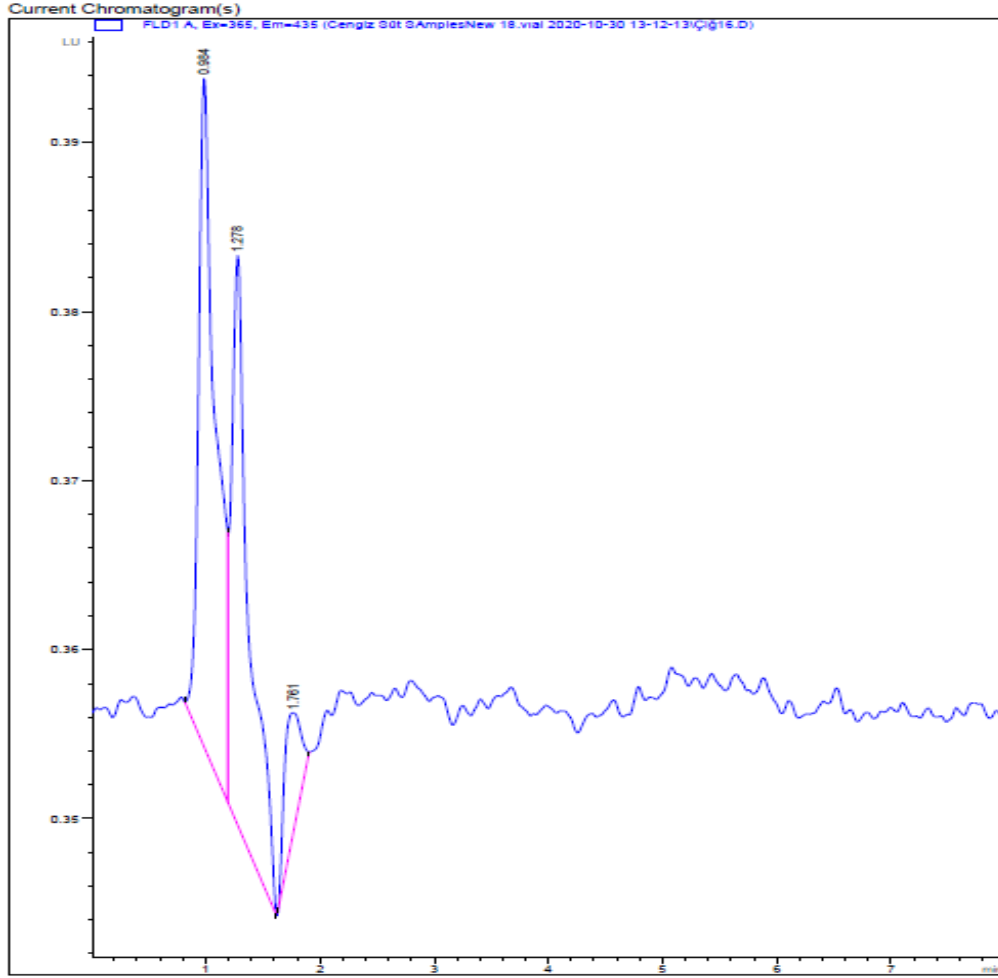
4. BULGULAR

4.1. Süt Örneklerindeki AFM₁ Düzeyleri

Süt örneklerinden elde edilen kromatogramlar, AFM₁ standart çözeltilerinin kromatogramları ile karşılaştırılarak bu örneklerdeki AFM₁ düzeyi hesaplanması amaçlandı. Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de görüldüğü üzere analiz edilen çiğ ve UHT inek sütü örneklerinin hiçbirinde AFM₁ tespit edilebilecek düzeyde bulunmadı.



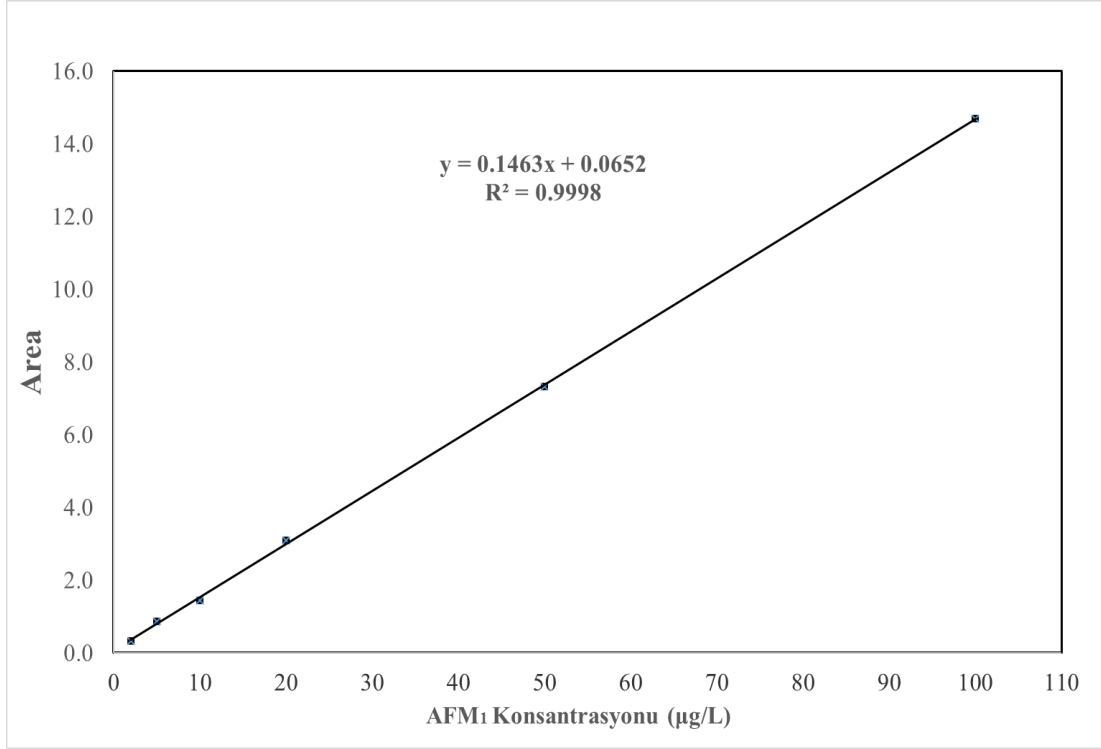
Şekil 4.1. AFM₁ düzeyi tespit edilemeyen UHT inek sütü numunesinin HPLC kromatogram örneği.



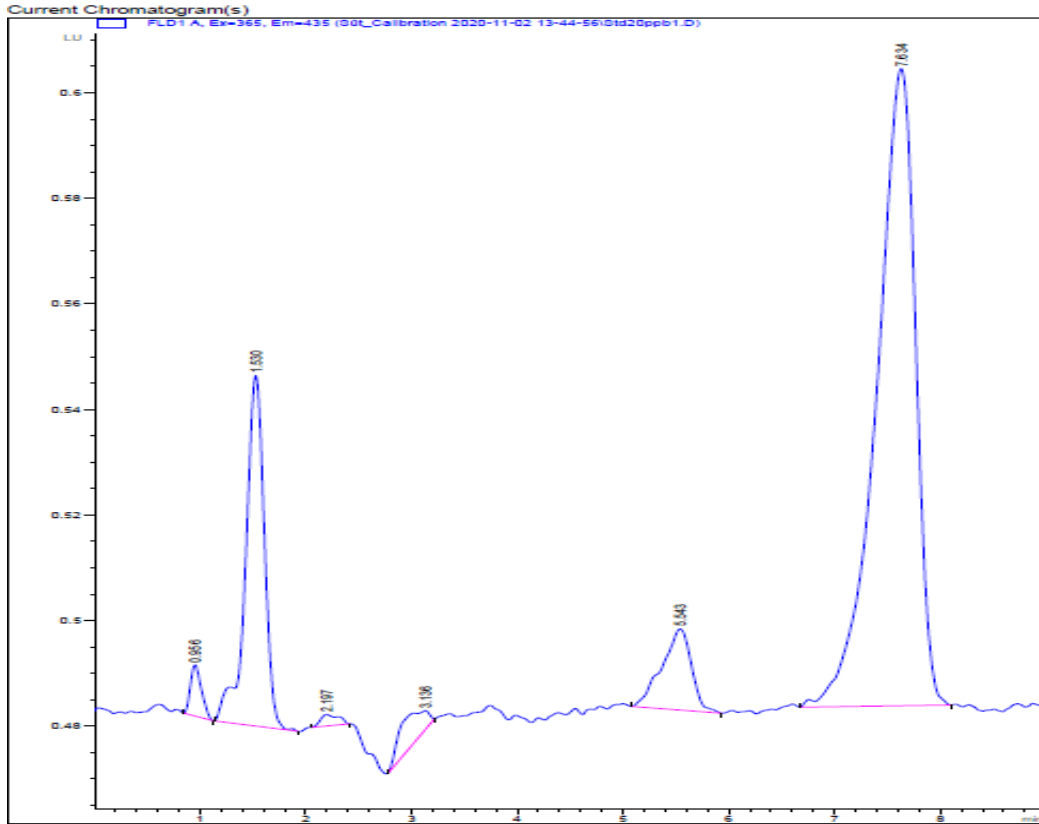
Şekil 4.2. AFM₁ düzeyi tespit edilemeyen çığ inek sütü numunesinin HPLC kromatogram örneği.

4.2. AFM₁ Kalibrasyon Eğrisi Verileri

Doğrusal regresyon çizgisi, farklı konsantrasyonda AFM₁ standartlarında elde edilen karşı tepe alanı kullanılarak çizildi. Kalibrasyon eğrisi, doğrusal denklem $y = 0,1463x + 0,0652$ olmak üzere 2 -100 ppb arasında doğrusaldı. Kalibrasyon eğrisinin belirme katsayısı (R^2) = 0,9998 olarak bulundu (Şekil 4.3.). 20 ppb standart AFM₁ çözeltisi enjekte edilerek, AFM₁'in tutulma süresi 7.637 dakika olarak bulundu (Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. AFM₁ standart solüsyonlarının kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.4. 20 ppb konsantrasyonda AFM₁ standart çözeltisine ait kromatogram.

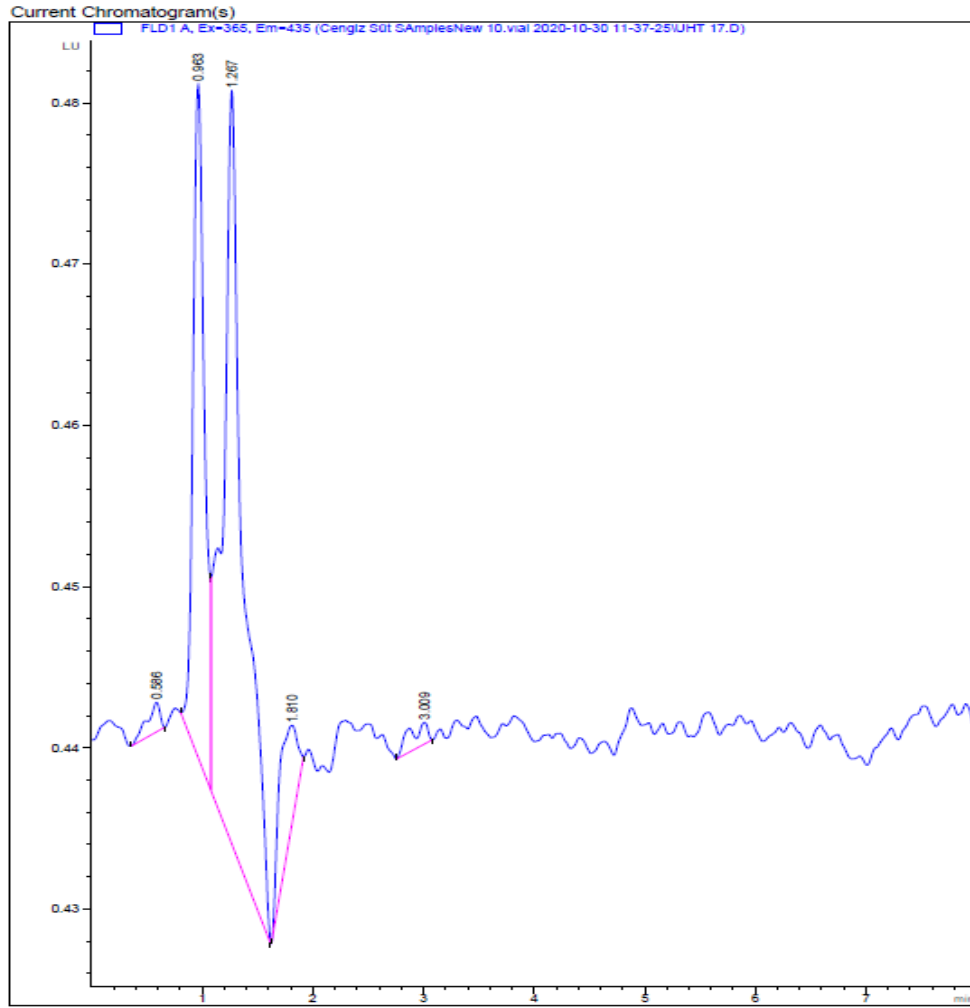
4.3. Yöntemin Geri Kazanım Oranları ve Hesap Limit Değerleri

Yöntemin ortalama geri kazanımı ve tekrarlanabilirliği sırasıyla, % 95,6 ve % 4,9 idi. Tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı kontrol etmeye yönelik testler Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

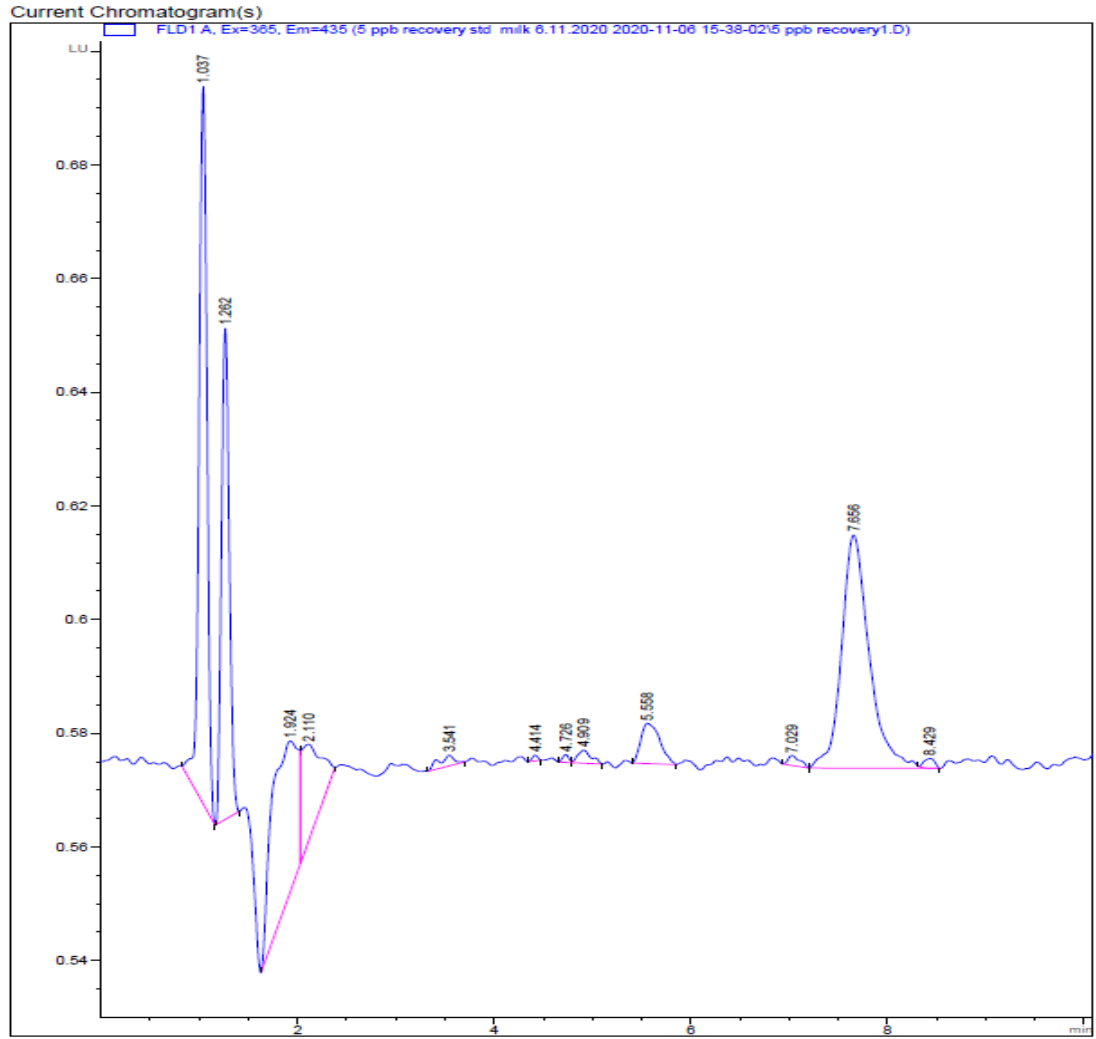
Tablo 4.1. Tekrarlanabilirlik ve geri kazanım verileri.

Parametreler	AFM ₁ Spayk Düzeyleri		
	12,5 ppb	25 ppb	32,5 ppb
Tekrarlanabilirlik (varyasyon katsayısı, % CV)	4,6	3,6	6,4
Geri Kazanım (% ± standart sapma SD)	96,6 ± 4,5	91,8 ± 3,3	98,6 ± 6,3

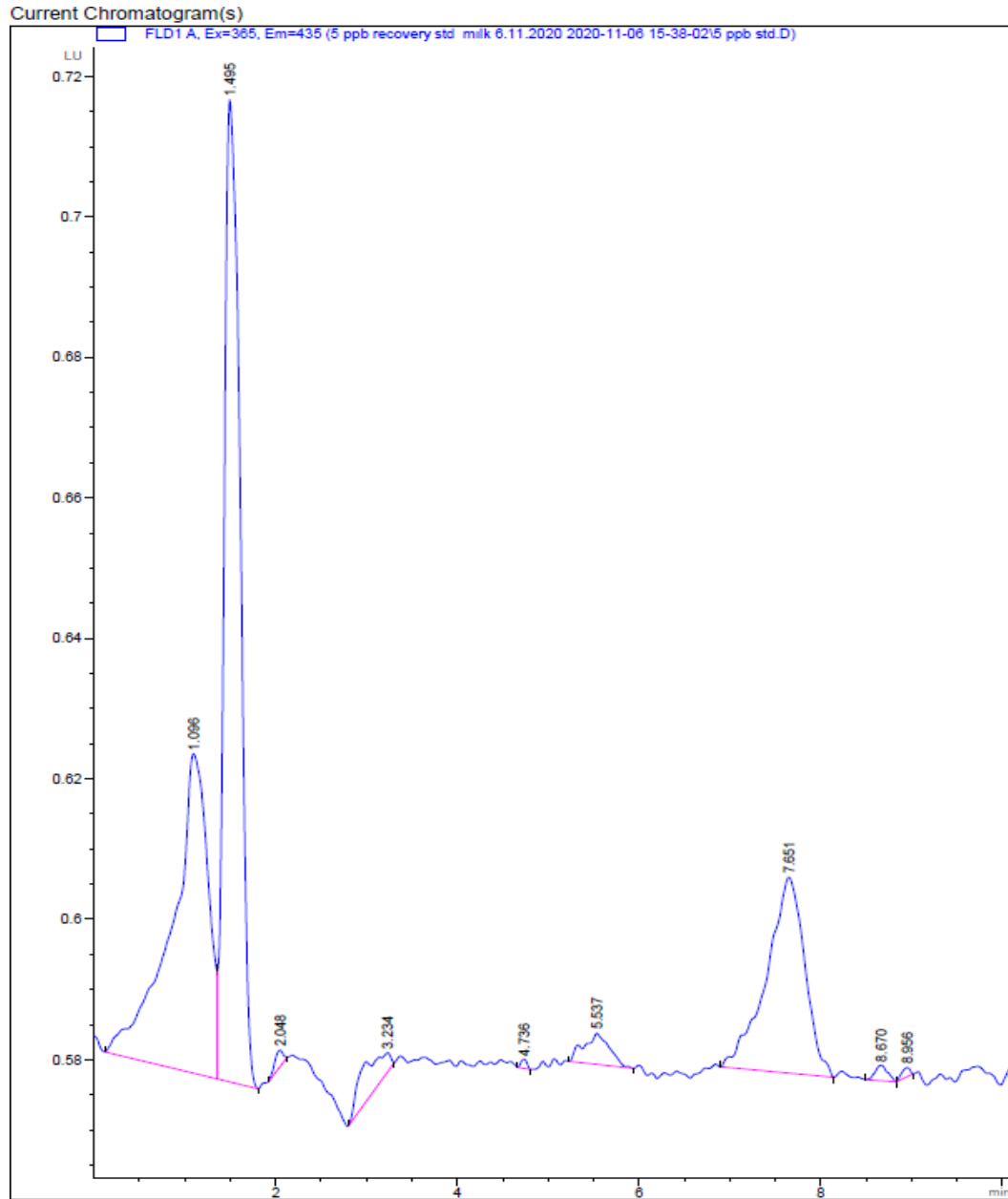
Geri kazanım için kullanılan süt numunesine ait standart ilave edilmiş, ilave edilmemiş analiz kromatogramları ve 5 ppb konsantrasyonda AFM₁ standart çözeltilisine ait kromatogram sırasıyla, Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de sunulmuştur.



Şekil 4.5. Standart ilave edilmemiş 17 no'lu süt örneğine ait kromatogram.



Şekil 4.6. 5 ppb AFM₁ standardı içeren 17 no'lu süt örneğine ait kromatogram.



Şekil 4.7. 5 ppb konsantrasyonda AFM₁ standardının kromatogramı

HPLC-FLD yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 1,038 ve 3,145 ppb olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Aflatoksinler; insan ve hayvanlarda birçok sağlık sorununa ve tarımsal ürünlerde dünya çapında ekonomik kayıplara neden olduğundan bu konudaki çalışmalar tüm dünyada yoğunluk kazanmıştır. Akdeniz diyetinin temel unsuru olan süt ve süt ürünleri, özellikle bebekler için önemli bir besin kaynağı olduğundan, süt ve süt ürünlerinde AFM₁'in varlığını düzenli olarak kontrol etmek gerekir.

KKTC'de farklı hayvan türlerinden (koyun, keçi ve inek) elde edilen ve tüketime sunulan yerel süt çeşitleri mevcut olmasına rağmen, halkın büyük çoğunluğunun inek sütü tüketmesi nedeniyle, bu çalışmada yalnızca inek sütü örneklerinin AFM₁ varlığı yönünden araştırılması tercih edilmiştir. Bu bağlamda, hem Gazimağusa'ya bağlı köylerden toplanan 22 adet çiğ inek sütü hem de merkezdeki süpermarketlerden toplanan 20 adet UHT inek sütü AFM₁ varlığı yönünden HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada, analiz edilen çiğ ve UHT inek sütlerinin hiçbirinde AFM₁, tespit edilebilir seviyelerde değildi. Dolayısıyla örneklerde AFM₁ seviyeleri, TGK (66) ve AB (258) tarafından bildirilen limit değerlerin üzerinde çıkmamıştır.

Kutlubay ve Sökmen (259)'in, Giresun Üniversitesi'nde yürüttükleri çalışmada, analiz edilen 30 inek sütü numunesinin hiçbirinde AFM₁ bulunamamıştır. Bellio ve ark. (260), İtalya'da toplanan toplam 1668 inek sütü örneklerinden yalnızca sekizinin (% 0,5) AB düzenleme sınırına uygun olmadığını rapor etmişlerdir. Piva ve ark. (261), 1985 yılında 276 süt örneğini AFM₁ varlığı yönünden araştırmışlar ve sadece 7'sinde AFM₁ düzeylerinin 50 ng/L'yi aştığını tespit etmişlerdir. Behfar ve ark. (262), İran'da üretilen 100 adet pastörize süt örneklerinin hiçbirinde AFM₁ düzeylerinin, süt için maksimum sınır olan 50 ng/L değerini aşmadığını rapor etmişlerdir. Cammilleri ve ark. (257)'nin, 170 inek sütü örneğinde AFM₁ varlığı üzerine yaptıkları çalışmada, hiçbir numunede AFM₁ düzeyleri Avrupa Komisyonu yönetmeliği 1881/2006 tarafından belirlenen sınırın üzerinde çıkmamıştır (263). Güney Kore'de 100 adet çiğ sütte AFM₁ oluşumu üzerine yapılan bir çalışmada, örneklerin hiçbiri AFM₁ için 0.5 ppb olan Kore yasal sınırını aşmamıştır (264). Yukarıda bahsedilen çalışmalarda analiz edilen süt örneklerinde AFM₁ düzeylerinin yasal sınırları aşmaması veya çok az örnekte yasal sınırları aşması; yapmış olduğumuz araştırmadan elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir.

Coğrafi ve mevsimsel farklılıklar, süt örneklerinin alındığı laktasyon periyodu ve kullanılan farklı analiz yöntemleri gibi çeşitli parametreler; araştırmalardan elde edilen AFM₁ bulunma sıklığına ilişkin farklı sonuçların nedenlerindedir (265). Bilindiği gibi hayvan beslemede kullanılan yemler, sütte AFM₁ varlığının tek faktörüdür. Dolayısıyla yemlerde bulunan AFB₁ miktarına bağlı olarak sütlerdeki AFM₁ düzeyi de yükselmektedir (266). Yemlerin üretim ve depolanmasının uygun olmayan koşullarda gerçekleştirilmesine bağlı olarak, küflerin geliştiği ve toksin oluşturduğu yemlerle beslenen hayvanların sütlerinde AFM₁ miktarlarının yüksek çıkması kaçınılmaz olmaktadır (267).

Bu araştırmada analiz edilen süt numunelerinde saptanan AFM₁ düzeylerinin yasal sınırları aşmaması hem süt tüketicileri hem de üreticileri için sevindirici bir durumdur. Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular, hayvan yemlerinin hasat sonrası iyi kurutulmuş uygun depolama koşullarında kısa süre tutulması, uygun şartlarda muhafaza edilmesi, sıcak ve yoğun neme maruz kalmamasıyla açıklanabilir. Aflatoksin oluşumunda gerekli olan optimum a_w , sıcaklık ve bağıl nemin sırasıyla 0,99; 33°C ve > %70 olduğu bilinmektedir (5). Ancak KKTC Meteoroloji Dairesi, süt numunelerinin toplandığı Eylül ayındaki ortalama hava sıcaklığını 28°C ve standart yağış indeksini 0,50 – 0,50 (hafif nemli ve hafif kurak arasında olan ‘normal civarı’ olarak rapor etmiştir (Bkz Tablo 3.1). Dolayısıyla süt numunelerinde AFM₁ düzeylerinin saptanamaması, aflatoksin oluşumu için gerekli olan ideal koşulların sağlanamaması ile de açıklanabilir.

6. SONUÇ

KKTC’de tüketilen süt örneklerindeki AFM₁ içeriği, halk sağlığı açısından önemli bir risk teşkil etmese de daha fazla sayıda süt örneğini içeren bir araştırmanın gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, hayvan yeminin tedarik ziciri boyunca aflatoksin kontaminasyon riskini izlemek için sürekli bir gözetim programı gerekmektedir. Bütün bu etmenlerin yanı sıra tüketicilerin beslenme alışkanlıklarına göre maruz kalınan toplamsal aflatoksin veya mikotoksin olasılığı da önem arz etmektedir. Bu şekilde çok yönlü düşünüldüğünde iyi tarım uygulamaları, iyi muhafaza uygulamaları, iyi hijyen uygulamaları ile HACCP bazlı gıda güvenliği sistemlerinin uygulanması bu açıdan yararlı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, şahin G. MİKOTOKSİNLER: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması [Internet]. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2008 Jan [cited 2020 Nov 20]. Available from: <https://dergipark.org.tr/en/pub/hujpharm/639173>. Erişim Tarihi: 07.01.2021
2. Marin S, Ramos A, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol*. 2013;60:218–37.
3. FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 [Internet]. 2003 [cited 2020 Nov 19]. Available from: <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm> Erişim Tarihi: 07.01.2021
4. Kaushik G. Effect of Processing on Mycotoxin Content in Grains. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(12):1672–83.
5. Neme K, Mohammed A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*. 2017;78:412–25.
6. Rawal S, Kim JE, Coulombe R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res Vet Sci*. 2010;89(3):325–31.
7. Soni KB, Lahiri M, Chackradeo P, Bhide S V., Kuttan R. Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenicity. *Cancer Lett*. 1997;115(2):129–33.
8. Abdel-Wahhab MA, Ahmed HH, Hagazi MM. Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. Vol. 26, *Journal of Applied Toxicology*. *Journal Of Applied Toxicology*, 26(3); 2006. 229–238 p.
9. Giovati L, Magliani W, Ciociola T, Santinoli C, Conti S, Polonelli L. AFM1 in milk: Physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination. *Toxins (Basel)*. 2015;7(10):4330–49.
10. Wangia RN, Tang L, Wang JS. Occupational exposure to aflatoxins and health outcomes: a review. Vol. 37, *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*. *Journal Of Environmental Science And Health, Part C*. 2019; 37(4):215–34.
11. Benkerroum N. Aflatoxins : A Comprehensive Overview. 10 20944/preprints. 2019;0350.:201911. Erişim Tarihi: 07.01.2021
12. Rushing BR, Selim MI. Aflatoxin B1 : A review on metabolism , toxicity , occurrence in food , occupational exposure , and detoxification methods. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019;124(November 2018):81–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047> Erişim Tarihi: 07.01.2021
13. International Agency for Research on Cancer. International Agency for Research on Cancer Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. *Iarc Monogr Eval Carcinog Risks To Humans*. 2002;82:1–556.

14. Bognanno M, Fauci L La, Ritieni A, Tafuri A, De Lorenzo A, Micari P, et al. Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(3):300–5.
15. Santini A, Raiola A, Ferrantelli V, Giangrosso G, Macaluso A, Bognanno M, et al. Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). *Food Addit Contam Part B*. 2013;6(3):181–6.
16. Iqbal S, Jinap S, Pirouz A, Faizal A. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends Food Sci Technol*. 2015;46(1):110–9.
17. Öztürk B, Çelik F, Çelik Y, Kabaran S, Ziver T. To Determine the Occurrence of Aflatoxin M 1 (AFM1) in Samples of Cyprus Traditional Cheese (Halloumi): A Cross-Sectional Study. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2014;20(5):773–8.
18. Steyn P. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol Lett*. 1995;82–83:843–51.
19. Edite Bezerra da Rocha M, Freire F da CO, Erlan Feitosa Maia F, Izabel Florindo Guedes M, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*. 2014;36(1):159–65.
20. Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res*. 2017;33(1):65–73.
21. Aiko V, Mehta A. Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. *J Biosci*. 2015;40(5):943–54.
22. Blount W. Turkey “X” disease. *J Brit Turkey Fed*. 1961;9:55–8.
23. Luo Y, Liu X, Li J. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control*. 2018;89:123–32.
24. Whitlow LW, Hagler WM, And J, Diaz DE. Mycotoxins in feeds. *Foodstuffs Magazine*. 2002;(Table 1):74–8.
25. Kebede H, Liu X, Jin J, Xing F. Current status of major mycotoxins contamination in food and feed in Africa. *Food Control*. 2020;110:106975.
26. Di Gregorio MC, Neeff DV De, Jager AV, Corassin CH, Carão ÁCDP, Albuquerque R De, et al. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Rev*. 2014;33(3):125–35.
27. Fink-Gremmels J. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Vet Q*. 1999;21(4):115–20.
28. Whitlow L, Hagler WM. Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity, prevention and treatment [Internet]. *Proc. Southwest Nutr. Conf. Proc*; 2005. 124–138 p.
29. Wambacq E, Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L, Haesaert G. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *J Sci Food Agric*. 2016;96(7):2284–302.
30. Adhikari M, Negi B, Kaushik N, Adhikari A, Al-Khedhairi AA, Kaushik NK,

- et al. T-2 mycotoxin: Toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*. 2017;8(20):33933–52.
31. Hussein H, Brasel J. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001;167(2):101–34.
 32. Sweeney M, Dobson A. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*. 1998;43(3):141–58.
 33. Ismail A, Gonçalves BL, de Neeff D V., Ponzilacqua B, Coppa CFSC, Hintzsche H, et al. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Res Int*. 2018;113:74–85.
 34. Vijaya Kumar V. Aflatoxins: Properties, Toxicity and Detoxification. *Nutr Food Sci Int J*. 2018;6(5).
 35. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(5):984–91.
 36. Karlovsky P, Suman M, Berthiller F, De Meester J, Eisenbrand G, Perrin I, et al. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Res*. 2016;32(4):179–205.
 37. Abdallah MF, Girgin G, Baydar T. Occurrence, prevention and limitation of mycotoxins in feeds. *Anim Nutr Feed Technol*. 2015;15(3):471–90.
 38. Hengstler J, der Burg V, B. S, P., Oesch F. Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 31(4); 1999. 917–970 p.
 39. Ajani J, Chakravarthy D V, Tanuja P, Pasha K. Aflatoxins. *Indian J Adv Chem Sci*. 2014;3:49–60.
 40. Matabaro E, Ishimwe N, Uwimbabazi E, Lee B. Current Immunoassay Methods for the Rapid Detection of Aflatoxin in Milk and Dairy Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16(5):808–20.
 41. Ghadiri S, Spalenza V, Dellafiora L, Badino P, Barbarossa A, Dall'Asta C, et al. Modulation of aflatoxin B1 cytotoxicity and aflatoxin M1 synthesis by natural antioxidants in a bovine mammary epithelial cell line. *Toxicol Vitr*. 2019;57:174–83.
 42. Gross-Steinmeyer K, Eaton D. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicology*. 2012;299(2–3):69–79.
 43. Mykkanen H, Zhu H, Salminen E, Juvonen R, Ling W, Ma J, et al. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males. *Int J Cancer*. 2005;115(6):879–84.
 44. Weng M, Lee H, Choi B, Wang H, Hu Y, Mehta M, et al. AFB1 hepatocarcinogenesis is via lipid peroxidation that inhibits DNA repair, sensitizes mutation susceptibility and induces aldehyde-DNA adducts at p53 mutational hotspot codon 249. *Oncotarget*. 2017;8(11).
 45. Yunus AW, Razzazi-Fazeli E, Bohm J. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and

- contemporary issues. *Toxins (Basel)*. 2011;3(6):566–90.
46. Valtchev I, Koynarski T, Sotirov L, Nikolov Y, Petkov P. Effect of aflatoxin B1 on moult duck's natural immunity. *Pak Vet J*. 2015;35:67–70.
 47. Smith LE, Prendergast AJ, Turner PC, Humphrey JH, Stoltzfus RJ. Aflatoxin exposure during pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. Vol. 96, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene. 2017;96(4):770–76.
 48. Abdulrazzaq YM, Osman N, Yousif ZM, Trad O. Morbidity in neonates of mothers who have ingested aflatoxins. Vol. 24, *Annals of Tropical Paediatrics*. *Annals Of Tropical Paediatrics*. 2004; 24(2):145–51.
 49. Turner PC, Collinson AC, Cheung YB, Gong Y, Hall AJ, Prentice AM, et al. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. Vol. 36, *International Journal of Epidemiology*. *International Journal Of Epidemiology*. 2007; 36(5):1119–25.
 50. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Vol. 80, *American Journal of Clinical Nutrition*. *The American Journal Of Clinical Nutrition*. 2004;80(5): 1106–122.
 51. El Khoury D, Fayjaloun S, Nassar M, Sahakian J, P A. Updates on the Effect of Mycotoxins on Male Reproductive Efficiency in Mammals. *Toxins (Basel)*. 2019;11(9):515.
 52. Mehrzad J, Malvandi AM, Alipour M, Hosseinkhani S. Environmentally relevant level of aflatoxin B1 elicits toxic pro-inflammatory response in murine CNS-derived cells. Vol. 279, *Toxicology Letters*. *Toxicology Letters*. 2017; 279: 96–106.
 53. de Oliveira, C., Corassin C. Aflatoxins. *Mycotoxins And Their Implications In Food Safety*. 2014; 6–19.
 54. WHO. Aflatoxins. *Food Saf Dig*. 2018;(February):1–5.
 55. Gürbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Şahin G. Assessment of aflatoxin M1 levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control*. 2006;17(1):1–4.
 56. Wang Y, Liu X, Xiao C, Wang Z, Wang J, Xiao H, et al. HPLC determination of aflatoxin M 1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control*. 2012;28(1):131–4.
 57. Duarte SC, Almeida AM, Teixeira AS, Pereira AL, Falcão AC, Pena A, et al. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*. 2013;30(2):411–7.
 58. Ismail A, Akhtar S, Levin RE, Ismail T, Riaz M, Amir M. Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(3):418–27.
 59. Golge O. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Adana province of Turkey. *Food Control*. 2014;45:150–5.

60. Assaf J, Nahle S, Chokr A, Louka N, Atoui A, Khoury E. Assorted Methods for Decontamination of Aflatoxin M1 in Milk Using Microbial Adsorbents. *Toxins (Basel)*. 2019;11(6):304.
61. Rodríguez Velasco M, Calonge Delso M, Ordóñez Escudero D. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M 1 in raw cow's milk. *Food Addit Contam*. 2003;20(3):276–80.
62. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*. 2002;127(1–3):19–28.
63. Womack ED, Sparks DL, Brown AE. Aflatoxin M1 in milk and milk products: A short review. *World Mycotoxin J*. 2016;9(2):305–15.
64. Magoha H, Kimanya M, De Meulenaer B, Roberfroid D, Lachat C, Kolsteren P. Association between aflatoxin M exposure through breast milk and growth impairment in infants from northern Tanzania. Vol. 7, *World Mycotoxin Journal*. *World Mycotoxin Journal*. 2014 ;7(3): 277–84.
65. The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Off J Eur Union*. 2010;L 50/8(2009):5.
66. Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği Mikotoksinler (Ek1). *Resmi Gazete Tar* 29. 2011;12.
67. Romer Labs. Mycotoxin Regulations For Food and Feed in Europe - Overview_Original_100428. 2016;(1137):2016.
68. Romer Labs. Mycotoxin Regulations for Food and Feed in China. 2016; https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF_Files/PO_MTX_Food_Feed_Combi_CN_EN_A2_0519_MBA.pdf Erişim Tarihi: 05.01.2021
69. Romer Labs. Mycotoxin Regulations for Food in Indonesia. 2016;(September):2016. https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF_Files/PO_MTX_FoodaFeed_Combi_IDN_EN_A2_1119_MBA.pdf Erişim Tarihi: 05.01.2021
70. Romer Labs. Mycotoxin Regulations for Food in Korea. 2016;(September):2016. https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF_Files/Regulierungsposter_Mycotoxins_Korea_0916.pdf Erişim Tarihi: 05.01.2021
71. Romer Labs. Mycotoxin Regulations for Food and Feed in Japan. 2016;(September):2016. Available from: <https://www.romerlabs.com/en/knowledge-center/knowledge-library/articles/news/worldwide-mycotoxin-regulations/> Erişim Tarihi: 05.01.2021
72. Choudhary AK, Kumari P. Management Of Mycotoxin C Ontamination In Preharvest And Post Harvest Crops: P Resent Status And Future Prospects. *J*

- Phytol. 2010;2(7):37–52.
73. Stoev SD. Food Safety and Increasing Hazard of Mycotoxin Occurrence in Foods and Feeds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(9):887–901.
 74. D’Mello JPF, Macdonald AMC. Mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol.* 1997;69(1–3):155–66.
 75. Kazemi Darsanaki R, Azizollahi Aliabadi M, Alikhani F, Mohammadi M. Biological Control of Aflatoxins. *Eur J Exp Biol.* 2013;3(2):162–6.
 76. Pankaj SK, Shi H, Keener KM. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends Food Sci Technol.* 2018;71:73–83.
 77. Directive 2002/32/ec of the european parliament and of the council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002L0032:20061020:EN:PDF> Erişim Tarihi: 20.11.2020.
 78. Aldred D, Magan N, Olsen M. The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals. In: *Mycotoxins in Food.* M. Olsen, . Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom: by N. Magan; 2004. p. 139–73.
 79. Park DL, Njapau H, Boutrif E. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *Food, Nutr Agric [Internet].* 1999;23:49–55.
 80. Magan N, Aldred D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol.* 2007;119(1–2):131–9.
 81. Manna M, Kim KD. Control Strategies for Deleterious Grain Fungi and Mycotoxin Production from Preharvest to Postharvest Stages of Cereal Crops : A Review. *Life Sci Nat Resour Res.* 2017;25:13–27.
 82. T F, Bean G. Effects of tricyclazole on growth, release of aflatoxin, and sterol and fatty acid content, by *Aspergillus* isolates. *Trans Br Mycol Soc.* 1986;87(3):445–9.
 83. El-Kady I, El-Maraghy S, Abdel-Mallek A, Hasan H. Effect of Four Pesticides on Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* IMI 89717. *Zentralbl Mikrobiol.* 1993;148(8):549–57.
 84. Jalili M. A Review on Aflatoxins Reduction in Food. *Iran J Heal Saf Environ.* 2015;3(1):445–59.
 85. Cotty PJ. Influence of Field Application of an Atoxigenic Strain of *Aspergillus flavus* on the Populations of *A. flavus* Infecting Cotton Bolls and on the Aflatoxin Content of Cottonseed. *flavus Infecting Cotton Bolls, on the Aflatoxin Content of*, editors. *Phytopathology.* 1994;84(11):1270.
 86. Brown R, Cotty P, Cleveland T. Reduction in Aflatoxin Content of Maize by Atoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*. *J Food Prot.* 1991;54(8):623–6.
 87. Verheecke C, Liboz T, Mathieu F. Microbial degradation of aflatoxin B1: Current status and future advances. *Int J Food Microbiol.* 2016;237:1–9.

88. Blanco M, Shen N, Smelser A, Engstrom F. Germplasm Enhancement of Maize (GEM) Project Germplasm Enhancement of Maize (GEM) Project USDA-ARS, 1 GEM Coordinator, 2 IT Specialist, and 3 Res. Technicians North Central Regional Plant Introduction Station, Ames, IA GEM Project History.https://www.researchgate.net/publication/237239766_Germplasm_Enhancement_of_Maize_GEM_Project_Germplasm_Enhancement_of_Maize_GEM_Project/download erişim Tarihi: 20.11.2021
89. Williams WP. Breeding for resistance to aflatoxin accumulation in maize. *Mycotoxin Res.* 2006;22(1):27–32.
90. Mayfield K, Betrán FJ, Isakeit T, Odvody G, Murray SC, Rooney WL, et al. Registration of Maize Germplasm Lines Tx736, Tx739, and Tx740 for Reducing Preharvest Aflatoxin Accumulation. *J Plant Regist.* 2012;6(1):88–94.
91. Kaaya AN, Warren HL, Kyamanywa S, Kyamuhangire W. The effect of delayed harvest on moisture content, insect damage, moulds and aflatoxin contamination of maize in Mayuge district of Uganda. *J Sci Food Agric.* 2005;85(15):2595–9.
92. Wilkinson JM, Davies DR. The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments. *Grass Forage Sci.* 2013;68(1):1–19.
93. Khan NA, Yu P, Ali M, Cone JW, Hendriks WH. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *J Sci Food Agric.* 2015;95(2):238–52.
94. Pitt JI, Taniwaki MH, Cole MB. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control.* 2013;32(1):205–15.
95. Kabak B, Dobson ADW, Var I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46(8):593–619.
96. Channaiah L. Mycotoxin [Internet]. *World Grain*; 2011. Available from: <http://www.world-grain.com/> Erişim Tarihi: 20.11.2021
97. Codex Alimentarius Commission. Prevention and Reduction of Food and Feed Contamination. In Rome: World Health Organization Food And Agriculture Organization Of The United Nations; 2012.
98. Channaiah LH, Maier DE. Best Stored Maize Management Practices for the Prevention of Mycotoxin Contamination. *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. In *Mycotoxin reduction in grain chains 2014*. 78–88 p.
99. Paster N, Bullerman LB. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *Int J Food Microbiol.* 1988;7(3):257–65.
100. S. R. Eckhoff, J. E. Van Cauwenberge, R. J. Bothast, G. W. Nofsinger, E. B. Bagley. Sulfur Dioxide-Supplemented Ambient Air Drying of High-Moisture Corn. *Trans ASAE.* 1980;23(4):1028–32.

101. Eckhoff SR, Tuite JF, Foster GH, Kirleis AW. Microbial Growth Inhibition by SO₂ or SO₂ Plus NH₃ Treatments During Slow Drying of Corn. *Cereal Chem.* 1983; 60: 185–8.
102. Magan N. Use of sulphur dioxide to control fungi in stored grain. In: S. D, editor. In:Navarro. Jerusalem Israel,,: Proceedings of Int. Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Grain Storages. Capital Press; 1993:163–71.
103. Drury DCH and EE. Antifungal activity of volatile fatty acids on grains. *Cereal Chem.* 1974;51:74–83.
104. D. B. Sauer, Rosemary Burroughs. Efficacy of Various Chemicals as Grain Mold Inhibitors. *Trans ASAE.* 1974;17(3):0557–9.
105. Bullerman LB. Effects of potassium sorbate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J Food Prot.* 1983;46(11):940–2.
106. Rusul G, Marth EH. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of potassium benzoate or potassium sorbate and at different initial pH values. *J Food Prot.* 1987;50(10):820–5.
107. Arino AA, Bullerman LB. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 as Affected by the Fungicide Iprodione1. *J Food Prot.* 1993;56(8):718–21.
108. Munimbazi C, Saxena J, Tsai WYJ, Bullerman LB. Inhibition of production of cyclopiazonic acid and ochratoxin A by the fungicide iprodione. *J Food Prot.* 1997;60(7):849–52.
109. Klensporf-Pawlik D, Aladedunye F. Wild Rice: Nutritional and Health-Promoting Attributes [Internet]. *Gluten-Free Ancient Grains: Cereals, Pseudocereals, and Legumes: Sustainable, Nutritious, and Health-Promoting Foods for the 21st Century.* Elsevier Ltd; 2017. 271–296 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100866-9/00010-8> Erişim Tarihi: 05.01.2021
110. Nesci A V., Etcheverry MG. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Manag Sci.* 2006;62(8):775–84.
111. Nesci A, Ferrari L, Etcheverry M. Effect of synthetic antioxidants on stored maize grain mycoflora in situ. *J Sci Food Agric.* 2008;88(5):797–804.
112. Paster N, Menasherov M, Ravid U, Juven B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J Food Prot.* 1995;58(1):70–5.
113. Montes-Belmont R, Carvajal M. No TitleControl of *Aspergillus flavus* in Maize with Plant Essential Oils and Their Components. *J Food Prot.* 1998;61:616–9.
114. Reddy KRN, Reddy CS, Muralidharan K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control.* 2009;20(2):173–8.

115. Naseer R, Sultana B, Khan MZ, Naseer D, Nigam P. Utilization of waste fruit-peels to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus flavus*: A biotreatment of rice for safer storage. *Bioresour Technol.* 2014;172:423–8.
116. Shi H, Ileleji K, Stroshine RL, Keener K, Jensen JL. Reduction of Aflatoxin in Corn by High Voltage Atmospheric Cold Plasma. *Food Bioprocess Technol.* 2017;10(6):1042–52.
117. Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B, Wang Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2011;145(2–3):464–70.
118. Velazhahan R, Vijayanandraj S, Vijayasamundeeswari A, Paranidharan V, Samiyappan R, Iwamoto T, et al. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill - Structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G1. *Food Control.* 2010;21(5):719–25.
119. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 1997;59(1):57–67.
120. Pearson TC, Wicklow DT, Pasikatan MC. Reduction of aflatoxin and fumonisin contamination in yellow corn by high-speed dual-wavelength sorting. *Cereal Chem.* 2004;81(4):490–8.
121. Fandohan P, Zoumenou D, Hounhouigan DJ, Marasas WFO, Wingfield MJ, Hell K. Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. *Int J Food Microbiol.* 2005;98(3):249–59.
122. Turner PC, Sylla A, Gong YY, Diallo MS, Sutcliffe AE, Hall AJ, et al. Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in west Africa: A community-based intervention study. *Lancet.* 2005;365(9475):1950–6.
123. Bethke NW, Conard CA, Fosdick LE, Fox EJ, Grunig D, Kirkvold SW, et al. Method and apparatus for reducing aflatoxin-contaminated corn. United States Patent (No: US 8,919,569 B2). 2014.
124. Huff WE. A Physical Method for the Segregation of Aflatoxin-Contaminated Corn. *Cereal Chem.* 1980;57(4):236–8.
125. Hwang JH, Lee KG. Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. *Food Chem.* 2006;98(1):71–5.
126. Siwela AH, Siwela M, Matindi G, Dube S, Nziramasanga N. Decontamination of aflatoxin-contaminated maize by dehulling. *J Sci Food Agric.* 2005;85(15):2535–8.
127. Vučković J, Bodroža-Solarov M, Vujić D, Bočarov-Stančić A, Bagi F. The protective effect of hulls on the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in spelt wheat. *J Sci Food Agric.* 2013;93(8):1996–2001.
128. Aly SE. Distribution of aflatoxins in product and by-products during glucose production from contaminated corn. *Nahrung - Food.* 2002;46(5):341–4.
129. Lefyedi ML, Taylor JRN. Effect of dilute alkaline steeping on the microbial

- contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt. *J Inst Brew.* 2006;112(2):108–16.
130. Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol.* 2007;119(1–2):140–6.
131. Rayner ET, Koltun SP, Dollear FG. Solvent extraction of aflatoxins from contaminated agricultural products. *J Am Oil Chem Soc.* 1977;54(3):A242--A244.
132. Cole RJ, Dorner JW. Extraction of aflatoxins from naturally contaminated peanuts with different solvents and solvent/peanut ratios. *J AOAC Int.* 1994;77(6):1509–11.
133. Rayner ET, Dollear FG. Removal of aflatoxins from oilseed meals by extraction with aqueous isopropanol. *J Am Oil Chem Soc.* 1968;45(9):622–4.
134. Gardner HK, Koltun SP, Vix HLE. Solvent Extraction of Aflatoxins from Oilseed Meals. *J Agric Food Chem.* 1968;16(6):990–3.
135. Aylward F, Coleman G, Haisman DR. Catty odours in food: the reaction between mesityl oxide and sulphur compounds in foodstuffs. *Chem Ind.* 1967;37:1563–4.
136. Lewis R. *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, 11th Edition By Richard J. Lewis, Sr. (Lewis Information Systems, Inc.). John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2004. *J Am Chem Soc.* 2005;127(8):2794–2794.
137. Je WP, Lee C, Kim YB. Fate of aflatoxin B1 during the cooking of Korean Polished rice. *J Food Prot.* 2005;68(7):1431–4.
138. Sani AM, Azizi EG, Salehi EA, Rahimi K. Reduction of aflatoxin in rice by different cooking methods. *Toxicol Ind Health.* 2014;30(6):546–50.
139. Je WP, Kim YB. Effect of pressure cooking on aflatoxin B1 in rice. *J Agric Food Chem.* 2006;54(6):2431–5.
140. Hussain A, Luttfullah G. Reduction of aflatoxin-B1 and ochratoxin-A levels in polished basmati rice (*Oryza sativa* linn.) by different cooking methods. *Journal of the Chemical Society of Pakistan. J. Chem. Soc. Pak.* 2009; 31(6):911-15.
141. Elias-Orozco R, Castellanos-Nava A, Gaytán-Martínez M, Figueroa-Cárdenas JD, Loarca-Piña G. Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxin content. *Food Addit Contam.* 2002;19(9):878–85.
142. Conway H, Anderson R, Bagley E. Detoxification Of Aflatoxin-Contaminated Corn By Roasting. *Cereal Chem, USA.* 1978;55(1):115–7.
143. Stoloff L, Trucksess MW. Effect of boiling, frying, and baking on recovery of aflatoxin from naturally contaminated corn grits or cornmeal. Vol. 64, *Journal - Association of Official Analytical Chemists. J. {AOAC}.* 1981;64(3):678-80.
144. Gowda NKS, Suganthi RU, Malathi V, Raghavendra A. Efficacy of heat treatment and sun drying of aflatoxin-contaminated feed for reducing the harmful biological effects in sheep. *Anim Feed Sci Technol.* 2007;133(1–

- 2):167–75.
145. Castells M, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review. *Food Addit Contam.* 2005;22(2):150–7.
 146. Perez-Flores G, Moreno-Martinez E, Mendez-Albores A. Effect of Microwave Heating during Alkaline-Cooking of Aflatoxin Contaminated Maize. *J Food Sci.* 2011;76(2):T48--T52.
 147. B K, S SN, Savita S, P BH, B S. Effect of processing on reduction of aflatoxins in contaminated wheat. *J Res.* 2014;51(2):163–7.
 148. Herzallah S, Alshawabkeh K, Al Fataftah A. Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ -radiation, and microwave heating. *J Appl Poult Res.* 2008;17(4):515–21.
 149. Aquino S, Ferreira F, Baggio Ribeiro DH, Corrêa B, Greiner R, Haasis Villavicencio ALC. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. *Brazilian J Microbiol.* 2005;36(4):352–6.
 150. Ghanem I, Orfi M, Shamma M. Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B1 in food and feed crops. *Brazilian J Microbiol.* 2008;39(4):787–91.
 151. Mohamed NF, El-Dine RSS, Kotb MAM, Saber A. Assessing the Possible Effect of Gamma Irradiation on the Reduction of aflatoxin B1, and on the Moisture Content in Some Cereal Grains. *American Journal of Biomedical Sciences.* American Journal of Biomedical Sciences; 2015. 33–39.
 152. Xu G, Yao J zhong, Tang L, Yang X yu, Zheng M, Wang H, et al. Electron beam induced degradation of atrazine in aqueous solution. *Chem Eng J.* 2015;275:374–80.
 153. Shahbazi H., Shawrang P, Sadeghi A. Effects of gamma and electron-beam irradiation on aflatoxin B1 content of corn grain. *Anim Sci J [Internet].* 2010;3:56–61.
 154. Liu R, Wang R, Lu J, Chang M, Jin Q, Du Z, et al. Degradation of AFB1 in aqueous medium by electron beam irradiation: Kinetics, pathway and toxicology. *Food Control.* 2016;66:151–7.
 155. Tripathi S, Mishra HN. Enzymatic coupled with uv degradation of aflatoxin b1 in red chili powder. *J Food Qual.* 2010;33(SUPPL. 1):186–203.
 156. Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD, Wei CI. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J Food Prot.* 1990;53(6):489–501.
 157. Ghanghro AB, Channa MJ, Sheikh SA, Nizamani SM, Ghanghro IH. Assessment of Aflatoxin Level in Stored Wheat of Godowns of Hyderabad Division and Decontamination by UV Radiation. *Int J Biosci.* 2016;8(1):8–16.
 158. Elmnasser N, Guillou S, Leroi F, Orange N, Bakhrouf A, Federighi M. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: A review. *Can J Microbiol.* 2007;53(7):813–21.

159. Wang B, Mahoney NE, Pan Z, Khir R, Wu B, Ma H, et al. Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. *Food Control*. 2016;59:461–7.
160. Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett*. 2001;122(2):179–88.
161. Jard G, Liboz T, Mathieu F, Guyonvarch A, Lebrihi A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit Contam - Part A*. 2011;28(11):1590–609.
162. Hasheminya S-M, Dehghannya J. Strategies for decreasing aflatoxin in livestock feed and milk. *Int J Sci Basic Appl Res*. 2013;4(6):1506–10.
163. AFSSA, CODA-CERVA, INRA Clermont-Ferrand, INRA Toulouse, IRTA, ISPA. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Vol. 6, EFSA Supporting Publications. 2017. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.a.2009.EN-22> Erişim Tarihi: 20.11.2021.
164. Vila-Donat P, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food Chem Toxicol*. 2018;114:246–59.
165. Jouany JP, Diaz DE. Effects of mycotoxins in ruminants. In: *Mycotoxins Blue Book* [Internet]. 2005. p. 295–321. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20053035855.html>
166. Masoero F, Gallo A, Diaz D, Piva G, Moschini M. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows. *Anim Feed Sci Technol*. 2009;150(1–2):34–45.
167. Rojo F, Martínez SP, Espinoza VHI, Vera MAN, De Lucas Palacios E, Velázquez WPR. Comparison of methods to evaluate aflatoxin B1 exposure in dairy cattle and the effect of mycotoxin adsorbents to reduce AFM1 residues in milk. *Rev Mex Ciencias Pecu*. 2014;5(1):1–15.
168. Phillips TD, Afriyie-Gyawu E, Williams J, Huebner H, Ankrah NA, Ofori-Adjei D, et al. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(2):134–45.
169. Neeff D V., Ledoux DR, Rottinghaus GE, Bermudez AJ, Dakovic A, Murarolli RA, et al. In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. *Poult Sci*. 2013;92(1):131–7.
170. Kolosova A, Stroka J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: A review. *World Mycotoxin J*. 2011;4(3):225–56.
171. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J*. 2011;9(10):1–97.

172. (EFSA) EFSA. Scientific Opinion on the safety and efficacy of bentonite (dioctahedral montmorillonite) as feed additive for all species. *EFSA J.* 2011;9(2):2007.
173. European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) No 1060/2013 of 29 October 2013 concerning the authorisation of bentonite as a feed additive for all animal species. *Off J Eur Union* [Internet]. 2013;L 289(1060):33–7.
174. Spotti M, Fracchiolla ML, Arioli F, Caloni F, Pompa G. Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid. *Vet Res Commun.* 2005;29(6):507–15.
175. Wielogorska E, MacDonald S, Elliott CT. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin J.* 2016;9(3):419–33.
176. Stanley V, Ojo R, Woldesenbet S, Hutchinson D, Kubena L. The Use of *Saccharomyces cerevisiae* to Suppress the Effects of Aflatoxicosis in Broiler Chicks. *Poult Sci.* 1993;72(10):1867–72.
177. Shetty PH, Jespersen L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17(2):48–55.
178. Diaz DE, Hagler WM, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, et al. Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia.* 2004;157(2):233–41.
179. El-Nezami HS, Chrevatidis A, Auriola S, Salminen S, Mykkänen H. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Addit Contam.* 2002;19(7):680–6.
180. El-Nezami H, Polychronaki N, Lee Y, Haskard C, Juvonen R, Salminen S, et al. Chemical Moieties and Interactions Involved in the Binding of Zearalenone to the Surface of *Lactobacillus rhamnosus* Strains GG. *J Agric Food Chem.* 2004;52(14):4577–81.
181. Aoudia N, Callu P, Grosjean F, Larondelle Y. Effectiveness of mycotoxin sequestration activity of micronized wheat fibres on distribution of ochratoxin A in plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(7):1485–9.
182. Kong C, Shin SY, Kim BG. Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: An in vitro approach. *Springerplus.* 2014;3(1):1–4.
183. Avantaggiato G, Greco D, Damascelli A, Solfrizzo M, Visconti A. Assessment of multi-mycotoxin adsorption efficacy of grape pomace. *J Agric Food Chem.* 2014;62(2):497–507.
184. Jansen Van Rensburg C, Van Rensburg CEJ, Van Ryssen JBJ, Casey NH, Rottinghaus GE. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poult Sci.* 2006;85(9):1576–83.
185. Gallo A, Masoero F. In vitro models to evaluate the capacity of different

- sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Ital J Anim Sci.* 2009;9(1):109–16.
186. Bocarov-Stancic A, Adamovic M, Salma N, Bodroza-Solarov M, Vuckovic J, Pantic V. In vitro efficacy of mycotoxins adsorption by natural mineral adsorbents. *Biotechnol Anim HusbandryBiotehnologija u Stoc.* 2011;27(3):1241–51.
 187. Li JJ, Suo DC, Su X Ou. Binding Capacity for Aflatoxin B1 by Different Adsorbents. *Agric Sci China.* 2010;9(3):449–56.
 188. Daković A, Kragović M, Rottinghaus GE, Ledoux DR, Butkeraitis P, Vojislavljević DZ, et al. Preparation and characterization of zinc-exchanged montmorillonite and its effectiveness as aflatoxin B 1 adsorbent. *Mater Chem Phys.* 2012;137(1):213–20.
 189. Misra NN, Pankaj SK, Walsh T, O'Regan F, Bourke P, Cullen PJ. In-package nonthermal plasma degradation of pesticides on fresh produce. *J Hazard Mater.* 2014;271:33–40.
 190. Niemira BA. Cold plasma decontamination of foods. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3(1):125–42.
 191. Pankaj SK, Bueno-Ferrer C, Misra NN, Bourke P, Cullen PJ. Zein film: Effects of dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma. *J Appl Polym Sci.* 2014;131(18):9541–6.
 192. Misra NN, Pankaj SK, Segat A, Ishikawa K. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. *Trends Food Sci Technol.* 2016;55:39–47.
 193. Shi H. Investigation of methods for reducing aflatoxin contamination in distillers grains. Purdue University; 2016.
 194. Park BJ, Takatori K, Sugita-Konishi Y, Kim IH, Lee MH, Han DW, et al. Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surf Coatings Technol.* 2007;201(9-11):5733–7.
 195. Sakudo A, Toyokawa Y, Imanishi Y. Nitrogen gas plasma generated by a static induction thyristor as a pulsed power supply inactivates adenovirus. *PLoS One.* 2016;11(6):619–26.
 196. Suzuki T, Noro T, Kawamura Y, Fukunaga K, Watanabe M, Ohta M, et al. Decontamination of aflatoxin-forming fungus and elimination of aflatoxin mutagenicity with electrolyzed NaCl anode solution. *J Agric Food Chem.* 2002;50(3):633–41.
 197. Fan S, Zhang F, Liu S, Yu C, Guan D, Pan C. Removal of aflatoxin B1 in edible plant oils by oscillating treatment with alkaline electrolysed water. *Food Chem.* 2013;141(3):3118–23.
 198. A. C, R.E. P. Aflatoxin detoxification: hydroxydihydro-aflatoxin b1. *Appl Microbiol.* 1968;16:665–6.
 199. Dutton MF, Heathcote JG. The structure, biochemical properties and origin of aflatoxins B2a and G2a. *Chem Ind.* 1968;13:418–21.
 200. Aiko V, Edamana P, Mehta A. Decomposition and detoxification of aflatoxin

- B1 by lactic acid. *J Sci Food Agric*. 2016;96(6):1959–66.
201. Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE, Marth EH. Physical, Chemical and Biological Degradation of Mycotoxins in Foods and Agricultural Commodities. *J Food Prot*. 1982;45(10):964–71.
 202. Williams KR, Dutton MF. Destruction of aflatoxin during the production of hydrolysed vegetable protein. *J Food Prot*. 1988;51(11):887–91.
 203. Waltanapat R, Nakayama T, Beuchat LR. Characteristics of Acid Hydrolysate from Defatted Peanut Flour. *J Food Sci*. 1995;60(3):443–5.
 204. Hasan HAH. Destruction of aflatoxin B1 on sorghum grain with acids, salts and ammonia derivatives. *Cryptogam Mycol*. 1996;17(2):129–34.
 205. Itoh Y, Morishita Y, Aibara K. Modification of Aflatoxin B1 in Alkaline pH Solutions. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 1980;54:527–34.
 206. Muller HM. Entgiftung von Mykotoxinen: II. Chem Verfahren und Reaktion mit Inhaltsstoffen von FuttermittelnÜbers Tierernährg. 1983;11:47–80.
 207. Prudente A, King J. Chemical Detoxification of Aflatoxins in Food and Feeds. Abbas HK (ed), *Aflatoxin and Food Safety*, New York: CRC Press.2005; 543–54.
 208. Weng CY, Park DL, Martinez AJ. Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. *Food Addit Contam*. 1994;11(6):649–58.
 209. Nyandieka H., Maina J., Nyamwange C. Detoxification of Aflatoxin in Artificially Contaminated Maize Crop by Ammoniation Procedures. *Discov Innov*. 2009;21(1–2).
 210. Proctor AD, Ahmedna M, Kumar J V., Goktepe I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Addit Contam*. 2004;21(8):786–93.
 211. McKenzie KS, Sarr AB, Mayura K, Bailey RH, Miller DR, Rogers TD, et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem Toxicol*. 1997;35(8):807–20.
 212. Misra NN, Kadam SU, Pankaj SK. An overview of nothermal technologies in food processing. *Indian Food Ind*. 2011;30(5--6):44–51.
 213. Freitas-Silva O, Venâncio A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: A review. *Drug Metab Rev*. 2010;42(4):612–20.
 214. Trombete FM, Porto YD, Freitas-Silva O, Pereira R V., Direito GM, Saldanha T, et al. Efficacy of Ozone Treatment on Mycotoxins and Fungal Reduction in Artificially Contaminated Soft Wheat Grains. *J Food Process Preserv*. 2017;41(3):e12927.
 215. Prudente AD, King JM. Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. *J Food Sci*. 2002;67(8):2866–72.
 216. Luo X, Wang R, Wang L, Li Y, Bian Y, Chen Z. Effect of ozone treatment on aflatoxin B1 and safety evaluation of ozonized corn. *Food Control*.

- 2014;37(1):171–6.
217. Womack ED, Brown AE, Sparks DL. A recent review of non-biological remediation of aflatoxin-contaminated crops. *J Sci Food Agric.* 2014;94(9):1706–14.
 218. Okonkwo PO, Nwokolo C. Aflatoxin B1: simple procedures to reduce levels in tropical foods. *Nutr Rep Int.* 1978;17(3):387–95.
 219. Diao E, Hou H, Chen B, Shan C, Dong H. Ozonolysis efficiency and safety evaluation of aflatoxin B1 in peanuts. *Food Chem Toxicol.* 2013;55:519–25.
 220. Ta E-D, Ama S, Desouky AIE, Ha EM. Effect of Ozone Gas on Degradation of Aflatoxin B1 and *Aspergillus Flavus Fungal.* *J Environ Anal Toxicol.* 2012;02(02).
 221. Savi G, Piacentini K, Scussel V. Ozone Treatment Efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* Growth Inhibition and Mycotoxin Degradation of Stored Wheat Grains (*Triticum aestivum L.*). *J Food Process Preserv.* 2014;39(6):940–8.
 222. Hagler WM, Hutchins JE, Hamilton PB. Destruction of aflatoxin B1 with sodium bisulfite: Isolation of the major product aflatoxin B1S. *J Food Prot.* 1983;46(4):295–300.
 223. Yagen B, Hutchins JE, Cox RH, Hagler WM, Hamilton PB. Aflatoxin B1S: Revised structure for the sodium sulfonate formed by destruction of aflatoxin B1 with sodium bisulfite. *J Food Prot.* 1989;52(8):574–7.
 224. Moerck KE, McElfresh P, Wohlman A, Hilton BW. Aflatoxin Destruction in Corn Using Sodium Bisulfite, Sodium Hydroxide and Aqueous Ammonia. *J Food Prot.* 1980;43(7):571–4.
 225. Hagler WM, Hutchins JE, Hamilton PB. Destruction of aflatoxin in corn with sodium bisulfite. *J Food Prot.* 1982;45(14):1287–91.
 226. Vijayanandraj S, Brinda R, Kannan K, Adhithya R, Vinothini S, Senthil K, et al. Detoxification of aflatoxin B1 by an aqueous extract from leaves of *Adhatoda vasica* Nees. *Microbiol Res.* 2014;169(4):294–300.
 227. Panda P, Mehta A. Aflatoxin detoxification potential of *ocimum tenuiflorum.* *J Food Saf.* 2013;33(3):265–72.
 228. Iram W, Anjum T, Iqbal M, Ghaffar A, Abbas M. Mass spectrometric identification and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B1 and B2 by *Corymbia citriodora* aqueous extracts. *Sci Rep.* 2015;5(1):146–72.
 229. Iram W, Anjum T, Iqbal M, Ghaffar A, Abbas M. Structural elucidation and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B1 and B2 by aqueous extracts of *Trachyspermum ammi.* *Front Microbiol.* 2016;7(MAR):146–72.
 230. Mishra HN, Das C. A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(3):245–64.
 231. El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol.* 1998;36(4):321–6.

232. Oluwafemi F, Da-Silva F. Removal of aflatoxins by viable and heat-killed *Lactobacillus* species isolated from fermented maize. *J Appl Biosci*. 2009;16(1):871–6.
233. Dorner JW. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *J Toxicol - Toxin Rev*. 2004;23(2–3):425–50.
234. Bueno D, Casale C, Pizzolitto R, Salvano M, Oliver G. Physical Adsorption of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A Theoretical Model. *J Food Prot*. 2007;70(9):2148–54.
235. Aflasafe – IITA BIP [Internet]. [cited 2020 Nov 19]. Available from: <https://iitabip.org/product/aflasafe/> Erişim Tarihi: 05.01.2021
236. Wang J, Ogata M, Hirai H, Kawagishi H. Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;314(2):164–9.
237. Applebaum R, Marth E. Inactivation of Aflatoxin M1 in Milk Using Hydrogen Peroxide and Hydrogen Peroxide plus Riboflavin or Lactoperoxidase. *J Food Prot*. 1982;45(6):557–60.
238. Mohammadi H, Mazloomi SM, Eskandari MH, Aminlari M, Niakousari M. The Effect of Ozone on Aflatoxin M1, Oxidative Stability, Carotenoid Content and the Microbial Count of Milk. *Ozone Sci Eng*. 2017;39(6):447–53.
239. Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Fusconi G, Galvano M, Piva A, et al. Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. *J Food Prot*. 1996;59(5):551–4.
240. Kissell L, Davidson S, Hopkins BA, Smith GW, Whitlow LW. Effect of experimental feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2013;97(4):694–700.
241. Applebaum RS, Marth EH. Use of sulphite or bentonite to eliminate aflatoxin M1 from naturally contaminated raw whole milk. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1982;174(4):303–5.
242. Carraro A, De Giacomo A, Giannossi ML, Medici L, Muscarella M, Palazzo L, et al. Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M1 from contaminated milk and effects on milk quality. *Applied Clay Science*. 2014;88-89:92–9.
243. Bovo F, Corassin CH, Rosim RE, de Oliveira CAF. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M1 in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. *Food Bioprocess Technol*. 2013;6(8):2230–4.
244. Pierides M, El-Nezami H, Peltonen K, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *J Food Prot*. 2000;63(5):645–50.
245. Abdelmotilib N, Hamad G, Elderea H, Salem E, Sohaimy S. Aflatoxin M1 Reduction in Milk by a Novel Combination of Probiotic Bacterial and Yeast Strains. *Eur J Nutr Food Saf*. 2018;8(2):83–99.
246. Corassin CH, Bovo F, Rosim RE, Oliveira CAF. Efficiency of *Saccharomyces*

- cerevisiae and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control*. 2013;31(1):80–3.
247. Assaf JC, Atoui A, Khoury A El, Chokr A, Louka N. A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Brazilian J Microbiol*. 2018;49(1):120–7.
 248. Polonelli L, Giovati L, Magliani W, Conti S, Sforza S, Calabretta A, et al. Vaccination of lactating dairy cows for the prevention of aflatoxin B 1 carry over in milk. *PLoS One*. 2011;6(10):e26777.
 249. Giovati L, Gallo A, Masoero F, Cerioli C, Ciociola T, Conti S, et al. Vaccination of heifers with anaflatoxin improves the reduction of aflatoxin B1 carry over in milk of lactating dairy cows. *PLoS One*. 2014;9(4):e94440.
 250. Cheng ML, Poole CF. Minor component tablet analysis by high-performance thin-layer chromatography. *J Chromatogr A*. 1983;257(C):140–5.
 251. Busman M, Bobell JR, Maragos CM. Determination of the aflatoxin M1 (AFM1) from milk by direct analysis in real time - mass spectrometry (DART-MS). *Food Control*. 2015;47:592–8.
 252. Guan D, Li P, Zhang Q, Zhang W, Zhang D, Jiang J. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk and infant milk products. *Food Chem*. 2011;125(4):1359–64.
 253. Ketney O, Santini A, Oancea S. Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review. *Int J Dairy Technol*. 2017;70(3):320–31.
 254. Kuraklık Analizi - K.K.T.C. Meteoroloji Dairesi [Internet]. [cited 2020 Nov 20]. Available from: <http://kktcmeteor.org/verianaliz/kuraklik-analizi> Erişim Tarihi: 05.01.2021
 255. Sıcaklık Analizi - K.K.T.C. Meteoroloji Dairesi [Internet]. [cited 2020 Nov 20]. Available from: <http://kktcmeteor.org/verianaliz/Analyze-sic> Erişim Tarihi: 05.01.2021
 256. R-Biopharm Rhone. RP70N EASI EXTRACT AFLATOXIN Milk and Milk Powder V11-2017-09. 2017.
 257. Cammilleri G, Graci S, Collura R, Buscemi M, Vella A, Macaluso A, et al. Aflatoxin M1 in cow, sheep, and donkey milk produced in Sicily, Southern Italy. *Mycotoxin Res*. 2018;35(1):47–53.
 258. Alimentarius C. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Vol. 257, Codex Committee on Food Additives and Contaminants 33rd Session, Hague, The Netherlands Commission Regulation (EC) No. Codex Committee on Food Additives and Contaminants 33rd Sessions, Hauge, The Netherlands; 2001. <http://www.fao.org/3/Y0474E/y0474e0s.htm> Erişim Tarihi: 05.01.2021
 259. Kutlubay Z, Sökmen B. Investigation of aflatoxin M1 in milks in the Giresun region. Giresun Üniversitesi; 2016.
 260. Bellio A, Bianchi DM, Gramaglia M, Loria A, Nucera D, Gallina S, et al. Aflatoxin M1 in cow's milk: Method validation for milk sampled in northern

- Italy. Toxins (Basel). 2016;8(3).
261. Piva G, Pietri A, Galazzi L, Curto O. Aflatoxin M 1 occurrence in dairy products marketed in Italy. *Food Addit Contam.* 1988;5(2):133–9.
 262. Behfar A, Khorasgani ZN, Alemzadeh Z, Goudarzi M, Ebrahimi R, Tarhani N. Determination of aflatoxin M1 levels in produced pasteurized milk in ahvaz city by using HPLC. Vol. 7, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. Toxicology Letters*, 196, S329-S330; 2012. 80–4.
 263. European Commission (EC). Commission Regulation (EC) No 118/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union.* 2006; 5–24.
 264. Kim HJ, Lee JE, Kwak BM, Ahn JH, Jeong SH. Occurrence of aflatoxin M1 In Raw Milk From South Korea Winter Seasons Using An Immunoaffinity Column And High Performance Liquid Chromatography. Vol. 30, *Journal of Food Safety. Food Control.* 2010; 20(2):804–13.
 265. Tunail N. Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar”, *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniv Ziraat Fak Gıda Müh Bölümü yayını.* 2000;82–8.
 266. Çiğdem A, Arif A. Ankara’da işlenen sütlerde aflatoksin-M1 varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. *Ankara Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* 2004;50(1):1.
 267. Yentür G, Er B. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. *Türk Hij ve Deney Biyol Derg.* 2011;69(1):41–52.

8. EKLER

EK-1. Turnitin Orjinallik Raporu

KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİNDE TÜKETİLEN SÜT
ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN M1 DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

DELİGÖZ, Efsun and BİLGE, Nebahat. "Sütle
Gelen Tehdit: Aflatoksin M1", TST, 2017.

Publication

<1%

2

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

Internet Source

<1%

3

www.journalagent.com

Internet Source

<1%

4

Amir Ismail, Bruna L. Gonçaves, Diane V. de
Neeff, Bárbara Ponzilacqua et al. "Aflatoxin in
foodstuffs: Occurrence and recent advances in
decontamination", Food Research International,
2018

Publication

<1%

5

www.researchgate.net

Internet Source

<1%

6

www.tandfonline.com

Internet Source

<1%

EK-2. Turnitin Dijital Makbuzu



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Cengiz Bereket
 Assignment title: KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYE..
 Submission title: KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYE..
 File name: Cengiz_Turnitin_son_hali.docx
 File size: 1.67M
 Page count: 100
 Word count: 22,772
 Character count: 160,939
 Submission date: 05-Feb-2021 02:14PM (UTC+0300)
 Submission ID: 1502259488

EC
 HUKUKİ ENSTİTÜSÜ
 SAĞLIK BİLİM ENSTİTÜSÜ

KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİNDE TÜKETİLEN SÜT
 ÖRNEKLERİNDE AHLATOKSİN VE DÜZEYLERİNİN
 ARAŞTIRILMASI

Doç. Cengiz BEREKET

Formalitik Tezlik Programı
 TÜRKİYE İNANÇ İZLE

ANKARA
 2021