

DEVAM SÜTLERİNDE AFLATOKSİN M1 VARLIĞININ ELISA YÖNTEMİYLE TESPİT EDİLMESİ

Meltem KAYA TUZ¹, Ahmet ASAN^{2*}, Suzan ÖKTEN³

¹Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji AD. Edirne

²Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji AD. Edirne

³Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji AD. Edirne

*Corresponding author: e-mail: ahmetasan84@gmail.com

Alınış (Received): 24 Şubat 2017, Kabul (Accepted): 28 Mart 2017, Erken Görünüm (Online First): 24 Mayıs 2017, Basım (Published): 15 Haziran 2017

Özet: Önemli bir besin kaynağı olan süt, bebek beslenmesinde kullanılmakta ve tüm dünyada tüketilmektedir. Devam sütlerine geçtiği bilinen kimyasal kontaminantlardan biri mikotoksinlerdir. Küfler tarafından üretilen ve devam sütlerine geçebilen mikotoksinler bebekte sağlık riski oluşturabilir. Mikotoksinlerin toksik etkilerinin önlenmesi için bebeğin normal büyüme ve gelişimi için en önemli besinlerden biri olan devam sütündeki aflatoksin M1 düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Süt kontaminantı olarak aflatoksinlerin kontrolü ile ilgili sosyal koruma projelerinin ve devam sütleri ile ilgili farkındalığın artırılması halk sağlığı korunması açısından önem arz eder. Çalışmamızda, yeni doğanların diyetlerinde aldığı ürün olan devam sütlerinde, aflatoksin M1'in varlığı ve halk sağlığı bakımından önemi araştırılmıştır. Bu amaçla, 7 farklı firmadan, farklı seri numaralarına sahip süt örneklerini içeren 60 adet devam sütü toplanmıştır. Çalışmamızda Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak devam sütlerinde aflatoksin M1 miktarları araştırılmıştır. Avrupa Birliğine uyum çerçevesinde hazırlanmış olan 2008/26 sayılı gıda maddelerindeki kontaminasyonların maksimum limitleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde; çiğ süt, UHT süt ve süt içeren ürünlerin yapımında kullanılan sütlerde maksimum AFM1 miktarının 0.05 µg/kg (parts per billion) olması gerektiği belirtilmiştir. Aflatoksin M1 konsantrasyonları hesaplandığında; <0.05 parts per billion konsantrasyon aralığında Aflatoksin M1 içeren 37 örnek, >0.05 ppb konsantrasyon aralığında Aflatoksin M1 içeren 23 örnek tespit edilmiştir. Sonuç olarak Türk Gıda Kodeksi limit değerini aşan 23 örnek halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Beslenmede devam sütünün sıklıkla tüketildiği ve önemli bir rol oynadığı bebek yaş grubunda, bu ürünler piyasaya çıkmadan önce Aflatoksin M1 varlığının saptandığı daha kapsamlı araştırmaların yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Devam sütü, aflatoxin M1, Elisa yöntemi.

Determination of Aflatoxin M1 on Follow-on Milk by ELISA Method

Abstract: Milk, which is an important source of nutrition is used for infant feeding and consumed widely all over the world. Mycotoxins are one of the chemical contaminants that are known to pass through milk. They are produced by molds and pass through milk, and may cause health problems in infants. Determination of aflatoxin M1 levels in follow-on milks which is one of the most important nutrients for healthy grown babies is important in prevention of toxic effects of mycotoxins. Promoting social protection studies concerning aflatoxins as milk contaminants and raising awareness on follow-on milks is important in protection of public health. In our study, investigation of aflatoxin M1 in follow-on milks; a product that newborns take in their diet, and to evaluate the results in terms of public health. For this purpose, 60 follow-on milk samples with different serial numbers were collected from 7 companies. In Turkish Food Codex Communiqué related to the contaminations in food products with in accordance with the law no 2008/6 for preparation compliance as part of European Union, indicated that the raw milk, UHT milk and other milks used for production of some products containing milk, maximum aflatoxin M1 should be 0.05 µg/kg (parts per billion). Aflatoxin M1 concentrations were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Our results showed that 37 samples contained aflatoxin M1 with <0.05 parts per billion concentrations, while 23 samples contained aflatoxin M1 with >0.05 parts per billion concentrations. In conclusion, the latter 23 samples including aflatoxin M1 values above Turkish Food Codex limits are important in terms of public health.

Key words: Follow-on milk, aflatoxin M1, Elisa method.

Giriş

Gelişimin erken döneminde sadece inek sütündeki vitamin ve mineraller, bebeklerin besin ihtiyacını karşılamada yetersiz kalabilir. Devam sütleri; inek sütünün faydaları ile biberon mamalarının sunduğu

besinleri birleştirir. Ancak devam sütlerine geçebilen bazı maddeler bebek sağlığını tehdit etmektedir. Örneğin, bunlardan biri de mikotoksinlerdir (Mead 2010). *Aspergillus flavus* Link, *A. parasiticus* Speare ve *A.*

oryzae (Ahlb.) Cohn gibi küfler tarafından oluşturulurlar. Bu küfler doğada yaygın olarak bulunurlar (Asan 2004) ve özellikle nem ve sıcaklığın uygun olduğu koşullarda depolanan ürünlerde kolayca gelişebilirler (Sümer 2006). Bebek ve çocukların biyotransformasyon kapasitelerinin yetişkinlere göre daha düşük olması ve aflatoksin M1'e (AFM1) yetişkin insanlara göre daha duyarlı olması da yine bu toksinin sağlık açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin miktarları coğrafi bölgelere, ülkelere ve mevsimlere göre farklılıklar gösterdiği, bahar ve yaz mevsiminde kış mevsimine oranla daha az miktarlarda AFM1 bulunduğu, dolayısıyla bu mevsimlerde yapılan süt ürünlerinde de AFM1 miktarının önemsenmeyecek düzeylerde görülebileceği bildirilmiştir (Kamkar 2005, Birdane ve ark. 2006, Gommez-Arranz ve Navarro-Blasco 2010). Bu araştırmanın amacı; aflatoksin M1'in devam sütündeki miktarlarını belirleyerek, bebeklerin maruz kalacağı riskleri ve olası sağlık etkilerini yorumlamak, bu riskleri ortadan kaldırmaya yönelik gerekli önlemlerin alınması için önerilerde bulunmaktır.

Materyal ve Metot

Çalışmada 7 farklı firmaya ait devam sütü örnekleri, Eylül 2014 – Şubat 2015 tarihleri arasında toplanmıştır ve numaralandırılmıştır. Toplanan örneklerden seri numarası farklı olan örnekler analize alınmıştır. Örneklerin deney aşamaları Şubat 2015 – Haziran 2015 tarihleri arasında tamamlanmıştır. Süt örnekleri buzdolabı sıcaklığında soğutulup 2-8°C'de 3000×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ile süttten yağ tabakası ayrılıp yağsız kısım direkt olarak analize alınmıştır. 25-1250ppt ölçüm aralığında en etkili aflatoksin

M₁ konsantrasyonunu elde etmek için örnek 5 kez dilüe edilmiştir (100µl örnek + 400µl örnek dilüenti).

AFM₁ Varlığının Gösterilmesi: Enzim Immunoassay Prosedürü

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodu ve M1 ELISA test kiti kullanılmıştır. Örneklerin ekstraksiyonundan sonra analiz prosedürü, üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

ELISA Yöntemi ile Aflatoksin M1 Analizi

Aflatoksin M1 ELISA analizi için R-Biofarm RIDASCREEN test kitleri kullanılmıştır.

Sonuçlar RIDA®SOFT Win (Art.No.Z9999) Software ile değerlendirilmiştir. Hesaplamalar aşağıda verilen formülle yapılmıştır.

$$\text{Hesaplama} = \frac{\text{Örneğin absorbanansı} \times 100}{\text{Maksimum bağlanma}}$$

Sonuçlar

2008/26 sayılı gıda maddelerindeki kontaminasyonların maksimum düzeyleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde; çiğ süt, UHT süt ve süt kökenli maddelerin üretiminde kullanılan sütlerde maksimum AFM₁ miktarının 0.05µg/kg (ppb) olması gerektiği bildirilmiştir. Çalışmamızda piyasadan sağlanan yedi farklı firmaya (A, B, C, D, E, F, G) ait 60 adet devam sütü materyal olarak kullanılmıştır. Toplanan örneklerin ELISA testi ile AFM₁ konsantrasyonları hesaplandığında; <0.05 ppb (parts per billion = milyarda 1) konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 37 örnek, >0.05 ppb konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 23 örnek tespit edilmiştir (Tablo 1).

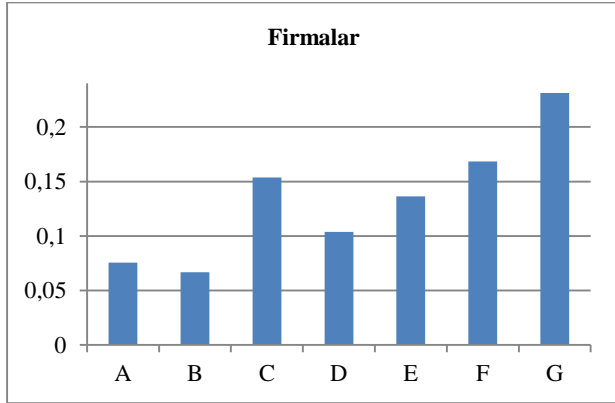
Tablo 1. AFM₁ varlığı pozitif olarak tespit edilen numunelerde AFM₁ konsantrasyonu.

Örnek Numarası	Ortalama Absorbans	Hesaplanan ppt (parts per trillion)	ppb
3	1.580	6.65	0.0665
10	1.550	8.45	0.0845
11	1.573	7.1	0.0710
20	1.587	6.25	0.0625
26	1.471	13.1	0.1310
28	1.394	17.65	0.1765
36	1.475	12.8	0.1280
38	1.582	6.6	0.0660
41	1.493	11.75	0.1175
44	1.176	23.12	0.2312
45	1.487	11.31	0.1131
46	1.535	9.97	0.0997
47	1.208	20.49	0.2049
49	1.505	10.83	0.1083
50	1.359	14.63	0.1463
51	1.236	18.94	0.1894
59	1.486	11.33	0.1133
60	1.101	34.19	0.3419
61	1.439	12.53	0.1253
62	1.224	19.55	0.1955
63	1.432	12.70	0.1270
72	1.312	16.03	0.1603
73	1.519	10.45	0.1045

Tablo 2. Firmalara ait devam sütü örneklerinin AFM1 konsantrasyonları

Örnek No	Firmalar						
	A	B	C	D	E	F	G
1	<0.05	0.0710	<0.05	<0.05	0.1131	<0.05	<0.05
2	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.0997	0.1083	<0.05
3	0.0665	<0.05	<0.05	<0.05	0.2049	0.1463	0.2312
4	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.1894	
5	<0.05	<0.05	<0.05	0.1280	0.1603	<0.05	
6	<0.05	<0.05	0.1310	<0.05	0.1045	0.1133	
7	<0.05	<0.05	<0.05	0.0660	<0.05	0.3419	
8	<0.05	<0.05	0.1765	<0.05		0.1253	
9	<0.05	0.0625	<0.05	<0.05		0.1955	
10	0.0845	<0.05	<0.05	0.1175		0.1270	

AFM1 varlığı tespit edilen 23 devam sütü örneğinden; 0.06-0.07ppb konsantrasyon aralığında AFM1 içeren 3 örnek, 0.07-0.08ppb konsantrasyon aralığında AFM1 içeren 1 örnek, 0.08-0.09 ppb aralığında 1 örnek, 0.09-0.10 ppb aralığında 1 örnek, 0.10-0.11ppb aralığında 2 örnek, 0.11-0.12ppb aralığında 3 örnek, 0.12-0.13 ppb aralığında 3 örnek, 0.13-0.14ppb aralığında 1 örnek, 0.14-0.16 ppb aralığında 1 örnek, 0.16-0.17 ppb aralığında 1 örnek, 0.17-0.18ppb aralığında 1 örnek, 0.18-0.19ppb aralığında 1 örnek, 0.19-0.20ppb aralığında 1 örnek, 0.20-0.23ppb aralığında 1 örnek ve 0.23-0.34 ppb aralığında 1 örnek olduğu görülmüştür (Tablo 1).

**Şekil 1.** Süt örneklerinde saptanan aflatoksin M1 miktarlarının firmalara göre dağılımı, çubuk modeli.

Tablo 2’de firmalara ait tespit edilen AFM1 değerleri, Şekil 1’de de firmalara (A, B, C, D, E, F, G) ait ortalama değerler çubuk grafiği şeklinde gösterilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait en düşük ve en yüksek değerler bakımından AFM1 değerleri sırasıyla (ppb) 0.0625, 0.0660, 0.0665, 0.0710, 0.0843, 0.1175, 0.1280, 0.1313 ve 0.1765 sınırları içerisinde olduğu görülmüştür. A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait en düşük ve en yüksek değerler bakımından AFM1 değerleri sırasıyla (ppb) 0.0997, 0.1045, 0.1083, 0.1131, 0.1133, 0.1253, 0.1270, 0.1463, 0.1603, 0.1894, 0.1955, 0.2049, 0.2312 ve 0.3419 olarak bulunmuştur. A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait ortalama değerler küçük değerden büyük değere göre sırasıyla A firması % 7, B firması % 8, D

firması % 11, E firması % 15, C firması % 16, F firması % 18 ve G firması % 25 olarak belirlenmiştir. Süt örneklerine ait Aflatoksin M1 (AFM1) bulguları için yapılan varyans analizi sonucuna göre ($p < 0.001$) firmalar arası fark önemli bulunmuştur.

Tartışma

Kuvvetli toksijenik özellik gösteren aflatoksin M1’in devam sütündeki miktarlarını belirlemek, bebeklerin maruz kalacağı riskleri ve olası sağlık etkilerini yorumlamak, bu riskleri ortadan kaldırmaya yönelik gerekli önlemlerin alınmasında önerilerde bulunmak amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Örnekler Eylül 2014 – Şubat 2015 tarihlerinde toplanmıştır. Alınan örnekler ELISA yöntemiyle okunmuştur. Çalışma sonucunda, incelenen toplam 60 devam sütü örneğinin hepsinde AFM1 saptanmış olup, 37 örnekte ise Türk Gıda Kodeksi’ne göre kabul edilebilir sınırlar içerisinde AFM1 bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi’ne göre 23 örnekte sınırları aşan devam sütü örneği tespit edilmiştir (Tablo 2).

A, B, C, D, G firmalarının ortalama AFM1 değerleri Türk Gıda Kodeksinde (TGK) belirtilen maksimum bulaşan değerinden (0.05ppb) daha büyüktür. A, B, C, D, G firmalarına ait ortalama değerler standart değerden yüksektir fakat fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. E ve F firmalarına ait ortalama değerler ise standart değerden yüksektir ve fark önemli bulunmuştur. Risk potansiyeli taşıma ihtimali olan aflatoksin miktarları, Türk Gıda Kodeksi’ne göre değerlendirilmiştir; Bu değerler sütte; 0.05µg/kg, süt tozunda (dry milk); 0.5µg/kg, peynirlerde; 0.25µg/kg, bebek mama ve devam formüllerinde; 0.020µg/kg olarak bildirilmektedir. Çalışmada, incelenen örneklerin 23’ünde tespit edilen AFM1 seviyelerinin Türk Gıda Kodeksi kriterleri dikkate alındığında, kabul edilebilir sınırların üstünde olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

A, B, C, D, E, F, G Firmalarına ait devam sütü örneklerine ait ortalama değerler standart değerden yüksektir. Fark istatistiksel olarak önemlidir. Bu nedenle devam sütlerinde AFM1 varlığının bulunması önemli bir risk oluşturduğunu düşünerek çalışmamızda Türkiye’de yaygın olarak tüketilen devam sütü ürünlerinde AFM1

miktarları araştırılmıştır. Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin tespiti için ince tabaka kromatografisi (thin layer chromatography=TLC), ELISA ve yüksek performans sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography) kullanılmaktadır. Bu iki yöntem içinde ELISA, duyarlılığının yüksek ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle, sütteki AFM1 analizinde yaygın kullanılan bir metot olduğu bilinmektedir (Amra 1998, Sarımehtemoğlu ve ark. 2004).

Bu çalışmada da, bahsedilen avantajlarından dolayı ELISA yöntemi kullanılmıştır. Birçok ülkede ve ülkemizde yapılan birçok çalışmada süt ve süt ürünlerinde AFM1 düzeyini belirlemek için analiz yapılmıştır (Bakırcı 2001, Sarımehtemoğlu ve ark. 2004, Atasever ve ark. 2006).

Bizim çalışmamızda da, toplam 60 süt örneğinden % 38'da, AFM1 miktarının Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğu görülmüştür. Süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin M₁'in meydana gelmesi çevre koşullarına bağlı olduğundan şartların düzeltilmesi problemin daha basit ve ucuz yollardan ortadan kaldırılmasını sağlayacaktır (Galvano ve ark. 1996, Franco ve ark. 1998, Akdemir 2001, Özmenteşe 2002,

Van Egmond ve Jonker 2003, Akdemir ve Altıntaş 2004). Devam sütlerinde kabul edilebilir seviyenin üstünde AFM1 varlığı risklidir ve kontrolün gerekli olduğu açıktır. Özellikle yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi için, yem, süt ve süt ürünleri alanında faaliyetde olan kişi ve kuruluşların, yem ve ham maddelerinde AFB₁, süt ve süt ürünlerinde ise AFM1 olup olmadığının önemi ve üretim koşulları konusunda bilgilencmelerinin sağlanması, yemlerde AFB₁, süt ve ürünlerinde ise AFM1 olup olmadığının düzenli kontrollerinin yapılması önemlidir.

İlave olarak, Türk gıda kodeksinin Bulaşanlar Yönetmeliğinde 19.12.2012 yılında yayınlanan yeni değişiklikte limitler "Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)" için Aflatoksin M₁ üst limiti 0.025µg/kg olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamız planlandığı tarih daha önce ve elimizdeki Kitin cut-off değeri 0.05 olduğu için ELISA yöntemine göre değerlendirme yapılmıştır. Daha hassas konsantrasyonları ölçme imkanı sağlayacak olan LC/MS-MS yöntemiyle AFM1 konsantrasyonları belirlemek daha doğru sonuçlar verebilecektir.

Kaynaklar

- Asan, A. 2004. *Aspergillus, Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon*, 89: 155-157.
- Akdemir, Ç. 2001. *Ankara'da işlenen sütlerde Aflatoksin M₁ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akdemir, Ç. & Altıntaş, A. 2004. Ankara'da işlenen sütlerde aflatoksin M₁ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 51: 175-179.
- Amra, H.A. 1998. Survey of aflatoxin M₁ in Egyptian raw milk by ELISA. *Revue de Medicina Veterinaria*, 149: 695.
- Atasever, M., Nizamlioğlu, M., Özturan, K., Karakaya, Y. & Ünsal, C. 2006. Erzurum bölgesinde tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin M₁ yönünden İncelenmesi, II. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Bildiri Kitabı, İstanbul.
- Bakırcı, I. 2001. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12: 47-51.
- Birdane, Y., Akaya, L., Baskaya, R., Cemek, M. & Bulut S. 2006. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan UHT sütler ile çiğ sütlerdeki AFM₁ miktarının belirlenmesi, 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, İstanbul.
- Franco, C.M., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Cepeda, A., Mahuzier, G. & Prognan, P. 1998. Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q₁, M₁ and P₁ fluorescence and chromatographic studies. *Journal of Chromatography A*, 815: 21-29.
- Galvano, F., Galofaro, V. & Galvano, G. 1996. Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. *Journal of Food Protection*, 59: 1079-1090.
- Gomez-Arranz, E. & Navarro-Blasco, I. 2010. Aflatoxin M₁ in Spanish infant formulae: Occurrence and dietary intake regarding type, protein-base and physical state. *Food Additives Contaminants. Part B Surveillance*, 3: 193-199.
- Kamkar, A.A. 2005. Study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, 16 (7): 593-599.
- Mead, M. 2010. Contaminants in human milk weighing the risks against the benefits of breastfeeding. *Environmental Health Perspectives*, 116: A426-A434.
- Özmenteşe, N. 2002. *İstanbul piyasasından sağlanan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin B₁ ve M₁ içerikleri yönünden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması*. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sarımehtemoğlu, B., Küplülü, Ö. & Çelik, T.H. 2004. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 15: 45-49.
- Sümer, S. 2006. *Genel Mikoloji*. 1. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Van Egmond, H.P. & Jonker, M.A. 2004. Worldwide regulations on aflatoxins-the situation in 2004. *Journal of Toxicology: Toxin Review*, 23: 273-293.