



Geleneksel Ev *İsot* Baharatının Aflatoksin İçeriğinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma

A. Ferit ATASOY^{1,*}, İbrahim HAYOĞLU¹, Aziz KORKMAZ¹, Esra KARA¹, Ali YILDIRIM¹

¹Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa

*Sorumlu yazar: fatasoy@harran.edu.tr

Öz

Geleneksel yöntemle evlerde üretilen *isot* biberlerinin aflatoksin (AF) içeriklerini belirlemek için yapılan bu çalışmada, toplam 20 adet ev *isot* örneği incelenmiştir. *İsot* baharatlarının toplam aflatoksin içeriklerinin en az 0.02 ppb, en fazla 9.54 ppb ve ortalama 1.52 ppb olduğu tespit edilmiştir. 20 *isot* örneğinden hiçbirinde aflatoksin G₁ ve G₂ varlığı tespit edilmemiştir. Analiz edilen örneklerden 6 tanesinde 0.02 ile 1.09 ppb arasında AFB₂ saptanmıştır. *İsot* örneklerinin AFB₁ içeriğinin ise 0.02 ile 8.45 ppb aralığında değiştiği belirlenmiştir. Kuru pul *isot* örneklerinin %10'unun AFB₁ açısından standartlara uymadığı tespit edilmiştir. Analiz edilen örneklerin hiç birisinin toplam AF açısından yasal limitleri aşmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ev *isotu*, Aflatoksin B₁, Aflatoksin B₂, Aflatoksin G₁, Aflatoksin G₂

A Research on The Determination of Aflatoxin Content of Traditional Home Made *Isot*

Abstract

In this study, 20 different home made *isot* samples were analyzed in order to determine the contents of aflatoxin (AF). Minimum and maximum total aflatoxin content of *isots* were found as 0.02 ppb and 9.54 ppb, respectively. AFG₁ and AFG₂ did not determined in the samples. AFB₂ and AFB₁ content of *isot* samples ranged between 0.02-1.09 ppb and 0.02-8.45 ppb, respectively. 10% of the samples did not obey the AFB₁ limit declared by TS. However, total aflatoxin content of *isot* did not exceed the limits.

Kew Words: Home made *isot*, Aflatoxin B₁, Aflatoxin B₂, Aflatoxin G₁, Aflatoxin G₂

Giriş

Kırmızıbiber (*Capsicum annum* L.) gıdalara kazandırdığı çeşni ve renk nedeniyle dünyada kültür yetiştiriciliği ve tüketimi domatesten sonra gelen ikinci sebzedir (Vengaiah ve Pandey, 2007). Türkiye, kırmızıbiber (*Capsicum annum* L.) yetiştiriciliğinde Dünyada Çin ve Meksika'dan sonra üçüncü sıradadır (Anonymous, 2013). Türkiye'de üretilen toplam yaş kırmızıbiberin %78'lik kısmı GAP bölgesinde bulunan iller tarafından yetiştirilmektedir. Ayrıca, ülkemizde üretilen

toplam yaş kırmızıbiberin yarısına yakını Şanlıurfa il sınırlarında yetiştirilmektedir (Anonim, 2015). Bu sebze, bölge için kritik bir ürün haline getiren temel nedenlerin başında, bir baharat olan geleneksel *isot* biberi gelmektedir.

Aflatoksinler (AF), özellikle *Aspergillus* türü küfler (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius*) tarafından üretilen toksik etkili bileşiklerdir. *A. flavus* bütün dünyada daha yaygın olarak bulunur. Küflerin aflatoksin üretimleri genetik potansiyeli, çevre koşulları (sıcaklık, pH,

redoks potansiyeli, substrat) ve fungusla substratın bulaşması gibi faktörlere bağlıdır. *Aspergillus*'lar mezofilik karakterli olup 6-8 °C'den 50-60 °C'ye kadar gelişebilirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38 °C dir. 10-13 °C'lerin altında ve 41-42 °C'lerin üzerinde aflatoksin oluşumu sınırlanır. En yüksek toksin oluşumuna ise 25-30 °C'lerde ulaşır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na (International Agency of Research on Cancer, IARC) göre aflatoksinler, birinci grup kanserojenler olarak sınıflandırılmıştır. Ultraviyole ışık altında mavi floresans verenler AFB₁ ve AFB₂, yeşil floresans verenler ise AFG₁ ve AFG₂ olarak adlandırılmaktadır. Benzer yapılara sahip toksinler olmakla birlikte başlıca aflatoksinler AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ ve AFM₂'dir. Baharat çeşitleri ve diğer gıdalarda aflatoksinlerin B₁, B₂, G₁ ve G₂ formları yaygın bulunmakta ve bunlar içerisinde en toksik olanı AFB₁'dir (Ardic ve ark., 2008).

Kırmızıbiber duyuusal öneminden ötürü, eskiden beri hem taze halde hem de baharat olarak tüketilse de günümüzde daha çok baharat haline getirilerek kullanılmaktadır. Günümüzde, baharatlık biber üretiminde endüstriyel metotlar yaygın olarak kullanılmakla beraber, bazı ülkelerde hala geleneksel olarak güneşte doğal şartlar altında kurutma ile biber baharatı elde edilmektedir. Bu ürünlerden biride Şanlıurfa'da üretilen *isot* baharatıdır. Önceki dönemlerde bölge insanı tarafından sadece kendi özel tüketimi için elde edilen *isot* biberi, günümüzde özellikle kadınlar başta olmak üzere ekonomik seviyesi düşük olan aile grupları için önemli bir gelir kaynağı olarak görülmeye başlanmıştır. Tüketicilerin de daha doğal özelliğe sahip geleneksel ürünlere eğilim göstermeye başlaması, Şanlıurfa *isot* biberine ulusal ve/veya uluslararası piyasada da pazarlanan bir ürün haline gelebilme

imkânı sunmuştur. Ancak, bunun bir sonucu olarak, tüketiciyi yanıltmaya yönelik sadece görünüş olarak benzer özellikte olup duyuusal ve hijyen kalitesi düşük ürünler de üretilmeye başlanmıştır. *İsot*larda gıda güvenliği açısından en önemli sorunu aflatoksin problemi oluşturmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı evlerde geleneksel yöntemle üretilen *isot*ların aflatoksin içeriklerini belirlemek, baharat standardı ile karşılaştırmak ve gıda güvenliği açısından değerlendirmektir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmanın materyalini 2015 yılında evlerde geleneksel yöntemlerle üretilen 20 adet *isot* baharatı oluşturmaktadır.

Aflatoksin Analizi

Aflatoksin analizi, AOAC Official Method 999.07 (Anonymous, 2000) yöntemine göre HPLC sistemi ile yapılmıştır. Bu analizdeki işlemler genel olarak ekstraksiyon, temizleme ve HPLC'ye enjeksiyon aşamalarından oluşmuştur.

Ekstraksiyon ve Temizleme

500 ml'lik blender kabına (Waring 8011; Torrington, CT, U.S.A) 50 g numune tartıldıktan sonra üzerine 5 g NaCl ilave edilmiş ve % 80'lik 300 ml metanol eklenmiştir. Daha sonra, 5 dakika yüksek devirde karıştırılıp cam huni kullanılarak kaba filtre kâğıdından ve Whatman No: 4 filtre kâğıdından geçirilerek süzümüştür. Süzüntüden 10 ml pipetle alınmış ve üzerine 60 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate buffered saline solution, PBS) ilave edilerek immunoaffinite safhasına geçilmiştir.

Bu işlem, aflatoksinler (B₁, B₂, G₁ ve G₂) için özel antikor içeren bir immuno-affinite kolonu (Romerlabs, Aflastar™ FIT, Tulln, Austria) yardımıyla ekstraktın temizlenmesi

ilkesine dayanmaktadır. Kolon sıcaklığı oda şartlarına getirildikten sonra, 10 ml ekstrakt alınarak 2-3 ml dakika⁻¹ hızda olacak şekilde yerçekimi yardımıyla kolondan geçirilmiştir. Akış hızının 5 ml dakika⁻¹'yi geçmemesine dikkat edilmiştir. Sonrasında, kolondan 15 ml saf su geçirilerek yıkama işlemi yapılmış ve 10 s süre ile kolondan hava geçirilerek kurutulmuştur. Aflatoksinlerin ayrışması için 0.5 ml metanol kolondan yerçekimi yardımıyla yavaşça geçirilerek 3 ml'lik balon jojeye alınmıştır. Bir dakika bekledikten sonra, ikinci kez olarak 0.75 ml metanol kolondan geçirilip hava yardımıyla pozitif basınç oluşturularak ayrıştırmada kullanılan metanolün tamamen balon jojeye alınması sağlanmıştır. Saf su ile hacim 3 ml'ye tamamlanmış ve bir vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 1 ml'lik vialle alınarak HPLC'ye enjeksiyon yapılmıştır. Kullanılan çözücü ve kimyasalların HPLC Grade kalitesinde olmasına dikkat edilmiştir.

HPLC Koşulları ve Miktar Tayini

Aflatoksinlerin HPLC (SHIMADZU LC-20AD Prominence, Shimadzu Corp, Kyoto, Japonya) sistemi ile kantitatif analizinde FLD (RF-10AXL) detektörü ile çalışılmıştır. Bazı aflatoksinleri (B₁ ve G₁) detektörde tespit edebilmek amacıyla da HPLC ve detektör arasına türevlendirme hücresi (Kobra Cell) eklenmiş ve brominasyon ile elektrokimyasal olarak türevlendirme yapılmıştır. Aflatoksinlerin FLD detektörde tespiti 360 nm (excitaiton) ve 430 nm (emission) dalga boyu aralığında yapılmıştır. Ayrıştırma için mobil faz olarak, saf su:Asetonitril:metanol (6:2:3/v:v:v) karışımı kullanılmış ve akış hızı 1 ml dakika⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Mobil faz karışımının 1 litresinde 120 potasyum bromid (KBr, Sigma-Aldrich) ve 350 µl nitrik asit (4 M) çözeltisi ilave edilmiştir. Mobil faz kullanılmadan önce 0.45 µm gözenekli PTFE

filtreden geçirilmiştir. Akış hızı 1 ml/dakika, fırın sıcaklığı 40 °C ve kolon basıncı <180 bar olarak ayarlanmıştır. Her bir örnek için iki defa olacak şekilde 100 µl kadar ekstrakt HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Miktar tayininde Aflatoksin standartları olarak B₁, B₂, G₁ ve G₂ aflatoksinlerinden her birini 250 ng ml⁻¹ oranında içeren ticari aflatoksin standardı (1000 ng ml⁻¹, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Metanol ile her bir aflatoksini 25 ng ml⁻¹ oranında içeren stok standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden de her bir 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 ve 5 ng ml⁻¹ konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon eğrişi oluşturulmuştur. HPLC'ye 100 µl enjekte edilip her bir konsantrasyona karşılık elde edilen pikin elektronik alanı belirlenerek 5 noktalı kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Doğrusal regresyon ile örneklerin aflatoksin içerikleri hesaplanmıştır ve sonuçlar ppb (µg kg⁻¹) olarak ifade edilmiştir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Aflatoksinlerin LOD, LOQ ve geri kazanım değerleri Çizelge 1'de gösterilmiştir. Analiz edilen *isot* örneklerin aflatoksin içerikleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Örneklerin 1 tanesinin hiç aflatoksin içermediği tespit edilmemiştir. Evlerde üretilen 20 *isot* örneğinin hiçbirisinde AFG₁ ve AFG₂ varlığı tespit edilmemiştir. Analiz edilen örneklerden 6 tanesinde AFB₂ saptanmış olup bunların miktarlarının 0.02 ile 1.09 ppb arasında olduğu belirlenmiştir. *Isot* örneklerinin AFB₁ içeriğinin 0.02 ile 8.45 ppb aralığında değiştiği saptanmıştır. *Isot* baharatlarının toplam aflatoksin içeriklerinin en az 0.02 ppb, en fazla 9.54 ppb ve ortalama 1.52 ppb olduğu tespit edilmiştir. Ardıç ve ark. (2008) 75 *isot* örneği üzerinde aflatoksin içeriğinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında 72 örneğin AFB₁ içerdiğini ve miktarlarının

0.11 ile 24.7 ppb arasında değiştiğini saptamışlardır. İnce tabaka kromatografisi ile 20 *isot* numunesinde aflatoxin araması yapılan bir araştırmada, sadece 1 örnekte aflatoxin (B+G) belirlenmiş olup değerinin 13.8 ppb olduğu bildirilmektedir (Erdoğan, 2004).

Çizelge 1. Uygulanan Aflatoxin Analiz Metoduna Ait Performans Göstergeleri

Table 1. The Performance Value of The Aflatoxin Analyses Method

Çeşit (Type)	LOD ^a (ppb)	LOQ ^b (ppb)	Geri Kazanım (Recovery) (%)
AFG ₂	0.062	0.210	82.06
AFG ₁	0.180	0.600	92.72
AFB ₁	0.158	0.530	93.59
AFB ₂	0.054	0.180	82.63

^aTespit Limiti (Limit of Detection, LOD)

^bTayin Limiti (Limit of Quantification, LOQ)

Çizelge 2. Analiz Edilen Örneklerin Aflatoxin İçerikleri (ppb)

Table 2. Aflatoxin Content of The Samples (ppb)

Örnek Samples	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁	Toplam AF Total AF
1	_1	_1	_1	0.05	0.05
2	-	-	-	0.42	0.42
3	-	-	-	0.05	0.05
4	-	-	-	0.03	0.03
5	-	-	-	0.11	0.11
6	-	-	-	0.02	0.02
7	-	-	0.02	1.28	1.30
8	-	-	1.09	8.45	9.54
9	-	-	-	0.33	0.33
10	-	-	0.16	6.72	6.88
11	-	-	-	_1	_1
12	-	-	0.22	2.35	2.57
13	-	-	-	0.02	0.02
14	-	-	-	0.33	0.33
15	-	-	-	0.22	0.22
16	-	-	-	0.52	0.52
17	-	-	0.18	2.95	3.13
18	-	-	-	0.72	0.72
19	-	-	0.29	3.35	3.64
20	-	-	-	0.57	0.57
En az	-	-	0.02	0.02	0.02
En fazla	-	-	1.09	8.45	9.54
Ortalama	-	-	0.10	1.42	1.52

¹Tespit edilemedi veya LOQ değerinin altındadır.

Genel olarak *isot*ların aflatoxin içeriklerinin çok düşük olmasına rağmen, bazı örneklerin yüksek içeriğe sahip olmasının kullanılan taze biber çeşit ve kalitesinden, üretim yeri ve şekline kaynaklandığı tahmin

edilmektedir. Yine, üretim zamanlarının farklı olması ve süresinin ailelere göre değişmesi bu farklılıkların oluşmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Kontrollü şartlarda üretilen kuru pul *isot* baharatında aflatoxin içeriklerin

çok düşük olduğu belirtilmektedir (Atasoy ve ark. 2016).

Aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin için izin verilen değerler Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (TGK, 2011) ve Avrupa Birliği gıda mevzuatında (EU, no 165/2010) 5 ppb ve 10 ppb olduğu bildirilmektedir (Anonymous, 2010; Anonim, 2011). Kuru pul *isot* örneklerinin %10'unun (8 ve 10 nolu örnek) AFB₁ açısından standartlara uymadığı tespit edilmiştir. Analiz edilen örneklerin hiç birisinin toplam AF açısından yasal limitleri aşmadığı belirlenmiştir. 75 *isot* örneği üzerinde yapılan bir çalışmada örneklerin %14.7'sinin AFB₁ açısından standartlara uymadığı belirtilmektedir (Ardıç ve ark. 2008).

Isot baharatı üretiminde kullanılan taze biberlerin su aktivitesinin yüksek ve *isotun* karakteristik rengi için uzun kurutma süresi uygulanmasına rağmen, kurutma sırasında su aktivitesinin hızlı bir şekilde düşmesi nedeniyle aflatoksin gelişimini sınırlandırıldığı belirtilmektedir. Ayrıca, üretim sırasında kullanılan beton zeminin güneşten dolayı biberlerin sıcaklığını yükseltmesi ve böylece kurutma işleminin daha etkin ve hızlı gerçekleşmesinin de su aktivitesinin hızlı düşmesinde ve aflatoksin gelişimini engellemede etkili olduğu bildirilmektedir (Atasoy ve ark. 2016). Kurutma sırasında biber baharatlarında oluşan aflatoksin miktarı, kurutulmuş biberin çeşidi ve su aktivitesi (Marin ve ark., 2009), kurutma sıcaklığı ve iklim koşulları (Cho ve ark., 2008) gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Aflatoksin oluşumunda kurutma süresinin de önemli bir etken olduğu ve bu sürenin uzamasına bağlı olarak aflatoksin oluşumunun da arttığı belirtilmektedir (Inan ve ark., 2007).

Sonuçlar

Baharatlarda gıda güvenliği açısından en önemli sorunu aflatoksin problemi

oluşturmaktadır. Aflatoksinler, tarımsal ürünlerin kurutulması sırasında uygun rutubet içeriğine bağlı olarak ürünlerde oluşabilmektedir. Nitekim analiz edilen *isot*lardan %10'unun AFB₁ açısından yasal limitlerin üstünde değer içerdiği saptanmıştır. Ancak belli kurallara dikkat edildiğinde Şanlıurfa'da yaygın olarak üretilen ve sevilerek tüketilen *isot*larda gıda güvenliğini sağlamak mümkündür. Bu nedenle "güvenilir ev *isotu*" üretebilmek için;

- Hasatı ve taşınması sırasında, kurutulması süresince biberlerin zedelenmesini neden olacak hareketlerden kaçınılmalıdır.

- Taze biberler büyük yığınlar halinde ve çuvallar içerisinde uzun süre bekletilmemelidir.

- Üretime başlamadan önce, zedelenmiş, parçalanmış özellikle de çürümüş taze biberlerin uzaklaştırılması gerekmektedir.

- Biberler mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılmalı ve ince serim yapılmalıdır.

- Biberlerin kurutulması sırasında toprakla temas kesinlikle engellenmeli, olabildiğince temiz ortamlarda (mesela damlarda), temiz bir bez üzerinde kurutulmalıdır.

- Kullanılan malzemelerin, özellikle polietilen torbaların, temiz, kuru ve zarar görmemiş olması gerekmektedir.

Kaynaklar

Anonim, 2011. Türk Gıda Kodeksi (TGK) Bulaşanlar Yönetmeliği, *T.C. Resmi Gazete*, 28157(3), 29 Aralık 2011.

Anonim, 2015. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkis/el.zul>. Erişim tarihi: 10.09.2016.

Anonymous, 2000. Aflatoxin B₁ and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste, and Paprika Powder. AOAC Official Method 999.07.

Anonymous, 2010. Commission Regulation (EU) No 165/2010, Amending Regulation (EC) No 1881/2006 Setting Maximum Levels for

- Certain Contaminants In Foodstuffs as Regards Aflatoxins. Official Journal of The European Union, 53, 27.02.2010
- Anonymous, 2013. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Erişim tarihi: 29.10.2016.
- Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M., Durmaz, H., 2008. Determination of Aflatoxin B1 Levels in Deep-red Ground Pepper (*isot*) Using Immunoaffinity Column Combined with ELISA. Food and Chemical Toxicology, 46:1596–1599.
- Atasoy, A. F., Aydoğdu, M. H., Korkmaz, A., Kara, E., 2016. Urfa İsoot Biberinin Özelliklerinin Belirlenerek Pazar Potansiyelinin Artırılması. Kalkınma bakanlığı GAP Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı, Tarımsal Araştırma Destekleri Proje Sonuç Raporu, 270s.
- Cho, S-H., Lee, C-H., Jang, M-R., Son, Y-W., Lee, S-M., Choi, I-S., Kim, S-H., Kim, D-B., 2008. Aflatoxins Contamination in Spices and Processed Spice Products Commercialized in Korea. Food Chemistry, 107:1283-1288.
- Erdoğan, A., 2004. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. Chemosphere, 56: 321-325.
- Inan, F., Pala, M., Doymaz, I., 2007. Use of Ozone in Detoxification of Aflatoxin B1 in Red Pepper. Journal of Stored Products Research, 43: 425–429.
- Marin, S., Colom, C., Sanchis, V., Ramos, A., J., 2009. Modelling of Growth of Aflatoxigenic A. Flavus Isolates from Red Chilli Powder as a Function of Water Availability. International Journal of Food Microbiology, 128: 491–496.
- Vengaiah, P. C., Pandey, J. P., 2007. Dehydration Kinetics of Bell pepper (*Capsicum annum* L.). Journal of Food Engineering, 81: 282–286.