

Ziba GÜLEY¹
Harun Raşit UYSAL²
Sevda KILIÇ²

Doğal Yolla Küflendirilen Bazı Geleneksel Peynirlerde Aflatoksin M₁, Aflatoksin B₁ ve Aflatoksin Üreten Küflerin Varlığının Araştırılması³

Investigation of the presence of aflatoxin M₁, aflatoxin B₁ and aflatoxigenic moulds in some naturally mould-ripened traditional cheeses

¹ Ege Üniversitesi Ödemiş Meslek Yüksekokulu,
Süt ve Ürünleri Teknolojisi Programı, Ödemiş, İzmir
e-posta: ziba.guley@ege.edu.tr

² Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi
Bölümü, 35100 Bornova, İzmir

³ İlk Yazarın Doktora Tezinin bir kısmından özetlenmiştir

Alınış (Received): 23.10.2012 Kabul tarihi (Accepted): 06.02.2013

Anahtar Sözcükler:

Mikotoksinler, Aflatoksin M₁, Aflatoksin B₁,
Küflü Peynir, Aflatoksin Üreten Küfler

Key Words:

Mycotoxins, Aflatoxin M₁, Aflatoxin B₁,
Mouldy Cheese, Aflatoxigenic Moulds

ÖZET

Bu çalışmada, Konya'daki üreticilerden ve pazar yerlerinden temin edilen, çoğu Konya küflü peyniri olmak üzere toplam 11 adet küflü peynir örneği hem aflatoxin M₁ ve aflatoxin B₁ varlığı hem de aflatoxin üreten küflerin varlığı açısından incelenmiştir. Aflatoksin analizleri immunoafinite kolonla temizleme ve floresan dedektörlü HPLC ile yapılmıştır. Yüksek yağ oranı ve yoğun küf gelişimi nedeniyle immunoafinite kolonla temizleme aşamasında sorun yaşanan 1 örnek dışında, analizi yapılan 10 örneğin hiçbirinde tespit edilebilir düzeyde aflatoxin B₁ ve aflatoxin M₁'e rastlanmamıştır. Örneklerden izole edilen toplam 27 adet küfün tamamının *Penicillium* genusuna ait türler olduğu belirlenmiştir.

ABSTRACT

In this study, 11 mouldy cheese samples which most of them were Konya küflü cheese, collected from producers and market places in Konya province, were investigated for the presence of aflatoxin M₁, aflatoxin B₁ and aflatoxigenic moulds. Aflatoxin analysis were performed by using immunoaffinity column clean-up and HPLC with fluorescence detection. Except 1 sample that failed during immunoaffinity column clean-up step, because of its high fat content and excessive mould growth, aflatoxin M₁ and aflatoxin B₁ were not detected in 10 samples that were analysed. All of 27 mould isolates from 11 samples were identified as *Penicillium* spp.

GİRİŞ

Mikotoksinler, gıdalarda ve yemlerde gelişen küfler tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Günümüzde 300 civarında mikotoksin izole edilip tanımlanmış olmasına rağmen, gıda ve yemlerde bunların yaklaşık 20 tanesine sıkça ve önemli miktarlarda rastlanmaktadır (Smith, 2001). Bunlar içinde aflatoxinler yalnızca bir grubu oluşturmaktadır. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (Line et al., 1994), *Aspergillus nomius* (Kurtzman et al., 1987; Gourama and Bullerman, 1995; Gourama and Bullerman, 1995a) ve *Aspergillus flavus*'un iki alt suşu

A. flavus var. *columnaris* ile *A. parasiticus* var. *globosus* (Uyulaşer vd., 2005) tarafından üretilen aflatoxinler, toksisitesi yüksek olan mikotoksinler arasında yer almaktadır. Bunların karsinojenik, teratojenik ve mutajenik özellikleri ortaya konmuştur (Barnes, 1970; Eaton and Gallagher, 1994; Henry et al., 1999). Aflatoksinlerin başlıcaları; B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂'dir. Bunlardan ilk dördü değişik oranlarda olmak üzere genellikle birlikte bulunurlar. İçlerinde yaygın ve en toksik olanı aflatoxin B₁ dir. Aflatoksin B₁ (AFB₁) birçok hayvan türünde en etkili hepatokarsinojendir. Asya ve Afrika'daki birçok ülkede aflatoxinle kontamine olmuş yiyeceklerin tüketimi ile karaciğer kanserinin

görülme sıklığındaki artış arasındaki pozitif korelasyon nedeniyle Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü (IARC) tarafından grup 1A karsinogenler sınıfına dahil edilmiştir (IARC, 1993).

Tahıllar (buğday, çavdar, arpa, yulaf pirinç), kuruyemişler (yerfıstığı, fındık, antepfıstığı, badem, ceviz), baharatlar (kırmızı toz biber, pul biber, karabiber), kuru meyveler (incir) ile yumurta, süt ve ürünleri gibi hayvansal kaynaklı gıdalar aflatoksinlerin en fazla bulunduğu ürünlerdir. (Coker, 1984; Karagözlü ve Karagözlü, 2000; Uylaşer vd., 2005).

Aflatoksinler süt ürünlerine iki farklı yoldan bulaşmaktadır. AFB₁ ile kontamine yemlerin laktasyon dönemindeki süt hayvanları tarafından tüketilmesi sonrasında, AFB₁ karaciğerde değişime uğrayarak aflatoksin M₁ (AFM₁)'e dönüşmekte ve meme bezlerinden süte salgılanmaktadır. (Bakırcı, 2001; Martins and Martins, 2004; Fink-Gremmels, 2008). AFM₁ oldukça stabildir ve pastörizasyon gibi ısı işlem uygulamalarından etkilenmemektedir (Tekinşen ve Uçar, 2008). Bu nedenle toksinli süttten üretilen süt ürünlerinde, ürünün yapısına bağlı olarak çeşitli oranlarda bulunmaktadır.

Peynir üretimi sırasında enzimatik koagülasyonla süttün pıhtılaşmasının toksine etkisi olmamaktadır. Ancak, pıhtılaşmadan sonraki safhada toksinin peynirde kalma ve peyniraltı suyuna geçme oranlarıyla ilgili çok farklı bulgular mevcuttur. Araştırmacıların bir kısmı AFM₁'in yarısının hatta yarısından fazlasının peynir suyuna geçtiğini bildirirken diğer bir kısmı, toksinin çoğunun pıhtıda kaldığını bildirmektedir (Govaris et al., 2001; Galvano et al., 1996). Yumuşak peynirlerde, peynirin üretildiği süttekinden 2.5-3.5 kat, sert peynirlerde ise 3.5-5.8 kat daha yüksektir (Dragacci et al., 1995). Govaris et al. (2001), suni olarak AFM₁ ile kontamine ettikleri süttten ürettikleri teleme peynirlerinde toksin konsantrasyonunun süttekinin 3.9 ile 4.4 katı olduğunu tespit etmişlerdir.

Süt ürünlerinde özellikle de peynirde olgunlaştırma ve depolama sürecinde küf gelişimi meydana gelmektedir. Ayrıca, Türkiye'nin çeşitli yörelerinde küflü tulum peyniri, küflü çökelek gibi doğal olarak küflenmiş süt ürünleri de tüketilmektedir. Bu ürünlerin yapımında herhangi bir saf kültür kullanılmadığından, üreyen küfler arasında aflatoksin üretenler de bulunabilmektedir (Evren, 1999). Yapılan birçok çalışmada çeşitli peynirlerden *Aspergillus flavus*'un aflatoksin üreten suşları izole edilmiştir. Ayrıca peynirlerde aflatoksin oluşumu tespit edilmiştir. (Bullerman and Olivigni, 1974; Bullerman, 1976; Jordano et al., 1989; Barrios et al., 1997).

Bu çalışmada, halk arasında faydalı olduğuna inanılan doğal yolla küflendirilmiş peynirlerin, aflatoksin yönünden bir risk taşıyıp taşımadıklarının tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmanın materyalini Konya ilindeki üreticilerden ve pazar yerlerinden toplanan küflü peynirler oluşturmuştur. 9 tanesi, Konya'da geleneksel yöntemlerle, kontrolsüz koşullarda küflendirilmek suretiyle üretilen ve yaygın olarak tüketilen Konya Küflü peyniri, 1 tanesi Küflü Kars Eski Kaşarı, 1 tanesi de dış yüzeyi küflü, Deri Tulum peyniri olmak üzere toplam 11 adet peynir kullanılmıştır.

Peynir örneklerinden aflatoksin ekstraksiyonunda kullanılan immunoaffinite kolonlar ile aflatoksin analizlerinde kullanılan aflatoksin M₁ ve "toplam aflatoksin" (B₁, B₂, G₁, G₂) standartları R-Biopharm Rhône Ltd. Türkiye distribütörü Sincer Ltd.'den temin edilmiştir.

Yöntem

Peynir örneklerinden aflatoksin M₁ ve aflatoksin B₁ ekstraksiyonu:

Dragacci et al. (1995)'in, peynirden AFM₁ ekstraksiyonu için geliştirdikleri metod, araştırmamızda, peynir örneklerinden hem AFM₁ hem de AFB₁ ekstraksiyonu amacıyla kullanılmıştır. AFB₁ ekstraksiyonunda kullanılan immunoaffinite kolonların aynı zamanda aflatoksin B₂, G₁, G₂'yi de tutma özelliği bu dört tip aflatoksinin varlığının bir arada incelenebilmesini sağlamıştır.

İlk yapılan geri kazanım çalışmalarında % 40-50 gibi düşük geri kazanım elde edilmesi nedeniyle ekstraksiyon yönteminin bazı kısımlarında modifikasyonlar yapılarak geri kazanım çalışmaları tekrarlanmıştır. Yapılan modifikasyon neticesinde daha iyi geri kazanım elde edilmesi nedeniyle yöntem aşağıda anlatıldığı şekliyle kullanılmıştır. Yöntemin geri kazanım oranı aflatoksin M₁ için ortalama %60, aflatoksin B₁ için ortalama %70, B₂ ve G₁ için ortalama %78 ve G₂ için ortalama %65.7 olarak belirlenmiştir. Yöntemin dedeksiyon limiti ise aflatoksin M₁ için 0.025ng/g peynir (0.25 ng/10 g peynir) ve aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ için (her biri için ayrı ayrı) 0.025 ng/10 g peynir olarak tespit edilmiştir. Buna göre

(A). 10 gr peynir üzerine 5-10 g Celite 545 (Merck 02693) ve 80 ml diklorometan eklenerek Waring (Waring Products Division, USA) marka blendırda 2 dak. süre ile karıştırılmıştır. 40 ml daha diklorometan

ilave edilip birkaç saniye daha karıştırıldıktan sonra Whatman No: 4 filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen süzöntünün hacmi ölçölüp sonuçların hesaplanmasında kullanmak amacıyla kaydedilmiştir. Daha sonra, süzöntü şilifli balona alınmış ve Heidolph (Heidolph, Germany) marka döner buharlaştırıcıda, 35-40°C'de, buharlaştırılmıştır. Kalıntı 1ml metanol ve 30ml saf su eklenerek çözülmüştür. Yağı uzaklaştırmak amacıyla üzerine 50 ml n-hegzan eklenmiş ve çözelti ayırma hunisine aktarılmıştır. İyice çalkalandıktan sonra faz ayrılması için bir süre beklenmiştir. Alttaki sulu faz bir mezüre alınmıştır. Ayırma hunisi iki kez daha 10'ar ml su ile yıkanarak sulu fazlar toplanmıştır. Toplanan sulu fazlar birleştirilmiş ve immunoaffinite kolondan, üretici firmanın (R-Biopharm Rhône Ltd., 2003) önerdiği kullanma talimatları doğrultusunda geçirilerek ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada izlenen yol, ekstraksiyonu yapılan toksine, dolayısıyla kullanılan kolona göre farklılık göstermiştir.

(B) Aflatoksin M₁ ekstraksiyonunda; AFM1'e özel monoklonal antikorlar içeren Aflaprep® M immunoaffinite kolonlar (R-Biopharm Rhône Ltd. P04) kullanılmıştır. Buna göre; mezür içeriğinin tamamı (yaklaşık 48 ml) 2-3 ml/dak. olacak şekilde kolondan geçirilmiştir. Daha sonra, kirliliklerin giderilmesi amacıyla kolon 10 ml saf su ile yıkanmıştır. Kolonda tutunan aflatoksin M₁, kolondan, önce 1.25 ml metanol:asetonitril (20:30) karışımı, ardından 1.25 ml saf su geçirilmek suretiyle örnek şişesine toplanmıştır. Elde edilen toplam 2.5 ml'lik ekstrakttan HPLC cihazına 100 µl enjekte edilerek toksin miktarı ölçölmüştür.

(C) Aflatoksin B₁, ekstraksiyonu için aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂'ye özel monoklonal antikorlar içeren Aflaprep® immunoaffinite kolonlar (R-Biopharm Rhône Ltd. P07) kullanılmıştır. Buna göre; mezür içeriğinin tamamı (yaklaşık 48ml) 2-3 ml/dak. olacak şekilde kolondan geçirilmiştir. Daha sonra, kirliliklerin giderilmesi amacıyla kolon 10 ml saf su ile yıkanmıştır. Kolonda tutunan aflatoksinler, kolondan, önce 1ml metanol, ardından 1 ml saf su geçirilmek suretiyle örnek şişesine toplanmıştır. Elde edilen toplam 2 ml'lik ekstrakttan HPLC cihazına 100 µl enjekte edilerek toksin miktarı ölçölmüştür.

HPLC (Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi) analizleri

Aflatoksin analizleri G1322A model Degaser, G1311A model Pompa, G1316A model Colcom Kolon fırını, G1321A model Floresan dedektör ve G1328A model Manuel enjeksiyon ünitelerinden oluşan Hewlett Packard Agilent 1100 series marka HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

HPLC Koşulları

Aflatoksin M₁ analizleri için:

Kolon: C18 Hypersil ODS 5µm, 250 x 4.6 mm

Kolon Sıcaklığı: 25°C

Mobil Faz: Su:Asetonitril:MeOH(Metanol)

(50:30:20 v/v/v)

Akış Hızı: 1 ml/dak.

Floresan Dedektör: Excitation 360 nm,

Emission 430 nm

Enjeksiyon Hacmi: 100 µl (Manuel enjeksiyon)

Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ analizleri için:

Kolon: C18 Hypersil ODS 5µm 250 x 4.6 mm

Kolon Sıcaklığı: 40 °C

Mobil Faz: Su:Metanol:Asetonitril

(62/22/16 v/v/v).

Kolon sonrası türevlendirme için mobil fazın 1000 ml'sine 350 µl 4M HNO₃ ve 0.119 g Potasyum bromür (KBr) (Riedel-de Haën 02110) ilave edilmiştir.

Akış Hızı: 1 ml/dak.

Floresan Dedektör: Excitation 362 nm,

Emission 455 nm (G₁, G₂ için)

425 nm (B₁, B₂ için)

Enjeksiyon Hacmi: 100 µl (Manuel enjeksiyon)

Aflatoksin B₁ ve G₁'in UV ışık altındaki doğal floresansını arttırmak ve daha kolay, daha hassas bir şekilde tespit edilmelerini sağlamak için kolon sonrası türevlendirme uygulanmış, bu amaçla Kobra Cell (R-Biopharm Rhône Ltd., product no: K01) kullanılmıştır.

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

R-Biopharm Rhône Ltd.'den temin edilen aflatoksin M₁ standardı (Ana Stok, AS) asetonitril içinde 1000 ng/ml (ppb) konsantrasyonda aflatoksin M₁ içeren 6 ml'lik ambalajdan oluşmaktadır. Ana Stoktan 100 µl alınıp asetonitril ile 10 ml'ye tamamlanmış ve 10 ng/ml konsantrasyondaki ara stok (ARS) standart çözeltisi elde edilmiştir. Bu ara stoktan, mobil fazla seyreltmek suretiyle 0.125 ng/ml, 0.25 ng/ml ve 0.5 ng/ml'lik çalışma standartları hazırlanmıştır.

Toplam Aflatoksin (B₁, B₂, G₁, G₂) Standardı (R-Biopharm Rhône Ltd., P22)(Ana Stok) (AS) metanol içinde toplam 1000 ng/ml (250 ng B₁, 250 ng B₂, 250 ng G₁, 250 ng G₂) konsantrasyonda aflatoksin karışımı içeren 6 ml'lik ambalajdan oluşmaktadır. Buradan 400 µl alınarak, metanol ile 10 ml'ye tamamlanmış ve 40ng/ml konsantras-yondaki ara stok (ARS) standart çözeltisi elde edilmiştir. Bu ara stok çözeltisi

kullanılarak, 0.5 ng/ml'lik (0.125 ng/mlx4), 1 ng/ml'lik (0.25 ng/mlx4), 2 ng/ml (0.5 ng/mlx4), 5 ng/ml'lik (1.25 ng/mlx4) ve 10 ng/ml'lik (2.5 ng/mlx4) çalışma standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Peynir Örneklerinden Küflerin İzolasyonu ve Genus Düzeyinde Tanımlanması

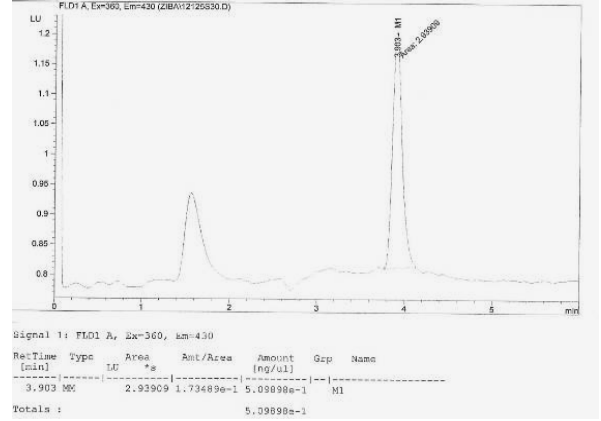
Küflü peynir örneklerinin her birinden steril poşetlere 10'ar gram tartılarak üzerlerine 90'ar ml ringer (Merck 15525) solüsyonu ilave edilmiştir. Colworth Stomacher 400 (BA6021 model, Seward Laboratory, U.K.) karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar parçalanmaları sağlanmıştır. Böylece 10^{-1} lik dilüsyonlar elde edilmiştir. Daha sonra 9'ar ml ringer solüsyonu içeren tüpler kullanılmak suretiyle 10^{-6} 'ya kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. "Dökme Plaka Yöntemi" kullanılarak 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} 'lik dilüsyonlardan Rose Bengal Chloramphenicol agara (Merck 1.00467) ekim yapılmıştır. 25-26°C'de 5-7 gün inkübasyondan sonra, petrilerdeki farklı görünüşe sahip küf kolonileri tesadüfi olarak seçilerek Malt Extract yatık agara (Merck 1.05398) aşılmalıdır. Böylece izolasyon tamamlanmıştır. Yine aynı sıcaklık ve sürede inkübasyona tabi tutularak geliştirilen saf izolatlar identifikasyona kadar buzdolabında saklanmıştır.

Aflatoksin üreten *Aspergillus* türlerinin olup olmadığını doğrudan belirlemek amacıyla ayrıca Chloramphenicol Selective Supplement (Fluka 29231) ilave edilmiş *Aspergillus* Differentiation Agar'a (Fluka BioChemika 17121) da ekim yapılmıştır.

Genus düzeyinde tanımlama için, küf izolatlarından Malt Extract Agar'a (Merck 05398), iğne öze kullanılarak üç nokta ekim yapılmıştır. 25-26°C de 5 gün inkübasyondan sonra, gelişen küf kolonileri 10x10 büyütme düzeyinde, Prior marka mikroskop altında incelenmiştir. İdentifikasyon, Raper and Fennel (1965) ve Raper and Thom (1968), Pitt (2000) ve Klich (2002)'e göre yapılmıştır.

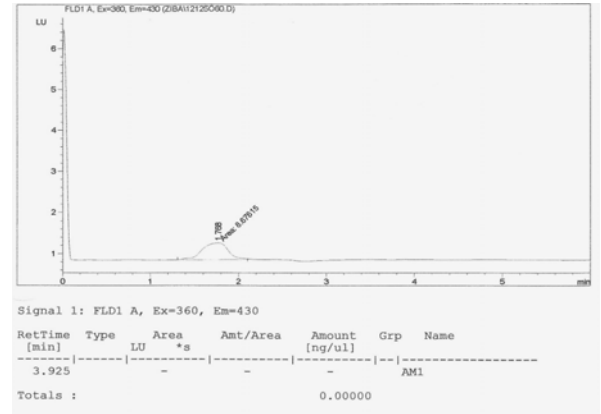
ARAŞTIRMA BULGULARI

Yüksek yağ oranı ve yoğun küf gelişimi nedeniyle immunoaffinite kolonla temizleme aşamasında sorun yaşanan Deri Tulum peyniri örneği hariç incelenen 10 örneğin hiçbirinde tespit edilebilir düzeyde AFM₁'e rastlanmamıştır. Şekil 1'de AFM₁ standardına ait kromatogram, Şekil 2'de ise örneklerden bazılarının ait kromatogramları görülmektedir.

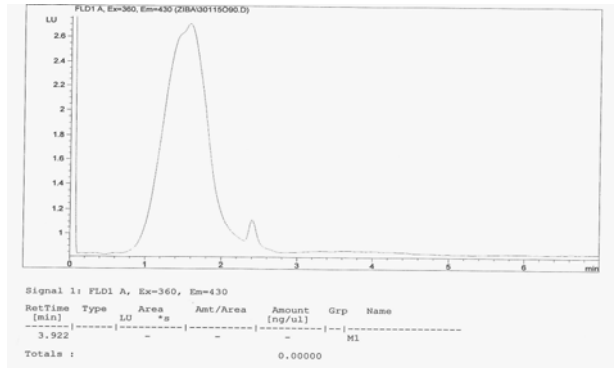


Şekil 1. AFM₁ standardına ait kromatogram (0.5 ng/ml)

Figure 1. HPLC Chromatogram of AFM₁ standard solution



(A)

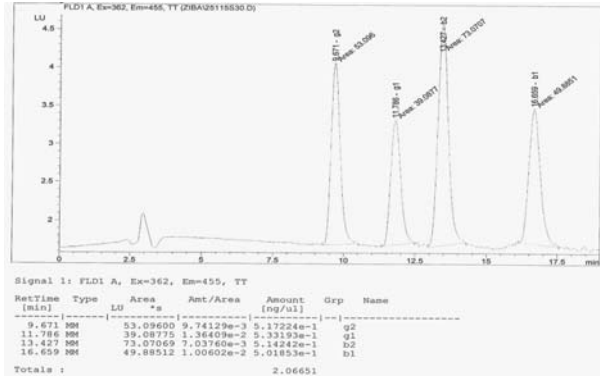


(B)

Şekil 2. Peynir Örneklerine Ait Kromatogramlar

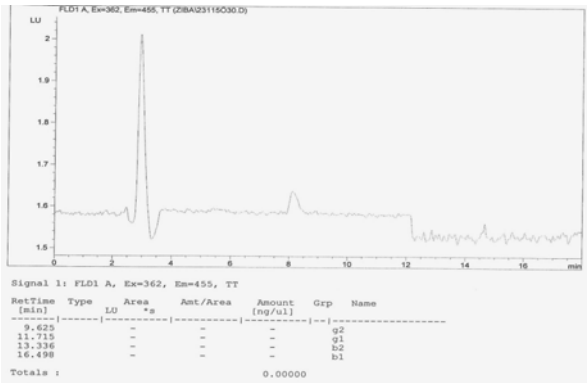
Figure 2. HPLC Chromatograms of Cheese Samples

Şekil 3'de Toplam aflatoksin (B₁, B₂, G₁, G₂) standardına ait kromatogram, Şekil 4'de ise 'toplam aflatoksin' analizi sonucunda elde edilen, örneklere ait kromatogramlardan bazıları görülmektedir. İncelenen 10 örneğin hiçbirinde tespit edilebilir düzeyde aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂'ye rastlanmamıştır.

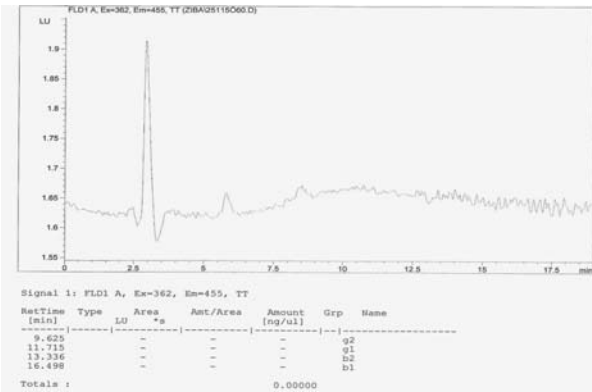


Şekil 3. Toplam aflatoksin (B₁, B₂, G₁, G₂) standardına ait kromatogram (0.5ng/ml x 4)

Figure 3. HPLC chromatogram of total aflatoxin (B₁, B₂, G₁, G₂) standard solution



(A)



(B)

Şekil 4. Peynir Örneklerine Ait Kromatogramlar

Figure 4 HPLC Chromatograms of Cheese Samples

Genus düzeyinde tanımlama sonucunda, peynir örneklerinden izole edilen toplam 27 adet küf izolatının tamamının *Penicillium* genusuna ait küf türleri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Aspergillus* Differentiation Agar'a (Fluka 17121) yapılan ekimlerin sonucunda da toksin üreten *Aspergillus* türleri tespit edilmemiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Peynirde AFM₁ varlığı ile ilgili çok farklı literatür bulgularına rastlanmaktadır. Sarimehmetoğlu vd. (2004) inceledikleri 400 adet peynir örneğinin 327'sinde AFM₁ tespit ettiklerini, bunların 110 tanesinde miktarın yasal limitin üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Tekinşen ve Uçar (2008), 100 adet krem peynir örneğinin 99'unda AFM₁ belirlemişler ve bunlardan %18'inin limit değeri aştığını gözlemişlerdir. Ayçiçek vd. (2005), Ankara'daki satış yerlerinden topladıkları 49 adet krem peynir örneğinin 44'ünde, 94 adet Beyaz peynir örneğinin 86'sında ve 53 adet Kaşar peyniri örneğinin 47'sinde AFM₁ saptamışlardır. 12 adet Beyaz peynir ve 7 adet Kaşar peynirindeki toksin miktarının ise Türk Gıda Kodeksi tarafından bildirilen kabul edilebilir değerin üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Gürbüz vd. (1999), Konya'da, 240 peynir numunesinde AFM₁ tespit edememişlerdir. Karaioannoglou et al. (1989), Yunanistan'daki Feta ve Teleme peynirlerinde, Tabata et al (1993) ile Taguchi et al. (1995) de Japonya'daki ithal peynirlerde yaptıkları incelemelerde AFM₁'e rastlamamışlardır. Elde ettiğimiz sonuçlar Gürbüz vd. (1999), Karaioannoglou et al. (1989), Tabata et al (1993) ve Taguchi et al. (1995)'in bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Bilindiği gibi, AFM₁ laktasyondaki hayvanların AFB₁ ile kontamine yemleri tüketmeleri sonucu sütte bulunmaktadır. Soğukta saklama, dondurma, ısıya tabi tutma, fermentasyon, konsantre etme, kurutma ve pastörizasyon gibi işlemler genellikle miktarında değişiklik oluşturmamakta, dolayısıyla süt ürünlerinde ve peynirde de bulunmaktadır (Oruç, 2003).

Toksinin yemden süte geçiş düzeyinde, hayvanın beslenme şekli, toksinli yem tüketme miktarı, sindirim derecesi, hayvanın sağlığı, karaciğer biyotransformasyon kapasitesi ve süt miktarı gibi besinsel ve fizyolojik faktörler etkili olmaktadır. Dolayısıyla, aflatoksinin absorpsiyon oranı ve süte salgılanması hayvandan hayvana, laktasyon dönemine ve bir sağımdan diğerine değişiklik göstermektedir (Fink-Gremmels, 2008). Birçok araştırmacıya göre, AFM₁ varlığında mevsimsel bir etki de söz konusudur. Bazı araştırmacılar, soğuk mevsimlerde sıcak mevsimlere nazaran daha sık AFM₁'e rastlandığını bildirmektedirler. Buna neden olarak da, kış aylarında ineklerin fazlaca silaj yemi ve depolanmış yemlerle, yaz ve bahar aylarında ise merada otlamak suretiyle besleniyor olmalarını göstermektedirler (Blanc and Karleskind, 1981; Blanco et al., 1988; Galvano et al., 1996). Bachner et al. (1988), Almanya'nın çeşitli bölgelerinde yapılan bir çalışmada, farklı zirai

uygulamalar ve yemleme şekillerinin aflatoksin M₁ varlığını etkilediğini tespit etmişlerdir (Galvano et al., 1996). Özkaya vd., (2003), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden temin ettikleri toplam 543 çiğ süt örneğinde AFM₁ mevcudiyeti açısından bölgelere göre farklılık olduğunu, Bursa, Erzurum, Kars, Kastamonu, Samsun ve Trabzon'dan alınan örneklerin hiçbirinde AFM₁'e rastlanmadığını bildirmişlerdir. Çoksöyler vd. (2003), Van'ın 10 ilçesine ait köylerden 52'si yaz ve 52'si kış döneminde olmak üzere topladıkları toplam 104 adet çiğ inek sütü örneğinin 96'sında AFM₁ tespit etmezken bunların 8'inde maksimum izin verilebilir limitin altında AFM₁ belirlemişlerdir. Araştırmacılar, her iki dönemde de sütlerde aflatoksin'e rastlama sıklığının ve bulunan düzeylerin oldukça düşük olduğunu, ayrıca, elde edilen bulguların yörede hayvan besleme yöntemi ile paralellik gösterdiğini ifade etmişlerdir. Örneklerin alındığı bölgelerdeki hayvanların yaz döneminde merada otladığını ahırda hiç beslenmediklerini, kış döneminde ise kurutulmuş ot ve kepek ile beslendiklerini belirtmişlerdir.

İncelediğimiz örneklerden 9'u Konya Küflü peyniri 1 tanesi de Kars Eski Kaşar Peyniri idi. Konya Küflü peyniri, Ağrı, Iğdır ve Ağrı'ya bağlı Taşlıçay bölgelerinde üretilip 55-60kg'lık torbalara basılmış halde Konya'ya gönderilen peynirlerin küflendirilmesi sonucunda elde edilen bir peynir çeşididir. Örnekler Aralık ayı başında toplanmıştır. Üreticiler bu gelen peyniri 40-45 gün soğuk hava deposunda beklettikten sonra Eylül sonu Ekim 15'i gibi küflendirmeye başladıklarını bildirmekteydiler. Buna göre esas peynirin üretimi yaz aylarına denk gelmektedir. Bu da analiz ettiğimiz peynir örneklerinde aflatoksin M₁ belirlenememesinin nedenini kısmen açıklamaktadır. Çoksöyler vd. (2003)'nin bulguları da bu sonucu destekler niteliktedir. Ayrıca peynirlerin üretildiği bölge açısından da ele alacak olursak Özkaya vd. (2003)'nin elde ettikleri sonuçlar da bulgularımızla uyum göstermektedir.

Literatürde daha çok inek sütüyle ilgili veriler mevcuttur. Oysa, AFM₁'in koyun, keçi, bufalo ve deve sütlerinde de bulunabildiği çok iyi bilinmektedir (Galvano et al., 1996). İspanya'nın güneyinde, marketlerde satışa sunulan, 9'u taze, 9 tanesi yarı olgunlaştırılmış, 17 tanesi de olgunlaştırılmış, inek, koyun, keçi ve bunların karışımından üretilmiş toplam 35 adet peynir örneğinin 16 tanesinde 20 ile 200 ng/g arasında değişen miktarlarda AFM₁ tespit edilmiştir (Barrios et al., 1996). Buna göre, incelediğimiz örneklerde AFM₁ tespit edilememesinde peynirin koyun sütünden üretilmiş olmasının etkisi yoktur.

Süt ürünlerinde aflatoksin M₁, bu toksinle kontamine olmuş sütlerin üretimde kullanılması sonucu bulunurken, aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ancak bu toksini oluşturan küflerin üründe gelişmesi ile görülebilmektedir.

Aflatoksin oluşumunda substrat çeşidi ile birlikte depolama sıcaklığının çok büyük etkisi vardır. Yumuşak ve sert peynirlerde, küf gelişimi ve/veya aflatoksin üretimi için gerekli en düşük sıcaklık derecesi suşa ve peynir çeşidine göre farklılık göstermektedir (Karaioannoglou, 1990). Karaioannoglou (1990), yüzeyine *A. flavus* (CMI 120920) sporları inokule ettiği Kefalotyri peynirinde, 13°C'nin altında küf gelişimi olmadığını, 13°C'de çok zayıf, 26°C'de ise yoğun gelişme olduğunu gözlemlemiştir. Araştırmacı, 26°C'de depolanan peynirlerde sadece yüzeyden 8mm derinliğe kadar aflatoksin B₁ ve G₁ tespit ettiğini, örneklerdeki AFB₁ miktarının 22-40 ng/g arasında AFG₁ miktarının ise 33-64 ng/g arasında değiştiğini bildirmiştir. Corbion and Fremy (1978), Brick peynirinde, 7.2°C'de, *A. flavus* CMI ve *A. parasiticus* CMI 96429'un her ikisinin de gelişebildiklerini fakat sadece *A. parasiticus* CMI 96429'un 12.8°C'de aflatoksin üretebildiğini tespit etmişlerdir. Oldham et al. (1971), *A. flavus* ATCC 15517'nin, Cheddar peynirinde, 4.4°C ve 7.2°C'de gelişme göstermezken 25°C'de geliştiğini ve aflatoksin ürettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda küf sporları peynirlere araştırmacılar tarafından inoküle edilerek toksin oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Peynirlerin küf mikroflorasını belirleyen Bullerman (1976), Aran vd. (1986), Barrios et al (1997), peynirlerden toksijenik *Aspergillus flavus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ancak bu peynirlerde aflatoksin olup olmadığını belirlememişlerdir. Konya Küflü peynirinin üretimine baktığımızda peynirin küflendirilmesi 18-23°C arasında ideal 22-23 °C'de (kimi üreticilere göre 25-30 °C'de) gerçekleştirilmektedir. Karaioannoglou (1990), Corbion and Fremy (1978), Oldham et al. (1971)'in bulgularına baktığımızda bu sıcaklık dereceleri *Aspergillus*ların da gelişimi ve toksin üretimine imkan sağlayacak derecelerdir. Ancak çalışmamızda, peynir örneklerinden izole edilen küflerin genus düzeyinde tanımlamasında, *Aspergillus* genusuna ait türlere rastlanmamıştır. Bu sonuç peynir örneklerinde aflatoksin tespit edilememesinin sebebini açıklamaktadır.

Peynirde küf gelişiminde sıcaklığın yanı sıra ortamdaki diğer birçok faktör de rol oynamaktadır. Metin (1996), de küf gelişimine sıcaklığın ve birçok fizyolojik faktörün etkisi olduğunu, hatta *Aspergillus*ların gelişiminin diğer küfler tarafından

engellendiği için peynirde aflatoksin üretmediklerini bildirmiştir. Araştırmacı, bunun bir rekabetten ileri geldiğini de belirtmiştir.

Bulgularımıza benzer şekilde Kıvanç (1990) da, perakende satış yerlerinden temin ettiği 25 adet taze peynir örneği ile salamura Beyaz peynirinde *A. flavus* tespit edemediğini, ayrıca örneklerin hiçbirinde aflatoksine de rastlamadığını bildirmiştir.

Erdoğan vd.(2000), Çoksöyler ve Köşker (1980)'e atfen, Isparta, Konya ve Mersin'den toplanan 4 adet küflü Tulum peynirinden izole edilen 12 küf izolatının hepsinin *P. roqueforti* olduğunu, *A. flavus* ve *A. parasiticus* izole edilemediğini bildirmişlerdir. Aran (1993), da Tulum ve Civil peynirlerinden *A. flavus* ve *A. parasiticus* izole edemediğini ifade etmiştir.

Araştırmamıza konu olan küflü peynirler kontrolsüz koşullarda küflendirilmektedir ve bilindiği gibi bazı *Penicillium* türleri de mikotoksin oluşturabilmektedirler. Halk arasında yaygın olan bir anlayışa göre mavi-yeşil küfler peynire aroma katmakta ayrıca bazı hastalıklara karşı direnç sağlamaktadır. Oysa bugün starter kültür olarak kullanılan küflerin bile toksin oluşturabileceği bildirilmektedir. Nitekim *Penicillium roqueforti*'nin bazı suşlarının PR toksin, roquefortin, izofomigaklavin, penisillik asit ve patulin gibi mikotoksinleri

oluşturdukları bildirilmiştir (Erdoğan vd., 2000). Wei Yun et al. (1988), çeşitli peynirlerden izole ettikleri 176 *Penicillium roqueforti* suşunun % 12' sinin patulin ve penisillik asit ürettiklerini tespit etmişlerdir. Erdoğan vd. (2002), Küflü tulum peynirlerinden izole ettikleri *Penicillium roqueforti* suşlarının tamamının toksin üretme potansiyeli olan suşlar olduklarını ve patulin, penisillik asit, PR toksin ve roquefortin toksinlerini ürettiklerini belirlemişlerdir. Bu toksinlerden patulin ve penisillik asit kanserojen olup diğerleri ise doku ve organlarda önemli lezyonlar oluşturmaktadır (Erdoğan vd., 2000). Yapılan bu çalışmalarda küf izolatlarının toksin oluşturma yetenekleri besiyeri ortamında tespit edilmiştir. Bazı kaynaklarda (Üçüncü, 2004a), bu toksinlerin peynirlerde aslında çok düşük miktarlarda olduğu, kısa süre sonra da parçalanıp ortadan kalktığı bildirilmektedir. Ancak, halk sağlığı açısından, ülkemizde üretilen küflü peynirlerin, bu toksinlerin varlığı yönünden de incelenmesi ileriki çalışmaların konusunu oluşturmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK (105 O 150 no'lu proje) ve E.Ü. BAP komisyonu tarafından (2004-ZRF-014 no'lu proje) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aran, N., 1993. Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Toksinler. Gıda Sanayi, 7(11):42.
- Aran, N., Eke, D. ve Alperden, İ., 1986. Yarı Sert Karakterdeki Türk Peynirlerinde Küf Florası. Ege Üni. Mühendislik Fakültesi Dergisi, 4(2): 1-10.
- Ayçiçek, H., Aksoy, A. ve Saygı, S., 2005. Determination of Aflatoxin Levels in Some Dairy and Food Products Which Consumed in Ankara, Turkey, *Food Control*, 16(3), 263-266.
- Bakırcı, İ., 2001. A Study on the Occurance of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products Produced in Van Province of Turkey, *Food Control*, 12: 47-51.
- Barnes, J.M., 1970. Aflatoxin as a Health Hazard. *Journal of Applied Bacteriology*, 33, 285-298.
- Barrios M.J., Gualda, M.J., Cabanas, J.M., Medina, L.M. and Jordano, R., 1996. Occurance of Aflatoxin M₁ in Cheeses from the South of Spain, *Journal of Food Protection*, 59(8): 898-900.
- Barrios, M.J., Medina L.M. and Cordoba, M.G., 1997. Aflatoxin-Producing Strains of *Aspergillus flavus* Isolated from Cheese, *Journal of Food Protection*, 60(2): 192-194.
- Blanc, M. and Karleskind, A., 1981. Données sur la Contamination par L'Aflatoxin M₁ du Lait et des Produits Laitiers en France, *Lait*, 61: 481-483
- Blanco, J.L., Domingues, L., Gomez-Lucia, E., Garayzabal, J.F.F., Garcia, J.A., and Suarez, G., 1988. Presence of Aflatoxin M₁ in Commercial Ultra-High Temperature Treated Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1622-1623.
- Bullerman, L.B. and Olivigni, F.J., 1974. Mycotoxin Producing-Potential of Molds Isolated From Cheddar Cheese, *Journal of Food Science*, 39: 1166-1168.
- Bullerman, L.B., 1976. Examination of Swiss Cheese for Incidence of Mycotoxin Producing Molds, *Journal of Food Science*, 41: 26-28.
- Coker, R.D., 1984. High Performance Liquid Chromatography and Other Chemical Quantification Methods Used in the Analysis of Mycotoxins in Foods, 207-263, Analysis of Food Contaminants, J. Gilbert (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 386p
- Corbion, B. and Fremy, J.M., 1978. Recherche des aflatoxines B₁ et M₁ dans les fromages de type 'Camembert'. *Lait*, 58: 573-574.
- Çoksöyler, N., Gültaktı, Y., Demir, C., Aşkın, O., Karadaş, F. ve Andiç, S., 2003. Van Yöresinde Üretilen Sütlerde Aflatoksin M₁ aranması, Ulusal Mikotoksin Sempozyumu 18-19 Eylül 2003, İstanbul, p. 99-104.
- Dragacci, S., Gleizes, E., Fremy, J.M. and Candlish, A.A.G., 1995. Use of Immunoaffinity Chromatography as a Purification Step for the Determination of Aflatoxin M₁ in cheeses, *Food Additives and Contaminants*, 12(1): 59-65.
- Eaton, D.L. and Gallagher, E.P., 1994. Mechanism of Aflatoxin Carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacology Toxicology*, 34, 135-172.
- Erdoğan, A., Gürses, M. ve Sert, S., 2000. Peynirler ve Küf Toksinleri, Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri VI. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu, Mayıs 2000, Tekirdağ, Tebliğler Kitabı (Ed. M. Demirci), 383-389.
- Erdoğan, A., Gürses, M. ve Sert, S., 2002. Isolation of Moulds Capable of Producing Mycotoxins from Blue Mouldy Tulum Cheeses Produced in Turkey, *International Journal of Food Microbiology*, 2649, 1-3.

- Evren M., 1999. Aflatoksinlerin Etki Şekilleri, Gıdalarda Bulunma Durumları ve Önleme Çareleri. *O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2): 159-172.
- Fink-Gremmels, J., 2008. Mycotoxins in Cattle Feeds and Carry-Over to Dairy Milk: A Review, *Food Additives and Contaminants*, 25(2): 172-180.
- Galvano, F., Galofaro, V. and Galvano, G., 1996. Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worldwide Review, *Journal of Food Protection*, 59(10): 1079-1090.
- Gourama, H. and Bullerman L.B., 1995. Antimycotic and Antiaflatoxic Effect of Lactic Acid Bacteria: A Review, *Journal of Food Protection*, 58(11) 1275-1280.
- Gourama, H. and Bullerman L.B., 1995a. Inhibition of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 58(11): 1249-1256.
- Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P.A. and Botsoglou, N.A., 2001. Distribution and Stability of Aflatoxin M₁ During Processing, Ripening and Storage of Telemes Cheese, *Food Additives and Contaminants*, 18(5): 437-443.
- Gürbüz, Ü, Nizamloğlu M, Nizamloğlu F, Dinç İ ve Doğruer Y., 1999. Bazı et, süt ürünleri ile baharatlarda aflatoksin B1 ve M1 aranması. *Veterinarium*, 10(1): 34-41.
- Henry, S.H., Bosch, F.X., Troxell, T.C. and Bolger, P.M., 1999. Reducing Liver Cancer- Global Control of Aflatoxin. *Science*, 286, 2453-2454.
- International Agency for Research on Cancer, 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, IARC, Lyon, vol. 56.
- Jordano, R., Jodral, M., Martinez, P., Salmeron, J. and Pozo, R., 1989. Aflatoxin-Producing Strains of *Aspergillus flavus* in Yogurt, *Journal of Food Protection*, 52(11): 823-824.
- Karagözü, N. ve Karagözü, C., 2000. Süt ve Süt Ürünlerinde Okratoksinler, Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Mayıs 2000, Tekirdağ, Tebliğler Kitabı (Ed. M. Demirci), 390-398.
- Karaioannoglou, P.G., Mantia, A., Koufidia, D., Koidia, P. and Triantafillou, J., 1989. Occurrence of Aflatoxin M₁ in Raw and Pasteurized Milk and in Feta and Teleme Cheese Samples, *Milchwissenschaft*, 44: 746-748
- Karaioannoglou, P.G., 1990. Aflatoxin Production on Kefalotyri Cheese, *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, 23: 4-6.
- Kıvanç, M., 1990. Mold Growth and Presence of Aflatoxin in some Turkish Cheese, *Journal of Food Safety*, 10:287-294.
- Klich, M.A., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 116p.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesselstine, C.W., 1987. *Aspergillus nomius*, a New Aflatoxin- Producing Species Related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 147-158.
- Line, J.E., Brackett, R.E. and Wilkinson, R.E., 1994. Evidence for Degradation of Aflatoxin B₁ by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, 57(9): 788-791.
- Martins, M.L. and Martins, H.M., 2004. Aflatoxin M₁ in Yoghurts in Portugal, *International Journal of Food Microbiology*, 91: 315-317.
- Metin, M.,1996. Süt Teknolojisi, Sütün Bileşimi ve İşlenmesi (1. Bölüm), Ege Üni. Mühendislik Fakültesi Yayınları No:33, 623s.
- Oldham, L.S., Oehme, F.W. and Kelley, D.C., 1971. Production of Aflatoxin in Pre-Packaged Luncheon Meat and Cheese at Refrigerator Temperatures, *Journal of Milk and Food Technology*, 34: 349-351.
- Oruç, H.H., 2003. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M₁ ve Aflatoxin'deki durumu, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22, (1-2-3): 121-125.
- Özkaya, Ş., Başaran, A., Topuz, F. ve Akdemir, Ç., 2003. Türkiye'de Üretilen Sütlerde Aflatoksin M₁ Aranması, Ulusal Mikotoksin Sempozyumu 18-19 Eylül 2003, İstanbul, p. 93-98.
- Pitt, J.I., 2000. A Laboratory Guide To Common *Penicillium*, 3rd Edition, Food Science Australia, 197p.
- Raper, K.B. and Fennel, D.I., 1965. The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Raper, K.B. and Thom, C.A., 1968. A Manual of the Penicillia, Hafner, New York.
- Sarımehtemetoğlu, B., Küplülü, Ö. ve Çelik, T.H., 2004. Detection of Aflatoxin M₁ in Cheese Samples by ELISA, *Food Control*, 15: 287-290.
- Smith, J.E., 2001. Mycotoxins, Food Chemical Safety Volume 1: Contaminants, Ed.: Watson, D.H. Woodhead Publishing Limited and CRC Pres LLC, 322p.
- Tabata, S., Kamimura, H., Ibe, A., Hashimoto, H., Iida, M., Tamura, Y., and Nishima, T, 1993. Aflatoxin Contamination in Foods and Foodstuffs in Tokyo: 1986-1990. *Journal of AOAC International*, 76: 32-35.
- Taguchi, S., Fukushima, S., Sumimoto, T., Yoshida, S. and Nishimune, T., 1995. Aflatoxins in Food Collected in Osaka, Japan from 1988 to 1992, *Journal of AOAC International*, 78: 325-327.
- Tekinşen, K.K. ve Uçar, G., 2008. Aflatoxin Levels in Butter and Cream Cheese Consumed in Turkey, *Food Control*, 19: 27-30.
- Uylaşer, V., Karaman, B. ve Kazancı, Y.T., 2005. Mikotoksinler ve İnsan Sağlığına Etkileri, *Hasad*, 21(244): 43-48.
- Üçüncü, M., 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi (Cilt I), Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova, İzmir, 543p.
- Wei Yun, J.T., Liewen, M.B., Bullerman, L.B., 1988. Toxicity and Sorbate Sensitivity of Moulds Isolated From Surplus Commodity Cheese, *Journal of Food Protection*, 51, 457-4