

Kayseri'de Tüketime Sunulan Kırmızı Biberlerde Aflatoksin B1'in Enzim immunoassay (EIA) ile Kantitatif Analizi*

Murat KANBUR¹, Bilal Cem L MAN¹, Gökhan ERASLAN¹, Ule ALTINORDULU¹
1 Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

Özet: Aflatoksinler (AF) son derece toksik ve karsinojenik bileşikler olup, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* adlı küf mantarlarının metabolitleridir. Gıdalar ve yemler bu küf mantarlarıyla hasat, depolama, işleme ve pazarlama sırasında kontamine olabilmektedir. Bu ara tırmada Kayseri'de tüketime sunulan 50 adet kırmızı biber örneğindeki aflatoksin B1 (AFB1) EIA yöntemi ile analiz edildi. Örneklerin tümünde AFB1 varlığına rastlandı. AFB1 değerleri, 1,48-70,05 ppb aralığında tesbit edildi. Kırmızı biber numunelerin üç adedinde (% 6.0) Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre baharatlarda bulunmasına izin verilen düzeyden (5 ppb) yüksek AFB1 olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B1, analiz, enzim immunoassay, kırmızı biber, Kayseri, Türkiye

Quantitative Analysis of Aflatoxin B1 by Enzyme Immuno Assay (EIA) in Red Pepper Marketed in Kayseri

Summary: Aflatoxins (AF) are highly toxic and carcinogenic metabolites of the mould fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Foods and feeds can be contaminated with molds via harvesting, storage, processing and marketing. In this study, Aflatoxin B1 (AFB1) was analysed by EIA in contamination in 50 red peppers marketed in Kayseri. In all samples, AFB1 contamination was determined with range of 1.48 to 70.05 ppb. Of 50 red peppers 3 (6%) had higher level (5 ppb) of AFB1 compared to tolerance limits for spices in Turkish Food Codex.

Key Words: Aflatoxin B1, analysis, enzyme immuno assay, red pepper, Kayseri, Turkey

Giri

AF'ler çeşitli mantarlar tarafından üretilen, insan ve hayvanlar tarafından yenildiklerinde akut, subakut ve kronik nitelikte zehirlenmelere yol açabilen maddelerdir. AF, insanlarda karaciğer kanseri oluşturma potansiyeli en fazla olan maddelerdir ve Dünya Kanser Ara tırmaları Merkezince (IARC) grup I karsinojenler içinde değerlendirilmektedir (13,15). AF'lerin karaciğer kanseri dışında immün sistemi baskılama, protein metabolizmasında bozulmaya yol açma gibi birçok önemli zehirli etkileri de bulunmaktadır (19).

AF üreten mantarlar tarımsal ürünlerin ve çeşitli gıda maddelerinin florasında yer alabilmekte veya dikey ekollerde bu ürünlere bulaşabilmekte; gelişmeleri için uygun koşullar olduğu anda tarım ürünlerinde ve gıda maddelerinde bozulmayla birlikte, AF olduğu umuna neden olmaktadır (18). Kırmızı biber, üretim, hasat, kurutma ve daha sonraki işleme safhalarında karışık olarak artlar nedeniyle AF olduğu umuna hassas ürünlerden birisidir (7,11,18).

Biber, dünyanın çeşitli ülkelerinde açıkta ve serada yetiştirilip yapılan, tüketici, üretici ve işleme endüstrisi açısından önemli olan bir kültür bitkisidir.

Dünya biber üretiminde en büyük ülke Çin'dir, bu ülkeyi sırasıyla Meksika ve Türkiye izlemektedir. Türkiye tek başına dünya biber üretiminde % 8, dünya işlenmiş biber ticaretinde ise % 3'lük bir paya sahip olması nedeniyle biber, ülke ekonomisi açısından önem taşıyan bir ürün konumundadır (9).

Ülkemizde kırmızı biberde AF olduğu umusu son 10-12 yıldır ihraç edilen biberlerin Avrupa ülkelerinden geri gönderilmesi ile dikkati çekmiş tir (11). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre baharatlarda bulunmasına izin verilen AFB1 miktarı 5 ppb'dir (3). Avrupa Birliğinde de baharatlarda bulunmasına müsaade edilen AFB1 düzeyi 5 ppb'dir (4).

Dünyada ve Türkiye'de, tüketime sunulan kırmızı biberlerin AFB1 içeriklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çeşitli ara tırmalar mevcuttur.

El-Kady ve ark (10) tarafından Mısır'da yapılan bir ara tırmada 120 farklı baharat numunesinin 16'sında (% 13,3) 8-35 ppb düzeylerinde AFB1 belirlenmiştir. Fufa ve Urga (12) Etiyopya'da marketlerden toplanan 60 kırmızı biber numunesinin 8'inde (% 13,33) 100-500 ppb aralığında AFB1 olduğu umusu belirtmişlerdir. Reddy ve ark (17) tarafından yapılan ara tırmada ise Hindistan'da marketlerden toplanan 182 kırmızı biber numunesinin % 59'unun AFB1 ile kontamine olduğu umusu, bunların % 18'indeki AFB1 düzeyinin kabul edilen limitlerin (30 ppb) üzerinde olduğu umusu belirlenmiştir.

Geli Tarihi/Submission Date : 31.01.2006
Kabul Tarihi/Accepted Date : 22.05.2006

* Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Tayda ve A kın (18), 127 adet kırmızı biber örneğinin 83'ünde (% 65,3) 1.25-28,50 ppb arasında AFB1 olduğu belirlenmiştir. Tarım Bakanlığı'nca yapılan bir piyasa taramasında toz ve kırmızı pul biberlerin % 46.7'sinin 5.0 ppb'den daha fazla AFB1 içerdiği ve biberlerin AFB1 yönünden en kontamine ürün olduğu belirtilmiştir (2). Hazır ve Çoksöyler (15) 141 adet kırmızı biber örneğinden 46'sında (% 32.6) 0.45-80.25 ppb aralığında AFB1 belirlenmiştir. Aao lu (1) tarafından yapılan ara tırmada Van ilinde açıkta satılan 40 adet kırmızı pul biber örneği AFB1 yönünden incelenmiştir; çalı ma sonucu numunelerin tamamında AFB1 saptanmıştır; numunelerin % 42.5'inde (17 örnek) 1.10-5.00 ppb, % 40'ında (16 örnek) 5.01-10.00 ppb, % 12.5'inde (5 örnek) 10.01-20.00 ppb ve % 5'inde (2 örnek) 20.01-44.00 ppb arasında AFB1 tespit edilmiştir. Erdoğan (11), 90 biber numunesinde yaptığı AFB1 taramasında, numunelerin 12'sinin (% 13,3) 1.1-97.5 düzeyinde AFB1 içerdiğini tespit etmiştir. Aydın ve ark (5), İstanbul'da farklı noktalarda satılan ve çeşitli firmalara ait 50 adet toz kırmızı biber numunesini analiz etmiş ve numunelerin % 16'sında (8 numune) 1.0 ppb altında, % 72'sinde (36 numune) 1-5 ppb ve % 12'sinde (6 numune) 5 ppb üzerinde AFB1 tespit etmiştir.

Baharatlarda AF analizlerinde EIA, kolay uygulanabilir, nispeten ucuz ve duyarlılığı yüksek olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (6,14,17,18).

Bu ara tırmayla Kayseri'de tüketime sunulan kırmızı biber örneklerinin AFB1 ile kirlenme düzeylerinin belirlenmesi ve sonuçların Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde belirtilen limitlerle göre değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Ara tırma kapsamında 2004 yılı içinde Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalına Kayseri'deki çeşitli kurumlardan analiz için gönderilen 50 adet kırmızı biber numunesinin EIA ile AFB1 yönünden analiz-

leri gerçekleştirildi. Her numune 3 kez analiz edildi ve bunların ortalaması alındı. Sonuçlar ppb olarak verildi. Bulunan AFB1 değerleri, Türk Gıda Kodeksi limitine (5 ppb) göre değerlendirildi. Hesaplamalar Excel XP programıyla yapıldı.

Standartların hazırlanması ve analizi

Metanolde 0.0, 0.5, 1.5, 4.5, 13.5 ve 40.5 ppb'lik AFB1 standartları hazırlandı ve analizler r-biofarm kiti kullanılarak EIA ile belirlendi. Sonuçlar kineticCalc.V2.16 programında ppb olarak hesaplandı. Yöntemin geri kazanım dereesi, korelasyon katsayısı ve kalibrasyon denklemi hesaplamalarında Excel XP programı kullanıldı.

Numunelerin analizi

Analizlerde; 2 gr kırmızı biber örneği behere alındı ve 10 ml % 70 lik metanolle oda ısısında 10 dakika karıştırıldı. Karışım tek kullanımlık C 18 kolondan süzüldü. Kırmızı biberlerin AFB1 analizleri, r-Biopharm kiti kullanılarak EIA ile gerçekleştirildi. Sonuçlar kineticCalc.V2.16 programında ppb olarak hesaplandı.

Bulgular

Yöntemin geri kazanımının % 85, korelasyon katsayısının 0,9998 olduğu belirlendi. Yöntemin kalibrasyon doğrusu denklemi ($y=mx+n$) $y=1,1486x + 0,0205$ 'dir ($y=$ absorpsiyon, $m=$ eğim, $n=$ kesim, $x=$ konsantrasyon)

Numunelerin analizleri sonucu örneklerin tümünde AFB1 varlığına rastlandı. Kırmızı biberlerde AFB1 değerleri 1.48-70.05 ppb aralığında tespit edildi (Tablo 1). Biber numunelerinin 3'ünde (% 6.0) 5.39, 5.67 ve 70.05 ppb olmak üzere, 5 ppb üzerinde AFB1 tespit edildi.

Tablo 1. Kırmızı biber numunelerinde tespit edilen AFB1 düzeyleri (ppb).

n (%)	47 (% 94)	2 (% 4)	1 (% 2)
AFB1	1-5 ppb	5-10 ppb	>10 ppb

Tartı ma ve Sonuç

AF çalı malarında kullanılan yöntemlerin kabul edilebilirli inde, geri kazanımın % 70 ve üzerinde olması (18); analitik çalı malarda korelasyon katsayısının (r) +1 ve -1'e çok yakın olması istenir (13). Bu çalı mada kırmızı biber AF analizleri EIA ile yapılmı ve yöntemin geri kazanımı % 85, korelasyon katsayısı 0,9998'dir. Hesaplanan geri kazanım oranı ve korelasyon katsayısı kabul edilen aralıklar içindedir.

Ülkemizde kırmızı biber üretiminin en fazla yapıldı ı bölge olan Güneydo u Anadolu Bölgesinde bazı üreticiler, kırmızı biberleri toprak üzerinde kurutmakta ve daha sonra fabrikalara satmaktadırlar (15,18). Bu artlarda üretilen kırmızı biberin toprak kökenli mantar kontaminasyonuna ve AF olu umuna oldukça açık bir ürün olaca ı dü ünülmektedir. Kırmızı biber üretiminde, içi açılmadan kurutulan kırmızıbiberlerin iç bo lu u fungal kolonizasyon için dolayısıyla da AF olu umu için uygun bir ortam olu turmaktadır (7,8,18). Bu ara tırmada da kırmızı biberlerde 1.48-70.05 ppb düzeyinde AFB1 belirlenmesi ve numunelerin % 6'sında 5 ppb üzerinde AFB1 tespit edilmesi, ülkemizde kırmızı biber üretiminde bazı üreticilerin biberleri toprak üzerinde veya içi açılmadan kurutmasıyla açıklanabilir.

Özellikle nemli, ya murlu ve ılıman iklimlerde yeti en biberlerden üretilen kırmızı biberlerde AF bulunma oranı daha fazladır (19). El-Kady ve ark (10), Fufa ve Urga (12), Reddy ve ark (17) yaptıkları çalı malarda kırmızı biber numunelerindeki AF düzeylerindeki yüksekli inin, uygun olmayan üretim ko ulları ile biberlerin yeti ti i bölgelerdeki nemli-ılıman iklim artları ve biber üretim teknikleriyle yakından ili kili oldu u belirtilmektedir. Ülkemizde kırmızı biber üretiminin % 80'i Kahramanmara ve Gaziantep illerinde yapılmaktadır (15). Bu illerin güney kesimleri Akdeniz ikliminin etkisinde olmakla beraber, genel olarak yazlar sıcak ve kurak, kış lar ise so uk ve ya ılıdır. Kayseri bölgesi ise karasal iklim ko ullarına sahiptir. Çalı mamızda tüm numunelerde AFB1 belirlenmesi ve 5 ppb üzerinde AFB1 içeren numunelerin olması, bölgenin iklim ko ullarından ziyade bu bölgelerde geleneksel üretim metodlarının kullanılması ve üretim sonrası saklama ko ullarıyla ili kili olabilir.

Gıda Kodeksi Yönetmeli i'ne göre baharatlarda en fazla 5 ppb AFB1 bulunmasına müsaade edilmektedir (3). Türkiye'de yapılan ara tırmalarda Tayda ve A kın (18) numunelerinin % 65.3'ünde 1.25-28.50 ppb, Tarım Bakanlığı (2) % 46.7'sinde 5.0 ppb üzerinde, Hazır ve Çoksöyler (15) % 46.0'sında 0.45-80.25, A o lu (1) 1.10-44.00 ppb, Aydın ve ark (5) % 12.0'sinde 5.0 ppb üzerin-

de AFB1 belirlemi lerdir. Bu çalı malarda, numunelerdeki en dü ük ve en yüksek AFB1 de erleri arasında önemli farklılıkların olması ile 5.00 ppb üzerinde AFB1 bulunma yüzdelerinin farklı olması dikkat çekici olup, bu farklılı ın örne i temsil eden numunelerin homojen olarak alınmayı ı, biberlerin üretim a amasında homojen olarak karı tılmayı ı ve küçük ambalajlar eklinde paketlenmesinden kaynaklandı ı belirtilmektedir. Çalı mamızda da numunelerin tümünde 1.48-70.05 ppb aralı ında AFB1 belirlenmesinin, uygun olmayan üretim ve depolama ko ullarıyla birlikte, numunenin yüksek miktarda AF içeren bir bölgeden alınıp paketlenmesine ba lı olabilece i dü ünülmektedir. Çalı mamızda biber numunelerinde 5.00 ppb üzerinde AFB1 bulunma yüzdesi, di er çalı malarla kıyaslandı ında oldukça dü üktür (% 6.0).

AF'lerin dü ük miktarlarda ve uzun süreli alınmaları durumunda karaci er kanseri olu ma riskini artırmaları dı ında immün sistemi baskılaya ve protein, vitamin A, vitamin D, demir, selenyum ve çinko metabolizmasında bozulmalara da yol açabilece i, HIV ve malaria görülme sıklı ını artırabilece i bildirilmektedir (19). Bu ara tırma sonucunda, 5 ppb üzerinde AFB1 içeren kırmızı biber numunelerinin tüketilmesi durumunda önemli sa lık sorunlarına yol açabilece i söylenebilir.

Türkiye'de kırmızı biber, çok tüketilen ve ihraç de eri olan bir üründür. Bu nedenle, yüksek düzeyde AFB1 içeren biberler, gerek insan sa lı ı, gerekse ihracat açısından önemli sorunlara ve ekonomik kayba yol açabilecektir. Sonuç olarak ülkemizde üretilen kırmızı biberlerde AF'lerle kirlenme durumu hala önemli bir sa lık sorunu ve ihracat sorunu olmayı sürdürmektedir. Bu sorunlar kırmızı biberin üretimi, muhafazası ve satı ı esnasında gösterilecek özenle, kırmızı biberlerin tüketime sunulmadan önce AF'ler yönünden analizleri ve üretim sonrası yapılacak piyasa kontrolleriyle giderilebilir.

Kaynaklar

1. A o lu S, 1999. Van ilinde açıkta satılan kırmızı pul biberlerde aflatoksin B1 varlı ının ara tırılması. *Van Tıp Derg*, 6:28-30.
2. Anonymus, 1996. Gıdalarda kalıntı ve bula anların izlenmesi, Tarım ve Köyi leri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlü ü, Bursa.
3. Anonymus, 1997. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeli i, 16 Kasım 1997 Tarih ve 23172 Sayılı *Resmi Gazete*.
4. Anonymus, 2002. Commission Regulation EC, 472/2002. *Official Journal of European Communities*, L 75 (18).

5. Aydın A, Ba kaya R, Erkan ME, Çakmak Ö, 2005. Toz kırmızı biber örneklerinde aflatoksin B1 düzeylerinin belirlenmesi üzerine bir ara tırma. *II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu* Poster Bildirisi, 23-24 Mayıs, stanbul-Türkiye.
6. Betina V, 1989. *Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects*. New York, Elsevier, p.437.
7. Çoksöyler N, 1999. Farklı yöntemlerle kurutulmuş kırmızıbiberlerde *Aspergillus flavus* geli mi ve aflatoksin olu umunun incelenmesi. *Gıda*, 24: 297-306.
8. Dıraman H ve Arıcı M 1999. Tekirda ilinde tüketime sunulan kırmızı pul biberlerde aflatoksin aranması üzerine bir çalı ma, *Gıda*, 41-43.
9. Duman AD, Zorlugenç B ve Evliya B, 2002. Kahramanmara 'ta kırmızı biberin önemi ve sorunları, *KSÜ Fen ve Müh Derg*, 5: 111-117.
10. El-Kady IA, El-Maraghy SS, Eman MM, 1995. Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt, *Folia Microbiol*, 40: 297-300.
11. Erdo an A, 2004. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. *Chemosphere*, 56: 321-325.
12. Fufa H, Urga K, 1996. Screening of aflatoxins in Shiro and ground red pepper in Addis Ababa, *Ethiop Med J*, 34: 243-249.
13. Gündüz S, 1998. Kimyaçılar çin statistik, Gazi Kitabevi, Ankara. s. 89.
14. Hansen TJ, 1993. Quantitative testing for mycotoxins, *Cereal Food World*, 38: 346-348.
15. Hazır Z ve Çoksöyler N, 1998. Farklı bölgelerde ve farklı yöntemlerle elde edilen kırmızı biberlerde aflatoksin düzeyleri, *Gıda Mühendisli i Kongre ve Sergisi*, ss 479-483. 16-18 Eylül, Gaziantep-Türkiye.
16. Kaya S, anlı Y, Yarsan E, Özsoy A, Akaya R, Bilgili A, 1996. Çok yönlü hayvan yeti tiricili inde karma yem ve yem hammaddelerinden kaynaklanan olumsuzluk faktörlerinin ara tırılması, *Etlük Vet Mikrob Derg*, 8: 59-80.
17. Reddy SV, Mayi DK, Reddy MU, Thirumala-Devi K, Reddy DV, 2001. Aflatoxin B1 in different grades of chillies (*Capsicum annum* L.) in India as determined by indirect competitive-ELISA, *Food Addit Contam*, 18: 553-558.
18. Tayda EE ve A kın O, 1995. Kırmızı biberlerde aflatoksin olu umu, *Gıda*, 20: 3-8.
19. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggerwal D, 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *Am J Clin Nutr*, 80: 1106-1122.
20. Zinedine A, Brera C, Elakhdari S, Catano C, Debegnach F, Angelini S, De Santis B, Faid M, Benlemlih M, Minardi V, Miraglia M, 2005. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco, *Food Control*, Article in Press.

Yazı ma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Murat KANBUR
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
38090 Kocasinan/KAYSERİ
E-mail: kanburm@erciyes.edu.tr