

Türkiye’de Isparta İlinin Eğirdir Bölgesinden Toplanan Koyun Sütlerinde Aflatoksin M₁ Kalıntı Varlığının ELISA ile Değerlendirilmesi

Sinan İNCE^{1,a,*}, Serkan KARATEKELİ^{2,b}

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye.

²Eğirdir İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Isparta, Türkiye.

^aORCID: 0000-0002-1915-9797, ^bORCID: 0000-0003-2491-7350

Geliş Tarihi: 27.08.2020

Kabul Tarihi: 07.12.2020

Özet: Aflatoksinler yem ve gıda ürünlerinde yaygın bir şekilde görülebilmekte ve kalıntısı ihtiva eden ürünlerin tüketiciler tarafından alınması ise önemli sağlık sorunları meydana getirmektedir. Bu çalışmada; Eğirdir’de koyun yetiştiriciliği yapılan işletmelerden toplanan 86 çiğ koyun sütü örneği aflatoksin M₁ kalıntı varlığı açısından ELISA yöntemiyle analiz edildi. Analiz neticesinde 83 örneğin aflatoksin M₁ kalıntısı içermediği ve 3 örneğin ise maksimum kalıntı limitinin altında kalıntı içerdiği belirlendi. Sonuç olarak, araştırılan süt örneklerinde düşük düzeyde aflatoksin M₁ kalıntısının olması tüketime sunulan sütlerin tüketici sağlığı açısından bir sakınca oluşturmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M₁, ELISA, Süt, Koyun.

Evaluation of Aflatoxin M₁ Residues by ELISA in Sheep Milk Obtained from Eğirdir in Isparta Province in Turkey

Abstract: Aflatoxins can be seen widely in feed and food products, and consumers' intake of products containing residue causes serious health problems. In this study, 86 raw sheep milk samples were collected from Eğirdir and analyzed for aflatoxin M₁ by ELISA. The results of the study showed that 83 samples did not contain residues and 3 samples contained a low level of residue which is less than acceptable maximum residue limits. As a result, a low level of aflatoxin M₁ residue in the milk samples investigated showed that the milk offered for consumption does not pose a drawback in terms of consumer health.

Keywords: Aflatoxin M₁, ELISA, Milk, Sheep.

Giriş

Süt ve süt ürünleri içerdikleri protein, vitamin ve temel mineraller bakımından önemli bir besin kaynağıdır. İnsanlar tarafından en çok tüketilen süt büyükbaş hayvanlardan alınan sütler olup bunlar su (%87), protein (%3), laktoz (%4-5), yağ (%3-4), mineraller (%0.8) ve vitaminleri (%0.1) içermektedir. Bununla birlikte, çevresel koşullar, emzirme durumu, hayvan türleri ve hayvanların beslenme durumu gibi çeşitli faktörler sütün kimyasal bileşimini etkileyebilir. Örneğin, koyun sütü yüksek yağ ve protein içeriğine sahip iken, keçi sütü yüksek miktarda vitaminler (A, B₁ ve B₁₂), kalsiyum ve fosfor içermektedir (Acaroz ve ark., 2020; Balthazar ve ark., 2017).

Aflatoksinler *Aspergillus*, *Penisilium* ve *Rhizopus* türleri mantarlar tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Aflatoksin B (1 ve 2) ve G (1 ve 2) yem ve hammaddeleri ile gıdalarda bulunan aflatoksin türleridir. Aflatoksin M (1 ve 2)'lerin günümüzde sadece sütte değil ayrıca mısır, soya, fıstık gibi ürünlerde de aflatoksin B'lerden oluştuğu görülmektedir. Süt ve ürünlerinde bulunabilen aflatoksin M₁ ve M₂ varlığı tüketiciler

açısından önemli bir sorun olmaktadır. Ülkemizde bugüne kadar yapılan araştırmalarla inek (Eker ve ark., 2019; Oruç ve ark., 2011), koyun (Karadal ve ark., 2018), keçi (Bilgin, 2014) sütü ve/veya bunların ürünlerinde aflatoksin M₁ varlığı araştırılmıştır.

Yapılan bu çalışmada, Eğirdir’de koyun yetiştiriciliği yapılan işletmelerden toplanan 86 adet koyun süt örneğinde aflatoksin M₁ kalıntı varlığı ELISA yöntemi kullanılarak araştırıldı. Ayrıca elde edilen bulguların tüketici sağlığı açısından önemi ile yasal mevzuat açısından kalıntı durumu değerlendirilerek yapılan kalıntı izleme programları için ilave bilgilerin eldesi gerçekleştirildi.

Materyal ve Metot

Süt numunelerinin toplanması ve analize hazırlanması:Bu çalışmada; koyun yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Isparta ilinin Eğirdir ilçesi Barla, Bademli, Sorkuncak ve Yuvalı köylerinde koyun yetiştiriciliği yapılan işletmelerden 2020 yılı Ocak-Nisan ayları arasında toplamda 86 adet koyun sütü numunesi sağım sonrası hayvanlardan

toplandı. Alınan sütler soğuk zincirde hemen laboratuvara getirildi ve analizler yapıncaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edildi.

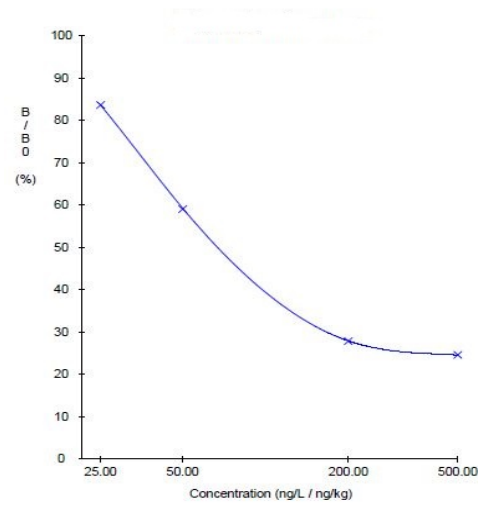
Analize başlanmadan önce numunelerin ön işlemi için; deney tüpüne 5 ml alınan süt örneğinin 2000 devirde 15 dakika santrifüjü yapıldı. Sonrasında tüp içerisinde üstte toplanan süt serumunun yağı uzaklaştırıldı ve elde edilen temiz süt serum örneği analiz işleminde kullanıldı (Kara ve Ince, 2014).

ELISA yöntemi ile numunelerin analizi: Süt numunelerinde aflatoksin M₁ kalıntı varlığını tespit etmek amacıyla ticari ELISA kiti (AflaM1, Celer, İtalya, Lot No: 03069) kullanıldı ve örneklerin okuma işlemi ELISA (Thermo MultiSkan) okuyucusunda gerçekleştirildi. Örneklerin değerlendirilmesi amacıyla konsantrasyonları belirli standartlara (0, 25, 50, 200 ve 500 ng/l) karşı okunan absorbanslar temel alınarak verilerin değerlendirmeleri RidaSoft Win Net programı ile yapıldı. Aflatoksin M₁ analizi için kullanılan kitin tespit limiti (çiğ süt için) ise 25 ng/l'dir.

BULGULAR

Analiz sonunda standartların absorbans değerlerine karşılık gelen miktarlar ve Şekil 1'de görülen konsantrasyon-absorbans eğrisi ile Tablo

1'de görülen standart konsantrasyonlarına ait veriler elde edildi.



Şekil 1. Aflatoksin M₁ standart-konsantrasyon eğrisi

Seksen altı süt örneğinde belirlenen aflatoksin M₁ kalıntı derişim aralıkları ve sonuç veren örnek sayısı Tablo 2'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 86 numunenin kalıntı içermediği, 3 örneğin ise maksimum kalıntı limitinin (50 ng/kg) altında aflatoksin M₁ kalıntısı içerdiği tespit edildi.

Tablo 1. Aflatoksin M₁ standart konsantrasyon verileri

Konsantrasyon (ng/l)	Absorbans (Ortalama)	B/B0 (%)	Hesaplama (ng/l)	Sapma (%)
0	1523	100.0	-	-
25	1274	83.7	24.96	0.2
50	0.899	59.0	50.06	0.1
200	0.424	27.8	200.84	0.4
500	0.375	24.6	488.12	2.4

Tablo 2. Süt numunelerindeki aflatoksin M₁ kalıntı düzeyleri

Konsantrasyon (ng/l)	Pozitif numune sayısı (n: 86)
<25	83
25-30	3

Tartışma ve Sonuç

Süt ve ürünlerinde aflatoksin M₁ kalıntısının belirlenmesi için yapılan araştırmalar, gıda üretimi

ve tüketici sağlığı açısından önem arz etmektedir. Süt ve ürünlerindeki aflatoksin M₁ kalıntısı tüketici sağlığı açısından gelişme geriliği, organ hasarı ve kanser gibi istenmeyen etkiler meydana

getirdiğinden bunun kalıntı analizinin yapılması giderek önem kazanmıştır. (Filazi ve ark., 2010; Kara ve Ince, 2014). Bundan dolayı yapılan bu çalışmada da koyun sütlerinde aflatoksin M₁ kalıntısı diğer araştırmalardaki benzer yöntemler ve sonuçlarla karşılaştırılarak araştırıldı ve sağlık açısından önemi değerlendirildi. Yapılan çalışmada, Eğirdir'den alınan koyun sütlerinde aflatoksin M₁ kalıntı varlığı ELISA yöntemiyle araştırıldı ve 86 süt örneği içerisinde 83 numunenin kalıntı içermediği, buna karşın 3 örnekte ise maksimum kalıntı limitlerinin altında aflatoksin M₁ kalıntı varlığı tespit edildi.

Ülkemizde süt ve/veya ürünlerinde aflatoksin M₁ kalıntısının araştırıldığı bazı çalışmalar incelenerek olunursa; Yeşil ve ark. (2019) ELISA ile aflatoksin M₁ kalıntı varlığını belirlemek amacıyla Diyarbakır ilinde tüketime sunulan süt ve ürünlerinde (beyaz peynir, krem, çökelek, çeçil, Van otlu, lor, Van otlu lavaş peyniri ve tereyağı) yaptıkları bir çalışmada, inceledikleri 248 örnekten 7 süt örneği ile 15 tereyağı örneğindeki kalıntı miktarının hem Türk kodeks limitini hem de Avrupa komisyonu limitlerini aştığını tespit etmişlerdir.

Bursa ilinde süt sığırcılığı yapılan işletmeler ile satışa sunulan UHT sütlerinde aflatoksin M₁ kalıntısının ELISA ile araştırıldığı bir çalışmada, 34 işletme sütü ve 54 UHT süt örneklerinin toplandığı ve yapılan analizler neticesinde tüm örneklerde aflatoksin M₁ kalıntısının tespit edildiği, buna karşın tespit edilen miktarların Türk Gıda Kodeksinde belirtilen limitlerin çok altında olduğu bildirilmiştir (Oruç ve ark., 2011).

Aydın ve Denizli illerinden elde edilmiş olan sütlerde aflatoksin M₁ prevalansı ve miktarlarının ELISA ile araştırıldığı çalışmada çiftliklerden toplanan 81 inek süt örneğinin 20 tanesinin yasal limitleri aştığı ve halk sağlığı açısından tüketime sunulmasının tehlikeli olacağı vurgulanmıştır (Hazer, 2011).

Çanakkale ilinden 2015 ve 16 yıllarında toplanan 360 çiğ süt ve peynir örneğinde aflatoksin M₁ kalıntısının ELISA ile araştırıldığı çalışmada çiğ sütlerde bulunan değerlerin (%3,3) Türk gıda kodeksi ve Avrupa Komisyonu limitlerini aştığı fakat peynirlerdeki miktarların ise belirtilen limitlerin altında kaldığı belirtilmiştir (Eker ve ark., 2019).

Aydın ili Çine ilçesine bağlı köylerden kış ve yaz mevsimlerinde alınan inek (30), koyun (30) ve keçi (30) olmak üzere toplamda 180 süt örneği aflatoksin M₁ bakımından ELISA metodu ile analiz edilmiştir. Analizler neticesinde inek sütlerinin yazın 3'ünde, kışın 15'inde, koyun sütlerinin yazın 1'inde, kışın ise 5'inde aflatoksin M₁ saptanmış iken, keçi sütlerinin hiçbirinde aflatoksin M₁ tespit edilmemiştir. Bununla birlikte bir inek ve bir koyun sütünde saptanan AFM₁ düzeylerinin, Türk Gıda Kodeksi limit değerinin üzerinde olduğu bildirilmiştir. Çalışmada

kış mevsiminde elde edilen sütlerin yaz sütlerine göre aflatoksin M₁ bakımından daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Bilgin, 2014).

Niğde ilinde tüketime sunulan çiğ koyun, keçi ve inek sütlerinde aflatoksin M₁ kalıntısının araştırıldığı çalışmada 90 çiğ süt örneği ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. İncelenen süt örneklerinin hepsinin aflatoksin M₁ içerdiği, keçi ve koyun sütlerindeki kalıntı miktarlarının Türk Gıda Kodeksi yasal limitlerinin altında, buna karşın inek sütlerinin 3'ünde ise bu limitlerin üzerinde aflatoksin M₁ olduğu belirtilmiştir (Karadal ve ark., 2018).

Dünya genelinde süt ve ürünlerinde aflatoksin M₁ varlığının araştırılmasına yönelik yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde; Pakistan'ın Pencap eyaletinin Faisalabad bölgesinden beş farklı memeli türünün süt örneklerindeki aflatoksin M₁, floresan saptama ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak belirlenmiştir. Toplam 169 süt örneği analiz edilmiş ve bunlar manda (55), inek (40), keçi (30), koyun (24) ve deveden (20) oluşan beş türden alınmıştır. Analizler neticesinde deve sütünde aflatoksin M₁ kalıntısı tespit edilmemişken, manda, inek, keçi ve koyun sütlerinde aflatoksin M₁ kontaminasyon yüzdeleri sırasıyla% 34.5, % 37.5, %20 ve% 16.7 olarak bulunmuştur (Hussain ve ark., 2010).

Hırvatistan'ın farklı bölgelerinden 2016 ilkbahar ve sonbahar aylarında toplamda 1618 çiğ inek, keçi ve koyun sütü örnekleri toplanmış, ELISA ile analiz sonucunda aflatoksin M₁ kalıntı miktarlarının inek sütlerinde 0.93–85.4 ng/kg, keçi sütlerinde 2.0–18.6 ng/kg ve koyun sütlerinde 2.27–11.2 ng/kg olarak bulunmuştur. Çalışmada ilkbaharda 2 inek sütü numunesinde ve sonbaharda 10 inek sütü örneğinde Avrupa Birliği'nin maksimum (50 ng/kg) kalıntı seviyesini aşan aflatoksin M₁ seviyeleri bulunduğu rapor edilmiştir (Bilandžić ve ark., 2017).

Batı Sicilya'da 2013-16 yılları arasında inek (170) koyun (133) ve eşeklerden (84) toplanan toplam 394 çiğ ve ısıl işlem görmüş 91 süt örneği ELISA ile aflatoksin M₁ yönünden analiz edilmiştir. Analiz sonucunda inek ve koyun sütlerinde sırasıyla %12,9 ve %5 pozitif sonuç alınmış buna karşın eşek sütü örneklerinde kalıntı varlığı görülmemiştir. Pozitif örneklerin sadece çiftliklerden toplanan örneklere ait olduğu ve buna bağlı olarak tüketicilerin korunması amacıyla süt çiftliklerinde gerekli olan beslenme tekniklerinin önemli olduğu vurgulanmıştır (Camilleri ve ark., 2019).

Elde edilen veriler ışığında 86 numunenin 25 ng/l düzeyinin altında ve 3 numunenin ise 25-30 ng/l aflatoksin M₁ ihtiva ettiği ve bu miktarların da yönetmelikte belirtilen maksimum kalıntı limitinin (TGK 2011) altında olduğu görülmüştür. Bu durum

Eğirdir'in köylerinde hayvanlara verilen yemlerin aflatoksin yönünden temiz olduğunu ve sütlerin güvenli bir şekilde tüketime verilebileceği şeklinde değerlendirilebilir.

Sonuç olarak tüketici sağlığı açısından hayvanlara verilecek yemlerin mikotoksin kalıntıları ihtiva edebileceğinden verilirken dikkat edilmesi gerekliliği ve bölgedeki yetiştiricilerin bu durum hakkında bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, rutin bir şekilde yem ve yem maddelerinden örnekler alınarak yetkili kurumlar tarafından kalıntı tarama ve tespit işlemlerinin önemle yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Kucukkurt I, Eryavuz A, 2020: Determination of kanamycin residue in Anatolian buffalo milk by LC-MS/MS. *Kafkas Vet. Fak. Derg*, 26 (1), 97-102
- Balthazar CF, Pimentel TC, Ferrão LL, Almada CN, Santillo A, Albenzio M, Mollakhalili N, Mortazavian AM, Nascimento JS, Silva MC, Freitas MQ, Sant'ana AS, Granato D, Cruz AG, 2017: Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf*, 16 (2), 247-262.
- Bilandžić N, Varenina I, Solomun Kolanović B, Božić Luburić Đ, Varga I, Želježić B, Cvetnić L, Benić M, Tanković ., Cvetnić Ž, 2016: Occurrence of aflatoxin M1 in raw cow, goat and sheep milk during spring and autumn in Croatia during 2016. *Toxin Rev*, 36 (4), 290-296.
- Bilgin Ö, 2014: İnek, koyun ve keçi sütlerinde yaz ve kış mevsimlerinde aflatoksin M1 düzeyinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Cammilleri G, Graci S, Collura R, Buscemi MD, Vella A, Macaluso A, Giaccone V, Giangrosso G, Cicero A, Lo Dico GM, Pulvirenti A, Cicero N, Ferrantelli V, 2019: Aflatoxin M1 in cow, sheep, and donkey milk produced in Sicily, Southern Italy. *Mycotoxin Res*, 35: 47-53.
- Eker FY, Muratoglu K, Eser AG, 2019: Detection of aflatoxin M1 in milk and milk products in Turkey. *Environ Monit Asses*, 191 (8), 523.
- Filazi A, Ince S, Temamogulları F, 2010: Türkiye'nin Urfa İli'ndeki koyun sütlerinden üretilen peynirlerde aflatoksin M1 düzeylerinin belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57 (3), 197-199.
- Hazer A, 2011: Denizli ve Aydın illerinden elde edilen çiğ sütlerde aflatoksin M1 prevelansı ve miktarının aranması. Doktora tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Hussain I, Anwar J, Asi MR, Munawar MA, Kashif M, 2010: Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control*, 21, 122-124.
- Kara R, Ince S, 2014: Aflatoxin M1 in buffalo and cow milk in Afyonkarahisar. Turkey, *Food Addit Contam B*, 7(1), 7-10.
- Karadal F, Onmaz NE, Hızlısoy H, Yıldırım Y, Serhat AL, Gönülalan Z, 2018: Niğde ilindeki çiğ koyun, keçi ve inek sütlerinde aflatoksin M1 düzeyleri. *Kocatepe Vet Derg*, 11 (2), 119-125.
- Oruç HH, Temelli S, Sorucu A, 2011: Bursa'da çiğ süt ve UHT sütlerde aflatoksin M1 düzeyleri. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 2, 1-4.
- TGK, 2011: Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 29.12.2011 Tarih ve 28157 (3. Mükerrer) Sayılı Resmi Gazete.
- Yeşil ÖF, Hatipoğlu A, Yıldız A, Vural A, Erkan ME, 2019: A research on the determination of aflatoxin M1 levels in milk and dairy products for sale in Diyarbakir by ELISA. *Erzincan Üniv Fen Bilim Derg*, 12 (1), 479-488.

*Yazışma Adresi: Sinan İNCE

Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

e-mail: inceninan@gmail.com