

Kars İlinde Satışa Sunulan Dondurmalarda Aflatoksin M₁ Varlığının Belirlenmesi

Çiğdem SEZER^{1*}, Aksem AKSOY², Leyla VATANSEVER¹, Nebahat BİLGE¹

¹Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

²Kafkas Üniversitesi, Kars Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı

*Sorumlu Yazar: Çiğdem SEZER Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı,
36100 Paşaçayır, Kars, Türkiye
e-posta: cigdemsezer@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 15.04.2013

ÖZET

Bu çalışmada Kars İli'nde üretilip ambalajsız olarak satılan 50 adet dondurma örneği aflatoksin M₁ varlığı yönünden analiz edilmiştir. ELISA tekniği ile yapılan analiz sonucu örneklerden 27 adedinde (%54) Aflatoksin M₁ miktarı <0,005 µg/kg olarak belirlenmiştir. Örneklerin 6 adedinde (%12) toksin miktarı 0,005-0,05 µg/kg'dır. Bununla birlikte, Avrupa Birliği ve Türk Gıda Kodeksi'nde süt ve ürünleri için belirtilen Aflatoksin M₁ limitini (0,05 µg/kg) aşan toplam 17 örnek (%34) tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, dondurmaların halk sağlığı açısından tehlike oluşturabileceği ve bu nedenle üretim ve depolama sırasında kontrollerinin ciddi bir şekilde yapılması gerektiğine işaret etmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dondurma, Aflatoksin M₁, ELISA

ABSTRACT

DETERMINATION OF AFLATOXIN M₁ LEVELS IN ICE CREAM SOLD IN KARS PROVINCE

In this study 50 unpackaged ice cream samples produced and retailed in Kars were tested for determining the presence of aflatoxin M₁. The test results conducted by ELISA showed that the concentration of Aflatoxin M₁ in 27 samples (54%) were lower than 0.005 µg/kg. In 6 samples (12%) the toxin levels were 0.005-0.05 µg/kg. However 17 samples (34%) were detected having toxin compound higher than the maximum tolerance limit accepted by European Union/Turkish Food Codex (0.05 µg/kg) for milk and milk products. The findings indicated that widespread occurrence of Aflatoxin M₁ in ice cream samples could be considered as possible hazard for public health, therefore they must be strictly controlled during their processing and storage.

Key Words: Ice cream, Aflatoxin M₁, ELISA

Giriş

Aflatoksin B₁ (AFB₁) memeliler için bilinen en güçlü hepatokarsinogen olup, uluslararası kanser araştırma merkezi (IARC) tarafından 1A kategorisinde karsinogen olarak sınıflandırılmaya alınmıştır (IARC, 2002). Aflatoksin

B₁'in metaboliti olan aflatoksin M₁ ise insanlar için muhtemel karsinogen olarak gruplandırılmış ve Grup 2B sınıfında yer almıştır (IARC, 1993). Daha sonra yapılan yeni bir sınıflandırma ile süt toksini olarak da isimlendirilen aflatoksin M₁ en güçlü

karsinojenleri içeren Grup 1 içerisinde yeniden değerlendirilmiştir (IARC, 2002). Türk Gıda Kodeksi, Bulaşanlar Yönetmeliğinde süt ve süt bazlı ürünler için Aflatoksin M₁ limiti 0,05 µg/kg olarak belirtilmiştir (Anon, 2011). Avrupa Birliği Komisyonu süt ve ürünlerinde 0,05 µg/kg limit değeri olarak bildirilmiştir, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration, FDA) ise bu limiti 0,5 µg/kg olarak değerlendirmektedir (Anon, 2003; FDA, 2011).

Küfler tarafından üretilen ikincil metabolitler olan aflatoksinlerin insanlar ve hayvanlar üzerinde karsinojenik, mutajenik, teratojenik etkileri belirlenmiştir (Eaton ve Gallagher, 1994; Ravinayagam ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012). Gıdalarda aflatoksin varlığı rutin olarak kontrol edilmelidir. Halk sağlığını riske eden aflatoksin M₁'in süt ve ürünlerindeki varlığı üzerine çok sayıda araştırma mevcuttur. Bu araştırma sonuçlarında gıdalarda toksin varlığının ciddi boyutlarda olabileceği ve halk sağlığı yönünden önemi vurgulanmıştır (Ardıç ve ark., 2009; Çelik ve ark., 2005; Dinçoğlu ve ark., 2007; Gürbay ve ark., 2006). Aflatoksin M₁ kontaminasyonu ve miktarının hayvanın beslenme şekline ve mevsime, hayvanın türüne, coğrafi bölgeye, gıdaya uygulanan teknolojik işlemlere bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir (Fallah, 2010; Galvano ve ark., 1996; Rahimi ve ark., 2010; Şanlı ve ark., 2012).

Süt ürünleri her yaşta insan beslenmesi için çok önemli bir besindir. Özellikle çocuklar tarafından sevilerek tüketilen dondurmada aflatoksin varlığı oldukça endişe verici bir durumdur. Bu çalışmada Kars ili piyasasında satışa sunulan ambalajsız sade dondurma örneklerinde aflatoksin M₁ varlığı ve miktarı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Gereç

Dondurma numunelerinin toplanması için Kars ili piyasasında 50 ayrı satış noktası belirlenmiştir. Satış noktaları içinde pastaneler, kafeteryalar ve dondurma üretimi yapıp satışa sunan küçük işletmeler yer almaktadır.

İşletmelerde satışa sunulan 50 adet sade dondurma örneği (kapalı ambalajı olmaksızın külah ve/veya polipropilen kasede) Temmuz ayı boyunca toplanarak soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. Örnekler analize alınmaya dek -18°C'de muhafaza edilmiş ve en kısa sürede (2 saat içerisinde) analize alınmıştır.

Yöntem

Örneklerde aflatoksin M₁ varlığını belirlemek için ELISA test kiti (Ridascreen R11219) kullanılmıştır. En az 200 g olacak şekilde toplanan örneklerin 20°C'de 30 dk bekletilerek çözümleri sağlanmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda örnekler hazırlanmıştır. Yağı uzaklaştırmak için örnekler santrifüj edildikten (10 dk /3500g/10°C) sonra tüp yüzeyinde biriken yağın tamamı pastör pipeti ile dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Çalışmada 96'lık mikrolakalar kullanılmıştır. Elde edilen yağsız örneklerden ve kit içerisinde var olan standart çözeltilerden her bir mikrolaka kuyucuğuna 100 µl aktarılmıştır. Kuyucuklara solüsyonundan 100 µl konulmuş ve 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Kuyucuklar içindeki sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara 250 µl yıkama çözeltisi eklenmiş ve aynı şekilde kuyucuktan bu sıvı da uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 2 kez daha tekrar edilmiştir. Belirlenmiş numaralı kuyucuklara 100'er µl standart çözeltiden veya örneklerden eklendikten sonra mikrolaka nazikçe karıştırılarak oda ısısında 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Kuyucuklar içindeki sıvı tamamen uzaklaştırılarak kuyucuklara 250 µl yıkama çözeltisi eklenmiş ve aynı şekilde kuyucuktan bu sıvı da uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlanmıştır. Her kuyucuğa enzim konjugat çözeltisinden 100 µl eklenmiş ve nazikçe mikrolaka karıştırılmıştır. Mikrolaka 15 dk oda ısısında karanlıkta bekletilmiştir. Kuyucukların içindeki sıvı uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara 250 µl yıkama çözeltisi eklenmiş ve aynı şekilde kuyucuktan bu sıvı da uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 2 kere daha tekrar edilmiştir. 100 µl substrat-kromojen çözeltisinden her bir kuyucuğa eklenmiş ve mikrolaka karıştırılmıştır. Oda ısısında karanlıkta 15 dk bekletildikten sonra

reaksiyonu durdurmak için 100 µl durdurma çözeltisi her bir kuyucuğa eklenmiş ve mikropilaka nazikçe karıştırılmıştır. Spektro-

fotometrede 450 nm'de okuma yapılmış ve tüm standartlar ile örneklerin absorbens değerleri kaydedilmiştir (Ridascreen R11219, 2012).

Standartların veya örneklerin absorbens değeri

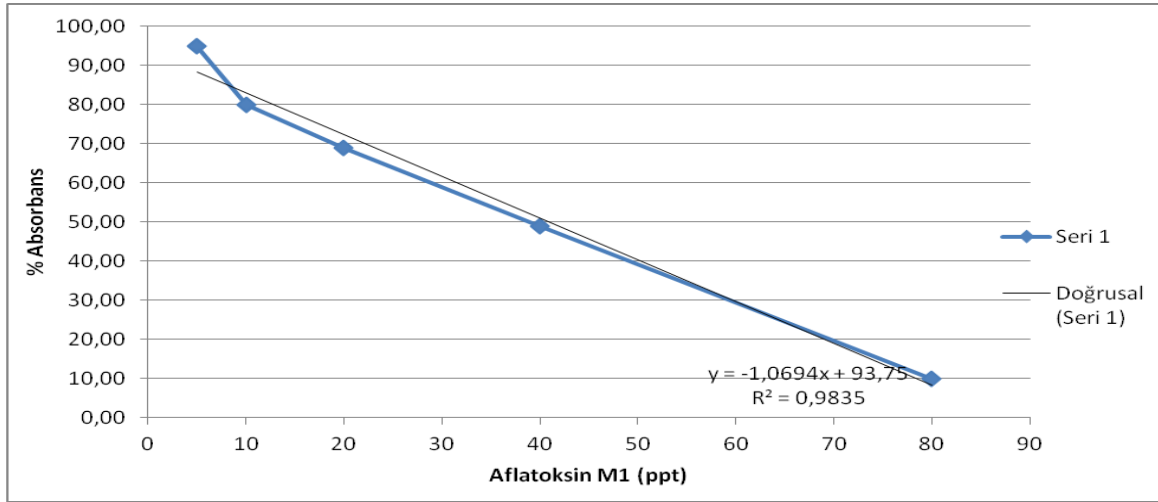
$$\frac{\text{Standartların veya örneklerin absorbens değeri}}{\text{0. standardın (0 ppt aflatoksin M}_1 \text{ içeren standart) absorbens değeri}} \times 100 = \% \text{ absorbens}$$

Bulgular

Standart Aflatoksin M₁ çözeltilerinin konsantrasyonları ve absorbens değerleri ile grafik hazırlanarak standart eğri oluşturulmuştur. Elde edilen standart eğri Şekil 1'de verilmiştir.

Analiz edilen 50 adet dondurma örneğinden 27 (%54) adedinde Aflatoksin M₁ miktarı

<0,005 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde süt ve ürünleri için Aflatoksin M₁ limitini (0,05 µg/kg) aşan toplam 17 örnek (%34) tespit edilmiştir. Örneklerde tespit edilen en yüksek toksin miktarı 0,702 µg/kg'dır. Tablo 1'de dondurma örneklerinde belirlenen Aflatoksin M₁ miktarları verilmiştir.



Şekil 1. Aflatoksin M₁ için standart eğri.

Figure 1. Calibration curve of Aflatoxin M₁.

Tablo 1. Dondurma örneklerinde Aflatoksin M₁ miktarları.

Table 1. Aflatoxin M₁ Levels in samples of Ice Cream.

Örnek Sayısı (n)	Örneklerdeki AFM ₁ Düzeyi (%)			Toplam x-Sx*
	<0,005µg/kg	0,005-0,05 µg/kg	0,05-0,702 µg/kg	
50	27 (%54)	6 (%12)	17 (%34)	0,112 ± 0,217

*AFM₁ düzeyi belirlenirken minimum tespit değeri altında belirlenen örneklerdeki veriler "0" olarak hesaplanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Özellikle çocukların çok severek tükettiği dondurmada bu denli toksin oranı korkutucudur. Ülkemizde ve birçok ülkede dondurmada aflatoksin M₁ varlığı araştırılmıştır. Fallah (2010) süt ürünlerindeki aflatoksin M₁ varlığını araştırdığı çalışmada 36 dondurma örneğinin 25'inde aflatoksin M₁ tespit etmiş ve kış aylarında toplanan örneklerdeki toksin miktarının yaz aylarına göre daha fazla olduğunu belirtmiştir. Khoshnevis ve ark. (2012) 45 dondurma örneğini analiz etmiş ve bunların 10 tanesinin 0,5 µg/kg'den fazla toksin içerdiğini, toksin konsantrasyonu 1,03 µg/kg olan örneklerin bulunduğunu da belirlemişlerdir. Nilchian ve Rahimi (2012) 40 dondurma örneğinin %29'unda aflatoksin M₁ tespit etmiş ve en yüksek toksin konsantrasyonunu 0,25 µg/kg olduğunu belirtmişlerdir. Mutlu ve ark. (2010) 16 dondurma örneğinin 6'sının toksin yönünden pozitif olduğunu ve maksimum toksin miktarının 0,026 µg/kg olduğunu belirtmişlerdir. Cadirci ve ark. (2011) 115 dondurma örneğinin 30'unda (0,006-0,032 µg/kg) toksin varlığını belirlemişlerdir. Atanda ve ark (2007) çiğ süt, geleneksel süt ürünleri ve dondurma üzerine yaptıkları araştırmalarında dondurmada 2,2 µg/kg gibi oldukça yüksek M₁ kontaminasyonu tespit etmişlerdir. Yapılan araştırma sonuçları dondurmadaki aflatoksin M₁ kontaminasyonu yönünden uyarıcı görülmektedir. Dondurmada aflatoksin kontaminasyonu yönünden risk oluşturacak önemli etkenler süt ve/veya süt tozu olabilir. Süt hayvanlarının beslenme şekli ve yemin kalitesi sütteki toksin miktarını oldukça etkiler. Yemdeki aflatoksin B₁ miktarı ile sütteki aflatoksin M₁ miktarı arasında önemli bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Fallah, 2010; Galvano ve ark., 1996; Prandini ve ark., 2009; Rahimi ve ark., 2010; Şanlı ve ark., 2012; Van Egmond, 1989). Dondurmanın yapımı ve depolanması sırasında aflatoksin M₁ stabilitesini araştırılmıştır ve dondurma miksindeki aflatoksin M₁ miktarının, kullanılan kontamine krema ve sütteki aflatoksin M₁ miktarı ile paralel olduğu belirlenmiştir. Dondurmanın depolanması boyunca da toksin miktarının

stabil kaldığı belirtilmiştir (Wiseman ve Marth, 1983). Gıda teknolojisinde detoksifikasyon amacıyla teknolojik işlemler ve/veya dekontaminantlar üzerine çalışmalar hala sürse de, gıdada toksin varlığını önlemenin en doğru yolu toksinden arı hammadde ve katkı maddeleri kullanımı olacaktır. Bu araştırmada kafeterya, pastane ve lokantalarda ambalajsız olarak satışa sunulan dondurma örnekleri incelenmiştir. Kaliteli ürün ancak kaliteli hammaddeden ve gıda güvenliği sağlanarak üretilebilir. "Çiftlikten çatala" gıdaların her aşamada kontrol edilmesi bu anlamda oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Anon, 2003.** Mycotoxins. L326/15 Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC) No 2174 / 2003 of 12 December 2003.
- Anon, 2011.** Türk Gıda Kodeksi. Bulaşanlar Yönetmeliği, Gıda Hayvancılık ve Tarım Bakanlığı. 29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi gazete, Ankara.
- Ardıc, M., Karakaya, Y., Atasever, M., Adiguzel, G., 2009.** Aflatoxin M₁ levels of Turkish white brined cheese. Food Control 20, 196-199.
- Atanda, O., Oguntubo, A., Adejumo, O., Ikeorah, J., Akpan, I., 2007.** Aflatoxin M₁ contamination of milk and ice cream in Abeokuta and Odeda local governments of Ogun State, Nigeria. Chemosphere 68 (8), 1455-1458.
- Cadirci, O., Gucukoglu, A., Ozpinar, N., Terzi, G., Alisarli, M., 2011.** Aflatoxin M₁ contamination of ice cream in Samsun, Turkey. Journal Animal Veterinary Advances 10 (15), 2047-2050.
- Çelik, T.H., Sarımehtemoglu, B., Küplülü, Ö., 2005.** Aflatoxin M₁ contamination in pasteurised milk. Veterinarski Arhiv 75 (1), 57-65.
- Dinçoğlu, A.H., Gönülalan, Z., Kök, F., 2007.** Determination of aflatoxin M₁ levels in cheese sold in İzmit Province. Lucrari Ştintifince Medicina Veterinara 40, 758-763.
- Eaton, D.L., Gallagher, E.P., 1994.** Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annual Review Pharmacology and Toxicology 34, 135-72.
- Fallah, A.A., 2010.** Aflatoxin M₁ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. Food Control 21, 1478-1481.

- FDA, 2011.** U.S. Food and drug administration. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. August 2000. Update 11/09/2011.
- 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 (10), 1079-1090.
- Gürbay, A., Aydın, S., Girgin, G., Engin, A.B., Şahin, G., 2006.** Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control* 17, 1-4.
- IARC, 1993.** IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 56, some naturally occurring substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins. Lyon, IARC Press. France
- IARC, 2002.** IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans vol. 82, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, IARC Press, France.
- Khoshnevis, S.H., Gholampour, Azizi, I., Shateri, S., Mousavizadeh, M., 2012.** Determination of the Aflatoxin M in Ice Cream in Babol City (Northern, Iran). *Global Veterinaria* 8 (2), 205-208.
- Mutlu, G.A., Kursun, O., Kasimoglu, A., Dukel, M., 2010.** Determination of Aflatoxin M₁ Levels and Antibiotic Residues in the Traditional Turkish Desserts and Ice Creams Consumed in Burdur City Center. *Journal Animal Veterinary Advances* 9 (15), 2035-2037.
- Nilchian, Z., Rahimi, E., 2012.** Aflatoxin M₁ in Yoghurts, Cheese and Ice-Cream in Shahrekord-Iran. *World Applied Science Journal* 19 (5), 621-624.
- Prandini, A.G., Tansini, S., Sigolo, L., Filippi, M., Laporta, G., 2009.** Piva On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* 47 (5), 984-991.
- Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafei, M., Kazemeini, H.R., 2010.** Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahraz, Iran. *Food and Chemical Toxicology* 48, 129-131.
- Ravinayagam, V., Jaganathan, R., Panchanadham, S., Palanivelu, S., 2012.** Potential Antioxidant Role of Tridham in Managing Oxidative Stress against Aflatoxin-B(1)-Induced Experimental Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Hepatology* 2012, 1-9.
- Ridascreen (R11219), 2012.** Ridascreen Aflatoxin M₁ enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁. R-Biopharm AG. Germany.
- Şanlı, T., Deveci, O., Sezgin, E., 2012.** Effects of pasteurization and storage on stability of aflatoxin M₁ in yoğurt. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi* 18 (6), 987-990.
- Van Egmond, H.P., 1989.** Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. Van Egmond H.P., (Ed.), *Mycotoxins in dairy products*, Elsevier Applied Science, London and New York (1989), pp. 11-55.
- Wiseman, D.W., Marth, E.H., 1983.** Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of ice-cream and sherbet. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 177; 22-24.
- Zhang, Y.J., Wu, H.C., Yazıcı, H., Yu, M.W., Lee, P.H., Santella, R.M., 2012.** Global hypomethylation in hepatocellular carcinoma and its relationship to aflatoxin B(1) exposure. *World Journal of Hepatology* 4 (5), 169-75.