

## Ülkemizde Tüketilen Biraların Enzim İmmunolojik Test Çubukları Metodu İle Zearelanon ve Aflotoksin B<sub>1</sub> Kalıntıları Yönünden İncelenmesi

Doç. Dr. Özer ERGÜN

*I. Ü. Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı*

### ÖZET

Bu çalışmada ülkemizde tüketime sunulan biralarda «Enzim İmmunolojik Test Çubukları Metodu» ile Zearelanon ve Aflotoksin B<sub>1</sub> kalıntıları arandı. İncelenen 25 bira numunesinde her iki mikotoksinin de kalıntılarına rastlanmadı. Bira örnekleri hiç biri ekstraksiyon işleminden geçirilmeksizin direkt olarak test edildi. Uygulanan yöntemin hassasiyeti Aflotoksin B<sub>1</sub> için 1 ppb, Zearelanon için de 5 ppb'dir.

### ZUSAMMENFASSUNG

**Untersuchungen auf Rückständen von Zeareleanon- und Aflatoxin B<sub>1</sub> in türkischen Biere mit enzymimmunologischen Teststreifen-Verfahren.**

In dieser Arbeit wurde in türkischen Biere Rückstände von Zeareleanon- und Aflatoxin B<sub>1</sub> mit enzymimmunologischen Teststreifen-Verfahren untersucht. In den untersuchten 25 Bierproben wurde keine Rückstände von beiden Mykotoxinen gefunden. Bierproben waren unbehandelt direkt getestet. Nachweissgrenzen waren um 1 ppb Aflatoxin B<sub>1</sub>/ml, und 5 ppb Zeareleanon/ml.

### 1. GİRİŞ

Dünya üzerinde ve ülkemizde genişlemesi önlenemeyen çevre ve gıda kirlenmesine bağlı olarak hızla gelişen gıda kontrolü sahasında yabancı madde kalıntılarının ve bunlar arasında da mikotoksinlerin araştırılması en aktüel konulardan biri haline gelmiştir.

Aflotoksin B<sub>1</sub> (AfB<sub>1</sub>) ve Zeareleanon da (ZEA) insan ve hayvanlarda çok çeşitli zararlı tesirler gösteren ve sayıları 300'ün üzerinde olduğu bildirilen mikotoksinlerin halk sağlığı açısından önem taşıyan değişik etki mekanizmalarına sahip iki ayrı çeşididir (DIETRICH, 1989).

AfB<sub>1</sub> Aspergillus (A). flavus ve A. parasiticus'un salgıladığı en kuvvetli kanserojen özel-

likteki aflotoksindir. AfB<sub>1</sub>'in insan karaciğerinde kolayca metabolize olduğu ve uzun süreli birikim neticesinde de karaciğer tümörü ve karaciğer sirozuna neden olduğu bildirilmektedir (WOGAN, 1975).

Zearelanon da dünyanın her iklim bölgesinde bulunabilen küf mantarı Fusarium'ların bir metabolitidir. FES (Fermentation Estragenic Substance) veya F-2 toksin adları ile de anılan ZEA, öncelikle tahıllarda olmak üzere en çok bitkisel kökenli ürünlerde bulunur (CHRIS TENSEN ve Ark., 1965).

Bitki ve tahılların ZEA ile kontaminasyonu normalde tarlada başlamakla beraber yüksek ısı ve rutubet gibi uygun olmayan depolama şartları ZEA'nın salgılanmasını artırır (GROSS VEROBB, 1975). Bu metaboliti dikkat çekici yapan onun östrojenik karakterdeki hormonal tesiridir. Bu özelliği ile ZEA, hayvanlarda dölerimi bozukluklarına ve hiperöstrojenismusa neden olmaktadır (BAUER ve GEDEK, 1978; MİROCHA ve Ark., 1968).

AfB<sub>1</sub> gibi ZEA'nın da bitkisel ve hayvansal orijinli gıda maddeleri vasıtası ile insanlarda oluşturduğu potansiyel tehlike son zamanlarda daha yoğun bir şekilde tartışılır olmuştur (KUİPER ve Ark, 1987; SUNDOLF ve STRICKTLAND, 1985). ZEA kalıntılarının süt (MİROCHA ve Ark, 1981), tavuk eti-tavuk karaciğeri (MİROCHA ve Ark., 1982) ve yumurta (DAİLEY ve Ark, 1980) gibi hayvansal orijinli gıda maddelerinde varlığı, çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Yine çeşitli literatür verilerinden ZEA'nın doğal olarak bulunduğu mısır, buğday, arpa, yulaf, çavdar, sorgum ve kuru otta tespit edildiği görülmektedir (BAUER ve GEDEK, 1978; GRUBER ve THALMANN, 1981; KALLELA ve ETTALA, 1984; NEUHOLO, 1982). Buna bağlı olarak bazı fermente ürünlerin ve biranın da ZEA kalıntısı taşıdığı bazı araştırmacılar tara-

findan belirtilmiştir (MARTİN ve KEEN, 1978; RENZ, 1988).

Bu araştırma çalışması ile de ülkemizde üretilen bir alanda halk sağlığı açısından önem taşıyan AFB<sub>1</sub> ve ZEA kalıntılarının olası varlığı hassas bir metodla araştırılarak bu konuya ilk adımın atılması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

Zeranol ve Aflatoxin B<sub>1</sub> kalıntıları yönünden incelenmek üzere piyasada satılan biralardan 25 adet numune orjinal kapları (kutu ve şişe) içerisinde toplandı.

**2.1.1. Araç ve Malzemeler :** Spektrofotometre (MR 580 Microelisa Auto Reader), mikropipetler, test çubukları (pall immunodyne immüneaffinity membran), Zeranol ve AFB<sub>1</sub> için uygun antiserumlar, konjugatlar, fetal dana serumu, 3'-3'-5'-5'-Tetramethylbenzidin, Elisa testinde kullanılan kimyasal çözeltiler.

**2.1.2. Numunenin hazırlanışı :** Bira numuneleri hiç bir ön hazırlık işleminden geçirilmeksizin direkt olarak uygulamaya koyuldu.

### 2.2. Metod

Toplanan bira numunelerinde ZEA ve AFB<sub>1</sub> kalıntıları SCHNEIDER'in (1991) geliştirdiği Heterojen Enzimimmünojenik test çubukları (Heterojen Teststreifen-EIA) metodu ile aranmıştır.

#### 2.2.1. Testin Uygulanışı

Pall immunodyne test çubukları ile yapılan bu testin uygulanış safhaları aşağıdaki şekle ve anlatımdaki gibidir (SCHNEIDER, 1991)

## BULGULAR VE TARTIŞMA

25 adet bira örneğinin incelenmesi neticesinde hiç bir örnekte Zeranol ve AFB<sub>1</sub> kalıntısına rastlanmamıştır.

AFB<sub>1</sub> ve ZEA dünya üzerinde çeşitli ülkelerde yem ve gıda maddelerinde tespit edilmiştir (BIERMANN ve TERPLAN, 1982; RENZ, 1988). Literatür verilerinden araştırılan örneklerin % 11'inde ZEA bulunduğu anlaşılmaktadır (ENDERS, 1984). Bunlar arasında % 23,8 pozitif numune oranı ile mısır gelmektedir. Mısırın haricinde buğday, arpa, çavdar, yulaf, saman, silaj, sorgum ve fermente ürünlerde ZEA

nın varlığı bildirilmiştir (BAUER ve GEDEK, 1978; KALLELA ve ETTALA, 1984).

Bir üretiminin temel maddesini teşkil eden «Arpa»nın da ZEA için uygun bir ortam oluşturduğu çeşitli araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (BARNİKOL ve Ark., 1978; GRUBER ve THALMANN, 1981; LEIBETSEDER, 1982; LENGAUER, 1981; NEUHOLD, 1982).

GRUBER ve THALMANN (1981) Almanya'da yaptıkları çalışmada arpada 10-21 ppb arasında ZEA bulurlarken Avusturya'da NEUHOLD (1982), 10-450 ppb gibi daha yüksek miktarlarda ZEA tespit etmiştir.

Konuya paralel olarak MARTİN ve KEEN (1978) Lesota'da 199 numunenin 23 tanesinde 300-2000 ppb miktarlarında ZEA bulurlarken OKOYE (1986) de Nijerya biralarında ZEA'a rastlamıştır. Ayrıca Almanya'da biralarda çok az miktarlarda da (3 ppb) olsa ZEA kalıntılarının varlığından bahsedilmektedir (RENZ, 1988).

AFB<sub>1</sub> de fındık, yer fıstığı gibi yağlı, taneli gıdaların yanında bilhassa mısır ve mısırlı ürünlerde de tespit edilmiş ancak diğer tahıl çeşitlerinde rastlandığı bildirilmemiştir (DIETRICH, 1989).

ARORA ve arkadaşları, 1981 ZEA'nın önemsiz denecede teratojen olduğunu belirtirken muhtemel karsinojen tesiri henüz kesinlik kazanmamıştır (RENZ, 1988).

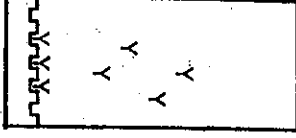
Her ne şekilde olursa olsun ZEA kalıntısı taşıyan gıda maddeleri tüketicilerde östrojen seviyesinin yükselmesine neden olduğu için ZEA'nın gıdalardaki kontrolü önem taşır. Bu nedenle, gerek AFB<sub>1</sub> ve gerekse ZEA'nın yem ve gıda maddelerinde tespiti için ilk önceleri fiziksel ve kimyasal metodlar kullanılmış, 80'li yıllardan sonra da aynı amaçla serolojik metodlar geliştirilmiştir. (DIETRICH, 1988; RENZ 1988; SCHNEIDER, 1991).

Kimyasal ve fiziksel metodlara gerek hasasiyet ve gerekse çabukluk yönünden üstünlük sağlayan mikrotiter plakalarda uygulanan ELISA Testi son yıllarda modifiye edilerek daha pratik olan enzim immünojenik test çubukları ile uygulanabilir hale gelmiştir (SCHNEIDER ve Ark. 1988, SCHNEIDER, 1991). Çok daha kısa sürede ve çok daha az çalışma ile yürütülen bu metod ile gıda ve yem maddelerinde

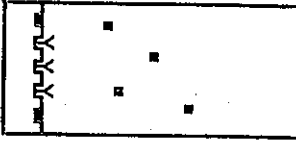
rinde ZEA ve AfB<sub>1</sub>'in yanısıra Aflatoksin M<sub>1</sub>, T-2 Toksin ve Ochratoksin A gibi diğer mikotoksinler de tespit edilebilmektedir.

Test çubukları ile birada ZEA ve AfB<sub>1</sub> kalıntılarının tespitinde bira örnekleri hiçbir ekst-

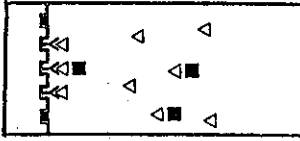
raksiyon işleminden geçirilmeksizin direkt olarak test edilmiş bu da uygulamada büyük kolaylıklar getirmiştir. Birada uygulanan bu metodun hassasiyeti AfB<sub>1</sub>'de 1 ppb, ZEA'de 5 ppb'dir.



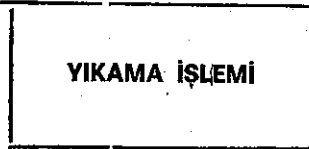
Test çubukları özel antikor ile kaplanır.



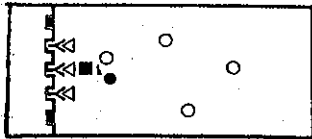
Test çubukları bu aşamada % 10'luk Fötal dana serumu/Fosfat puffer (FCS/PBS) çözeltisi içerisinde doyurulur.



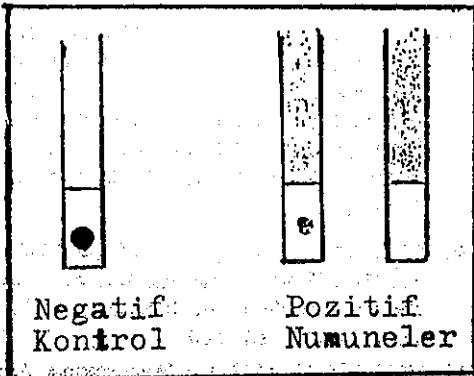
Bu şekilde hazırlanan test çubukları 1 ml Bira örneği/Enzim konjugat çözeltisi içerisinde 20-30 dk. inkübe edilir. (Negatif kontrol için % 10 metanol PBS kullanılır)



Test çubukları sırasıyla NaCl-Tween 20 çözeltisi içerisinde 5-10 dk., PBS çözeltisi içerisinde de 5 dk. tutularak yıkanır.



Son olarak da substrat eriyiği içerisinde 5 dakikalık inkübe edilir.



Son inkübasyon işlemini takiben test çubuklarından, renk oluşumuna göre değerlendirme yapılır. Negatif kontrol örneği koyu mavi renk verirken pozitif numuneler açık maviden-beyaza kadar hafifleyen tonlarda bulunurlar. Negatif kontrol test çubuğu ile aynı renk tonunda olanlar negatif olarak değerlendirilirler.

## K A Y N A K L A R

- 1 - ARORA, R.G, FRÖLEN, H., ve NILSSON, A. (1981) : Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. I. Influence of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and zearalenone. *Acta Vet. Scand.* 22, 524 - 534.
- 2 - BARNIKOL, H., GRUBER, S., THALMANN, A. (1981) : Hyperöstrogenismus durch Fusariumtoxine bei neugeborenen und abgesetzten Ferkeln. *Tierärztl. Umsch.*, 35, 94 - 105.
- 3 - BAUER, J. ve GEDEK, B. (1978) : Fusariumtoxikose als Ursache von Futterverweigerung und Fruchtbarkeitsstörungen beim Pferd. *Tierärztl. Umsch.* 35, 600 - 603.
- 4 - BIERMANN, A, TERPLAN, G. (1982) : Erfahrungen mit einem Mikro-Elisa zur Aflatoxin B<sub>1</sub>-Bestimmung in Lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.* 33, 17 - 20.
- 5 - CHRISTENSEN, C.M., NELSON, G.H., MIROCHA, C.J. (1965) : Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. *Appl. Microbiol.* 13, 653 - 659.
- 6 - DAILEY, R.E., REESE, R.E., ve BROUWER, E.A. (1980) : Metabolism of (14 C) zearalenone in laying hens. *J. Agric. Food Chem.* 28, 286 - 291.
- 7 - DIETRICH, R. (1989) : Anwendbarkeit enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis einiger Mykotoxine in Lebensmitteln tierischen und pflanzlichen Ursprungs. *Diss. Vet. Med. LM - Universität. München.*
- 8 - ENDERS, C (1984) : Zur Analytik von Zearalenon, —und —Zearalenol in Material pflanzlichen und tierischen Ursprungs. *Diss. Vet. Med. LM - Universität, München.*
- 9 - GROSS, V.J, ve ROBB, J. (1975) : Zearalenone production in barley. *Am. Appl. Biol.* 80, 211 - 216.
- 10 - GRUBER, S, THALMANN, A. (1981) : Unters. über das Vorkommen von Mykotoxinen (ausser Aflatoxin) in Futtermitteln und mögliche Zusammenhänge mit fütterbedingten Leistungsminierungen bei landwirtschaftlichen Leistungsminderungen bei andwirtschaftlichen Nutztieren. *Forschungsbericht 78 HS 12, Bundesministerium für Ernährung.*
- 11 - KALLELA, K. ve ETTALA, E. (1984) The oestrogenic *Fusarium* toxin (Zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. *Nord. Vet. Med.* 36, 305 - 309.
- 12 - KUIPER - GOODMAN, T. PSCOTT, P.M., ve WATANABE, H. (1987) : Risk assesment of the mycotoxin zearalenone. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 7, 253 - 306.
- 13 - LEIBETSEDER, J. (1982) : Mykotoxinprobleme in der Schweineproduktion. *Kraftfutter*, 11, 428 - 432.
- 14 - LENGAUER, E., LEW, H. (1981) : Über den mikrobiellen Zustand wirtschaftseigener Futtermittel. *Wien tierärztliche Mschr.* 68, 288 - 298.
- 15 - MARTIN, P.M.D., und KEEN, P. (1978) : The occurrence of zearalenone in raw and fermented products from Swaziland and Lesotho. *Sabour* 16, 15 - 22.
- 16 - MIROCHA, C.J., HARRISON, J., NICHOLS, A.A., ve Mc CLINTOCK, M. (1968) : Detection of a fungal estrogen (F - 2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* 16, 797 - 798.
- 17 - MIROCHA, C.J., PATHRE, S.V., ve ROBISON, T.S. (1981) : Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Fd Cosmet. Toxicol.* 19, 25 - 30.
- 18 - MIROCHA, C.J., ROBISON, T.S., PAWLOSKEY, R.J. ve ALLEN, N.K. (1982) : Distribution and residue determination of (3 H) zearalenone in broilers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66, 77 - 87.
- 19 - NEUHOLD, F.J. (1982) : Unters. über den Zusammenhang zwischen mikrobiologischem Status und Mykotoxingehalt von Futtermitteln. *Diss. Vet. Med. Universität Wien, Österreich.*
- 20 - OKOYE, Z.S.C. (1986) : Zearalenone in native cereal beer brewed in Jos Metropolis of Nigeria. *J. Food Safety* 7, 233 - 239.
- 21 - RENZ, V. (1988) : Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Zearalenon. *Diss. Vet. Med. L.M. Universität, München.*
- 22 - SCHNEIDER, E. (1991) : Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Teststreifen - Verfahren zum Nachweis von niedermolekularen Rückständen (Mykotoxine, Chloramphenicol). *Diss. Vet. Med., LM Universität, München.*
- 23 - SCHNEIDER, E., MARTLBAUER, E., ve TERPLAN, G. (1988) : Elisa - Test, - streifenverfahren zum Nachweis von Mykotoxinen und pharmakologisch wirksamen Substanzen in der Milch. *D. Veterinärmed. Gesellschaft e.V. in Garmisch - Partenkirchen*, p. 328 - 331.
- 24 - SUNDOLF, S.F., ve STRICKLANO, C. (1985) : Zearalenone and Zeranol : Potential residue problems in livestock. *Vet. Hum. Toxicol.* 28, 242 - 250.
- 25 - WOGAN, G. (1975) : Mycotoxins. *Ann. Rev. Pharmacol.* 15, 437 - 451.