

MERSİN İLİNDE ÇİĞ VE MARKET SÜTLERİNDE AFLATOKSİN M₁ DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF AFLATOXIN M₁ LEVELS IN RAW AND MARKET MILKS IN MERSIN PROVINCE, TURKEY

Nuran DELİALİOĞLU¹, Feza OTAĞ¹, N. Didem ÖCAL¹, Gönül ASLAN¹, Gürol EMEKDAŞ¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin. (nurandel@hotmail.com)

ÖZET

Aflatoksin M₁ (AFM₁), başta *Aspergillus flavus* olmak üzere bazı *Aspergillus* türleri tarafından üretilen aflatoksin B₁ (AFB₁)'in hidroksillenmiş bir metaboliti olup, kontamine yemlerle beslenen çiftlik hayvanlarının süt ve süt ürünlerinde bulunabilir. İnsanlar için en temel besin kaynağı olan süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek AFM₁, toksik ve karsinojenik etkileri nedeniyle insan sağlığı için potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada, ilimizdeki çiğ ve market sütlerindeki AFM₁ düzeyinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 39 keçi ve 53 inekten alınan toplam 92 çiğ süt örneği ile marketlerden rastgele alınan üretim tarihleri ve üretici firmaları farklı 45 adet UHT (ultra high temperature) ile pastörize edilmiş süt örnekleri dahil edilmiştir. Toplam 137 süt örneğinde AFM₁ düzeyi, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC; Aflaprep M immunoaffinity column; R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow) yöntemi ile araştırılmış ve keçi sütlerinin %35.8 (14/39)'inde, inek sütlerinin %86.7 (46/53)'sinde ve UHT sütlerin %73.3 (33/45)'ünde AFM₁ pozitifliği tespit edilmiştir. AFM₁ düzeylerinin; çiğ sütlerde 0.0021-0.8666 µg/l, UHT sütlerde ise 0.001-0.059 µg/l arasında değiştiği izlenmiştir. Yapılan değerlendirmede; keçi sütlerinin %10.2 (4/39)'sinde, inek sütlerinin %73.5 (39/53)'inde, UHT sütlerin ise %2.2 (1/45)'sinde saptanan AFM₁ düzeylerinin, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre kabul edilebilir aflatoksin sınır değerinin üzerinde (> 0.05 µg/l) olduğu görülmüştür. Sonuç olarak çalışmamızda, Mersin ilinden toplanan tüm süt örneklerinin %32 (44/137)'sinde sınır değer üzerinde saptanan AFM₁ varlığı; hayvan yemleri ve süt/süt ürünleri alanında faaliyet gösteren kurum ve kişilerin, aflatoksinlerin önemi ve korunma yolları konusunda hassasiyetle bilinçlendirilmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Aflatoksin M₁, çiğ süt, UHT süt, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC).

ABSTRACT

Aflatoxin M₁ (AFM₁) which is produced by some *Aspergillus* species, mainly *Aspergillus flavus*, is the hydroxylated metabolite of aflatoxin B₁ (AFB₁) and can be found in milk and dairy products of livestock fed with contaminated feed. AFM₁ is a potential threat to human health owing to its toxic and carcino-

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje no: BAP-TF TTB (ND) 2005-2) tarafından desteklenmiştir.

genic effects. This study was aimed to investigate the level of AFM₁ in raw and ultra-high-temperature pasteurized (UHT) milk samples. A total of 137 milk specimens (39 from goats, 53 from cows, and 45 from UHT market milks) were included to the study, and AFM₁ levels were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC; Aflaprep M immunoaffinity column; R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow) method. AFM₁ positivity was detected in 14 (35.8%) goat milk samples, in 46 (86.7%) cow milk samples and 33 (73.3%) UHT milk samples, with the levels ranging from 0.0021 µg/l to 0.8666 µg/l in raw milk, and from 0.001 µg/l to 0.059 µg/l in UHT milk samples. In 10.2% (4/39) of goat milk, 73.5% (39/53) of cow milk, and 2.2% (1/45) of UHT milk samples, the toxin levels were found to be above the officially reasonable limit value (> 0.05 µg/l) recommended by Turkish Food Codex Regulation. Since AFM₁ levels were found to be significantly high in the raw milk samples collected in Mersin province (located on Mediterranean part of Turkey), it was concluded that people dealing with feed, milk and dairy products should be informed about the importance of aflatoxins and the preventive measures to get protected from AFB₁ and AFM₁.

Key words: Aflatoxin M₁, raw milk, UHT milk, high performance liquid chromatography (HPLC).

GİRİŞ

Bazı *Aspergillus* türleri (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve nadiren *Aspergillus nomius*) tarafından oluşturulan aflatoksinlerin ana kaynağı yer fıstığı, mısır ve pamuk çekirdeği olup, çeşitli bitki ve bitki ürünleri aflatoksinler ile kontamine olabilmektedir. Aflatoksinlerin dört majör tipi (B₁, B₂, G₁, G₂) tanımlanmış ve *A.flavus*'un sadece aflatoksin B, diğer iki türün ise aflatoksin B ve G oluşturduğu belirlenmiştir¹. Aflatoksin M₁ (AFM₁) ve M₂ ise, aflatoksin B₁ (AFB₁) ve B₂'nin hidroksile metabolitleridir ve kontamine gıdalarla beslenen çiftlik hayvanlarının süt ve süt ürünlerinde bulunabilir^{1,2}. Hayvanlarda yemlerle alınan AFB₁ metabolize olarak %1-2 oranında AFM₁'e dönüşmekte ve bu metabolit süte geçebilmektedir³. Toksik ve karsinojenik etkileri olan aflatoksinler, insanlarda immün sistemin baskılanmasına yol açabilmekte ve özellikle hepatit B virusu ile birlikte karaciğer kanseri gelişiminde rol oynayabilmektedir^{4,5}.

Yapılan epidemiyolojik araştırmalar daha ziyade AFB₁'e odaklanmıştır; zira bu aflatoksin tipi en potent doğal karsinojendir. AFB₁, "International Agency for Research on Cancer" tarafından grup 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır⁶. AFM₁ de, AFB₁ gibi insan hepatositlerine sitotoksik etki gösterir; ancak daha düşük karsinojenik etkiye sahiptir. Toksikolojik çalışmalar, AFM₁'in akut ve kısa süreli toksisitesinin AFB₁ ile aynı veya daha düşük düzeyde olduğunu göstermiş; genotoksisite çalışmalarında ise AFM₁'in AFB₁'den yaklaşık 10 kez daha az mutajenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır². Her ne kadar insanlarda süt ve süt ürünleri ile AFM₁ alımı ve karaciğer kanseri arasındaki doğrudan ilişki aydınlatılamamışsa da, özellikle yenidoğanlar, çocuklar ve yaşlılar için en temel besin maddesi olan bu ürünlerin AFM₁ ile kontamine olmasının ciddi sağlık sorunları doğuracağı açıktır. Bu nedenle birçok ülkede, hayvan yemlerinde kullanılan AFB₁ düzeyi sıkı bir kontrol altında tutulmaktadır. Ülkemizde de, sütte bulunabilecek kabul edilebilir AFM₁ değeri 0.05 µg/L'dir⁷.

Bu çalışmada, ilimizdeki çiğ sütlerde ve marketlerde satılan UHT (ultra high temperature) yöntemi ile pastörize edilmiş sütlerde AFM₁ düzeyinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, Mayıs-Ağustos 2006 tarihleri arasında Mersin merkeze bağlı beş köyden 39 keçi ve 53 inekten alınan çiğ süt ile marketlerden alınan 45 adet UHT süt olmak üzere toplam 137 adet süt örneği araştırıldı. Çiğ süt örnekleri steril kaplara toplanarak laboratuvara ulaştırıldı. 100 ml süt örneği Whatman no: 4 filtre kağıdından süzülerek yağı ayrıldı ve çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı. Marketlerden alınan UHT sütler ise, üretim tarihleri farklı ve beş ayrı üretici firmaya ait olacak şekilde örneklendi.

Tüm örneklerde AFM₁ düzeyi, "Aflaprep M immunoaffinity column" (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow Scotland) sistemi kullanılarak firmanın önerdiği prosedüre göre yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) metodu ile analiz edildi. HPLC cihazı; floresan dedektör ve intersil OD-2 (25 cm x 4.6 mmID) kolona sahip; ekzitasyonu 360 nm, emisyonu 430 nm dalga boyunda olan ve mobil fazı saf su/asetonitril/metanol (50/30/20 v/v/v) karışımından oluşan bir cihazdır. Hazırlanan örnekten 50 ml alınarak immünoafinite kolondan 2-3 ml/saniye hızla geçirildi. Kolonun üzerine yeni bir şırınga takılarak kolon 10 ml su ile 1-2 damla/saniye hızla iki kere yıkandıktan sonra, kolondan şırınga ile hava geçirilerek kolondaki su kalıntıları uzaklaştırıldı. Kolondan 1.25 ml metanol/asetonitril (20:30 v/v) 2-3 saniyede 1 damla hızla geçirildikten sonra yine aynı hızla 1.25 ml saf su geçirilip aynı "vial"de toplandı ve toplam hacim 2.5 ml olarak ayarlandı. Toplanan örnek karıştırıldıktan sonra 100 µl HPLC (Agilent 1100 series) enjekte edilip floresan detektörde okutularak aflatoksin M₁ düzeyinin kantitatif analizi yapıldı. AFM₁ standartları; 0.25, 0.5, 1 ve 2 ng/ml konsantrasyonlarda hazırlanarak cihazda okutuldu ve kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Örneklerdeki AFM₁ düzeyleri bu eğriye göre kantitatif olarak ölçüldü.

BULGULAR

Çalışmamızda, keçi sütlerinin %35.8 (14/39)'inde, inek sütlerinin %86.7 (46/53)'sinde ve UHT sütlerin %73.3 (33/45)'ünde AFM₁ pozitifliği tespit edilmiştir. AFM₁ düzeyleri; çiğ sütlerde 0.0021-0.8666 µg/l arasında, UHT sütlerde ise 0.001-0.059 µg/l arasında değişmektedir. Keçi sütlerinin %10.2 (4/39)'sinde, inek sütlerinin %73.5 (39/53)'inde, UHT sütlerin ise %2.2 (1/45)'sinde olmak üzere tüm örneklerin %32 (44/137)'sinde aflatoksin düzeyinin olması gereken sınır değerin üzerinde (> 0.05 µg/l) olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA

İnsanlar için en temel besin kaynağı olan süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek AFM₁, insan sağlığı için potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle süt ve süt ürünlerinde AFM₁ varlığının ve düzeyinin saptanması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla genellikle immünokimyasal yöntemler kullanılmakta olup, bunlar arasında EIA (enzyme immunoassay), RIA (radioimmunoassay), TLC (thin-layer chromatography) ve HPLC sayılabilir².

Yapılan çalışmalar, sütün ısıtılması (3-4 saat ateşte) ya da pastörizasyonu ile AFM₁ düzeyinde değişme olmadığını vurgulamaktadır. Martins ve arkadaşlarının³ Portekiz'de yaptıkları çalışmada, çiğ sütlerde %80.6, UHT sütlerde ise %84.2 oranında AFM₁ varlığı sap-

tanmış; sadece bir UHT süt örneğinde AFM₁ düzeyinin kabul edilebilir olduğu belirlenmiştir. Roussi ve arkadaşları⁸ Yunanistan'da pastörize sütte %85.4, çiğ inek sütünde %73.3, koyun sütünde %66.7, keçi sütünde %40 ve UHT sütlerde %82.3 oranında AFM₁ saptamışlar, bir inek sütünde de sınırın üzerinde AFM₁ düzeyi tespit etmişlerdir. Blanco ve arkadaşlarının⁹ İspanya'da yaptıkları çalışmada, UHT sütlerde %29.8 oranında AFM₁ pozitifliği belirlenmiş ve iki örnekte sınır değer üzerinde AFM₁ varlığı rapor edilmiştir. Kamkar¹⁰ ise İran'da, çiğ sütlerde %76.6 oranında AFM₁ tespit etmiş, pozitif örneklerin %40'ında saptanan değer kabul edilebilir sınırın üzerinde olduğunu bildirmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da, değişik gıda ürünlerinin farklı oranlarda AFM₁ ile kontamine olduğu bildirilmektedir. Oruç ve arkadaşları¹¹ tarafından Bursa'da yapılan çalışmada, AFM₁ düzeyinin beyaz peynirde kabul edilebilir sınırın üzerinde olduğu, ancak sütlerde bu sınırın altında kaldığı ifade edilmiştir. Akdemir ve arkadaşları¹², Türkiye'nin 7 ilinden topladıkları 48 çiğ süt örneğini araştırmışlar; Eskişehir ve Lüleburgaz dışındaki illerden (Burdur, Nevşehir, Bursa, Ankara, Antalya) alınan örneklerde aflatoksin varlığı saptamışlar ve örneklerin %33.3'ünde aflatoksin düzeyinin sınır değerinin üzerinde olduğunu rapor etmişlerdir. Çelik ve arkadaşları¹³ da, 85 pastörize süt örneğinin %64'ünde kabul edilebilir düzeyin üzerinde toksin varlığı bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, keçi sütü örneklerinin %10.2'sinde ve inek sütü örneklerinin %73.5'inde AFM₁ düzeylerinin kabul edilebilir sınırın üzerinde olduğu bulunmuştur. UHT sütlerinde ise bir örnek dışında (%2.2) toksin düzeyinin kabul edilebilir sınırın altında olduğu saptanmıştır.

Süt örneklerinde tespit edilen aflatoksin düzeyinin mevsimlere göre değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir. Kamkar¹⁰ AFM₁ düzeyinin kış ve sonbaharda, ilkbahar ve yaz göre anlamlı olarak yüksek olduğunu, bunun nedeninin ise ilkbahar ve yaz aylarında ineklerin doğal dış ortamlarda otlamasından kaynaklandığını ifade etmektedir. Bu bulguya paralel olarak Unusan'ın¹⁴ çalışmasında, İç Anadolu'nun çeşitli illerinden Ocak ve Şubat aylarında toplanan UHT sütlerinde %47 gibi yüksek bir oranda sınır değer üzerinde aflatoksin varlığı tespit edilmiştir. Bizim mayıs-ağustos döneminde gerçekleştirdiğimiz çalışmada da, sınır değer üzerindeki toksin düzeyinin UHT sütlerinin sadece %2.2'sinde saptanması, bu düşüncüyü desteklemektedir. Yüksek AFM₁ düzeyinin keçi sütlerinde (%10.2) inek sütlerine (%73.5) göre daha düşük oranda saptanmasının nedeni ise, bölgemizde keçilerin ineklere oranla daha fazla dış ortamda otlatılması olarak düşünülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, Mersin ilinde keçi ve ineklerden toplanan çiğ sütlerin %46.7 (43/92)'sinde ve UHT sütlerinin %2.2 (1/45)'sinde olmak üzere, tüm örneklerin %32 (44/137)'sinde resmi makamlarca bildirilen kabul edilebilir değer üzerinde (> 0.05 µg/l) AFM₁ düzeyleri saptanmıştır. Bu sonuç, gerek hayvan yemleri ve süt/süt ürünleri alanında faaliyet gösteren, gerekse bunların kontrolünü yapan kurum veya kişilerin konu ile ilgili olarak ciddi bilgi ve eğitim eksikliği olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle sütü kullanan hayvanlara verilen yemlerdeki AFB₁ ve elde edilen süt ve süt ürünlerindeki AFM₁ düzeylerinin periyodik olarak ve bilinçli bir şekilde kontrol edilmesi, aflatoksinin neden olabileceği olası toksik ve karsinojenik komplikasyonların önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 497-516.
2. Henry SH, Whitaker T, Rabbani I, et al. Aflatoxin M1. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>
3. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M₁ in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. Food Addit Contam 2000; 17: 871-4.
4. Groopman JD, Johnson D, Kensler TW. Aflatoxin and hepatitis B virus biomarkers: a paradigm for complex environmental exposures and cancer risk. Cancer Biomark 2005; 1: 5-14.
5. Mizrak D, Engin B, Onder FO, et al. Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey. Turk J Gastroenterol 2009; 20: 192-7.
6. International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 82. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene (2002) Lyon: IARC. 39-267.
7. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Resmi Gazete, 16 Kasım 1997. Sayı: 23172, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
8. Roussi V, Govaris A, Varagoulis A, Botsoglou NA. Occurrence of aflatoxin M1 raw and market milk commercialized in Greece. Food Addit Contam 2002; 19: 863-8.
9. Blanco JL, Dominguez L, Gomez-Lucia E, Garayzabal JFF, Garcia JA, Suarez G. Presence of aflatoxins M1 in commercial ultra-high-temperature treated milk. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 1622-3.
10. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. Food Control 2005; 16: 593-9.
11. Oruc HH, Sonal S. Determination of aflatoxin M1 levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey. Vet Hum Toxicol 2001; 43: 292-3.
12. Akdemir Ç, Altıntaş A. Ankara'da işlenen sütlerde aflatoksin-M1 varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004; 51: 175-9.
13. Çelik TH, Sarımeçmetoğlu B, Küplülü Ö. Aflatoksin M1 contamination in pasteurised milk. Vet Arhiv 2005; 75: 57-65.
14. Unusan N. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. Food Chem Toxicol 2006; 44: 1897-900.