

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VAN İLİNDE ÜRETİLEN POLENLERDE
AFLATOKSİN İÇERİKLERİ**

Veteriner Hekim Fatih ARSLAN
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hisamettin DURMAZ

VAN 2017

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VAN İLİNDE ÜRETİLEN POLENLERDE
AFLATOKSİN İÇERİKLERİ**

Veteriner Hekim Fatih ARSLAN
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hisamettin DURMAZ

VAN 2017

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2017-6135 nolu proje ile desteklenmiştir.

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VAN İLİNDE ÜRETİLEN POLENLERDE AFLATOKSİN İÇERİKLERİ

Veteriner Hekim Fatih ARSLAN
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Yakup Can SANCAK

Üye
Prof. Dr. Hisamettin DURMAZ

Üye
Yrd. Doç. Dr. Hakan SANCAK

TEZ KABUL TARİHİ
14 /12/2017

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sırasında bana desteklerini esirgemeyen ve çalışmalarımı yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Hisamettin DURMAZ'a, yüksek lisans boyunca benden ilgi ve alakalarını esirgemeyen Besin Hijyeni ve Teknolojisi anabilim dalı hocalarımdan Prof. Dr. Yakup Can SANCAK, Prof. Dr. Emrullah SAĞUN, Prof. Dr. Kamil EKİCİ ve Doç. Dr. Özgür İŐLEYİCİ'ye, Arş. Gör. Rabia Mehtap TUNCAY'a teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmaya TYL-2017-6135 nolu proje ile destek veren Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca aldığım her karar ve attığım her adımda yanımda olan, beni hiç yalnız bırakmayan annem Zahide ARSLAN'a, babam Enver ARSLAN'a, benim için abla olmaktan çok anne olan ve elindeki tüm imkânları benim için seferber eden ablam Nihal GÖKÇE ve eŐi Özgür GÖKÇE'ye, her zaman varlığını arkamda hissettiğim abim Tezcan ARSLAN ve eŐi Tuba HANER ARSLAN'a, benim dünyadaki en büyük kıymetlilerim yeğenlerim Yağmur Selin GÖKÇE ve Elanaz Tuba ARSLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VI
Şekiller Listesi.....	VII
Tablolar Listesi.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Polen.....	3
2.2. Mikotoksinler.....	9
2.2.1. Mikotoksinlerin üreme şartları.....	10
2.2.2. Mikotoksinlerin detoksifikasyonu ve dekontaminasyonları.....	11
2.3. Aflatoksinler	13
2.3.1. Aflatoksin limitleri	15
2.3.2. Aflatoksinlerin toksisitesi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç.....	19
3.2. Kullanılan aletler ve kimyasallar.....	19
3.3. Yöntem.....	20
3.3.1. Rutubet, su aktivitesi ve pH değerlerinin belirlenmesi.....	20

3.3.2. Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ standartlarının hazırlanması.....	20
3.3.3. Aflatoksin miktarlarının belirlenmesi	24
3.3.4. Kromatografik şartlar	26
3.3.5. HPLC çalışma şartları.....	26
3.3.6. Tanımlama.....	27
3.3.7. Tayin.....	27
3.3.8. İstatistiksel analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
ÖZET.....	35
SUMMARY.....	36
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	42
EKLER.....	43
EK1. Etik Kurul Raporu.....	43
Ek 2. Tez Orjinallik Raporu.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

μl	: mikrolitre
μm	: Mikrometre
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$: Asetonitril
CH_3OH	: Metanol
H_2O	: Su
HNO_3	: Nitrik asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KBr	: Potasyum bromür
kcal	: Kilo kalori
ml	: mililitre
ng	: nanogram
nm	: nanometre
ppb	: Parts Per Billion (milyarda bir $\mu\text{g}/\text{kg}$)
ppm	: Parts Per Million (milyonda bir)
PTFE	: Polytetrafloretillen
UNICEF	: United Nations International Children's Emergency Fund
WHO	: World Health Organization

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Arının poleni alması.....	6
Şekil 2.	Arıların kovana girmesi.....	7
Şekil 3.	Polenlerin kurutulması.....	8
Şekil 4.	Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ ve M ₂ 'nin kimyasal yapıları.....	14
Şekil 5.	Aflatoksin G ₁ 'in kalibrasyon eğrisi.....	21
Şekil 6.	Aflatoksin G ₂ 'in kalibrasyon eğrisi.....	22
Şekil 7.	Aflatoksin B ₁ 'in kalibrasyon eğrisi.....	22
Şekil 8.	Aflatoksin B ₂ 'in kalibrasyon eğrisi.....	23
Şekil 9.	Çalışma standartlarının alıkonma zaman grafiği.....	23
Şekil 10.	Örneklerin ekstraksiyonu.....	24
Şekil 11.	Örneklerin süzülmesi.....	25
Şekil 12.	Süzüntünün immunoafinite kolondan geçirilmesi.....	25
Şekil 13.	Araştırmada kullanılan HPLC cihazı.....	26

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	Polenin kimyasal içeriği.....	4
Tablo 2.	Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanıldığı hastalıklar.....	5
Tablo 3.	Aflatoksinlerin formülü ve moleköl ağırlıkları.....	14
Tablo 4.	Gıdalarda aflatoksin içeriği ve maksimum limitleri.....	16
Tablo 5.	Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri.....	18
Tablo 6.	Aflatoksin ara stok standartlarının hazırlanması.....	21
Tablo 7.	Toplam aflatoksin düzeyi, su aktivitesi, pH ve rutubet değerleri arasındaki korelasyon katsayıları.....	28
Tablo 8.	Polen örneklerinin kimyasal analiz sonuçları.....	29
Tablo 9.	Polen örneklerindeki aflatoksin miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$).....	30

1. GİRİŞ

Türkiye nüfusunun yarısından fazlası tarım ile uğraşmasına rağmen her geçen yıl gayri safi milli hasılda tarımın payı gittikçe düşmektedir. Günümüzde bu oranın % 6.5-12 arasında kalması bile tarımdan elde edilen gelirin ve kalitenin iyi olmadığını göstermektedir. Türkiye’de arıcılık konusunda devlet desteği çeşitli şekillerde yapılmakta ve bu desteklemelerden bütün arıcıların faydalanması konusunda hassasiyet gösterilmektedir. İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlükleri, Ziraat Bankası ve Tarım Kredi Kooperatifleri desteklemeler ve teşvikler konusunda gerekli olan bilgileri arıcılara verebilmektedirler (Sağlam, 2011). Tarımda kalite ve ürün miktarının artmasına sebep olacak en önemli yollardan biri de tozlaşma ihtiyacının karşılanmasıdır. Polen toplamak için çiçeğe giden arılar bitki türlerinde çeşitliliğe ve miktar oranlarının artmasına neden olmaktadır (Kumova ve Özkütük, 1988).

Ülkemizde genelde sabit arıcılık faaliyetleri yerine gezginci arıcılık tercih edilmekte olup arıcıların büyük bir çoğunluğu yalnızca bal üretimi yapmaktadır. Diğer arı ürünlerinin üretimi bala oranla çok az olmasına rağmen, günümüzde özellikle tedavi amaçlı olarak talep edilmekte ve profesyonel arıcılar tarafından polen ve arı sütü üretiminin artırılması sağlanmaktadır (Kumova ve Korkmaz, 1999).

Arılar poleni, hem genç larvaların hem de yaşlı larvaların beslenmesinde kullanılmaktadırlar. Günümüzde polen, arılar kadar insanlar için de önemli bir besin kaynağı olarak kullanılmaktadır (Alataş ve ark., 1997). Son yıllarda hem polen tüketimine olan ilgi artış hemde kayıt dışı ve denetlenmeyen üreticilerin varlığı artmıştır. Bu sebeple polen, faydalı olmasından daha çok tehlike arz etmektedir. Polen, çiçeklerin açtığı ve hava sıcaklığının yüksek olduğu ilkbahar ve yaz mevsimlerinde elde edilmektedir. Kurutulması sırasında polenin nem içeriğinin ölçülmesi ve tüketime sunulacak polenin nem oranının % 3-7 arasında olması mikrobiyolojik üreme açısından önem arz etmektedir (Çankaya ve Korkmaz, 2008). Aksi takdirde protein ve karbonhidrat değerinin yüksek olması nedeni ile polenlerde küf üremesinde artış olabilir ve bu küfler aflatoksin üretebilirler. Aflatoksinler, depolanmış yem ve yem maddeleri ile besinlerde ve doğada yaygın bir şekilde bulunur. Ayrıca, üremeleri için uygun olan koşullarda (% 15’in üzerinde nem, 20-30 °C sıcaklık ve yeterli oksijen) muhafaza edilen

besin ve yemlerde hızla gelişip toksin sentezi yapabilirler. Dolayısıyla kayıt dışı üretilen ve denetlenmeyen bu üretimlerde aflatoksin varlığının insanların sağlığı için bir tehlike oluşturduğu tahmin edilmektedir.

Yapılan bu çalışmayla Van ilinde üretilen polenlerde aflatoksin varlığının halk sağlığı açısından tehlike oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polen

Bal arıları bitki çeşitliliğinin oluşmasında ve bitkilerin üremesinde aktif rol oynamaktadır. Bu arılar sayesinde insanlara sunulan en önemli besin kaynaklarından biri de polen olarak adlandırılan çiçek tozlarıdır. Polen taneleri mikroskop altında incelendiğinde 6-200 µm boyutlarında görülen sıkıştırılmış polen tozlarından oluşmaktadır (Çankaya ve Korkmaz, 2008).

Ergin bal arılarının temel enerji kaynakları karbonhidratlardır ve arılar bu karbonhidrat ihtiyaçlarını nektarlar vasıtasıyla karşılarlar. Ergin arıların yaşamlarını sürdürmeleri için sadece karbonhidrat yeterli olurken, yavru ve genç arıların yeterince gelişebilmeleri için karbonhidratın yanında proteine de ihtiyaçları vardır ve polen bu ihtiyacı karşılayabilen tek besin kaynağıdır. Polenin yokluğunda yavru üretimi durur ve koloninin devamı sağlanamaz (Schmidt, 1995; Pernal ve Currie, 2001). Bal arılarının beslenmesi sırasında polen miktarını yeteri kadar alabilmesi salgı bezleri, dokuları ve diğer organların gelişebilmesi için önemi büyüktür. Genç işçi arıların vücutlarındaki nitrojenin tamamı polenden karşılanır. Bundan dolayı işçi arılarının özellikle petekten çıktıktan sonra iki hafta boyunca bol miktarda polen tüketmeleri gerekmektedir. Petek gözlerinden çıkan işçi arılar, polen tüketimine başlar ve 12 saat içerisinde polenin yaklaşık % 50'sini tüketirler. Daha sonraki 42-52 saat sürede ise, işçi arılar polenin tamamını tüketmiş olurlar. İşçi arıların ergin hale gelmeleri ile birlikte polen tüketimi azalır ve karbonhidrat ihtiyacını karşılamak için nektar ve bal ile beslenmeye devam ederler (Herbert, 1997).

Bal arılarının polen üretimi için tek kaynakları doğal floradır. Doğal floranın polen değeri ise çiçek türlerinin fazlalığına, çeşitliliğine ve hasat sürenin uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca floranın polen değeri ve polenin kimyasal yapısını iklim şartları da etkilemektedir (Lakovleva, 1985).

Polenin besin içeriği, bölgelerdeki bitki çeşitliliğinin farklı olmasından dolayı değişkenlik gösterebilmektedir. Genelde polen; protein, karbonhidrat, yağ asitleri,

vitaminler ve mineral madde içerir. Antimikrobiyal etkiye sahip olan polenlerin ağırlık bakımından yaklaşık % 25'i proteindir (Özcan ve ark., 2003).

Polenin kimyasal içeriği Tablo 1'de gösterilmiştir (Schmidt, 1996). Doğal bir besin olan arı poleni vitaminleri, mineralleri, aminoasitleri, enzimleri, koenzimleri, yağ asitlerini ve karbonhidratları da yapısında bulundurmaktadır (Özcan ve ark., 2003). Ayrıca fitokimyasallardan; karotenoidler, flavonoidler ve fitosteroidler de polende yoğun olarak yer almaktadır (Broadhurts, 1999).

Tablo 1. Polenin kimyasal içeriği.

Bileşen	Değer	Bileşen	Değer
Enerji	2.46 kcal/g	Nikel	45 ppm
Protein	% 23.7	Tiamin	9.4 ppm
Karbonhidrat	% 27	Niasin	157 ppm
Lipit	% 4.8	Riboflavin	18.6 ppm
Fosfor	% 0.53	Pridoksin	9 ppm
Potasyum	% 0.58	Pantotenat	28 ppm
Sodyum	% 0.044	Folik asit	5.2 ppm
Kalsiyum	% 0.225	Biotin	0.32 ppm
Magnezyum	% 0.148	Vitamin C	350 ppm
Çinko	87 ppm	Karoten	95 ppm
Bakır	14 ppm	Vitamin E	14 ppm
Demir	140 ppm		

Baydar ve Gürel (1996) yaptıkları çalışmada, polen yağının yağ asitleri bakımından zengin olduklarını bildirmişlerdir. Özellikle oleik asit başta olmak üzere linolenik asit, palmitik asit, stearik asit ve araşidik asit bakımından zengin olduğunu tespit etmişler ve bu yağların beslenme kalitesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca besin elementlerinden potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum ve demir açısından da iyi bir kaynak olduğunu ifade etmişlerdir.

Kumova ve Korkmaz (1999) arı ürünlerinin kullanılmasıyla ilgili yaptıkları bir anket çalışmasında, tüketimin sırasıyla % 87.20 bal, % 13.05 polen, % 11.60 arı sütü, % 0.49 bal mumu ve % 0.49 propolis olduğunu belirlenmişlerdir. Özellikle ankete

katılanların baldan ziyade, poleni tedavi amaçlı kullandıkları ortaya çıkmıştır. Ayrıca eğitim seviyesi yükseldikçe poleni tedavi amaçlı kullananların sayısının da arttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda araştırmacılar bu çalışmada arı ürünlerinin hangi hastalıkların tedavisinde kullanıldıklarını da bildirmişlerdir (Tablo 2).

Tablo 2. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanıldığı hastalıklar.

Ürün Adı	Tedavisinde Kullanılan Hastalık Adı
Bal	Farenjit, ülser, gastrit, soğuk algınlığı, anjin, şeker hastalığı, astım, bronşit, kanser, kondisyon artırma, omurilik zedelenmesi
Polen	Tansiyon, ülser, kolit, hepatit b, iştahsızlık, vücut gelişimi, vitamin desteği, saç dökülmesi, alerji, astım, bronşit, prostat, hipertansiyon, omurilik zedelenmesi, iştahsızlık, kansızlık, sindirim sistemi rahatsızlığı
Arı Sütü	Kansızlık, akciğer kanseri, yorgunluk giderici, tansiyon, damar sertliği, zayıflık, omurilik zedelenmesi
Balmumu	Kemik kırığı
Propolis	Ergenlik sivilcesi

Ayrıca polen, hastalıkların tedavi edilmesinin yanında başka sektörlerde de kullanılmaktadır (Çankaya ve Korkmaz, 2008). Bunlardan başlıcaları;

1. Vücudumuzun günlük ihtiyaçları olan maddeleri tamamlamada kullanılarak vücut direncini artırmak ve vücudu zinde tutmak
2. Özellikle sabah kahvaltılarında iştah açıcı olarak
3. Apiterapi uygulaması
4. Çiçek tozlaşması
5. Cildi beslemek amacıyla krem üretimi ve cilt temizleme losyonları
6. Arı kovanlarında bulunan genç ve yaşlı larvaların beslenmesi
7. Evcil hayvanların özellikle de yarış atların beslenmesi
8. Tıpta polen alerjisinin tedavisi ve ilaç sanayisi
9. Bombus arı yetiştiriciliği
10. Gıda sanayinde kek ve pasta üretimi
11. Büyüme ve gelişmeyi hızlandırma

Arılar havanın ısınmaya başladığı ilkbahar aylarında polen toplamaya başlamaktadırlar. Arıların ayaklarına yapışan polenler kovana girişinde bulunan polen tuzakları sayesinde alt kısımda bulunan hazneye toplanmaktadır. Bir günde arılar 5-12 arasında değişebilen aralıklarda sefer yaparak ve her seferinde yaklaşık 14 mg polen toplayabilmektedirler (Çankaya ve Korkmaz, 2008).



Şekil 1. Arının poleni alması (Anonim, 2017a).

İşçi arılar çiçeklerde mevcut olan polen granüllerini arka ayaklarındaki polen sepetlerine ve diğer vücut organlarına yapışık halde kovana getirmektedirler. Polen, işçi arılar çiçekten çiçeğe giderken polenler arıların vücudunun sert olan kıllarına yapışır, polenler arıların ağızdan salgılanan salgı ile nemlendirilerek daha yapışkan hale getirilir ve polen sepetinde tutunması sağlar (Genç ve Dodoloğlu, 1993).

Bal arıları kovana girişlerinde polen tuzağına polenlerin bir kısmını bırakırlar. Taşıma ve depolama alanına bırakılan bu polenler tükürük salgısıyla ıslanmasından ve nemlenmesinden dolayı küflenmeye neden olabilmektedir. Bu yüzden tuzağın alt kısmında biriken polen toplama sonunda hemen alınır, böylece nem ve sıcaklık dolayısıyla hemen bozulma gerçekleşmez (Çankaya ve Korkmaz, 2008).



Şekil 2. Arıların kovana girmesi (Anonim, 2017b).

İşletmelerde soğutucu olanağının olmadığı veya kurutarak işlemeye tabi tutulacak olan polen; havalandırması iyi olan, temiz, direkt güneş ışınlarına maruz kalmadan ve temiz pamuklu bez üzerine yayılarak kurutulmalıdır. Kurutma dolaplarının yanı sıra bu şekilde de basit olarak kurutulabilmektedirler. Kurutulması esnasında nem ölçen higrometre bulundurulması gerekmektedir. Aksi takdirde karbonhidrat ve protein değerinin yüksek olması sebebiyle polende mikroorganizma kaynaklı bozulmalar görülebilir (Çankaya ve Korkmaz, 2008).



Şekil 3. Polenlerin kurutulması (Anonim, 2017c).

Günümüzde arıcılık düşük sermaye ile geçim kaynağı oluşturabilen tarımsal faaliyetlerden biridir. Kırsal kalkınma konusunda arıcılık bazı ülkelerde önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır (Kumova ve Korkmaz, 2001; Yayçep, 2001).

Arıcılık işletmelerinde ana ve oğul yetiştiriciliğinden başka, bal, bal mumu, arı sütü ve propolis gibi ürünler elde edilmektedir. Bu ürünlerin üretimi ve tüketimi, arıcıların gelir seviyelerini arttırmasının yanı sıra ülke ekonomisine de katkı sağlamaktadır (Anonim, 2001). Fakat Türkiye arıcılık için elverişli çevre ve iklim şartlarına sahip bir ülke olmasına rağmen arı ürünlerinde yeterli düzeye ulaşamadığı bildirilmektedir (Sarısöz, 2006). Özellikle üretici bilgisinin az olması, teknolojiyi yeterince kullanamaması, dağınık, örgütsüz ve kayıt dışı üretimin yoğun olması ile denetlemenin yetersiz kalması gibi nedenlerle ülke arıcılığı yeterince gelişmemiştir (Gürel ve Gösterit, 2004).

1952 yılı itibariyle Orman Genel Müdürlüğü, arıcıların ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla Ayancık (Sinop), Borçka (Artvin), Eskipazar (Karabük) ve Dursunbey (Balıkesir) Orman İşletmelerinde toplam 8.000 adet/yıl, Adapazarı'nda bulunan Türkiye Zirai Donatım Kurumu tesislerinde ise 2.000 adet/yıl kapasiteli kovan üretimi gerçekleştirmiştir. 1952 yılları ile 1960 yılları arasında fabrikalara ucuz tomruk tahsisi yapılarak arıcıların kovanları ucuza alabilmesi sağlamıştır (Gönenç, 1987). İlk

zamanlarda arıcılık yapanları desteklemek amacıyla yapılan faizsiz kredi karşılığında kovan dağıtımının belirli yerlerden yapılması ve arıcıların kovanları temin etmede yaşadıkları güçlükler nedeniyle bu uygulamadan vazgeçilmiştir (Ulu, 1987). Orman Genel Müdürlüğü verilerine göre, 2012 Eylül ayında arıcılara destek amacıyla 8205.3 hektar alana 116 adet bal üretim ormanı oluşturulmuştur (Şanal ve Yılmaz, 2012).

İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından arıcılık sektörünün gelişmesi ve devamının sağlanması amacıyla çıkarılan yasa ve yönetmeliklerle üreticilerin örgütlenmesine çalışılmıştır. Ülkemizdeki arı ve arı ürünleri üretiminin tespiti, kontrolünün sağlanması ve üretimin artırılması amacıyla 2008 yılında bakanlık tarafından Arıcılık Kayıt Sistemi (AKS) oluşturulmuştur (Anonim, 2012). 2016 yılından sonra AKS sistemindeki bilgiler Hayvancılık Bilgi Sistemine aktararak bütün hayvansal desteklemeler tek sistem altına toplanmıştır (Anonim, 2016).

Avrupa, Asya ve Amerika ülkelerinde 1970'li yıllarından bu yana arıcılık üretiminde üretici ve tüketicinin bilgilendirilmesi sağlanarak, tarım sektöründe yer alan arı ürünlerinde önemli gelişmeler sağlamıştır. Ayrıca Çin, Japonya, Yeni Zelanda, Polonya ve Macaristan gibi birçok ülkede arı ürünleri beslenmenin yanı sıra hastalıkların tedavisinde, ilaç, gıda, içki ve kozmetik sektöründe de yaygın olarak kullanılmıştır (Krell, 1996).

2.2. Mikotoksinler

Mikotoksin Yunanca mukoz ve Latince toksikum kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuştur (Turner ve ark., 2009). Mikotoksinler, canlılarda zararlı toksik etki oluşturan, küfler tarafından meydana getirilen ve meydana getirdikleri zehirlenmelere mikotoksikozis adı verilen toksik maddelerdir (Vural, 1984).

Gıda ve yemlerde birçok küf çeşidi olmasına rağmen, araştırılan yüzlerce küf türünden büyük bir kısmı mikotoksin oluşturmamaktadır. Mikotoksin oluşturan küfler yaklaşık olarak 350 civarındadır ve bunlardan sadece 20-25'i doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Mikotoksin üreten küfler arasında en çok bilinen türler *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türleridir (Gilbert ve Anklam, 2002; Whitlow ve Hagler, 2002; Yiannikouris ve Jouany, 2002). Üzerinde en çok çalışma yapılan aflatoksinler 1960

yılında keşfedilmiş olup, 1962 yılında ise güçlü hepatotoksik ve hepatokarsinojenik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Hacıbekiroğlu, 2013).

Mikotoksinli yemleri tüketen hayvanlarda verim kaybı, kilo kaybı, akut ya da kronik zehirlenme ve bağışıklık sisteminde baskılanma meydana gelmektedir. İnsanlarda meydana gelen problemler ise daha büyük olmasından dolayı halk sağlığı açısından daha fazla önem arz etmektedir (Sonal ve Oruç, 2000; Kaya, 2001; Yiannikouris ve Jouany, 2002). İnsanlara toksik ve karsinojenik etkileri ile zarar veren mikotoksinlerle ilgili olarak yapılmış çalışmaların büyük bir kısmını aflatoksinler oluşturmaktadır. Aflatoksinlerle birlikte tahıllarda, tohum ve mısırdaki bulunan okratoksin A, trikotesenler, patulin ve fumonisin insan ve hayvan sağlığı açısından büyük problemler oluşturmaktadır (Sonal ve Oruç, 2000; Creppy, 2002; Gilbert ve Anklam, 2002; Whitlow ve Hagler, 2005).

2.2.1. Mikotoksinlerin üreme şartları

Gıda maddesinde bulunan % rutubet oranı, su aktivitesi, pH değeri, sıcaklık ve gıda maddesinin yapısı, mikotoksinlerin oluşumunda başlıca faktörler arasında yer almaktadır (Karapınar, 2013).

Rutubet ve su aktivitesinin etkisi

Gıdaların bulunduğu ortamın rutubeti ile gıdaların su aktivitesi değerleri arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. Bu parametreler, gıdanın dokusunu ve raf ömrünü etkileyen en önemli faktörler arasındadır. Ortamda rutubet arttıkça gıdanın hem rutubeti hem de su aktivitesi artmaktadır (Tunail, 2000; Gonzáles ve ark., 2005). Maya ve küf üremesi su aktivitesi ve nem içeriği yüksek olduğunda artmaktadır (Bonvehi ve Jorda, 1997). Mikotoksinler türlerine göre değişiklik göstermekle birlikte, genelde ortamın rutubetinin yaklaşık olarak % 50 olduğu zaman, gıdanın rutubetinin % 9'un ve su aktivitesinin ise 0.70'in üzerine çıktığı koşullarda daha iyi ürerler (Whitlow ve Hagler, 2001; Yaroğlu, 2002).

pH'nın etkisi

Mikotoksinlerin üremelerinde pH aralığı oldukça geniştir. pH aralığı 1.5-11 olmasına rağmen, optimum üreme pH 5-6 arasında gerçekleşmektedirler. *Aspergillus* türleri asidik ortam olan pH 2.5-6 arasında toksin sentezlemelerine rağmen, optimum üremeleri için gerekli olan pH değeri 5 olarak belirlenmiştir (Whitlow ve Hagler, 2001; Ehrlich ve ark., 2005).

Sıcaklığın etkisi

Mikotoksinlerin gelişebilmeleri için gerekli olan sıcaklık aralığı oldukça geniştir. Aflatoksinler minimum 6-8°C arasında, maksimum ise 50-60°C arasında üremelerine rağmen toksin oluşturabilmeleri için minimum 10-13°C'ye, maksimum ise 42°C'ye ihtiyaçları vardır. Aflatoksinler için optimum gelişme sıcaklığı 35-38°C olduğu halde toksin oluşturabilmeleri için gerekli sıcaklık optimum 25-30°C'dir. *Penicillium* ve *Fusarium*'lar 5°C'nin altında gelişme göstermelerine karşın, *Aspergillus* türleri bu sıcaklıklarda hem üreyemez ve hem de toksin geliştiremezler (Tunail, 2000).

Sürenin etkisi

Depolama süresi arttıkça küf gelişiminin yanında, ürünlerde mikotoksin oluşma ihtimali de artmaktadır. Mikotoksin üreten küfler ile kontamine olmuş ürünlerin uygun sıcaklık ve rutubet şartlarının oluşması durumunda üreme başlayıp sağlığı tehdit edecek boyutlara ulaşabilmektedir (Kaya, 2001; Yaroğlu, 2002).

Gıdanın yapısı

Gıdaların yapısı mikotoksinlerin gelişiminde önemli faktörlerden biridir. Özellikle karbonhidrat bakımından zengin olan gıdalarda mikotoksin üremesi oldukça sık görülmektedir (Kaya, 2001; Yaroğlu, 2002; Kuhn ve Ghannoum, 2003; Agag, 2004).

2.2.2. Mikotoksinlerin detoksifikasyonu ve dekontaminasyonları

Mikotoksinler insan sağlığında büyük bir problem oluşturmasının yanında ekonomik yönden de büyük sorunlar oluşturmaktadır. Dünyada aflatoksin nedeniyle

ekonomik kayıpların milyarlarca doları bulduğu belirtilmektedir. Bu ekonomik kayıpların başlıcaları;

1. Ürün kaybı
2. Hayvan kaybı
3. Süt kaybı
4. İşletmecinin yüksek maliyetleri
5. Dağıtımıcının yüksek maliyetleri
6. Tüketicinin sağlık giderleri ve ürünlerin fiyatlarının yükselmesi
7. Ayrıca eğitim, mevzuat ve araştırma faaliyetlerindeki giderlerdir (Pohland, 1993; Smith, 1997).

Gıdalarda ve yemlerde aflatoksin oluşmasının engellenmesi büyük önem taşımaktadır. Aflatoksin oluşumunu önlemek için öncelikle ürünün tarlada olgunlaşması ve hemen sonrasında hasat edilmesi, depolanması, ürünün elde edilmesi ve işlenmeleri aşamalarında kontaminasyonun en aza indirilmesi ya da olanak varsa tamamen engellenmesi önem taşımaktadır. Bakteriyel bulaşmayı her ne kadar tarlada engellemek zor olsa da daha sonraki aşamalarda hijyen-sanitasyon uygulamalarına dikkat edilerek ve teknolojiyi iyi kullanarak son ürüne gelene kadar ki işlemlerde küf bulaşmasının önlenmesi gerekmektedir. Bu da ancak bilinçli üretimle mümkün olmaktadır. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinin başarısız olduğu durumlarda fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak aflatoksinin uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Goldblatt ve Dollear, 1977; Tunail, 2000).

Fiziksel ayırma olarak ifade edilen ve yaygın olarak kullanılanlar elle veya elektronik yollarla aflatoksini ayıklama yöntemidir. Rengi değişmiş, bozulmuş, şekli bozuk taneleri ayıklayarak aflatoksinleri azaltılan yer fıstığı bu yöntemde en başarılı olan ürünlerden biridir. Fakat mısır ve pamukta ise bu yöntem genel olarak olumlu sonuçlar vermemektedir. Fiziksel ayırma yöntemindeki dezavantaj ise her ne kadar aflatoksin miktarında azalma oluştursa da tamamen kontaminasyon giderilememektedir (Park, 1993).

Gıda katkıları ve kimyasal absorbanlar da kontaminasyonu engellemede kullanılan yöntemler arasındadır (Mutlu ve Gökmen, 1998). Yapılan bir çalışmada, gıda

katkı maddelerinin aflatoksin düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Saf aflatoksinler sodyum bisülfid ve sodyum hipoklorit solüsyonlarında 48 saat bekletildikten sonra aflatoksinlerde bozulmalar gözlenmiştir (Tabata ve ark., 1994). Patulin ve okratoksin A gibi mikotoksinlerin ise aktif karbonla giderildiği bildirilmiştir (Galvano ve ark., 1998).

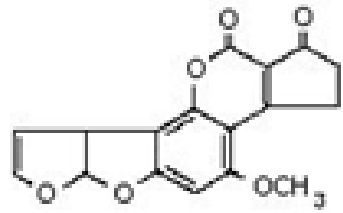
Biyolojik yöntem olarak ise fermantasyon yöntemi, mikotoksinlerin giderilmesi işlemidir. İki farklı çalışmada zeralenon ve fumonisine kontamine olan mısırlardan etanol elde edilirken toksin miktarında değişim gözlenmiş olup elde edilen etanolde herhangi bir toksine rastlanmadığı tespit edilmiştir. Çalışmalarda öğütülmüş mısırlara fermantasyon ortamı hazırlanmış ve 72 saat fermente edilmesi sağlanmıştır. Fermantasyon sonucunda toksinlerin elimine edildiği görülmüştür (Bennett ve ark. 1981; Bothast ve ark., 1992).

2.3. Aflatoksinler

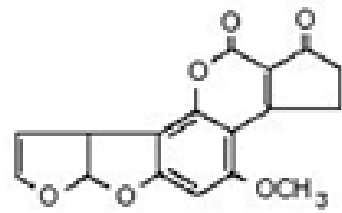
Aflatoksinler her çeşit yem, besin ve doğa da bulunabilen toksijenik *Aspergillus flavus* ile *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Penicillium* suşları tarafından üretilirler. Bu mikroorganizmalar uygun koşullarda (% 15'in üzerinde nem, 20°C üzerinde sıcaklık ve oksijen) bulunan yemlerde ve gıdalarda gelişip toksin sentezi yapabilirler (Kaya ve ark., 1985). Başlıca 4 farklı aflatoksin vardır. Bunlar; B₁, B₂, G₁ ve G₂'dir. Bulunan bu 4 tip aflatoksin arasında en tehlikeli olarak kabul edilen Aflatoksin B₁'dir. Toksisitesi yüksekten düşüğe doğru sırasıyla B₁, G₁, B₂ ve G₂ şeklindedir. Aflatoksinin adlandırılması B₁ ve B₂'nin ultraviyole (UV) ışık altında blue (mavi), G₁ ve G₂'nin UV ışık altında green (yeşil) renk göstermesinden dolayı bu harflendirme kullanılmıştır. Aflatoksinin diğer izole edilen türleri olan M₁ ve M₂ hayvan sütlerinden (milk) elde edildiği için bu şekilde adlandırılmıştır (Creppy, 2002).

Tablo 3. Aflatoksinlerin formülü ve molekül ağırlıkları (Creppy, 2002).

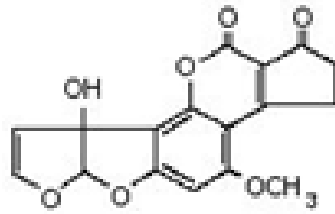
Aflatoksin	Formülü	Molekül Ağırlığı(g/mol)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.28
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.30
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.28
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.30
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.28
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.30



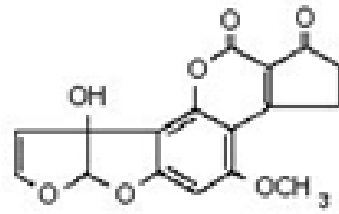
AFLATOXIN B₁



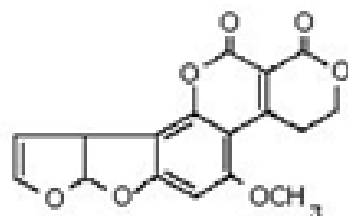
AFLATOXIN B₂



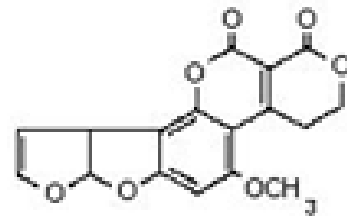
AFLATOXIN M₁



AFLATOXIN M₂



AFLATOXIN G₁



AFLATOXIN G₂

Şekil 4. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂'nin kimyasal yapıları (Creppy, 2002).

Toksin üreten *Aspergillus flavus* kültürleri ile kontamine olmuş gıdalarda biyolojik aktiviteye sebep olan aflatoksinlerin başında B₁ gelmekte ve onu aflatoksin G₁ takip etmektedir. Aflatoksin B₂ ve G₂ bunların dihidro türevleridir (Groopman ve Kensler, 1988). Bu dört aflatoksin dışında ise yemle beslenen laktasyon dönemindeki hayvanların sütü ve idrarında tespit edilen aflatoksin M₁ ve M₂ türleri de vardır (Betina, 1989). Aflatoksinlerin sudaki çözünürlükleri az olmasına karşın metanol, kloroform ve diğer organik çözücülerle çözünebilmektedirler (Groopman ve Kensler, 1988).

2.3.1. Aflatoksin limitleri

Gıdalarda aflatoksin detoksifikasyonunda çok başarılı olunmaması nedeniyle, tarımsal ürünleri ihraç eden ülkelerin ürünlerinin mikotoksinler ile kontamine olması, gıdaların ve yemlerin kontrol edilmesini zorunlu hale getirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organization) ve Gıda Tarım Teşkilatı (FAO, Food and Agriculture Organization) gibi kuruluşlar gıdalardaki aflatoksin sınırını 30 µgkg⁻¹ olarak belirlemiş olup bu sınır zaman içerisinde düşürülmüştür. Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu (UNICEF, United Nations International Children's Emergency Fund) ve Avrupa Birliği ülkeleri ise aynı zamanlarda daha düşük aflatoksin miktarlarını benimsemeyi tercih etmişlerdir. Günümüzde birçok ülke aflatoksin, okratoksin A, sitrinin, patulin, zearalenon, deoksinivalenol, T-2 toksin ve fumonisin gibi mikotoksinlerin yasal olarak sınırlarını belirlemişlerdir. Ülkemizde ise Avrupa Birliği uyum yasalarına uymak adına 2011 yılı itibarı ile aflatoksin sınırlarında tekrar değişikliğe giderek Avrupa Birliği ülkeleriyle uyumlu hale getirilmiştir (Hacıbekiroğlu, 2013).

Tablo 4. Gıdalarda aflatoksin içeriği ve maksimum limitleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (Anonim, 2011).

Gıda Maddesi	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
Fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5.0	10.0	-
Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8.0	15.0	-
Tahıllar (karabuğday dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2.0	4.0	-
Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5.0	10.0	-
Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0.050
Baharatların aşağıdaki türleri için; Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiber ve acı kırmızıbiberin bütün ve toz hali dahil) Karabiber (<i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	5.0	10.0	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0.10	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0.025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0.10	-	0.025
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5.0	10.0	0.5

2.3.2. Aflatoksinlerin toksisitesi

Aflatoksinler akut ve kronik toksisiteye sahip olup, akut toksisiteyi yüksek doz alımlarında, kronik toksisiteyi ise düşük doz alımlarında göstermektedirler. Düşük dozlarda alımlar sürekli olduğu zaman toksinlerin karsinojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek dozlarda alınan aflatoksinler ise akut aflatoksikoze neden

olmaktadır. Akut aflatoksikozisin klinik bulguları ise kilo kaybı, iştah azalması, sinirsel anomaliler, sarılık, kasılmalar ve ölümlerle sonuçlanmaktadır (Bullerman, 1979).

İnsanlardaki akut zehirlenmeyle ilgili bazı vakalar literatürlere geçmiştir. Tayvan'da küflü pirinç tüketen 26 kişide ayaklarda ödem, karın ağrısı, karaciğerde büyüme ve kusma gibi belirtiler görülmüş, bu 26 kişi arasından 3 çocuğun öldüğü bildirilmiştir. Tüketilen pirinçler incelendiğinde 200 ppb seviyelerinde aflatoksin B₁'e rastlanmıştır. Tayland'da 3 yaşındaki bir çocuğun Reye's sendromundan öldüğü bildirilmiş, yapılan inceleme sonucunda 2 gün önce tükettiği pirinçte 10 ppb düzeyinde aflatoksin B₁ tespit edilmiştir (Bullerman, 1979).

Hindistan'da 1974 yılında 320 kişi kontamine olmuş mısırları tüketmesi sonucunda rahatsızlanmış ve bunların % 25'inin öldüğü bildirilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda mısırlarda 15 ppm'den yüksek aflatoksin kontaminasyonu tespit edilmiştir (Pohland, 1993).

Kronik etki gösteren aflatoksinler subletal dozlarda alınmaktadır. Bu dozlarda aflatoksin uygulanan hayvanların etlerinde sararma ve siroz hastalığının ortaya çıktığı gözlenmiştir (Bullerman, 1979). Düşük dozlarda ve uzun süreli aflatoksin verilen hayvanlarda ise karaciğer kanseri görüldüğü tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan aflatoksinin hepatokarsinojen olduğu tespit edilmiş olup insanlar üzerinde etkisini anlamak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Afrika ve Asya'da yapılan çalışmalar sonucunda mikotoksin ile kontamine gıdaları tüketme sıklığıyla karaciğer kanseri görülme olasılığındaki artış arasında paralellik olduğu görülmüştür (Wilson, 1978; Ueno, 1985). Mikotoksinlerin insan sağlığı üzerine olan etkileri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri (Hacıbekiroğlu, 2013).

Mikotoksin	Sağlığa zararlı olası etkileri	Ürün
Aflatoksin	Karaciğer hastalıkları (hepatotoksik, hepatokarsinogenik), kanserojen ve teratojenik etkiler, kanamalar (bağırsaklarda ve böbreklerde), bağışıklık sistemine baskı	Yer fıstığı ve diğer fıstıklar, tahıllar (özellikle mısır), süt, baharatlar
Okratoksin	Nefrotoksik etki, kanserojen etki, bağışıklık sistemine baskı	Tahıllar (buğday, mısır), şarap, üzüm suyu
Fumonisin	Akciğerde ödem, equine leukoencephalomalacia, nefrotoksik ve hepatotoksik etki, bağışıklık sistemine baskı	Mısır
Trikotesen	Sindirim sisteminde düzensizlik (kusma, ishal), kilo kaybında artış, kanamalar (mide, kalp, ince bağırsak, akciğer, mesane), ağızda yara, iltihap, kısırlık, kemik iliğinde bozulmalar, yavaş büyüme, bağışıklık sistemine baskı	Tahıllar (buğday, arpa)
Zeralenon	Östrojenik etkiler, genital bölgede ödem, vajinada sarkma, rahimde genişleme, testislerde atrofi, yumurtalıklarda atrofi, kısırlık	Mısır, buğday
Ergot alkaloidler	Gangren, halüsinasyonlar	Çavdar
Patulin	Genetik mutasyon, genotoksik, kanserojen	Meyve suları (elma, armut)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada, polen örnekleri alınabilecek arıcılardan tespit edildi ve üretim yerine gidilerek Van ilinde 13 ilçeden 35 farklı arıcıdan aseptik şartlarda TS 2109 ve TS EN ISO 16050'ye göre toplam 35 adet polen örneği (her bir arıcıdan 1 adet 50 g) alınmıştır (Anonim, 1990; Anonim, 2013).

3.2. Kullanılan aletler ve kimyasallar

Aflatoksin analizleri HPLC cihazında (Thermo, Dionex, Ultimate 3000, ABD) yapılmıştır. Cihazının bölümleri izokrotik pompa (Seri no: 8008793), otosampler (seri no: 8008965), kolon fırını (seri no: 8009603), floresan dedektör (seri no: C20954175803-US) ve degasser (seri no: 8009529)'dir.

Ultra saf su cihazı (Sartorius-H20 Basic-T, seri no: 26306770, Almanya)

Aflatest İmmunoafinite Kolonu (Vicam, seri no: P2100E).

Karıştırıcı (Waring Commercial, seri no: BHM-27 W104-333, ABD).

Filtre Kağıdı (Machaney Nagel, seri no: 43502160825H).

Enjektör (Genject, seri no: 20371).

Analitik Terazî (Ohaus, seri no: iTem Pa 413, ABD)

2 mL vial (Alwsci, seri no: ASC20160519VJ).

20 mL vial (Alwsci, seri no: ASC20161209V).

Sodyum Klorür (Merck, seri no: K38858800-825).

Potasyum Bromür (Merck, seri no: 1.040907.0100).

Asetonitril (Carlo Erba, seri no: 412372000).

Metanol (%99'luk) (Merck, seri no: I0895309-727).

Nitrik Asit (Merck, seri no: K34106852-451).

Mobil Faz Hazırlanışı: 300 ml distile su, 100 ml asetonitril (C₂H₃N), 150 ml metanol (CH₃OH), 550 ml'lik mobil faz şişesine alınarak çalkalama süretiyle çözüldürülüp karıştırıldı. Daha sonra 0.066 g potasyum bromür (KBr) ve 175 ml 4 M nitrik asit (HNO₃) ilave edilerek ultrasonik su banyosunda karıştırıldı.

Su aktivitesi analizinde Novasina ms1-a_w (İsviçre), pH analizinde Hanna HI pH 2211 (Romanya), nem tayininde ise Nüve FN 500 (Türkiye) cihazlarında yararlanıldı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Rutubet, su aktivitesi ve pH değerlerinin belirlenmesi

Örneklerdeki rutubet içeriğini belirlemek amacıyla AOAC (1997) tarafından önerilen 925.45B metot kullanıldı ve her bir polen örneğinde 3 g alınarak etüvde 105°C'de 3 saat bekletilerek soğuduktan sonra tartıldı ve rutubet içeriği ölçüldü. Su aktivitesi (a_w) değerleri için her bir polen örneği su aktivitesi tayin cihazına (Novasina, ms1-a_w, İsviçre) direkt olarak yerleştirilerek 25°C'de ölçüldü. pH belirlenmesinde ise 5 g polen örneği alınarak 20 ml ultra saf su içerisinde sulandırıldı ve homojenize edildikten sonra digital pH-metre (Hanna 2211, Romanya) ile ölçüldü.

3.3.2. Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ standartlarının hazırlanması

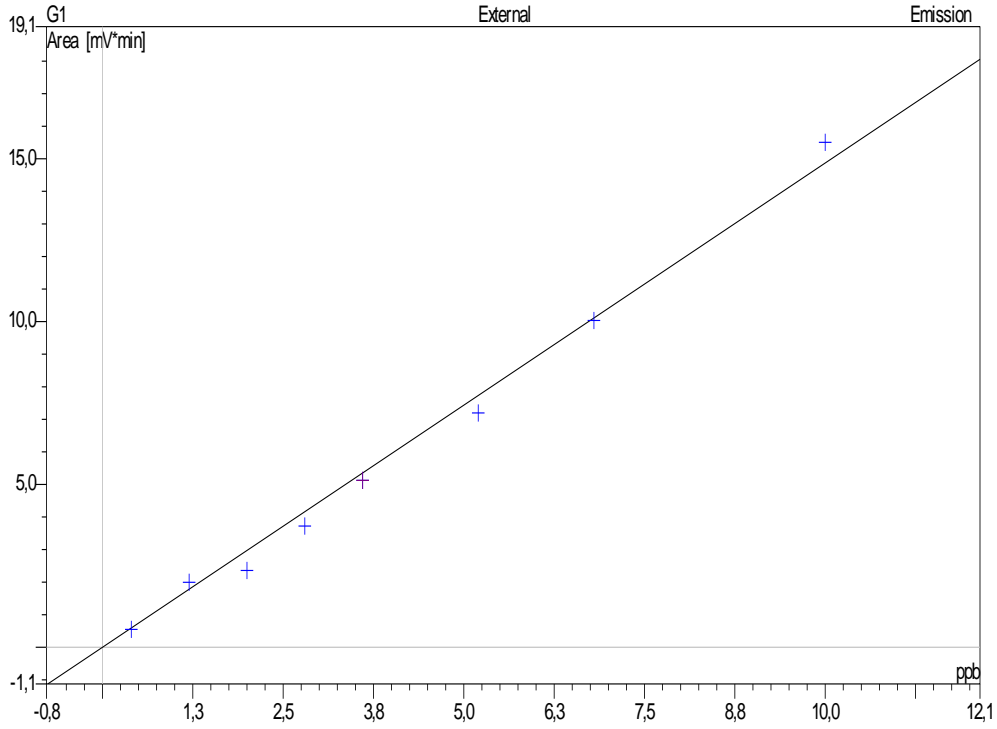
Aflatoksin standartlarını hazırlarken öncelikle ana stok hazırlandı. İlk aşamada içerisinde 2600 mg toplam aflatoksin bulunan (1000 mg B₁, 1000 mg G₁, 300 mg B₂, 300 mg G₂) şişe içeriği şilifli şişeye alındı. 1 ml olan içeriğin üzerine 9 ml metanol (HPLC saflığında) eklenerek karıştırıldı ve elde ettiğimiz konsatrasyon ana stok olarak adlandırıldı. 10 kat seyreltilmiş olan ana stok örneğin içinde 100 mg B₁, 100 mg G₁, 30 mg B₂, 30 mg G₂ bulunmaktadır ve daha sonra bu ana stoktan 8 tane ara stok hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Ara stok standartlarının hazırlanışı Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Aflatoksin ara stok standartlarının hazırlanması.

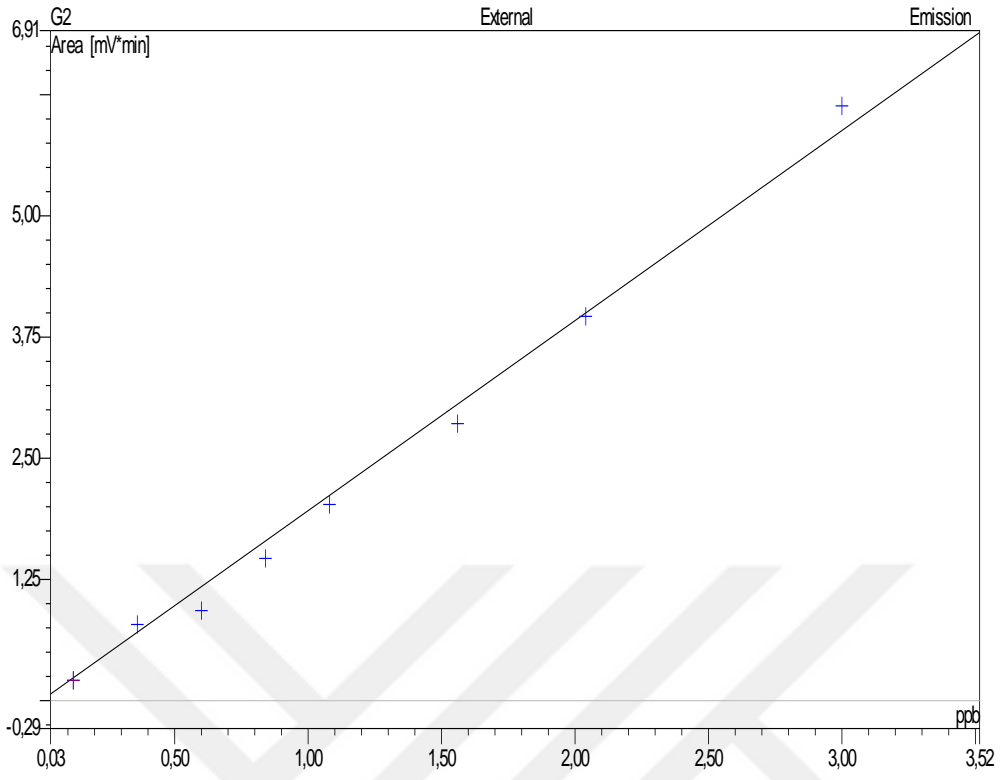
SIRA	SU	METANOL	STD	B ₁ G ₁	B ₂ G ₂
1	6 ml	3960 ml	40 ml	0.4 µg/kg	0.12 µg/kg
2	6 ml	3880 ml	120 ml	1.2 µg/kg	0.36 µg/kg
3	6 ml	3800 ml	200 ml	2.0 µg/kg	0.60 µg/kg
4	6 ml	3720 ml	280 ml	2.8 µg/kg	0.84 µg/kg
5	6 ml	3640 ml	360 ml	3.6 µg/kg	1.08 µg/kg
6	6 ml	3480 ml	520 ml	5.2 µg/kg	1.56 µg/kg
7	6 ml	3320 ml	680 ml	6.8 µg/kg	2.04 µg/kg
8	6 ml	3000 ml	1000 ml	10 µg/kg	3.0 µg/kg

Hazırlanan bu ara stokların kapakları numaralandırılarak viallere aktarıldı. Daha sonra bilgisayarda standartların protokolü oluşturularak vialler cihaza verildi ve okuması yapıldı. Oluşturulan bu kalibrasyon eğrisi 8 noktalı olarak hazırlandı.

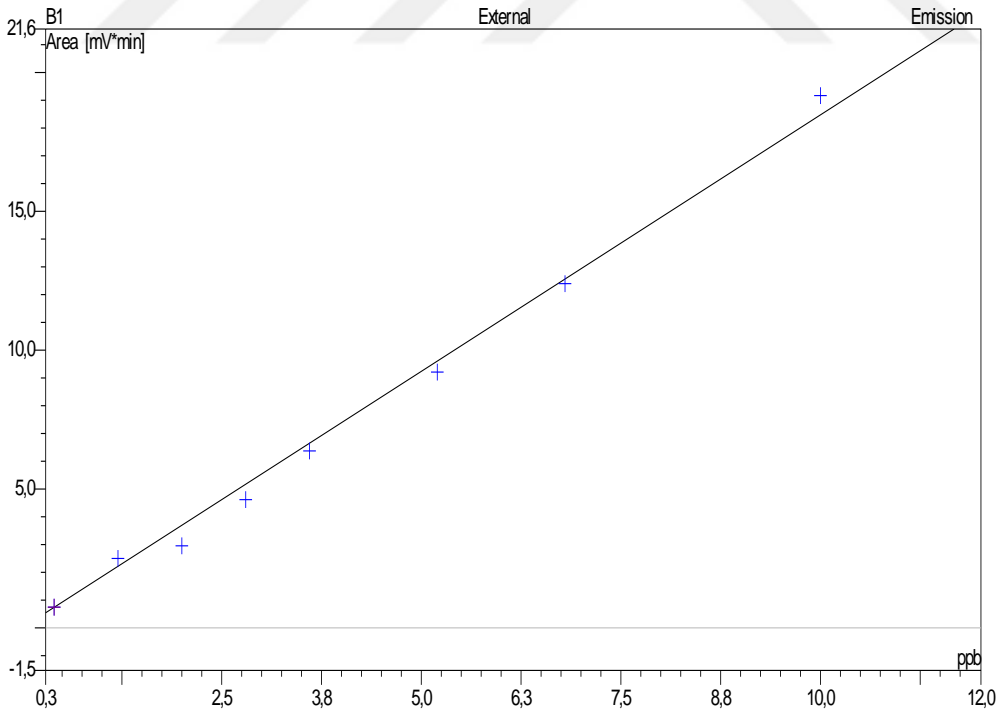
Aflatoksin G₁, G₂, B₁ ve B₂ standartlarının kalibrasyon eğrileri ile standartların alıkonma zamanları Şekil 5-9'da verilmiştir;



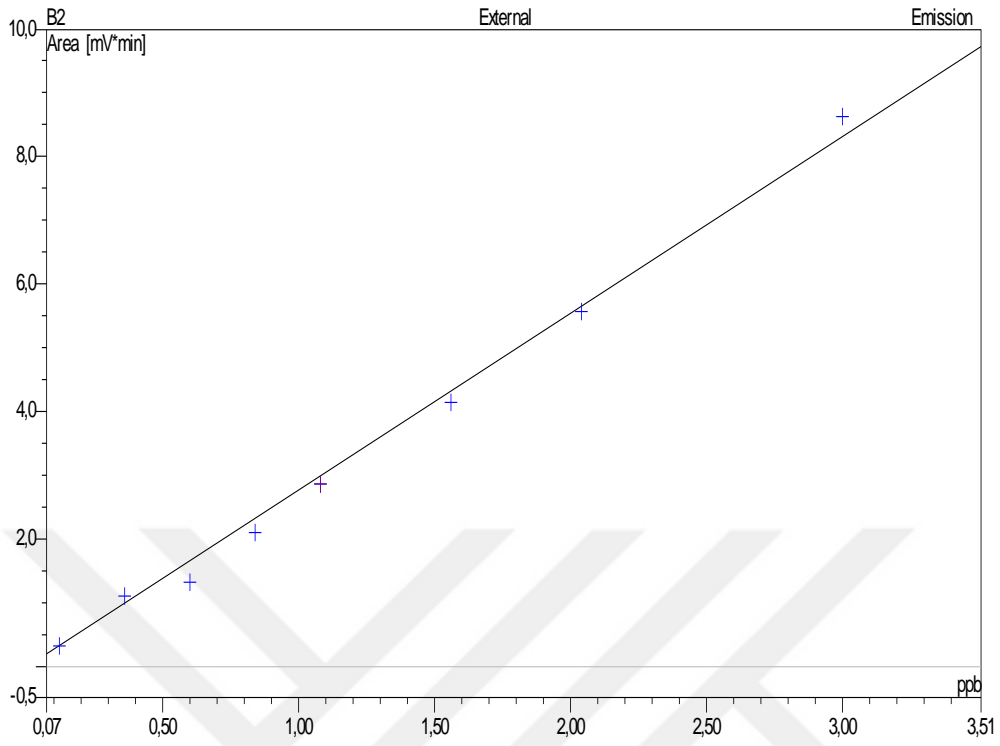
Şekil 5. Aflatoksin G₁'in kalibrasyon eğrisi.



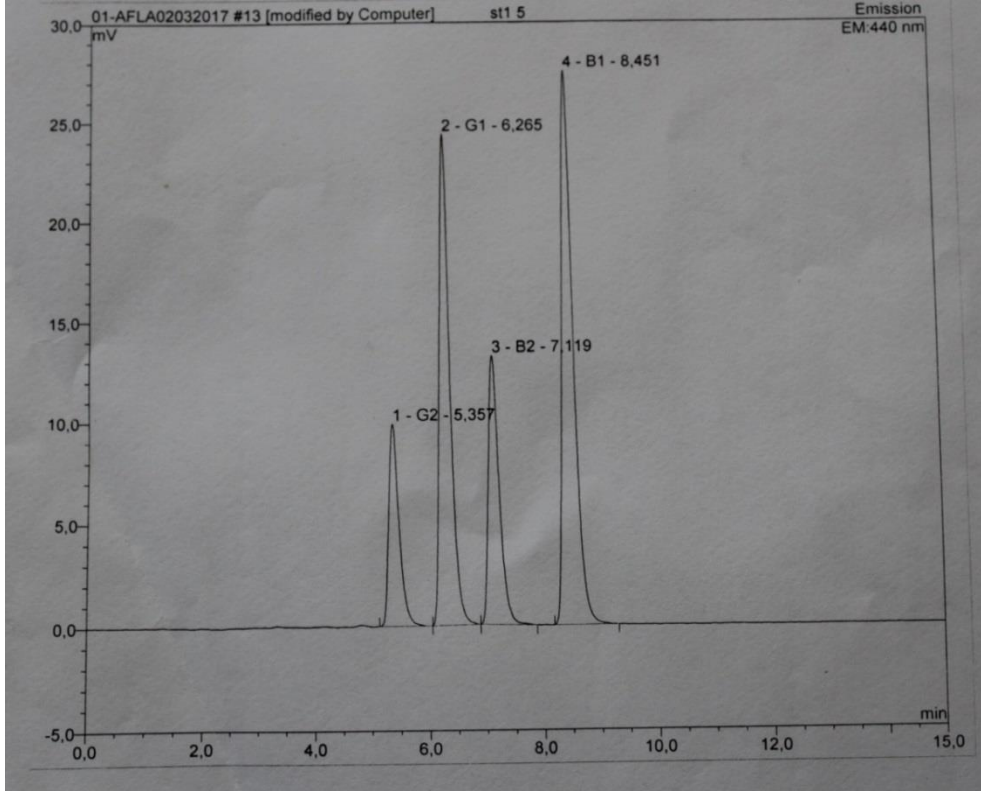
Şekil 6. Aflatoxin G₂'in kalibrasyon eğrisi.



Şekil 7. Aflatoxin B₁'nin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 8. Aflatoxin B₂'in kalibrasyon eğrisi.



Şekil 9. Çalışma standartlarının alıkonma zaman grafiği.

3.3.3. Aflatoksin miktarlarının belirlenmesi

Analiz amacıyla homojen hale getirilen örneklerden 25 ± 0.1 g tartıldı, blenderin parçalayıcı haznesinde 5 g sodyum klorür ve 125 ml özütleme çözeltisi (87.5 ml metanol+37.5 ml ultra saf su) eklenerek karışım yüksek hızda 2 dakikada homojen hale getirildi (Şekil 10).



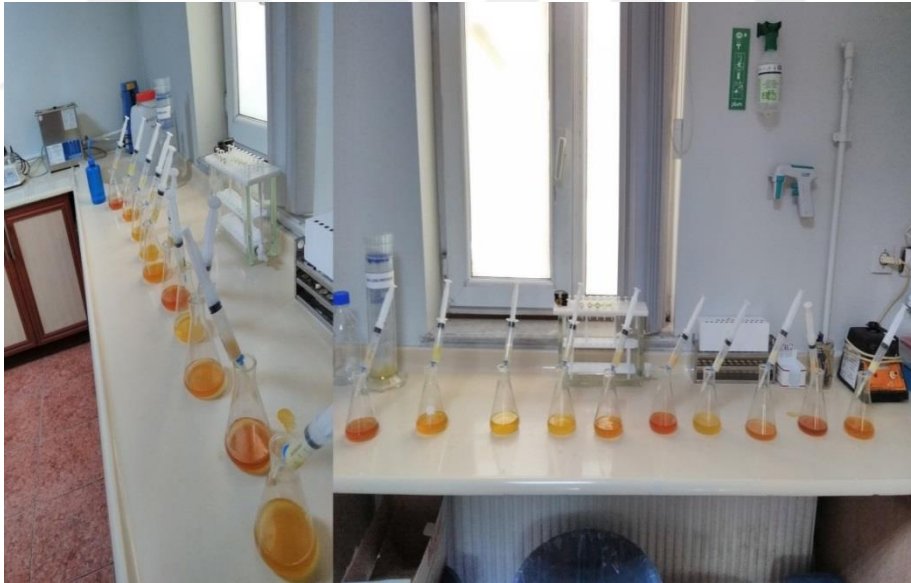
Şekil 10. Örneklerin ekstraksiyonu.

Elde edilen homojen karışım kaba oluklu filtre kâğıdından süzülerek berrak bir süzüntü elde edildi. Berrak bir süzüntü elde edilemeyenlerde ise süzme işlemi tekrarlandı (Şekil 11).



Şekil 11. Örneklerin süzülmesi.

Örneklerdeki aflatoksinler ekstrakte edilip, elde edilen süzüntüden 5 ml alındı ve daha sonra üzerine 10 ml ultra saf su ilave edilerek immunoaffinite kolondan süzüntü geçirildi. Bu işlem bağlanmayan pigmentleri uzaklaştırmak için yapıldı (Şekil 12).



Şekil 12. Süzüntünün immunoaffinite kolondan geçirilmesi.

Saflaştırılan toksinler immunoaffinite kolondan 1 ml HPLC saflığında metanolle (%99'luk konsantrasyonda) geçirilerek vialde aktarıldı ve üzerine 1 ml ultra saf su ilave edildi ve bu vialdeki karışım homojenize edildi. Daha sonra HPLC cihazına küçük viallere aktarılarak ve kapakları kapatılarak enjeksiyon için verildi (Şekil 13).



Şekil 13. Araştırmada kullanılan HPLC cihazı.

3.3.4. Kromatografik şartlar

Mobil faz: Su-metanol-asetonitril (300/150/100) v/v/v +4 M nitrik asit (175 ml)+
0.066 g potasyum bromür

Kolon: C18 (15 cm uzunluk, 4.6 mm çapında)

Dalga Boyu: Eksitasyon; 360 nm, Emisyon; 440 nm

Enjeksiyon hacmi: 100 µl

Akış: 1 ml/dk.

Türevlendirme Aparatı: Kobracell

Kolon sıcaklığı: 30°C

3.3.5. HPLC çalışma şartları

Ayırma kolonunun çıkışı ile art-kolon türetme sisteminin T parçasının bir kolu, dahili çapı 0.25 mm olan kısa bir boru parçası ile birleştirildi. Art-kolon türevlendirme reaktifini sağlayan pompanın çıkışı T parçasının diğer kolu ile birleştirildi. PTFE veya

paslanmaz çelik kangalın bir ucu T parçasının üçüncü kolu ile diğer ucu da dedektörün diğer ucuna bağlandı. Bir etüv kullanılarak kangalın ısı 70°C'de tutuldu. Bütün sistemin kendini dengelemesi için HPLC cihazı 10 dakika ila 20 dakika süreyle çalıştırıldı. Floresan detektör veya integratör duyarlılık kontrolleri 50 µl'de 0.125 ng aflatoksin G₂ için 5:1 sinyal tepkisi gürültü oranı verecek şekilde ayarlandı. Şeritli bir kayıt cihazı kullanıldığında 50 µl'de 0.125 ng aflatoksin, G₂ için % 30-40'lık ölçek sapması veren bir değere ayarlandı.

3.3.6. Tanımlama

İlgili referans standartlardaki aflatoksinlere ait alıkonma süreleri karşılaştırılarak numune kromatogramındaki her bir aflatoksin tepe değeri tanımlandı. Alternatif olarak aflatoksinler örnek deney çözeltisi ve standart çözeltilerin eşzamanlı enjeksiyonu ile tanımlandı. Ayrıca türevlendirme reaktifi eklenmediği durumda aflatoksin B₁ ve G₁ pikinin görülmemesi, tanımlama için yardımcı olarak değerlendirildi.

3.3.7. Tayin

Nicel tayin pik alanının birleştirilmesi veya pik yüksekliği standart maddeye ait ilgili değer ile ilişkilendirildi. Enjektör imalatçısının talimatlarına göre standart çözeltiden 50 µl'lik hacim enjeksiyon haznesine enjekte edildi. Aflatoksinler G₂, G₁, B₂ ve B₁ sırasıyla yaklaşık, 6, 8, 9 ve 11 dakika alıkonma zamanları ile birlikte elüte edildi ve taban çizgisine göre ayırt edilebilir olduğuna dikkat edildi. Gerekliğinde hareketli fazın metanol konsantrasyonu değiştirilerek alıkonma süreleri ayarlandı.

3.3.8. İstatistiksel analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-wilks testi ile değerlendirilmiştir. Veriler arasındaki korelasyonlar ise Spearman 's rho testi ile belirlenmiştir. Verilerin analizinde SPSS (1991) paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Araştırmada kullanılan örneklerdeki rutubet, su aktivitesi ve pH değerleri Tablo 8’de verilmiştir. Rutubet içeriği % 7.35 ile % 11.41 değerler arasında değişiklik göstermiş olup ortalama rutubet içeriği % 9.46 ± 0.18 olarak belirlenmiştir. Ortalama su aktivitesi ise (a_w) 0.28 ± 0.01 olarak tespit edilmiş ve 0.24 ile 0.45 arasında değişiklik göstermiştir. Örneklerin pH değerleri ise 3.91’den 5.50’ye kadar farklılık göstermiş ve ortalama olarak 4.38 ± 0.06 olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan örneklerin hiçbirinde aflatoksin B₁ (AFB₁) tespit edilememiştir. Aflatoksin B₂ (AFB₂) ise 0-0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında olup ortalama değer ise 0.01 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak belirlenmiştir. Toplam aflatoksin seviyesinde ise minimum, maksimum ve ortalama değerleri sırasıyla 0, 2.84 ve 0.34 ± 0.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 9). İstatistiksel analiz sonuçlarına göre toplam aflatoksin ile rutubet miktarı arasında orta derecede ($r: 0.41$) bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Toplam aflatoksin düzeyi, su aktivitesi, pH ve rutubet değerleri arasındaki korelasyon katsayıları.

	Aflatoksin	Su aktivitesi	pH
Su aktivitesi	0.22		
pH	-0.12	-0.14	
Rutubet (%)	0.41 *	0.21	-0.27

*: Korelasyon katsayısı istatistiksel açıdan önemli ($P<0.05$).

Tablo 8. Polen örneklerinin kimyasal analiz sonuçları.

Örnekler	Rutubet (%)	a_w	pH
Polen1	10.26	0.28	4.10
Polen2	9.19	0.29	4.11
Polen3	9.16	0.27	4.09
Polen4	10.12	0.25	3.95
Polen5	8.70	0.25	4.35
Polen6	10.20	0.24	3.91
Polen7	11.33	0.27	4.35
Polen8	11.18	0.25	4.33
Polen9	11.08	0.28	4.83
Polen10	10.42	0.31	4.50
Polen11	9.14	0.40	4.09
Polen12	11.41	0.35	4.75
Polen13	11.05	0.45	4.53
Polen14	9.28	0.27	4.25
Polen15	8.70	0.25	4.47
Polen16	10.01	0.28	4.03
Polen17	8.29	0.25	4.85
Polen18	8.37	0.26	4.95
Polen19	9.92	0.28	4.15
Polen20	10.58	0.25	4.30
Polen21	9.83	0.26	4.22
Polen22	9.84	0.27	4.05
Polen23	9.13	0.25	4.52
Polen24	8.29	0.27	4.60
Polen25	9.28	0.26	4.25
Polen26	9.26	0.28	3.95
Polen27	9.10	0.25	4.70
Polen28	9.61	0.27	4.20
Polen29	7.35	0.27	5.50
Polen30	7.80	0.26	5.03
Polen31	8.26	0.26	4.25
Polen32	8.63	0.27	4.45
Polen33	8.57	0.27	4.30
Polen34	9.18	0.27	4.33
Polen35	8.54	0.28	4.05
Ortalama	9.46	0.28	4.38
Minimum	7.35	0.24	3.91
Maksimum	11.41	0.45	5.50
Standart hata	0.18	0.01	0.06

Tablo 9. Polen örneklerindeki aflatoksin miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$)*.

Örnekler	AFB₁	AFB₂	AFG₁	AFG₂	Toplam (B₁+B₂+G₁+G₂)
Polen1	0.00	0.00	2.76	0.00	2.76
Polen2	0.00	0.00	0.04	0.00	0.04
Polen3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen4	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01
Polen5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen7	0.00	0.00	0.68	0.00	0.68
Polen8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen9	0.00	0.00	2.16	0.00	2.16
Polen10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen11	0.00	0.24	0.00	0.00	0.24
Polen12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen13	0.00	0.00	0.00	0.36	0.36
Polen14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen16	0.00	0.21	0.00	2.64	2.84
Polen17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen18	0.00	0.00	0.00	0.34	0.35
Polen19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen20	0.00	0.00	0.00	1.24	1.24
Polen21	0.00	0.00	0.09	0.00	0.09
Polen22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen25	0.00	0.05	0.00	0.00	0.05
Polen26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen28	0.00	0.00	0.00	0.74	0.74
Polen29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen32	0.00	0.00	0.17	0.00	0.17
Polen33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polen35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ortalama	0.00	0.01	0.17	0.15	0.34
Minimum	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Maksimum	0.00	0.24	2.76	2.64	2.84
Standart hata	0.00	0.01	0.10	0.08	0.13

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüksek derecelerde besleyici maddeleri ihtiva eden taze polenler yaklaşık % 20-30 rutubet oranlarına sahip olup bu özellikleri ile birçok mikroorganizmanın ve özellikle maya-küflerin gelişip çoğalması için iyi bir ortam oluşturmaktadırlar. Bu nedenle polenler bozulmayı önlemek ve raf ömrünü uzatmak için en kısa sürede hasat edilip kurutma aşamasına hazır hale getirilmelidirler. Arıcılar polenleri günlük olarak toplamazlar ve bunun bir sonucu olarak higroskopik olan polenler yüksek derecede çevreden rutubet çekerler (Bogdanov, 2012).

Polenlerde renk bozukluğu ve kimyasal reaksiyonlar (maillard reaksiyonu ve lipid oksidasyonu) oluşup, kötü koku ve acı tada neden olduğundan dolayı % 3'den az rutubet oranı arzu edilmez (Bonvehi ve ark., 1991). Bu nedenle kurutulmuş polenlerin rutubet içeriği % 4-8 arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Mutsaers, 2005; Melo ve ark., 2011). Brezilya, Arjantin, Sırbistan ve Çin gibi ülkelerde kurutulmuş polenlerde maksimum rutubet içeriği resmi olarak belirlenmiş olup sırasıyla, % 4, % 4, % 8 ve % 10 olarak belirlemişlerdir (Krell, 1996; Sluzbeni list SCG 45, 2003; GB/T19330-2003's, 2003; Official Gazette, 2013). Bu çalışmada elde edilen rutubet miktarları yönünden örneklerin % 5.7'si Sırbistan mevzuatlarına ve % 68.5'i ise Çin mevzuatlarına uygun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada belirlenen rutubet miktarları Nogueira ve ark. (2012)'nin polenler üzerine yapmış oldukları çalışmada belirledikleri rutubet değerleri (% 6.02-8.40) ile benzerlik göstermiştir. Buna karşın tespit edilen sonuçlar, Brezilya ve Arjantin resmi mevzuatlarındaki ticari arı polenleri için belirlenen limitlerin üzerinde bulunmuştur. Polen örneklerindeki yüksek rutubet içeriği uygun olmayan muhafaza şartlarından kaynaklanmış olabilir. Polenler nadiren vakumlu plastik poşetlerde saklanır ve genellikle uygulanan dondurma ve çözündürme işlemleri rutubet içeriğini olumsuz yönde etkileyebilir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre ise toplam aflatoksin ile rutubet miktarı arasında orta derecede (r: 0.41) bir korelasyon olduğu tespit edilmiş olup, daha çok yüksek rutubet değerlerine sahip örneklerde daha fazla oranda aflatoksin belirlenmiştir (Tablo 7).

Fungal gelişme için en önemli çevresel faktörler su aktivitesi (serbest su miktarının ölçülmesi) ve sıcaklıktır (Lacey ve Magan, 1991). Polen gibi dehidre

gıdaların hijyenik olarak muhafaza edilebilmesi için su aktivite değerinin 0.30'dan düşük olması gerekmektedir (Bonvehí ve Jordà, 1997). Bu araştırmada örneklerin su aktivitesi 0.24–0.45 değerleri arasında ve ortalama 0.28 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir. Belirlenen değer aralığı, dehidre gıdalar için normal sınırlar içerisinde olup, Brezilya (0.3-0.5) ve İspanya (0.261-0.280)'da arı polenlerinde belirlenen limitler içerisinde olduğu görülmektedir (Bonvehi ve Jordà, 1997; Carpes ve ark., 2009). Tespit edilen su aktivitesi değerleri, Estevinho ve ark. (2012)'nin bildirdikleri 0.32-0.55 değerleri ve Serra Bonvehi ve Jorda (1997)'nin bildirdikleri ortalama 0.27 değerine benzerlik göstermiştir. Bu çalışmadaki örneklerden tespit edilen su aktivitesi değerleri ürünün mikrobiyolojik stabilitesini sağlamada yeterli olabileceği sonucunu göstermektedir.

Polenlerin pH değerleri tekstür, stabilite ve raf ömrünü önemli derecede etkiler. Bundan dolayı polenlerin muhafazası esnasında bu değerlerin büyük önemi vardır (González-Martin ve ark., 2007). Bu çalışmada analiz edilen polen örnekleri 3.91-5.50 arasında pH değerine sahip olup, tamamı asidik özellik göstermiştir. Elde edilen veriler Brezilya mevzuatına (pH: 4-6) benzerlik göstermiştir. Ayrıca araştırmamızda elde edilen pH değerleri, Herbert ve Shimanuki (1978)'nin (3.8-5.9), Bastos ve ark. (2003)'nin (3.7-5.5), Coronel ve ark. (2004)'nin (4.27-6.54) ve Machini ve ark. (2006)'nin (4.3-5.2) belirledikleri değerlere benzerlik göstermektedir.

Aspergillus flavus tropik ve subtropik bölgelerde daha yaygın görülmektedir. Türkiye'nin birçok bölgesinde çeşitli sebeplerden dolayı rutubet ve sıcaklık, mikroorganizmaların lehinde değişmiş (Çetin ve ark., 2008) ve son yıllarda Van ilinde de iklim değişikliği görülerek sıcaklık ve rutubet değerlerinde artış görülmüştür. Bu durum doğada kontrolsüz bir şekilde kurutulmuş veya muhafaza edilen polenlerin üzerinde küf mantarlarının üremesini arttırmaktadır. İncelenen örneklerin bir kısmında aflatoksin tespit edilmesi, analiz edilen polenlerin *Aspergillus* spp. gibi mikroorganizmalar ile kontamine olduğunu düşündürmektedir.

Aspergillus cinsi mikroorganizmaların gelişmesinde mısır, soya fasulyesi ve buğdayın önemli bir yeri vardır (Rustom, 1997; Nilüfer ve Boyacıoğlu, 2002). Arılar bu bitkilerden *Aspergillus* ile kontamine polenleri toplar ve kovana getirirler. Yapılan bir çalışmada buğday, mısır ve soya fasulyesinin bu tip bir kontaminasyona sahip olduğu bildirilmiştir (Niu ve ark., 2011). Diğer bir kontaminasyon kaynağı arıların bizzat

kendileridir. Polen üretim aşamalarından; toplama, kurutma, paketlenme ve muhafaza dönemlerinde arıcalar polenleri kontamine edebilirler. Nitekim Pitta ve Markaki (2010)'nin arı polenleri üzerine yaptığı bir araştırmada kovanlardan alınan polenlerin sıklıkla sonraki aşamalarda aflatoksin ile kontamine olduğunu bildirmiş ve polenlerin aflatoksin ile kontaminasyonunun toplama sonrası arıcalar tarafından olduğu kanaatine varılmıştır.

Ratlar üzerine yapılan çalışmalarda günlük 10 µg/kg vücut ağırlığı miktarında aflatoksin alımının en tehlikeli sonucunun kanserojen etki olduğu ve akut toksisite değerinin (LD₅₀) 7.2 mg/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir (Belitz ve ark., 2009). Tablo 9'de görüldüğü gibi örneklerin bir kısmında aflatoksin belirlenmiş ve maksimum değer olarak 2.84 µg/kg olarak tespit edilmiş ve bu değer belirlenen limitlerin çok altında olduğu görülmektedir.

Türkiye'de diğer birçok ülkede olduğu gibi gıdalarda aflatoksin kontaminasyonu ile ilgili yasal kısıtlamalar vardır. Türkiye'de hazırlanan Türk Gıda Kodeksi Tebliği (Anonim, 2011)'nde çeşitli gıdalar için AFB₁, toplam aflatoksin (B₁, B₂, G₁ ve G₂) ve aflatoksin M₁ (AFM₁) ile ilgili sınırlar belirlenmiştir. Bu tebliğe göre gıdalarda bulunabilecek üst limitler AFB₁ için 5 µg/kg ve toplam aflatoksin için 10 µg/kg'dır. Bu çalışmada hiçbir örnekte AFB₁ tespit edilememiş ve toplam aflatoksin değerleri de izin verilen değerler arasında (0-2.84 µg/kg) bulunmuştur. Her ne kadar insanlar tarafından günde 5-10 g polen tüketimi potansiyel olarak tehlikeli görünmese de, mısır, buğday ve süt gibi aflatoksinlerle kontaminasyona maruz kalan diğer gıda maddeleri fazla miktarlarda tüketildiğinde ve bu tür gıdalara aflatoksin içeren polen ilavesiyle günlük kabul edilebilir değerin aşabileceğini unutulmamalıdır. Ayrıca Niu ve ark. (2011), arı yemlerine propolis ilavesiyle aflatoksin toksisitesinin azaltılabildiğini bildirmişlerdir. Bu uygulama insan tüketimi için hazırlanmış polenlerde de benzer bir etkiye sahip olabilir ve bu konunun bilimsel sonuçlar ile ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Sonuç olarak örneklerden bir kısmının aflatoksin grupları ile kontamine olduğu, fakat bulunan değerlerin mevzuatta bildirilen maksimum limitlerin altında olduğu ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyecek düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Ancak yukarıda da ifade edildiği gibi düşük seviyedeki kontamine polenlerin, başka kontamine bir ürüne ilave edilmesi sonucunda maksimum limitleri aşmaya neden olabileceğinden,

bu konuda riskli gıda olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca belirlenen düşük rutubet polenlerde aflatoksin bulunmasını azaltmıştır ($P<0.05$). Dolayısıyla küf mantarlarının gelişip aflatoksin üretimini engellemek amacıyla polenlerin biran önce uygun şartlarda kurutulması gerekmektedir.



ÖZET

Arslan F. Van ilinde üretilen polenlerde aflatoksin içerikleri. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2017. Bu çalışmada, Van ilinde üretilen 35 adet polen örneklerinin rutubet miktarı, su aktivitesi içeriği ve pH değerleri ile aflatoksin içerikleri araştırılmıştır. Polen örneklerindeki aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂, (AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂) miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Yapılan araştırmada polen örneklerinin rutubet miktarı % 7.35 ile % 11.41 değerler arasında değişiklik göstermiş olup ortalama % 9.46±0.18 olarak belirlenmiştir. Ortalama su aktivitesi (a_w) içeriği 0.28±0.01 olarak tespit edilmiş olup 0.24 ile 0.45 arasında değişiklik göstermiştir. pH değerleri ise 3.91'den 5.50'ye kadar farklılık göstermiş ve ortalama 4.38±0.06 olarak tespit edilmiştir. Örneklerin hiçbirinde AFB₁ tespit edilemezken, AFB₂ düzeyleri 0-0.24 µg/kg arasında dağılım göstermiştir (ortalama 0.01±0.01 µg/kg). Toplam aflatoksin düzeylerinin minimum, maksimum ve ortalama değerleri sırasıyla 0, 2.84 ve 0.34±0.13 µg/kg olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, incelenen toplam 35 polen örneğinin 23'ünde (% 66) aflatoksin saptanmış ve belirlenen aflatoksin miktarının Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir limitler içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca polenlerde yüksek rutubet içeriğinin, aflatoksin kontaminasyon oranını arttırdığı (P<0.05) tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, Polen, Van.

SUMMARY

Arslan F. Aflatoxin contents in pollens produced in Van province. Van Yuzuncu Yil University Institute of Health Sciences, Department of Food Hygiene and Technology, Master Thesis, Van, 2017. The objective of this study was to investigate moisture content, water activity, pH value and aflatoxin contents of pollen samples (n: 35) collected in Van province of Turkey. Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂, (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂,) contents of the pollen samples were detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). The moisture contents varied from 7.35 % up to 11.41 % with an average of 9.46 ± 0.18 %. The average water activity (aw) was determined as 0.28 ± 0.01 varying between 0.24 and 0.45. The pH value varied from 3.91 to 5.50 and averaged 4.38 ± 0.06 . While AFB₁ was not detected in any of the samples AFB₂ content varied between 0.00 and 0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with an average of 0.01 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The minimum, maximum and mean value of total aflatoxin level was determined as 0, 2.84 and 0.34 ± 0.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. A low but statistically significant correlation between the total aflatoxin and moisture content was found ($P < 0.05$). As a result, aflatoxin was detected in 23 (66 %) of the 35 pollen samples tested, and the amount of aflatoxin was found in the levels permitted by the Turkish Food Codex. The results suggested that moisture content had a positive influence on the aflatoxin content of the pollen samples examined.

Key words: Aflatoxin, Pollen, Van.

KAYNAKLAR

- Agag BI (2004). Mycotoxins in foods and feeds. *Ass Univ Bull Environ Res*, 7, 1, 173-205.
- Alataş İ, Yalçın Lİ, Öztürk Aİ (1997). Arıcılıkta polen üretiminin kolon gelişimine ve bal verimine etkisi. *Anadolu J of Aarı*, 7, 1, 30-42.
- Anonim (1990). Türk Standartları Enstitüsü-TS 2109 Baharat ve çeşniler-numune alma standardı.
- Anonim (2001). Devlet Planlama Teşkilatı. VIII. Beş Yıllık Kalkınma Planı, Hayvancılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Ankara, <http://ekutup.dpt.gov.tr/hayvanci/oik587.pdf>. Erişim Tarihi: 12. 11. 2017.
- Anonim (2011). Türk Gıda Kodeksi 2011/28157, Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğ.
- Anonim (2012). <http://www.aks.tarim.gov.tr>. Erişim Tarihi 12.11.2017.
- Anonim (2013). Türk Standartları Enstitüsü-TS EN ISO 16050, Gıda maddeleri-hubuat, sert kabuklu yemiş ve bunlardan üretilmiş ürünler içindeki aflatoxin B1 ve toplam aflatoxin muhtevasının tayini Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi standardı.
- Anonim, 2016. <http://www.tbs.tarbil.gov.tr>. Erişim Tarihi 12.11.2017.
- Anonim, 2017a. <http://www.reitix.com/Makaleler/Ari-Poleni-ile-Kanser-Tedavisi/ID=4467> Erişim Tarihi 12.11.2017.
- Anonim, 2017b. <http://listelist.com/bal-arisi-ilginc-ozellikler>. Erişim Tarihi 12.11.2017.
- Anonim, 2017c. <http://www.munzuriksiri.com/?pnum=7&pt=POLEN>. Erişim Tarihi 12.11.2017.
- Bastos DHM, Rocha CI, Cunha IBS, Carvalho PO, Torres EAS (2003). Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revist Inst Adolfo Lutz*, 62, 239-244.
- Baydar H, Gürel F (1996). Antalya doğal florasında bal arısı (*Apis mellifera*)'nın polen toplama aktivitesi, polen tercihi ve farklı polen tiplerinin morfolojik özellikleri. *Tr J of Agriculture and Forestry* 22 (1998) 475-482 © TÜBİTAK
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2009). *Food chemistry*. Heidelberg: Springer-Verlag, 472-474.
- Bennett GA, Lagoda AA, Shotwell OL, Hesseltine CM (1981). Utilization of zearalenone-contaminated corn for ethanol production, *J Am Oil Chem Soc*, 58, 974-976.
- Betina V (1989). Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects, Elsevier, ISBN 0-444 98885-8, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo,437.
- Bogdanov S (2012). Pollen production, nutrition and health: a review. *Bee Product Science*, www.bee-hexagon.net Erişim Tarihi 15.11.2017.
- Bonvehi JS, Jordà RE (1997). Nutrient composition and microbiological quality of honeybee collected pollen in Spain. *J Agric Food Chem*, 45, 725-732.

- Bonvehi JS, Escura PF, Giner PJ (1991). La de'termination quantitative des acides aminés libres dans les pollens apicoles a l'aide de la chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide haute performanceet spectrophotometrie. *Annales des falsifications, de l'expertise chimicque et toxicologique*, 84, 153-166.
- Bothast RJ, Bennett GA, Vancauwenberge JE, Richard JL (1992). Fate of fumonisin B₁ in naturally contaminated corn during ethanol fermentation, *Appl Environ Microbiol*, 58, 233-236.
- Broadhurst CL (1999). Bee products: Medicine From the Hive. *Nutrition Science News*, 4(8): 366-368.
- Bullerman LB (1979). Significance of mycotoxins to food safety and human health: *Journal of Food Protection*, 42, 1, 65–86.
- Carpes T, Cabral I, Rosalen PL, Matias de Alencar S, Masson ML (2009). Caracterizaciaon do potencial antimicrobiano dos extractos de po'len api'cola da regia~o Sul do, *Brasil Alimentos e Nutricao Araraquar*, 20, 271-277.
- Coronel BB, Grasso SC, Pereira G, Fernández A (2004). Caracterización bromatológica del polen apícola Argentino *Cienc Docencia Tecnol*, 15, 141–181.
- Creppy EE (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.
- Çankaya N, Korkmaz A (2008). Polen, Samsun İl Tarım Müdürlüğü, 10.
- Çetin Ö, Eylen M, Üzen N (2008). İklim Değişikliğine Karşı GAP Bölgesinde Etkin Sulama Stratejileri, TMMOB İklim Değişimi Sempozyumu, 13-14 Mart, Ankara, 269.
- Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ (2005). Divergent regulation of aflatoxin production at acidic pH by two *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 159, 579-581.
- Estevinho LM, Rodrigues S, Pereira AP, Feás X (2012). Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int J Food Sci Technol*, 47, 429-435.
- Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Piva A Chies, L, Galvano M (1998). Activated carbons: In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *Journal of Food Protection*, 61, 4, 469-475.
- Genç F, Dodoloğlu A (1993). Arıcılığın temel esasları. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Yayınları*. No:166, 338, Erzurum.
- Gilbert J, Anklam E (2002). Validation of analytical methods for determining mycotoxins in food stuffs. *Trends Anal Chem*, 21, 468-486.
- Goldblatt LA, Dollear FG (1977). Detoxification of contaminated crops: Mycotoxins in human and animal health 'Alınmıştır Rodricks, JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. 139-150.
- González G, Hinojo MJ, Mateo R, Medina A, Jiménez M (2005). Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int J Food Microbiol*, 105, 1-9.
- Gonzalez-Martin I, Hernandez-Hierro JM, Barros-Ferreiro N, Cordon MC, Garcia-Villanova RJ (2007). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen, *Talanta*, 998-1003.

- Gönenç A (1987). Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Arıcılık Çalışmaları ve Proje Uygulamaları. Türkiye 1. Arıcılık Kongresi (22-24 Ocak 1980), 81-96.
- Groopman JD, Kensler TW (1988). Aflatoxin exposure in human populations: Measurements and relationship to cancer, *CRC Critical Review in Toxicology*, 19(2), 113-145.
- Gürel F, Gösterit A (2004). Arıcılığın Etik Açısından Değerlendirilmesi, 4.Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Isparta, 228.
- Hacıbekiroğlu I (2013). Gıda örneklerinde aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve okratoksina'nın HPLC metot validasyonu ve miktar tayinleri, Doktora tezi, İstanbul.
- Herbert JR (1997). Honey bee nutrition 'Alınmıştır' Graham JM, The hive and the honey bee, *Dadant and Sons Inc Haamilt Illinois*, 197-233.
- Herbert JR, Shimanuki H (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9, 33-40.
- Karapınar SH (2013). Bazı gıdaların aflatoksin içeriğinin HPLC metodu ile tayini, sayfa: 11, Yüksek Lisans Tezi, Karaman.
- Kaya S (2001). Mikotoksinler. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, İkinci Baskı. Editörler: Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A, Medisan Yayınevi, 537-571.
- Kaya S, Şanlı Y, Özkazanç AN (1985). Küflenmekten şüpheli yem ve yem ham maddelerinde aflatoksinler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 32, 1-12.
- Krell R (1996). Value-Added Products from Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin. No:124.
- Kuhn DM, Ghannoum MA (2003). Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev*, 16, 144-172.
- Kumova U, Korkmaz A (1999). Arı ürünleri tüketim davranışları üzerine bir araştırma. Türkiye'de arıcılık sorunları ve I. Ulusal Arıcılık Sempozyumu. 28-30 Eylül 1999. Kemaliye/Erzincan.
- Kumova U, Korkmaz A (2001). Arı yetiştiriciliği, Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi Yayınları, Adana.
- Kumova U, Özkütük K (1988). Çukurova bölgesinde arıcılığın yapısı. *ÇÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 3, 1, 26-40.
- Lacey J, Magan N (1991). Fungi colonising cereal grain: their occurrence and water and temperature relationships. In: J. Chelkowski (Eds.), cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage, Amsterdam: *Elsevier Science*. 77-118.
- Lakovleva LP (1985). Characteristic of pollen collection and flower specialization of various races of honeybees. *Apiacta*, 1, 1015.
- Marchini LC, Reis VDA, Moreti ACCC (2006). Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Ciênc Rural*, 36, 949-953.
- Melo ILP, Almeida-Muradian LB (2011). Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31, 1, 194-197.

- Mutlu M, Gökmen V (1998). Determination of effective mass transfer coefficient of patulin adsorption on activated carbon packed bed columns with recycling, *Journal of Food Engineering*, 35, 259-266.
- Mutsaers M, Blitterswijk H, Leven L, Kerkvliet J, Waerdt J (2005). Bee Products. Properties, Processing and Marketing. Agromisa Foundation, Wageningen, Netherlands.
- Nilüfer D, Boyacıoğlu D (2002). A comparative study of three different methods for the determinations of aflatoxins in tayini. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3375-3379.
- Niu G, Johnson RM, Berenbaum MR (2011). Toxicity of mycotoxins to honey bees and its amelioration by propolis. *Apidologie*, 42, 79-87.
- Nogueira C, Iglesias A, Fea's X, Estevinho LM (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 11173-11187.
- Official Gazette (2013). Regulation for the Quality and Other Requirements for the Honey and Other Honeybee Products and for the Preparation Based on Honey or Honeybee Products.
- Özcan M, Ceylan A, Ünver A, Yetişir R (2003). Türkiye' nin çeşitli bölgelerinden sağlanan polen ve propolis ekstratlarının antifungal etkisi, *Uludağ Bee Journal August*, 3, 27-34.
- Park LD (1993). Perspectives on mycotoxin decontamination procedures, *Food Additives and Contaminants*, 10, 1, 49-60
- Pernal SF, Currie RW (2001). The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol*, 51, 1, 53-68
- Pitta M, Markaki P (2010). Study of aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus* in bee pollen of greek origin. *Mycotoxin Research*, 26, 229-234.
- Pohland AE (1993). Mycotoxins in review. *Food Additives and Contaminants*. 10, 1, 17-28.
- Rustom IYS (1997). Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59, 57-67.
- Sağlam M (2011). Başlarken *Ordu'da Tarım*. Yıl:15 sayı:89 syf:1-8. Ordu.
- Sarıöz P (2006). Dünden Bugüne Türkiye'de Arıcılık, Stil Matbaacılık, 1.baskı, İstanbul, S.16-189.
- Schmidt LS, Schmidt JO, Rao H, Wang W, Xu L (1995). Feeding preference of young worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) ferape, sesame, and sunflower pollen, *J. Econ. Entomol.* 88 1591-1595.
- Sluzbeni list SCG 45 (2003). Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za med, druge pčelinje proizvode, preparate na bazi meda i drugih pčelinjih proizvoda [Rulebook on quality and other requirements for honey, other bee products and products based on honey and other bee products]. Službenom listu SCG, br. 45/2003 od 17.10.2003. godine, član 31.
- Smith JE (1997). Aflatoxins: *Handbook of Plant and Fungal Toxicant*. J.P. 269-285.

Sonal S, Oruç HH (2000). Bursa bölgesindeki tavuk çiftliklerinden sağlanan yemlerde mikotoksin düzeyleri. *YYÜ Vet Fak Derg*, 11, 2, 1-6.

SPSS (1991). Statistical package for the social sciences (SPSS/PC+). Chicago, IL: SPSS Inc.

Şanal F, Yılmaz C (2012). Orman Arıcılık İlişkileri ve Bal Ormanlarının Kuruluşu. 3. Uluslararası Arıcılık ve Çam Balı Kongresi (01-04 Kasım 2012) 173-179. Muğla.

Tabata S, Kamimura H, Ibe A, Hashimoto H, Tamura Y (1994). Degradation of aflatoxins by food additives. *Journal of Food Protection*, 57, 1, 42-47.

Tunail N (2000). Mikotoksinler: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2.baskı, (Yazarlar: Akçelik M, Ayhan K, Çakır İ, Doğan HB, Gürgün V, Halkman AK, Kaleli D, Kuleaşan H, Özkaya BF, Tunail N, Tükel Ç), Sim Matbaacılık, Ankara. 116-189.

Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 2, 168-180.

Ueno Y, 1985. The Toxicology of Mycotoxins, *CRC Critical Review in Toxicology*, 14(2), 99-132.

Ulu M (1987). Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Arıcılık Çalışmaları ve Proje Uygulamaları. Türkiye 1. Arıcılık Kongresi(22-24 Ocak 1980), 97-103

Vural N (1984). Toksikoloji: Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 56, Ankara, 416.

Whitlow LW, Hagler WM (2001). Mycotoxin contamination of feedstuffs, an additional stress factor for dairy cattle. 25. symposium sur les bovins laitiers held on October 17, 2001 in St-Hyacinthe, Quebec.

Wilson BJ (1978). Hazards of mycotoxins to public health, *Journal of Food Protection*, 41, 5, 375-384.

Yaroğlu T (2002). Türk silahlı kuvvetlerine bağlı birliklerde tüketime sunulan peynirlerde aflatoksin M₁ düzeylerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bursa.

YAYÇEP (Yaygın Çiftçi Eğitim ve Yayım Projesi) (2001). Arıcılık, Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Teşkilatlanma ve Destekleme Çiftçi Eğitimi.

Yiannikouris A, Jouany JP (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. *Anim Res*, 51, 81-99.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Adana’da doğdu. Liseye kadar olan eğitimini Adana’da tamamladı. 2006 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ne girdi ve 2011 yılında mezun oldu. 2014 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı ve halen eğitime devam etmektedir. 2013 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı olarak Van ili Muradiye ilçesine Veteriner Hekim olarak atandı. 2015 yılında Van Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü’ne geçiş yaptı ve halen görevine burada devam etmektedir.



EKLER

EK 1. Etik Kurul Raporu



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı Van İlinde Üretilen Polenlerde Aflatoksin İçerikleri.
Title of the Research Aflatoxin Content of Pollen Produced in Van Province.
Araştırmacı(lar) Yürütücü / Chief investigator: Prof. Dr. Hisamettin DURMAZ
Investigator(s) Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Vet. Hek. Fatih ARSLAN

Araştırmada kullanılacak hayvanlar / Animals to be used in the research:

Tür / species: Sayı / Numbers:

Yaş / Age: Cinsiyet / Sex:

Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: 15.03.2017

Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date: 15.09.2017

Dosya no / File no:

Karar:



Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmemektedir. Tarih:30/ 03 / 2017 ; Karar no: 2017/03

Decision:

The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 30/ 03 / 2017 Decision number 2017/03

	BASKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Prof. Dr. Fazıl ŞEN	 Prof. Dr. Seddik KESKİN	 Prof. Dr. Suphi DENİZ
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	 Doç. Dr. Atilla DURMUŞ	 Doç. Dr. Nalan ÖZDAL
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN	 Yrd. Doç. Dr. Özer ALKAN	 Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Oruç ALI-AHVERDİYEV	Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET

EK 2. Tez Orjinallik Raporu

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih: 23/11/2017	
Tez Başlığı / Konusu: Van İlinde Üretilen Polenlerde Aflatoksin İçerikleri	
<p>Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 56 sayfalık kısmına ilişkin, 21/11/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %10 (on) dir.</p> <p>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</p> <ul style="list-style-type: none">- Kabul ve onay sayfası hariç,- Teşekkür hariç,- İçindekiler hariç,- Simge ve kısaltmalar hariç,- Gereç ve yöntemler hariç,- Kaynakça hariç,- Alıntılar hariç,- Tezden çıkan yayınlar hariç,- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) <p>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini bilgilerinize arz ederim.</p> <p>Tarih ve İmza 23.11.2017 </p>	
Adı Soyadı: Fatih ARSLAN Öğrenci No:139301050 Anabilim Dalı: Besin Hijyeni ve Teknolojisi Programı: Veteriner Programı Statüsü:Y.Lisans X Doktora <input type="checkbox"/>	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR  (Prof. Dr. Hisamet'in DURMAZ)	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)