

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU

Koyulaştırılmış Süt ve Süt Tozlarının Aflatoksin M₁ İçeriklerine Proses Aşamaları
ve Depolamanın Etkisi

Prof. Dr. Emel SEZGİN
Proje Numarası: 2002-07-11-057
Başlama Tarihi: 19.11.2002
Bitiş Tarihi: 19.05.2004
Rapor Tarihi: 25.05.2004

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2004"

İÇİNDEKİLER

SİMGELER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
1. PROJENİN TÜRKÇE ve İNGİLİZCE ADI ve ÖZETLERİ	1
2. AMAÇ ve KAPSAM	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM	5
3.1. Materyal	5
3.2. Yöntem	5
3.2.1. Çiğ Süt, Yağsız Süt ve Pastörize Sütlere Uygulanan Analizler	8
3.2.2. Koyulaştırılmış sütlere uygulanan analizler	15
3.2.3. Süttozlarına uygulanan analizler	18
3.2.4. İstatistiksel analizler	21
4. ANALİZ ve BULGULAR	21
4.1. Hammadde Süt ile AFM1 Katkılı Yağsız Süt, Pastörize Süt, Koyulaştırılmış Süt ve Süttozlarının Bazı Bileşim Unsurları	21
4.2. AFM1 Katkılı Sütlerden Üretilen Yağsız Süttozlarının AFM1 İçeriklerine Proses Aşamalarının Etkisine İlişkin Sonuçlar	22
4.2.1. Pastörizasyonun AFM1 içeriğine etkisine ilişkin sonuçlar	28
4.2.2. Koyulaştırma işleminin AFM1 içeriğine etkisine ilişkin sonuçlar	32
4.2.3. Kurutma işleminin AFM1 içeriğine etkisine ilişkin sonuçlar	35
4.2.4. Depolamanın süttozlarının AFM1 içeriklerine etkisine ilişkin sonuçlar	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	42
5.1. Öneriler	45
6. KAYNAKLAR	47
7. Ekler	54

SİMGELER DİZİNİ

HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
μg	Mikrogram
ng	Nanogram
ppb	Milyarda bir kısım
AFM1	Aflatoksin M ₁
ÇS	Hammadde çiğ süt
YS	Yağsız süt
PS	Pastörize süt
YS15	1,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız süt
YS35	3,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız süt
PS15	1,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen pastörize süt
PS35	3,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen pastörize süt
KS15	1,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen koyulaştırılmış süt
KS35	3,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen koyulaştırılmış süt
ST15	1,5 $\mu\text{g/kg}$ AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttozu
ST35	3,5 $\mu\text{g/kg}$ AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttozu
ST15-D3	1,5 $\mu\text{g/kg}$ AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttozu, 3 ay depolama sonrası
ST35-D3	3,5 ppb AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttozu, 3 ay depolama sonrası
ST15-D6	1,5 ppb AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttozu, 6 ay depolama sonrası
ST35-D6	3,5 ppb AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttozu, 6 ay depolama sonrası

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. AFM1 katkıli koyulaştirılmış süt ve yağsız süttozu üretim şeması.....	7
Şekil 3.2. Standart AFM ₁ zeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrisi.....	11
Şekil 3.3. Standart zeltilere ait kramotogramlar.....	12
Şekil 4.1. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkıli sütlerden üretilen pastörize sütlerin toplam M ₁ içeriklerinde görülen değişim.....	30
Şekil 4.2. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkıli sütlerden üretilen pastörize sütler ve koyulaştirılmış sütlerin toplam M ₁ içeriklerinde görülen değişimler.....	34
Şekil 4.3. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkıli sütlerden üretilen koyulaştirılmış sütler ve süttozlarının toplam M ₁ içeriklerinde görülen değişimler.....	37
Şekil 4.4. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkıli sütlerden üretilen süttozlarının 3 ve 6 aylık depolama sonrası toplam M ₁ içeriklerinde görülen değişimler.....	41
Şekil 5.1. 1,5 ve 3,5 µg/L AFM1 katkıli yağsız sütlerin pastörizasyonu, koyulaştirılması, kurutulması ve depolanmasıyla M ₁ içeriklerinde gözlenen değişimler.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. HPLC koşulları	8
Çizelge 3.2. Standart çözeltilerinin hazırlanması.....	10
Çizelge 3.3. Hazırlanan AFM1 standart çözeltilerine göre elde edilen pik alanları	10
Çizelge 3.4. Süt örnekleri için geri kazanım oranları.....	14
Çizelge 3.5. Koyulaştırılmış süt örnekleri için geri kazanım oranları	17
Çizelge 3.6. Süttozu örnekleri için geri kazanım oranları.....	20
Çizelge 4.1. Deneme örneklerinin bazı bileşen özellikleri	21
Çizelge 4.2. Deneme örneklerinin AFM1 düzeyleri	23
Çizelge 4.3. 1,5 µg/kg, L AFM1 katkılı örneklerin toplam AFM1 içerikleri	26
Çizelge 4.4. 3,5 µg/kg, L AFM1 katkılı örneklerin toplam AFM1 içerikleri	27
Çizelge 4.5. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen pastörize sütlerin toplam M ₁ içerikleri.....	29
Çizelge 4.6. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen pastörize ve koyulaştırılmış süt örneklerinin toplam M ₁ içerikleri.....	32
Çizelge 4.7. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen koyulaştırılmış süt ve süttozlarının toplam M ₁ içerikleri.....	36
Çizelge 4.8. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen süttozlarının 3 ve 6 aylık depolama sonrası belirlenen toplam M ₁ içerikleri.....	39
Çizelge 5.1. 1,5 ve 3,5µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin pastörizasyonu, koyulaştırılması, kurutulması ve depolanmasıyla M ₁ içeriklerinde gözlenen ortalama kayıplar.....	43

1. PROJENİN TÜRKÇE ve İNGİLİZCE ADI ve ÖZETLERİ

Koyulaştırılmış Süt ve Süt Tozlarının Aflatoksin M₁ İçeriklerine Proses Aşamaları ve Depolamanın Etkisi

ÖZET

Planlanan bu çalışmada yapay yolla iki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM₁ ile kontamine edilmiş sütlerden koyulaştırılmış süt ve sprey kurutma ile yağsız süttözleri üretilerek proses aşamalarının M₁ içeriklerine olası etkileri belirlenmiştir.

Araştırmada, 1,5 µg/L AFM₁ katkılı sütler için pastörizasyon, koyulaştırma ve kurutmanın sütlerin AFM₁ içeriklerinde sırasıyla % 15,93, % 40,12 ve % 67,57'lik bir kayba neden olduğu, 3,5 µg/L AFM₁ katkılı sütler için ise M₁ kayıplarının sırasıyla % 11,71, % 34,55 ve % 58,69 olduğu tespit edilmiştir. Anılan kayıplar istatistiksel bakımdan P<0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Depolama süresi (3 ve 6 aylık) sonrasında 1,5 µg/L AFM₁ katkılı sütlerden üretilen süttözlerinin AFM₁ içeriklerinde sırasıyla % 1,43 ve % 5,18'lik bir azalış saptanırken 3,5 µg/L AFM₁ katkılı sütlerden üretilen süttözlerinin M₁ içeriklerinde söz konusu azalışlar % 1,48 ve % 3,82 düzeyinde tespit edilmiştir. İstatistiksel bakımdan değerlendirildiğinde 3 ve 6 aylık depolama sonrasında görülen değişimlerin önemsiz (p>0,05 ve p>0,01) olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Aflatoksin M₁, süt, koyulaştırılmış süt, süttözu, depolama, sprey kurutma

Effect of Process Stages and Storage on Aflatoxin M₁ Contents of Concentrated Milk and Milk Powder

ABSTRACT

In this study, concentrated milk and skim milk powder was produced from cow's milk contaminated artificially with AFM₁ at two different levels (1.5 and 3.5 µg/L) and the probable effects of process stages on the AFM₁ contents were investigated.

Pasteurization, concentration and spray drying caused 15.93 %, 40.12 % and 67.57 % losses, respectively in AFM₁ content of the milk contaminated with 1.5 µg/L AFM₁, and 11.71 %, 34.55 % and 58.69 % losses respectively, in the milk contaminated with 3.5 µg/L AFM₁. These losses were found to be statistically significant at the level of $p < 0.01$.

After 3 and 6 month storage periods, AFM₁ content of the skim milk powder produced from milk with 1.5 µg/L AFM₁ decreased by 1.43 % and 5.18 %, respectively; while these rates were found as 1.48 % and 3.82 %, respectively for the skim milk powders made from milk with 3.5 µg/L AFM₁. Changes in AFM₁ content of milk powder samples were found statistically insignificant ($p > 0.05$ and $p > 0.01$) for 3 and 6 month storage periods.

Key Words: Aflatoxin M₁, milk, condensed milk, milk powder, storage, spray drying

2. AMAÇ ve KAPSAM

Süt, kalite muhafazasını artırmak ve tüketici taleplerini karşılamak amacıyla çok farklı şekillerde işlenerek tüketime sunulmaktadır. Sütün aflatoksin M₁ içeriğine işleme yöntemleri ve depolamanın değişik etkileri bulunmaktadır (Galvano vd 1996). Süte ısı işlem uygulanması, konsantre edilmesi, kurutulması, yoğurt, peynir gibi ürünlere işlenmesi ve depolanması sırasında aflatoksin M₁ içeriklerindeki değişimin gözlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmış ve literatürlerde yerlerini almışlardır (Egmond-Van vd 1977, Wiseman ve Marth 1983a, Wiseman ve Marth 1983b, Wiseman ve Marth 1983c, Blanco vd 1988, Hassanin 1994, Ciapara vd 1995, Dragacci ve Fremy 1996, Saitanu 1997, Lopez vd 2001, Choudhary vd 1998).

Koyulaştırma ve kurutmanın hammadde süte ilave edilen aflatoksin M₁'in stabilitesini ne yönde etkilediğine ilişkin farklı kurutma tekniklerinin kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Allcroft ve Carnaghan 1963, Purchase vd 1972, Neuman-Kleinpaul ve Terlan 1972, Paul vd 1976, Kiermeier ve Mashaley 1977, Weiss vd 1978, Wiseman ve Marth 1983b). Ancak anılan çalışmaların hepsinde aflatoksin M₁'in belirlenmesinde hassasiyeti düşük olan TLC (ince tabaka kromatografisi)'den yararlanılmıştır. Ayrıca, Kazakistan'da (Nikov vd 1991), İtalya'da (Galvano vd 1998), İsviçre ve Almanya'da (Galvano vd 1998), Thai'de (Saitanu 1997) ve Kore'de (Kim vd 2000) bebek maması yapımında kullanmak ve diğer ürünlere işlemek (rekombinasyon) amacıyla üretilen süttozlarının aflatoksin M₁ içeriklerini belirlemeye yönelik bazı survey çalışmaları da bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde, süttozu ve bebek mamalarında aflatoksin M₁ varlığı ve kontaminasyon oranının sağlığı tehdit edecek düzeyde olmadığı (0,01 – 0,1 µg/kg) görülmektedir. Bununla birlikte, üretilen süttozlarının bir bölümünün yetişkinlere göre daha korumasız ve hassas olan bebeklerin tüketimine sunulan bebek mamalarının üretiminde yararlandığı düşünüldüğünde, süttozlarının aflatoksin M₁ içeriklerinin sürekli incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde de süt ve ürünlerinde aflatoksin M₁ varlığı ve izlenmesine yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmaların altısında (Demirer 1973, Demirer 1974, Çoksöyler ve Köşker 1980, Kaya 1982, Demirer vd 1989, Bakırcı 2001) aflatoksin M₁

içeriklerinin belirlenmesinde ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılırken diğer altısında (Dağoğlu vd 1995, Oruç ve Sonal 2001, Ayçiçek ve ark 2002, Günsen ve Büyükyörük 2002, Bostan vd 2003, Sarımehmetoğlu vd 2003) ELISA, ikisinde de (Kendirci ve Altuğ 2003, Özkaya vd 2002) yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) tekniğinden yararlanılmıştır. Ancak anılan çalışmaların hiç birinde süttozları aflatoksin M₁ yönünden irdelenmemiştir. Diğer bir ifade ile ölkemizde bu konuya ilişkin bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada sütün depolama süresini artırmak, ürünü zenginleştirmek ve/veya kurumaddesini artırmak, bebek maması formölyasyonlarında kullanmak gibi amaçlarla, sprey yöntemiyle üretilen yağsız süttozlarının üretimi sırasında uygulanan proses aşamalarının aflatoksin M₁ içeriğini ne yönde etkilediği irdelenmiştir. Bu amaçla hammadde sütlere farklı iki konsantrasyonda aflatoksin M₁ katılarak yağsız süt tozu üretilmiş ve proses aşamalarının (yağ seperasyonu, ısıl işlem, koyulaştırma, kurutma, depolama) aflatoksin M₁ üzerine olası etkileri incelenmiştir.

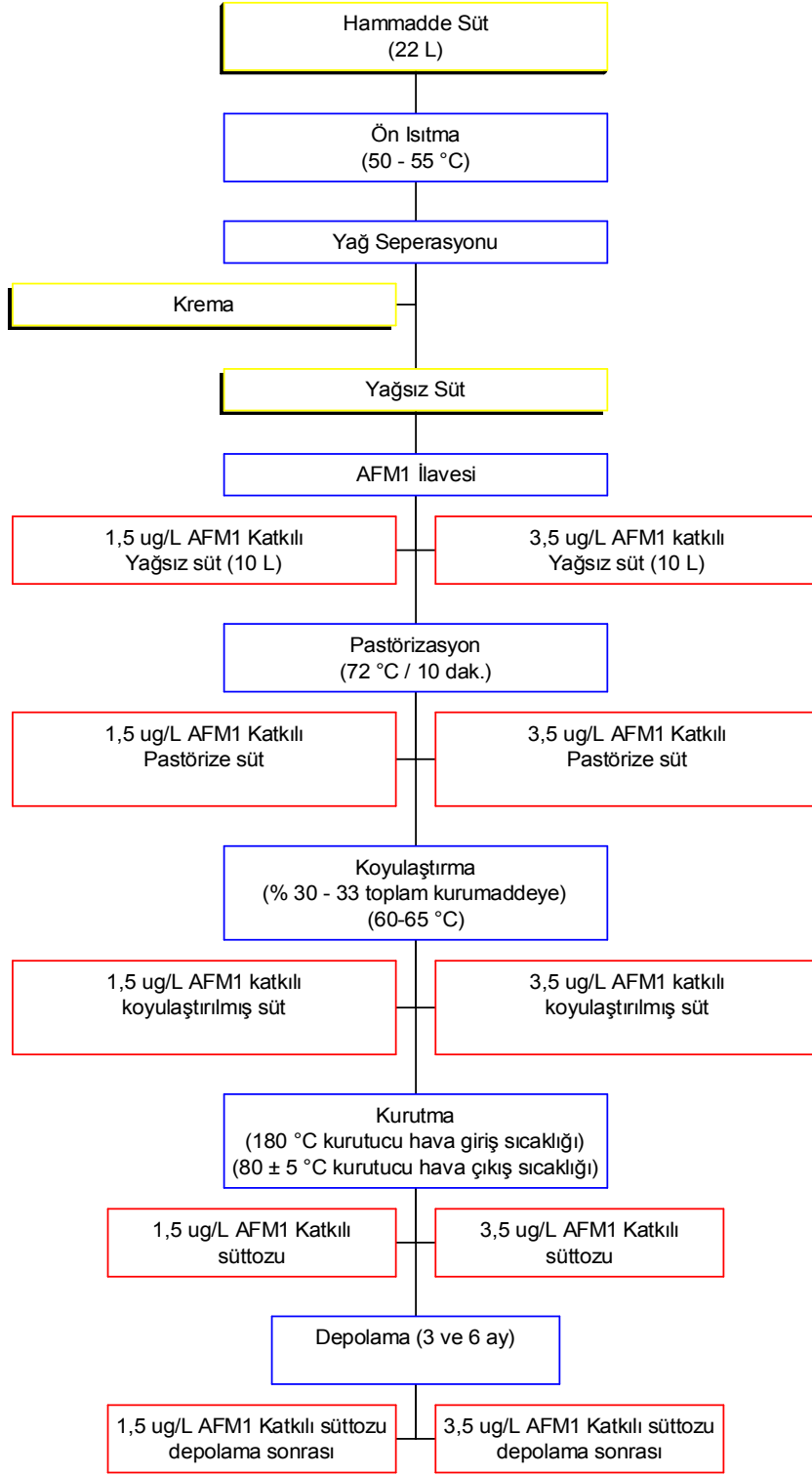
Süt ve ürünleri protein, yağ, karbonhidrat gibi yaşamsal öneme sahip pek çok besin maddesini yeterli ve dengeli bir şekilde içeren yegane gıda maddesidir. Tekniğine uygun şekilde ve hijyenik kurallar göz önüne alınarak üretilen süt ürünleri çocuklar ve gençlerin gelişiminde önemli bir role sahiptir. Bununla birlikte süt, aflatoksin M₁ gibi toksik (zehirli) madde kaynağı da olabilmektedir (Çetin vd 2003).

Anne adayı ve yeni doğan yavrunun aflatoksinlere maruz kalması, insan sütü ve kasında aflatoksin B₁ veya aflatoksin M₁ gibi metabolitlerinin bulunması ciddi ve gelecek nesilleri etkileyebilecek bir sağlık riski oluşturmaktadır (Galvano vd 1996, Moss 1998). Bu nedenle, annelerin kendilerini dolayısıyla bebeklerini aflatoksin riskinden korumak için özellikle hamilelik ve emzirme dönemlerinde aflatoksin içermeyen gıdaları tüketmeleri büyük önem arz etmektedir.

Özetle, sütte bulunması muhtemel aflatoksin M₁'in, sütün ürünlere işlenmesi ve elde edilen ürünlerin depolanması aşamasında stabilitesini yitirip yitirmediğinin bilinmesi, özellikle bu süt ürünlerinden ürünlerini zenginleştirmek ve/veya kurumaddesini

Koyulaştırma işlemi, 50 °C'de 40 kg/saat buharlaştırma kapasitesine sahip pilot Anhydro AI-323 model vakum evaporatöründe $0,5 \pm 0,1$ kg/cm² vakum basıncında gerçekleştirilmiştir. Evaporatörün ürün tahliye bölümünden alınan koyulaştırılmış süt örnekleri 20 °C'ye soğutulmuş ve Abbe refraktometresi ile yaklaşık kurumaddeleri belirlenmiştir. Elde edilen iki farklı düzeyde AFM1 katkılı koyulaştırılmış sütler rotary atomizörlü plot Anhydro 3.52.50.01 model sprey kurutucuda kurutulmuştur. Kurutma esnasında ürün besleme debisi düşük tutulmuş, böylece kurutucu havanın çıkış sıcaklığının mümkün olduğunca sabit kalması sağlanmıştır. Her iki koyulaştırılmış süt örneğinin kurutulmasında kurutucu hava giriş sıcaklığı 180 °C, çıkış sıcaklığı ise 80 ± 5 °C olarak uygulanmıştır. Kurutma sırasında atomizör devir sayısı 18.000 devir/dakika düzeyinde tutulmuştur. Bu şekilde 1,5 ve 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen sprey yağsız süttozları hava almayan polietilen torbalara alınmış, ağızları kapatılarak ışık geçirmeyecek şekilde çift katlı kağıt ambalaj ile ambalajlanarak oda sıcaklığında (20 ± 3 °C), ortalama % 50 – 55 nispi rutubette 6 ay süreyle depolanmışlardır.

İki tekerrürlü olarak yürütülen bu denemenin planı Şekil 3.1.'deki gibi şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. AFM1 katkılı koyulaştırılmış süt ve yağsız süttozu üretim şeması

3.2.1. Çiğ Süt, Yağsız Süt ve Pastörize Sütlere Uygulanan Analizler

3.2.1.1 Titrasyon asitliği, pH değeri, yağ içeriği, toplam kurumadde içeriği, toplam protein içeriği

Titrasyon asitliği, Soxhlet Henkel (°SH) yöntemi (Anonymous 1981), pH değeri, Orion 420 model dijital pH metre, yağ içeriği ise Gerber metodu ile tespit edilirken (Anonymous 1981), toplam kurumadde içeriği gravimetrik metot ile (Anonymous 1981), toplam protein içeriği ise Mikro Kjeldahl düzeneğinden yararlanılarak IDF (Anonymous 1993) tarafından önerilen yöntemle göre saptanmıştır.

3.2.1.2. AFM1 içeriği

AFM1'in belirlenmesinde Hewlett Packard marka (1100 series) degaze ünitesi (Hewlett Packard, G1322A), quaterner pompalı (Hewlett Packard, G1311A), kolon ısıtıcı/soğutucu ünitesi (Hewlett Packard, G1316A) sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de HPLC kromatografik koşulları verilmiştir. Belirleme limiti 0,01 µg/kg olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1. HPLC koşulları

Kolon materyali	Hicrom 5 C18 (250 x 4,6, mm, ID)
Kolon sıcaklığı	25 °C
Mobil faz	Asetonitril/Su (25:75), isokratik
Akış hızı	1 ml/dak.
Dedektör	Hewlett Packard (G1321A) Floresans (exc: 360 nm, emis: 430 nm)
Enjeksiyon hacmi	100 µl
Basınç	185 ± 2 bar
Software	Chem Station

Stok ve ara stok AFM1 çözeltilerinin hazırlanması

5 µg kristal AFM1 standardı (Sigma – Aldrich) 5 ml kloroform içinde çözündürülerek 1 µg/ml konsantrasyonunda stok AFM1 çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti alüminyum folyo ile sarılıp 4 °C'de, karanlıkta muhafaza edilmiştir. Bu şartlarda stok

çözeltinin stabilitesini 2 ay koruduğu, 2 aydan sonra stabilitesinin kontrol edilmesi gerektiği bildirilmektedir (Anonymous 1998a).

AFM1 stok çözeltisi oda sıcaklığına getirildikten sonra öncelikle 0,01 µg/ml konsantrasyonunda 10 ml'lik bir ara stok çözelti hazırlanmıştır. Bunun için;

Stok çözülden (1 µg/ml) otomatik pipetle 0,1 ml (100 µl) alınarak hacmi kloroform ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde elde edilen ara stok çözeltisi (0,01 µg/ml), standart çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

AFM1 standart çözeltilerinin hazırlanması

Ara stok (0,01 µg/ml) kullanılarak sırasıyla 0,5 ng/ml, 1,0 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5,0 ng/ml ve 7,5 ng/ml konsantrasyonlarında 5 adet standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltileri hazırlanırken ara stoktan vial (4 ml'lik) alınan miktar (µl) azot gazı altında tamamen uçurulup % 10'luk asetonitrilde (CH₃CN) (2,5 ml) tekrar çözündürülmüştür. Dolayısıyla standart çözeltilerinin son hacmi 2,5 ml olmuştur. Azot gazı altında ara stoktaki kloroformun tamamen uçurulmasının nedeni, kloroformun piklerde yayılmaya (bant genişlemesine) neden olmasıdır. Asetonitrilin % 10'luk çözeltisinin (10 asetonitril / 90 su) kullanılmasının nedeni de aynıdır. Asetonitril miktarındaki artışın piklerde yayılmaya sebep olduğu, ancak su oranının artırılmasının piklerin şekline etki etmediği bildirilmektedir (Anonymous 1998a, Anonymous 1998b). Çizelge 3.2'de standart çözeltileri hazırlanırken ara stoktan alınan miktarlar görülmektedir.

Hazırlanan AFM1 standart çözeltileri enjeksiyon loop hacmine bağlı olarak uygun hacimlerde (100 µl) manuel enjeksiyon (Rheodyne, Hewlett Packard, G1328A) ile HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Çizelge 3.2. Standart çözeltilerinin hazırlanması

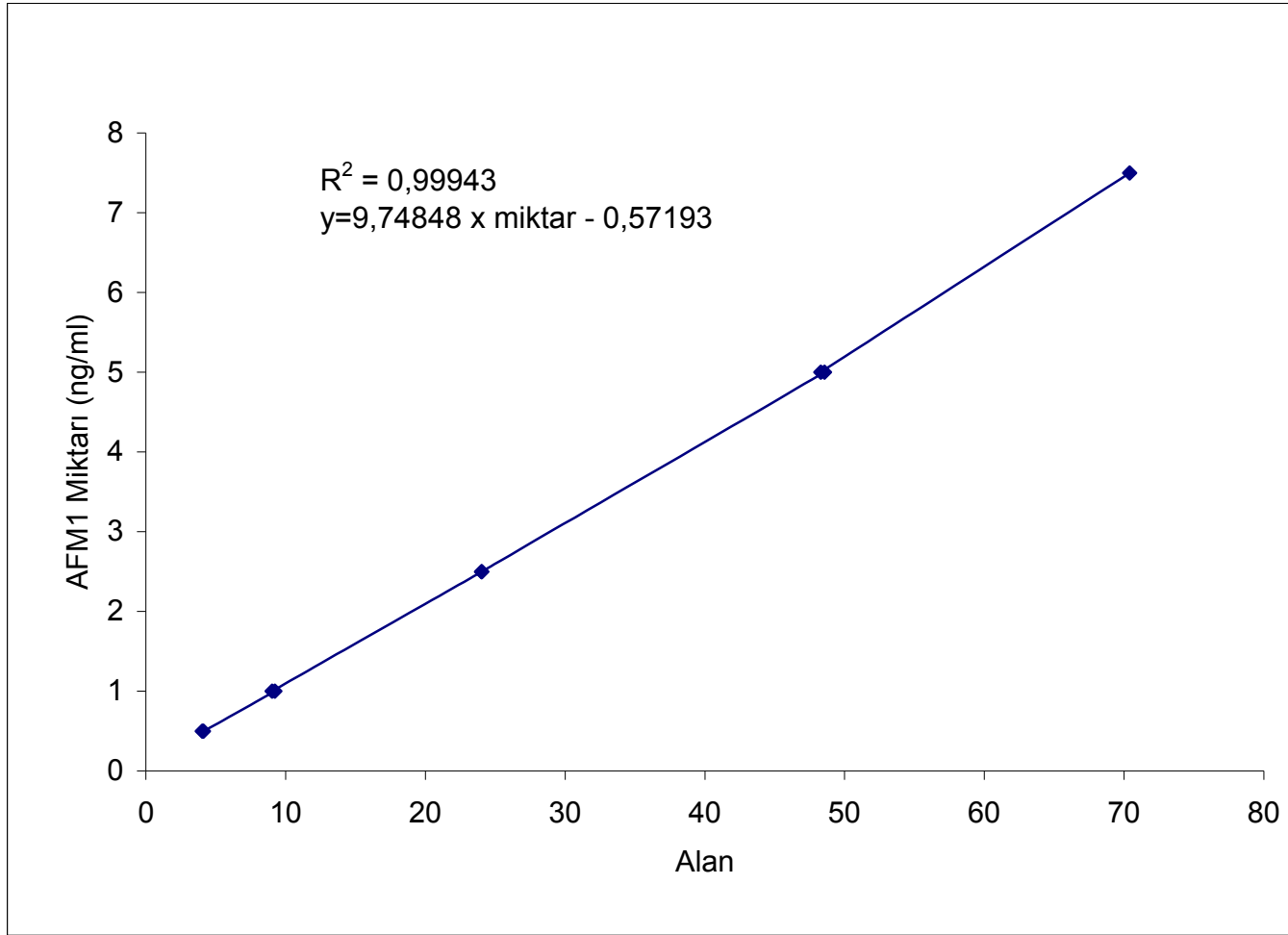
Örnek No	0,01 µg/ml'lik ara stoktan alınan miktar (µl)	Son konsantrasyon (ng/ml)	Çözücü (Su + ACN*) (90 : 10) (ml)
1. vial	125	0,5	2,5
2. vial	250	1,0	2,5
3. vial	625	2,5	2,5
4. vial	1250	5,0	2,5
5. vial	1875	7,5	2,5

* ACN: Asetonitril

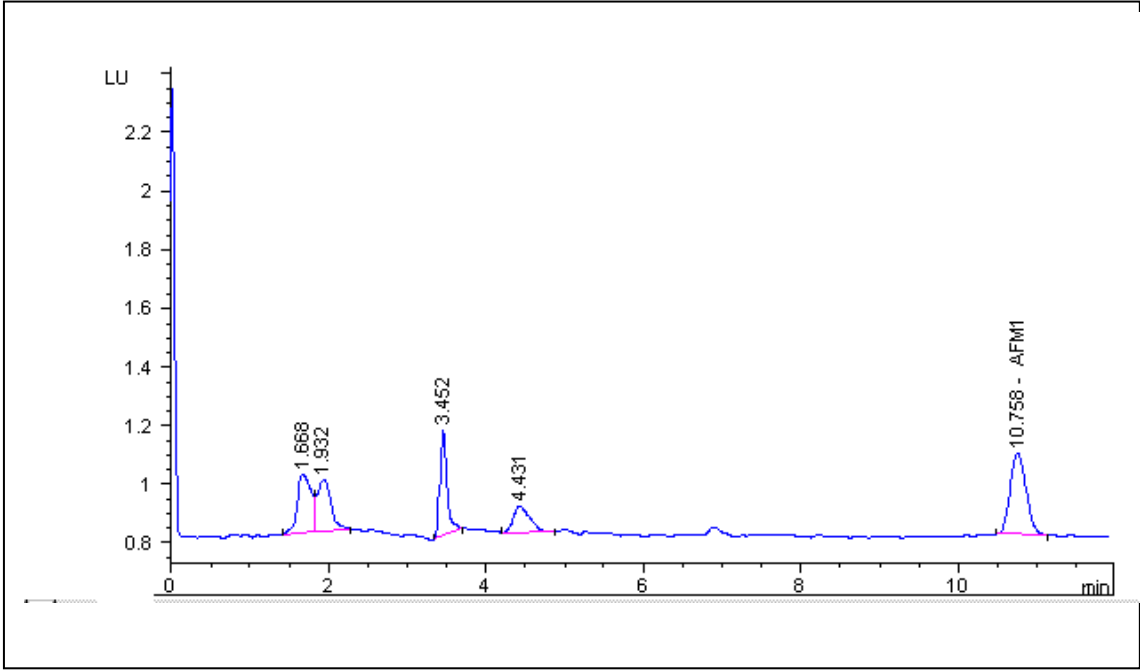
Hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki 5 standart AFM1 çözeltilerinin her biri üçer kez enjekte edilmiş (Çizelge 3.3), dolayısıyla standart çözeltilerin konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen pik alanlarına göre 15 noktada kalibrasyon grafiği oluşturulmuş (Şekil 3.2) ve korelasyon, 0,99943 olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.3'de 0,5 ng/ml ve 7,5 ng/ml'lik standart çözeltilerine ait elde edilen kromatogramlar örnek olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Hazırlanan AFM1 standart çözeltilerine göre elde edilen pik alanları

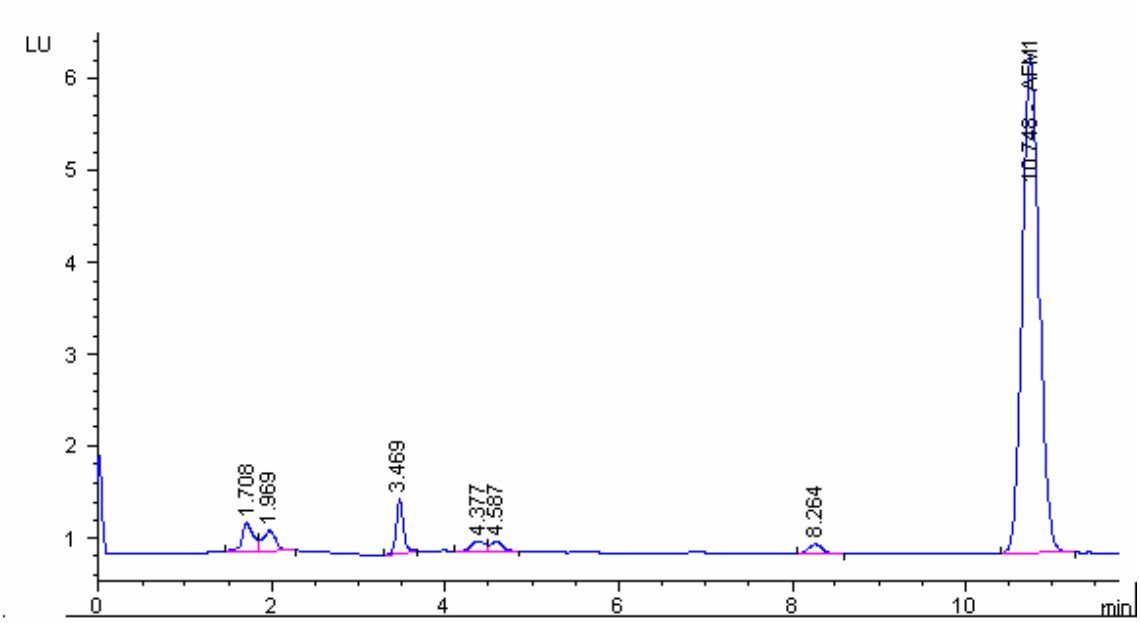
Düzye	Standart AFM1 konsantrasyonu (ng/ml)	Elde edilen pik alanı	Düzye	Standart AFM1 konsantrasyonu (ng/ml)	Elde edilen pik alanı
1	0,500	4,02290	9	2,500	24,00668
2	0,500	4,11661	10	5,000	48,55287
3	0,500	3,89458	11	5,000	48,29091
4	1,000	9,23662	12	5,000	50,17890
5	1,000	9,02842	13	7,500	70,38601
6	1,000	8,66530	14	7,500	71,90931
7	2,500	24,02786	15	7,500	73,83130
8	2,500	23,25096			



Şekil 3.2. Standart AFM₁ çözeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrisi



A



B

*AFM1 dışındaki piklerin hangi maddelere ait olduğu bilinmemektedir.

Şekil 3.3. Standart çözeltilere ait kromatogramlar

A: 0,5 ng/ml AFM1 standardı

B: 7,5 ng/ml AFM1 standardı

Süt örneklerinin ekstraksiyonu ve saflaştırma

ISO 14501 (Anonymous 1998a)'de belirtildiği gibi süt örneğinden 100 ml alınıp 35 – 37 °C'ye su banyosunda ısıtılmış, 4000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek yağı uzaklaştırılmıştır. Örnek filtre edilerek (whatman 4) en az 50 ml filtrat toplanmıştır. Hazırlanan test örnekleri pipet ile 50 ml'lik şırıngalara alınıp 2-3 ml/dk'lık sabit hızla İ.Affinite kolondan (Vicom, AFLA M₁)¹ geçirilmiştir. 10 ml damıtık su ile yıkanıp kurutulduktan sonra kolondan 4 ml asetonitril (saf) yavaşça geçirilerek AFM1 elute edilmiştir. Akış oranı şırınganın tıpası ile kontrol edilerek 4 ml asetonitrilin kolondan yaklaşık 60 saniyede geçmesi sağlanmıştır. İmmunoaffinite kolonundan alınan eluate, 4 ml'lik bir vialle alınıp hacmi (V_e), azot gazı kullanılarak 30 °C'de yaklaşık 400 µl'ye düşürülmüştür. Elde edilen son eluatenin hacmi (V_f) 4 ml'ye su ile tamamlanarak 10 kat seyreltilmiştir.

Süt ekstraktlarının analizi ve hesaplama

Enjeksiyon loopu vasıtasıyla 100 µl hacimde eluate (V₁) HPLC'ye enjekte edilmiştir. Standart çözeltilerde uygulanan şartların aynıları kullanılarak (Çizelge 3.2) örneklerdeki mevcut AFM1'in ayrılması sağlanmıştır. Her 5 örneğin enjeksiyonundan sonra bir AFM1 standardı enjekte edilerek alıkonma sürelerinde meydana gelebilecek değişimler dikkate alınmıştır.

Test örneklerinin AFM1 içerikleri (W_m) (µg/kg) aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır;

$$W_m = \frac{M_A \times V_f}{V_i \times m}$$

¹ Sütün immunoaffinity kromatografisi kolonundan geçirilmesiyle içerdiği AFM1 ekstrakte olmaktadır. Adı geçen kolon, katı destek materyaline bağlı spesifik monoklonal antikorlar (antibody) içermektedir. Örnek kolondan geçerken seçici antikorlar AFM₁ (antijen) ile bağlanmakta ve antijen – antikor kompleksi oluşturmaktadır. Örnek matrisindeki diğer tüm bileşenler kolondan su geçirilmek suretiyle uzaklaştırıldıktan sonra asetonitril (ACN) yardımıyla M₁ toplanmaktadır (Elue edilmektedir).

Burada;

M_A : Örneğin AFM1 içeriği (ng) (Pik alanına göre belirlenen)

V_i : Enjekte edilen örnek miktarı (μ l)

V_f : Örnek eluatesinin son hacmi (μ l)

m : İmmuno affinite kolonundan geçen örnek miktarı (ml)

Sonuçlar, litrede μ g (μ g/L) olarak, virgülden sonra 3 haneli verilmiştir.

Süt örnekleri için geri kazanım oranlarının tespiti

Geri kazanım oranının belirlenebilmesi için, AFM1 içermeyen, şahit (blank) 3 sütte örneği (BCR-Information Reference Materials – İngiltere) uygun oranda rekonstitüe edilerek süt haline dönüştürüldükten sonra litresinde 0,05 μ g AFM1 içerecek oranda toksin katılmış ve örnekler 3.2.1.2'deki gibi hazırlanıp HPLC'ye enjekte edilmişlerdir. Her üç örnekten de 2'şer tane olmak üzere toplam 6 enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar kullanılarak örneklerin son AFM1 içerikleri madde 3.2.1.2'de belirtildiği gibi hesaplanmış ve geri kazanım oranı yüzde olarak ifade edilmiştir (Çizelge 3.4). Geri kazanım oranı aşağıdaki formülden yararlanılarak ortalama % 99,60 düzeyinde bulunmuştur.

Çizelge 3.4. Süt örnekleri için geri kazanım oranları

Örnek No	AFM1 (μ g/L)	Geri kazanım oranı (%)
1	0,053	105,72
2	0,050	99,36
3	0,048	96,48
4	0,046	91,20
5	0,051	101,76
6	0,050	99,84
Ortalama	0,049 \pm 0,003	99,60

$$\text{GeriKazanımOranı(\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{burada;}$$

C1: AFM1 katkılı süt örneğindeki M₁ içeriği (µg/L)

C2: AFM1 katılmamış süt örneğindeki M₁ içeriği (µg/L)

C3: Eklenen AFM1 içeriği (µg/L)

3.2.2. Koyulaştırılmış sütlere uygulanan analizler

3.2.2.1. Titrasyon asitliği, pH değeri, yağ içeriği, toplam kurumadde içeriği, toplam protein içeriği

Titrasyon asitliği, Soxhelet Henkel (°SH) yöntemi (Anonymous 1990), pH değeri, Orion 420 model dijital pH metre, yağ içeriği ise gerber metodu ile tespit edilirken (Anonymous 1990), toplam kurumadde içeriği gravimetrik metot ile (Anonymous 1961), toplam protein içeriği ise Mikro Kjeldahl düzeneğinden yararlanılarak IDF (Anonymous 1993) tarafından önerilen yönteme göre saptanmıştır.

3.2.2.2. AFM1 içeriği

Stok ve ara stok AFM1 zeltilerinin hazırlanması

3.2.1.2'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

AFM1 standart zeltilerinin hazırlanması

3.2.1.2'deki gibi hazırlanmıştır.

Koyulaştırılmış süt örneklerinin ekstraksiyonu ve saflaştırma

Koyulaştırılmış sütlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında Mayes ve MacDonald (1995)'in önerdiği yöntem kullanılmıştır.

Koyulaştırılmış süt örneği (40 g) 250 ml'lik behere alınmış, üzerine 10 g Celite-545, 2 ml NaCl, 150 ml kloroform ilave edilmiş ve ultratraks (junke kunkel typ: T25) ile yüksek devirde 1 – 2 dakika karıştırılmıştır. Karışım filtre (whatman 4) edildikten sonra toplanan filtrat rotary evaporatöre (Heidolph vv 2000) alınmış ve kloroformun 30 °C'de uçurulması sağlanmıştır. Kalan kısma 2 ml metanol ve 60 ml PBS² ilave edilmiş ve elde edilen karışım ayırma hunisine alınmıştır. Karışım üzerine 50 – 100 ml hekzan ilave edilerek faz ayrılması sağlanmıştır. Alt fazın 50 ml'si immuno affinite kromatografi kolonundan (Vicom AFLA M1) geçirilmiş, 10 ml saf su ile yıkamayı takiben kolon tarafından tutulan AFM1 asetonitril ile elue edilmiş ve eluate 4 ml'lik vial alınmıştır. Son eluate içindeki asetonitril azot gazı altında tamamen uçurulmuş, hacmi 1:1 oranında asetonitril / su ile 500 µl'ye tamamlanmıştır. Örnek hazırlamada HPLC saflıkta kimyasallar kullanılmıştır.

Koyulaştırılmış süt ekstraktlarının analizi ve hesaplama

Koyulaştırılmış süt ekstraktları 3.2.1.2'deki gibi analiz edilmiştir.

Test örneklerinin AFM1 içerikleri (W_c) (µg/kg) aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır;

$$W_c = \frac{M_A \times V_f}{V_i \times m}$$

Burada;

M_A: Örneğin AFM1 içeriği (ng) (Pik alanına göre belirlenen)

V_i: Enjekte edilen örnek miktarı (µl)

V_f: Örnek eluatesinin son hacmi (µl)

m: Hazırlanan test çözeltisinin 50 ml'sindeki koyulaştırılmış süt miktarı (g)

² PBS: 900 ml su, 8 g NaCl, 1,16g Na₂HPO₄ karıştırılıp karışımın pH'sı 7,4'e ayarlanmıştır.

Sonuçlar, kilogramda μg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) olarak, virgülden sonra 3 haneli verilmiştir.

Koyulaştırılmış süt örnekleri için geri kazanım oranlarının tespiti

Geri kazanım oranının belirlenebilmesi için, AFM1 içermeyen, şahit (blank) koyulaştırılmış süt örneği bulunamadığından 0,154 $\mu\text{g}/\text{kg}$ düzeyinde AFM1 içeren (geri kazanım oranında dikkate alınmıştır) 3 koyulaştırılmış süt örneği kullanılmıştır. Örnekler kg'ında 0,5 μg AFM1 içerecek oranda toksin katılmış ve örnekler 3.2.1.2'de belirtildiği şekilde hazırlanıp HPLC'ye enjekte edilmişlerdir. Her üç örnekten de 2'şer tane olmak üzere toplam 6 enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar kullanılarak örneklerin son AFM1 içerikleri 3.2.1.2'deki gibi hesaplanmış ve geri kazanım oranı yüzde olarak ifade edilmiştir (Çizelge 3.5). Geri kazanım oranı aşağıdaki formülden yararlanılarak ortalama % 90,60 düzeyinde bulunmuştur.

Çizelge 3.5. Koyulaştırılmış süt örnekleri için geri kazanım oranları

Örnek No	AFM1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Geri kazanım oranı (%)
1	0,462	92,40
2	0,450	89,96
3	0,461	92,20
4	0,450	90,04
5	0,448	89,56
6	0,447	89,44
Ortalama	0,453 \pm 0,006	90,60

$$\text{GeriKazanımOranı}(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \text{ burada;}$$

C1: AFM1 katkılı koyulaştırılmış süt örneğindeki M1 içeriği ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

C2: AFM1 katılmamış koyulaştırılmış süt örneğindeki M1 içeriği ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

C3: Eklenen AFM1 içeriği ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

3.2.3. Süttozlarına uygulanan analizler

3.2.3.1. Titrasyon asitliği, pH değeri, yağ içeriği, toplam kurumadde içeriği, toplam protein içeriği

Titrasyon asitliği Amerikan Süttozu Enstitüsü (ADMI)'nün 916 numaralı bültenindeki yöntemine göre Soxhlet Henkel (°SH) cinsinden belirlenirken (Anonymous 1971), pH değeri Orion 420 model dijital pH metre, yağ içeriği ise gerber metodu ile tespit edilmiştir (Anonymous 1978). Toplam kurumadde içeriği gravimetrik metot ile, (Anonymous 1964), toplam protein içeriği ise Mikro Kjeldahl düzeneğinden yararlanılarak IDF (Anonymous 1993) tarafından önerilen yöntemine göre saptanmıştır.

3.2.3.2. AFM1 içeriği

Stok ve ara stok AFM1 çözeltilerinin hazırlanması

3.2.1.2'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

AFM1 standart çözeltilerinin hazırlanması

3.2.1.2'deki gibi hazırlanmıştır.

Süttozu örneklerinin ekstraksiyonu ve saflaştırma

Süttozu örneklerinin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında ISO 14501 (Anonymous 1998a)'de önerilen yöntem kullanılmıştır.

Süttozu örneğinden 10 g behere tartılıp, üzerine 50 ml saf su (50 °C) ilave edilmiş, iyice karıştırılarak rekonstitüsyon (çözünme) sağlanmıştır. Rekonstitüe süt 20 °C'ye soğutulup, 100'lük balon jojeye alınarak seviye su ile 100'e tamamlanmıştır.

Hazırlanan örnek Whatman 4'den süzölmüş ve santrifüj (4000 x g / 15 dak) edilmiştir. Analiz için en az 50 ml filtrat toplanmıştır.

Hazırlanan test örnekleri pipet ile 50'lik şırıngalara alınıp 2-3 ml/dakika'lık sabit hızla İ.Affinite kolondan (Vicam AFLA M1) geçirilmiştir. 10 ml su ile yıkanıp kurutulduktan sonra kolondan 4 ml asetonitril (saf) yavaşça geçirilerek AFM1 elute edilmiştir. Akış oranı şırınganın tıpası ile kontrol edilerek 4 ml ACN'nin kolondan yaklaşık 60 saniyede geçmesi sağlanmıştır. Eluate, 4 ml'lik vialle alınıp hacmi (V_e), azot buharı kullanılarak 30 °C'de yaklaşık 400 µl'ye düşürölmüştür. Elde edilen son eluatenin hacmi (V_f) 4 ml'ye saf su ile tamalanmıştır. Örnek hazırlamada HPLC saflıkta kimyasalların kullanımına özen gösterilmiştir.

Süttozu ekstraktlarının analizi ve hesaplama

Eluate (V_1) enjeksiyon loopu (100 µl) vasıtasıyla HPLC'ye enjekte edilmiştir. Standart çözeltilerde uygulanan şartların aynıları kullanılarak (Çizelge 3.1) örneklerdeki mevcut AFM1'in ayrılması sağlanmıştır. Her 5 örnek enjeksiyonundan sonra bir AFM1 standardı enjekte edilerek alıkonma sürelerinde meydana gelebilecek olası değişimler dikkate alınmıştır.

Süttozu örneklerinin AFM1 içerikleri (W_p) (µg/kg) aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır;

$$W_p = \frac{M_A \times V_f}{V_i \times m}$$

Burada;

M_A : Örneğin AFM1 içeriği (ng) (Pik alanına göre belirlenen)

V_i : Enjekte edilen örnek miktarı (µl)

V_f : Örnek eluatesinin son hacmi (µl)

m : Hazırlanan test çözeltilisinin 50 ml'sindeki süttozu miktarı (g)

Sonuçlar, kilogramda µg (µg/kg) olarak, virgülden sonra 3 haneli verilmiştir.

Süttozu örnekleri için geri kazanım oranlarının tespiti

Süttozlarında geri kazanım oranının belirlenebilmesi için, AFM1 içermeyen, blank (kör) 3 süttozu örneğine (BCR-Information Reference Materials – İngiltere) kg'ında 0,5 µg AFM1 içerecek oranda toksin katılmış ve örnekler 3.2.1.2'deki gibi hazırlanıp HPLC'ye enjekte edilmişlerdir. Her üç örnekten de 2'ser tane olmak üzere toplam 6 enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar kullanılarak örneklerin son AFM1 içerikleri 3.2.1.2'de belirtildiği gibi hesaplanmış ve geri kazanım oranı % olarak ifade edilmiştir (Çizelge 3.6). Geri kazanım oranı aşağıdaki formülden yararlanılarak ortalama % 99,24 düzeyinde bulunmuştur.

Çizelge 3.6. Süttozu örnekleri için geri kazanım oranları

Örnek No	AFM1 (µg/kg)	Geri kazanım oranı (%)
1	0,498	99,60
2	0,491	98,16
3	0,490	97,92
4	0,502	100,32
5	0,498	99,60
6	0,499	99,84
Ortalama	0,496 ± 0,004	99,24

$$\text{GeriKazanımOranı}(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \text{ burada;}$$

C1: AFM1 katkılı süttozu örneğindeki M1 içeriği (µg/kg)

C2: AFM1 katılmamış süttozu örneğindeki M1 içeriği (µg/kg)

C3: Eklenen AFM1 içeriği (µg/kg)

3.2.4. İstatistiksel analizler

Başlangıçta hammadde süte 2 farklı konsantrasyonda ilave edilen aflatoksin M₁ içeriklerine proses aşamalarının (yağ seperasyonu, ısıl işlem, koyulaştırma, kurutma, depolama) olası etkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde “Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi” modeli kullanılmıştır (Düzgüneş vd 1987). İstatistiksel değerlendirmelerde Minitab for windows ver. 13.0 ve SPSS ver. 9.0 programlarından yararlanılmıştır.

4. ANALİZ ve BULGULAR

4.1. Hammadde Süt ile AFM1 Katkılı Yağsız Süt, Pastörize Süt, Koyulaştırılmış Süt ve Süttozlarının Bazı Bileşim Unsurları

Çizelge 4.1. Deneme örneklerinin bazı bileşen özellikleri

Örnekler*	Titrasyon Asitliği (SH)	pH değeri	Yağ (%)	Toplam Kurumadde (%)	Protein (%)
ÇS	7,32 ± 0.049	6,42 ± 0.078	4,00 ± 0.566	12,60 ± 0.729	3,62 ± 0.049
YS	7,37 ± 0.007	6,41 ± 0.092	0,10 ± 0.000	9,40 ± 0.233	3,37 ± 0.049
PS	7,38 ± 0.042	6,41 ± 0.106	0,10 ± 0.000	9,41 ± 0.245	3,38 ± 0.247
KS15	24,20 ± 0.304	6,20 ± 0.028	0,32 ± 0.071	30,74 ± 0.365	9,81 ± 0.014
KS35	24,30 ± 0.127	6,20 ± 0.028	0,32 ± 0.071	30,51 ± 0.030	9,84 ± 0.049
ST15	7,25 ± 0.049	6,37 ± 0.021	1,10 ± 0.141	96,87 ± 0.067	32,20 ± 0.141
ST35	7,27 ± 0.120	6,39 ± 0.049	1,10 ± 0.141	96,37 ± 0.799	32,16 ± 0.219
ST15-D3	7,27 ± 0,061	6,37 ± 0,048	1,10 ± 0,141	96,42 ± 0,049	32,18 ± 0,140
ST35-D3	7,29 ± 0,118	6,38 ± 0,021	1,10 ± 0,141	96,15 ± 0,148	32,17 ± 0,139
ST15-D6	7,27 ± 0,048	6,36 ± 0,060	1,10 ± 0,141	96,38 ± 0,061	32,04 ± 0,111
ST35-D6	7,30 ± 0,111	6,36 ± 0,031	1,10 ± 0,141	96,11 ± 0,139	32,00 ± 0,161

*Bkz. Simgeler Dizini

Hammadde çiğ süt ile ondan elde edilen AFM1 katkılı yağsız süt, pastörize süt, koyulaştırılmış süt ve süttozlarının titrasyon asitlikleri ve pH değerleri ile yağ, toplam kurumadde ve protein içerikleri tespit edilerek sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde hammadde çiğ sütler ile üretilen koyulaştırılmış süt ve süttozlarının bileşen içerikleri bakımından Türk Standartları’na uygun oldukları (Anonymous 1974, Anonymous 1981, Anonymous 1990) görülmektedir.

Sütteki yüksek bakteri içeriğine bağlı olarak gelişen asitlik, süt tozlarının üretimini ve son ürünün eriyebilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Anılan nedenden ötürü süttozuna işlenecek sütlerin titrasyon asitliğinin 7,5 °SH’dan az olması istenmektedir (Early 1994). Bu bağlamda Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi araştırmada kullanılan sütler asitlik bakımından süttozuna işlemeye uygun olarak nitelendirilebilirler. Sütün suyunun vakum ortamında uzaklaştırılmasıyla elde edilen koyulaştırılmış sütlerin kurumaddeyi oluşturan bileşenlerinden yağ ve toplam protein içeriklerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak yaklaşık 3 katlık bir artış olduğu yine Çizelge 4.1’den takip edilebilmektedir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak titrasyon asitliği de yükselmektedir (Tumermann ve Webb 1965, Sherbon 1988, Yetismeyen ve Deveci 2000). Nitekim bu çalışmada hammadde çiğ sütün titrasyon asitliği 7,32 °SH iken koyulaştırma işlemiyle kurumadde artırımını sonucu konsantre sütün asitliği 1,5 µg/kg AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen koyulaştırılmış sütlerde (KS15) 24,20°SH’ya, 3,5 µg/kg AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen koyulaştırılmış sütlerde (KS35) ise 24,30°SH’ya yükselmiştir.

4.2. AFM1 Katkılı Sütlerden Üretilen Yağsız Süttozlarının AFM1 İçeriklerine Proses Aşamalarının Etkisine İlişkin Sonuçlar

Hammadde çiğ süt ve ondan üretilen yağsız sütler ile AFM1 katkılı yağsız süt, pastörize süt, koyulaştırılmış süt ve süttozlarının tespit edilen M₁ içeriklerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2.'nin incelenmesiyle de görüleceği gibi süttozu üretiminde kullanılan hammadde sütlerin AFM1 içerikleri ortalama 0,020 µg/L düzeyinde tespit edilmiştir. Separasyon işlemi ile kremanın ayrılmasından sonra elde edilen yağsız sütlerin AFM1 içeriklerinin ise ortalama 0,019 µg/L olduğu görülmüştür. AFM1 içeriğinde görülen bu 0,001 µg/L'lik (% 5'lik) azalış istatistiksel bakımdan önemsiz bulunmuştur ($p>0,01$ ve $p>0,05$). Yağ seperasyonunun sütün AFM1 içeriğini etkilemediği, separasyondan sonra yağlı sütteki M_1 'in yaklaşık % 95'inin yağsız süte geçtiği söylenebilir. Bu durum, AFM1'in hidrofilik karakteriyle açıklanabilir. Bu özelliği onun yağsız fazda baskın durumda bulunmasını sağlamaktadır (Egmond-Van and Paulsch 1986, Galvano vd. 1996).

Applebaum vd. (1982) de krema seperasyonunun sütün AFM1 içeriğini etkilemediğini, seperasyondan sonra elde edilen yağsız sütün M_1 içeriğinin yaklaşık olarak yağlı sütünkine eşit olduğunu vurgulamışlar, buna sebep olarak AFM1'in hidrofobik bağlarla kazeine bağlanmasını göstermişlerdir.

Çizelge 4.2. Deneme örneklerinin AFM1 düzeyleri

Örnek*	AFM1Düzeyi (µg/L, kg)	Örnek*	AFM1Düzeyi (µg/L, kg)
ÇS	0,020 ± 0,004	ÇS	0,020 ± 0,004
YS	0,019 ± 0,004	YS	0,019 ± 0,004
YS15	1,362 ± 0,017	YS35	2,788 ± 0,040
PS15	1,145 ± 0,007	PS35	2,461 ± 0,023
KS15	3,295 ± 0,002	KS35	8,456 ± 0,042
ST15	10,219 ± 0,211	ST35	25,943 ± 1,474
ST15-D3	10,073 ± 0,236	ST35-D3	25,549 ± 1,002
ST15-D6	9,690 ± 0,255	ST35-D6	24,947 ± 1,230

*Bkz. Simgeler Dizini

Çizelge 4.2'den de izlenebileceği gibi 1,5 ve 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin M_1 içerikleri sırasıyla ortalama 1,362 ve 2,788 µg/L bulunmuştur. Bu,

1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütler için % 90,8, 3,5 µg/L AFM1 katkılı sütler için ise yaklaşık % 79,7'lik bir geri kazanım anlamına gelmektedir. 10 litre gibi büyük bir hacme çok düşük düzeylerde (µg) toksin katkısı söz konusu olduğundan anılan oranlar normal karşılanmıştır.

İki farklı düzeyde (1,362 ve 2,788 µg/L) AFM1 içeriğine sahip olan sütlerden (YS15 ve YS35) üretilen koyulaştırılmış sütlerin (KS15 ve KS35) AFM1 içerikleri (3,295 ve 8,456 µg/kg) incelendiğinde sırasıyla 2,4 ve 3 katlık bir artış olduğu göze çarpmaktadır (Çizelge 4.2). Koyulaştırma, sütün suyunun düşük sıcaklık ve düşük basınç altında uzaklaştırılması işlemidir. Anılan artış, toplam kurumaddede dolayısıyla konsantrasyondaki değişime bağlı olarak ortaya çıkan bir artıştır.

Çizelge 4.1'den de görülebileceği gibi bu çalışmada % 9,4 toplam kurumaddeli süttten üretilen 1,5 µg/L ve 3,5 µg/L AFM1 katlı koyulaştırılmış sütlerin toplam kurumadde içerikleri sırasıyla % 30,74 ve % 30,51 bulunmuştur. Bu yaklaşık 3,2 katlık bir konsantrasyon artışı anlamına gelmektedir. Başka bir ifadeyle başlangıçtaki M₁ katkılı hammadde yağsız sütlerin hacimlerinde 1/3'lik bir azalış söz konusudur. Hacimdeki bu azalışa karşılık AFM1 içeriklerinde de nisbi olarak artış meydana gelmesi doğaldır. Bazı araştırmacılar da konsantrasyon artışına bağlı olarak AFM1 katkılı sütlerden üretilen peynirlerin M₁ içeriklerinde 2 – 4 katlık (Brackett and Marth 1982, Blanco vd. 1988, Govaris vd. 2001), yoğurtların M₁ içeriklerinde ise yaklaşık 1,2 katlık (Blanco vd. 1993) artış olduğunu bildirmişlerdir.

Sütün suyunun hemen hemen tamamına yakınının uzaklaştırılmasıyla elde edilen süttözlerinin AFM1 içerikleri de konsantrasyondaki artışa bağlı olarak yükselmiştir. Çizelge 4.2'den de izlenebileceği gibi toplam kurumadde içeriklerindeki 10 katlık artışa karşılık 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttözlerinin M₁ içeriklerinde 7,5 katlık, 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız süttten üretilen süttözlerinin M₁ içeriklerinde ise 9,3 katlık bir artış saptanmıştır.

Yukarıdaki bilgiler ışığında değerlendirildiğinde, AFM1 katkılı yağsız sütler ile onlardan üretilen koyulaştırılmış süt ve süttözlerinin kurumadde içeriklerindeki artışa

bağlı olarak M_1 içeriklerinin de arttığı görülmüştür. İstatistiksel analizler neticesinde de 1,5 $\mu\text{g/L}$ M_1 katkılı deneme örneklerinin toplam kurumadde ve M_1 içerikleri arasında $r=0,996$ 'lık, 3,5 $\mu\text{g/L}$ M_1 katkılı deneme örneklerinin toplam kurumadde ve M_1 içerikleri arasında ise $r=0,998$ 'lik pozitif bir korelasyonun bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak daha önce de ifade edildiği gibi deneme örneklerinin kurumadde içeriklerine bağlı olarak AFM1 içeriklerinde görülen artışlar konsantrasyon artışına bağlı nisbi artışlardır. Süttozu üretimi sırasında proses aşamalarının AFM1 içeriklerini ne yönde etkilediğinin ortaya konabilmesi için örneklerin miktarlarına bağlı toplam M_1 (μg) içeriklerinden yararlanılmalıdır. Bu amaçla deneme örneklerinin toplam AFM1 içeriklerini gösteren Çizelge 4.3 ve 4.4 oluşturulmuştur.

Çizelge 4.3. 1,5 µg/kg, L AFM1 katkılı örneklerin toplam AFM1 içerikleri

Örnekler *	1. Deneme				2. Deneme			
	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg-L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg-L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***
YS15	10 L	1,350 ± 0,009	13,500 ± 0,009 ^a	100	10 L	1,374 ± 0,014	13,740 ± 0,014 ^a	100
PS15	10 L	1,140 ± 0,006	11,400 ± 0,006 ^b	84,44	10 L	1,150 ± 0,010	11,500 ± 0,010 ^b	83,70
KS15	2,500 kg	3,296 ± 0,035	8,240 ± 0,035 ^c	61,04	2,450 kg	3,293 ± 0,064	8,068 ± 0,064 ^c	58,72
ST15	470 g	10,070 ± 0,025	4,733 ± 0,025 ^d	35,06	395 g	10,368 ± 0,058	4,095 ± 0,058 ^d	29,80
ST15-D3	470 g	9,906 ± 0,029	4,656 ± 0,029 ^d	34,49	395 g	10,240 ± 0,026	4,045 ± 0,026 ^d	29,44
ST15-D6	470 g	9,510 ± 0,021	4,470 ± 0,021 ^d	33,11	395 g	9,871 ± 0,044	3,899 ± 0,044 ^d	28,38

* Bkz. Simgeler Dizini

** Aynı sütunda farklı üst simgeyle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur (p<0,01)

*** Başlangıçta AFM1 içeriği “100” kabul edildiğinde elde edilen değerler

Çizelge 4.4. 3,5 µg/kg, L AFM1 katkılı örneklerin toplam AFM1 içerikleri

Örnekler *	1. Deneme				2. Deneme			
	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg-L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg-L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***
YS35	10 L	2,760 ± 0,055	27,600 ± 0,055 ^a	100	10 L	2,816 ± 0,021	28,160 ± 0,021 ^a	100
PS35	10 L	2,477 ± 0,022	24,770 ± 0,022 ^b	89,75	10 L	2,445 ± 0,012	24,450 ± 0,012 ^b	86,83
KS35	2,136 kg	8,426 ± 0,066	17,998 ± 0,066 ^c	65,21	2,180 kg	8,486 ± 0,071	18,499 ± 0,071 ^c	65,69
ST35	475 g	24,900 ± 0,050	11,828 ± 0,050 ^d	42,85	415 g	26,985 ± 0,078	11,198 ± 0,078 ^d	39,77
ST35-D3	475 g	24,840 ± 0,093	11,799 ± 0,093 ^d	42,75	415 g	26,257 ± 0,036	10,896 ± 0,036 ^d	38,69
ST35-D6	475 g	24,078 ± 0,048	11,437 ± 0,048 ^d	41,44	415 g	25,817 ± 0,063	10,714 ± 0,063 ^d	38,05

* Bkz. Simgeler Dizini

** Aynı sütunda farklı üst simgeyle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur (p<0,01)

*** Başlangıçta AFM1 içeriği “100” kabul edildiğinde elde edilen değerler

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 genel olarak incelendiğinde 1,5 µg/L ve 3,5 µg/L toksin katkılı yağsız süt örneklerinin toplam AFM1 içeriklerinin pastörizasyon, koyulaştırma ve kurutma işlemlerinden sonra belirli oranlarda azaldığı görülmektedir. 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin (YS15) toplam M₁ içerikleri 1. ve 2. deneme için “100” kabul edildiğinde bu süttten üretilen pastörize sütlerin (PS15), koyulaştırılmış sütlerin (KS15) ve süttozlarının (ST15) toplam AFM1 içerikleri sırasıyla ortalama “84,07”, “59,88” ve “32,43” bulunmuştur. Üretilen süttozlarının 3 ve 6 ay süre ile depolanmasından sonra ise anılan değerler sırasıyla “31,97” ve “30,75”’e düşmüştür. Benzer şekilde 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin toplam M₁ içerikleri 1. ve 2. deneme için “100” kabul edildiğinde bu süttten üretilen pastörize sütlerin (PS35), koyulaştırılmış sütlerin (KS35) ve süttozlarının (ST35) toplam AFM1 içerikleri aynı sıraya göre ortalama “88,29”, “65,45” ve “41,31” çıkmıştır. 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen süttozlarının 3 ve 6 ay süre ile depolanmasından sonra ise toplam AFM1 içeriklerinin “40,72” ve “39,75” olduğu görülmüştür.

İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 Mg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden süttozu üretimi sırasında uygulanan proses aşamaları ve depolamanın örneklerin AFM1 içeriğini ne yönde etkilediğinin ortaya konabilmesi için anılan proses aşamaları ayrı başlıklar halinde irdelenmiştir.

4.2.1. Pastörizasyonun AFM1 içeriğine etkisine ilişkin sonuçlar

Çizelge 4.5’de iki farklı düzeyde (1,5 µg/L ve 3.5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen pastörize sütlerin toplam M₁ içerikleri verilmiştir.

Çizelge incelendiğinde toplam AFM1 içerikleri 1. denemede 13,500 µg, 2. denemede 13,740 µg olan 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin (YS15) 72 °C’de 10 dakikalık pastörizasyon işleminden sonra M₁ içeriklerinin sırasıyla 11,400 µg ve 11,500 µg’a düştüğü görülmektedir. Yağsız sütlerin AFM1 içerikleri “100” kabul edildiğinde onlardan elde edilen pastörize sütlerin M₁ içerikleri 1. ve 2. denemede sırasıyla “84,44” ve “83,70” olmaktadır. Diğer bir ifadeyle anılan sıcaklık/süre uygulaması örneklerin AFM1 içeriklerinde ortalama % 15,93’lük bir kayba

neden olmuştur. Bu kaybın istatistiksel bakımdan da $p<0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 $\mu\text{g/L}$) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen pastörize sütlerin toplam M_1 içerikleri

Örnek*	1. Deneme				2. Deneme			
	Örnek Miktarı	AFM1 ($\mu\text{g/kg, L}$)	Toplam AFM1 (μg)**	%***	Örnek Miktarı	AFM1 ($\mu\text{g/kg, L}$)	Toplam AFM1 (μg)**	%***
YS15	10 L	1,350 \pm 0,009	13,500 ^a	100	10 L	1,374 \pm 0,014	13,740 ^a	100
PS15	10 L	1,140 \pm 0,006	11,400 ^b	84,44	10 L	1,150 \pm 0,010	11,500 ^b	83,70
YS35	10 L	2,760 \pm 0,055	27,600 ^c	100	10 L	2,816 \pm 0,021	28,160 ^c	100
PS35	10 L	2,477 \pm 0,022	24,770 ^d	89,75	10 L	2,445 \pm 0,012	24,450 ^d	86,83

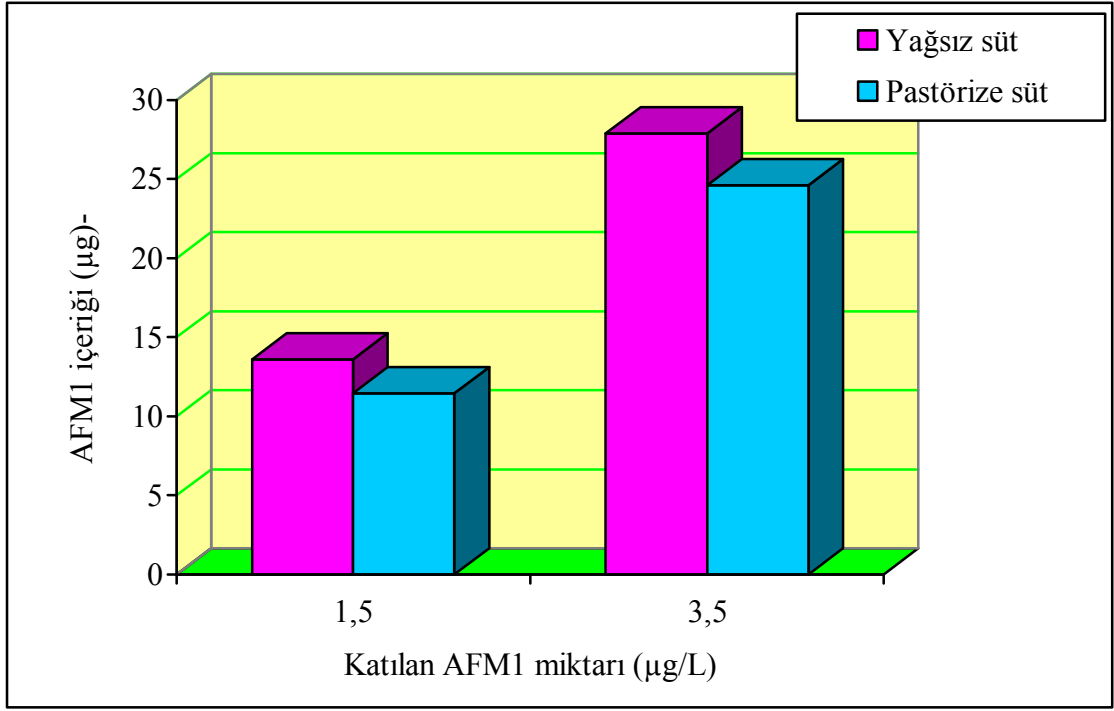
* Bkz. Simgeler Dizini

** Aynı sütunda Farklı üst simgeyle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur ($p<0,01$).

*** Başlangıçta AFM1 içeriği "100" kabul edildiğinde elde edilen değerler

Aynı çizelgeden görülebileceği üzere 3,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız sütlerin pastörizasyonunda da (72 °C'de 10 dakika) benzeri bir durumla karşılaşmıştır. Başlangıçta toplam AFM1 içeriği 1. denemede 27,600 μg (100), 2. denemede 28,160 μg (100) olan 3,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı yağsız sütlerin (YS35) pastörizasyon işleminden sonra M_1 içerikleri sırasıyla 24,770 μg (89,75)'a ve 24,450 μg (86,83)'a düşmüştür (Çizelge 4.5). İstatistiksel bakımdan da önemli ($p<0,01$) olan bu azalış ortalama % 11,71 düzeyinde bulunmuştur.

Özetle belirtmek gerekirse, 72 °C'de 10 dakikalık ısı işlem uygulaması Şekil 4.1'den de izlenebileceği gibi yapay yolla kontamine edilmiş sütlerin AFM1 içeriklerini azaltıcı yönde etki etmiştir. Bu azalış, 1,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı sütler için ortalama % 15,93, 3,5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 katkılı sütler için ise % 11,71 olarak çıkmıştır.



Şekil 4.1. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı sütlerden üretilen pastörize sütlerin toplam M₁ içeriklerinde görülen değişim.

Isıl işlem uygulamasının sütlerde AFM1 içerikleri üzerine etkisinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu konuda Bio-Assay tekniği ile yapılan ilk çalışmada (Allcroft and Carnaghan 1963) pastörizasyonun sütlerde M₁ içeriğini etkilemediği bildirilmiştir. Ancak daha sonraları Applebaum vd (1982), Bio-Assay metodunun AFM1 içeriklerinde görülen küçük değişimlere karşı duyarlı olmadığını belirtmişlerdir. Egmond-Van vd (1977)'de doğal yolla kontamine sütlerin pastörizasyon ve sterilizasyonunun AFM1 stabilitesini etkilemediğini öne sürmüştür. Benzer şekilde, doğal ve yapay yolla kontamine edilmiş sütlerin M₁ içeriklerinin ısı ve asit stabilitesini değerlendirdikleri çalışmalarında Wiseman ve Marth (1983a), 64 °C ve 84 °C'de 15, 30, 60 ve 120 dakikalık ısı işlem uygulamalarının M₁ stabilitesini önemli derecede etkilemediğini vurgulamışlardır. Purchase vd. (1972)'de 62 °C'de 30 dakikalık bir pastörizasyon işleminin AFM1 içeriğinde % 32, 72 °C ve 80 °C'de 45 saniyelik pastörizasyonda ise sırasıyla % 45 ve % 64 oranında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Doğal ve yapay yolla kontamine olmuş sütlere değişik sıcaklık/süre normlarını uygulayan Kiermeier ve Mashaley (1977), % 12 – 40 arasında değişen oranlarda AFM1 redüksiyonundan söz etmişler ve yapay yolla kontamine olan sütlerde M₁ kaybının daha yüksek bulunduğunu vurgulamışlardır.

AFM1'in ısı ile parçalanmasının büyük ölçüde uygulanan sıcaklık/süre normuna bağlı olduğunu vurgulayan El-Deep vd. (1992) de 63 °C'de 30 dakikalık ve 121 °C'de 15 dakikalık ısıtıl işlemin AFM1 içeriğinde sırasıyla % 9,5 ve % 26'lık bir azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir.

Isıtıl işlem uygulamasının sütlerin AFM1 stabilitesini ne yönde etkilediğinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar alınmasının nedenleri 3 başlık altında toplanabilir;

- AFM1'in Stabilitesi: AFM1 stabil değildir, konsantrasyonu zamanla azalabilmektedir. Doğal yolla kontamine edilmiş sütün 0 °C'de 4 gün depolanmasıyla % 40 ve 6 gün depolanmasıyla da % 80 oranında aflatoksin M₁ kaybı gözlenmiştir (Galvano vd 1996). Mashaley ise 5 °C'de 1-3 gün depolanan sütün aflatoksin içeriğinde % 18,8 - % 24,2 arasında değişen oranlarda aflatoksin M₁ kaybı olduğunu tespit etmiştir (Galvano vd 1996).

- Metot Farklılığı: AFM1'in tespitinde yararlanılan metodlar aynı doğruluk ve hassasiyete sahip değillerdir. Kullanılan ekstraksiyon ve saflaştırma tekniklerindeki farklılıklar, değişik sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir. Ayrıca AFM1'in başlangıçtaki kontaminasyon düzeyindeki farklılıklar da burada önem taşımaktadır (Rustom 1997).

- Kontaminasyon Őekli: Yapay yolla kontamine olmuş aflatoksinin ısı ile kaybı doğal yolla kontamine olandan daha kolaydır (Kiermeier ve Mashaley 1977).

4.2.2. Koyulaştırma işleminin AFM1 içeriğine etkisine ilişkin sonuçlar

Farklı iki düzeyde (1,5 µg/L ve 3.5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen pastörize ve koyulaştırılmış süt örneklerinin toplam M₁ içerikleri Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen pastörize ve koyulaştırılmış süt örneklerinin toplam M₁ içerikleri

Örnek*	1. Deneme				2. Deneme			
	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg, L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg, L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***
YS15	10 L	1,350 ± 0,009	13,500 ^a	100	10 L	1,374 ± 0,014	13,740 ^a	100
PS15	10 L	1,140 ± 0,006	11,400 ^b	84,44	10 L	1,150 ± 0,010	11,500 ^b	83,70
KS15	2,50 kg	3,296 ± 0,035	8,240 ^c	61,04	2,45 kg	3,293 ± 0,064	8,068 ^c	58,72
YS35	10 L	2,760 ± 0,055	27,600 ^d	100	10 L	2,816 ± 0,021	28,160 ^d	100
PS35	10 L	2,477 ± 0,022	24,770 ^e	89,75	10 L	2,445 ± 0,012	24,450 ^e	86,83
KS35	2,136kg	8,426 ± 0,066	17,998 ^f	65,21	2,180	8,486 ± 0,071	18,499 ^f	65,69

* Bkz. Simgeler Dizini

** Aynı sütunda Farklı üst simgeyle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur (p<0,01).

*** Başlangıçta AFM1 içeriği "100" kabul edildiğinde elde edilen değerler

Süttozu üretim parametrelerinden biri olan ve koyulaştırma işleminden önce uygulanan pastörizasyon işlemi sütlerin AFM1 içeriklerini belirli oranda azalttığından koyulaştırma işleminin AFM1 stabilitesini ne yönde etkilediğinin irdelenmesinde hem iki farklı düzeyde M₁ katkılı hammadde yağsız sütler, hem de onlardan üretilen M₁ katkılı pastörize sütler baz alınmıştır. Bu bağlamda koyulaştırma işleminin AFM1 içeriğine etkisi incelendiğinde 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütün (YS15) toplam M₁ içeriğinin 1. denemede 13,500 µg'dan 8,240 µg'a, 2. denemede ise 13,740 µg'dan 8,068 µg'a düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.2). 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütün toplam M₁ içeriği "100" kabul edildiğinde ondan üretilen koyulaştırılmış sütün M₁ içeriği 1. denemede "61,04", 2. denemede "58,72" bulunmuştur. Oransal olarak ifade etmek gerekirse, koyulaştırma işlemi başlangıçtaki AFM1 katkılı yağsız sütün M₁

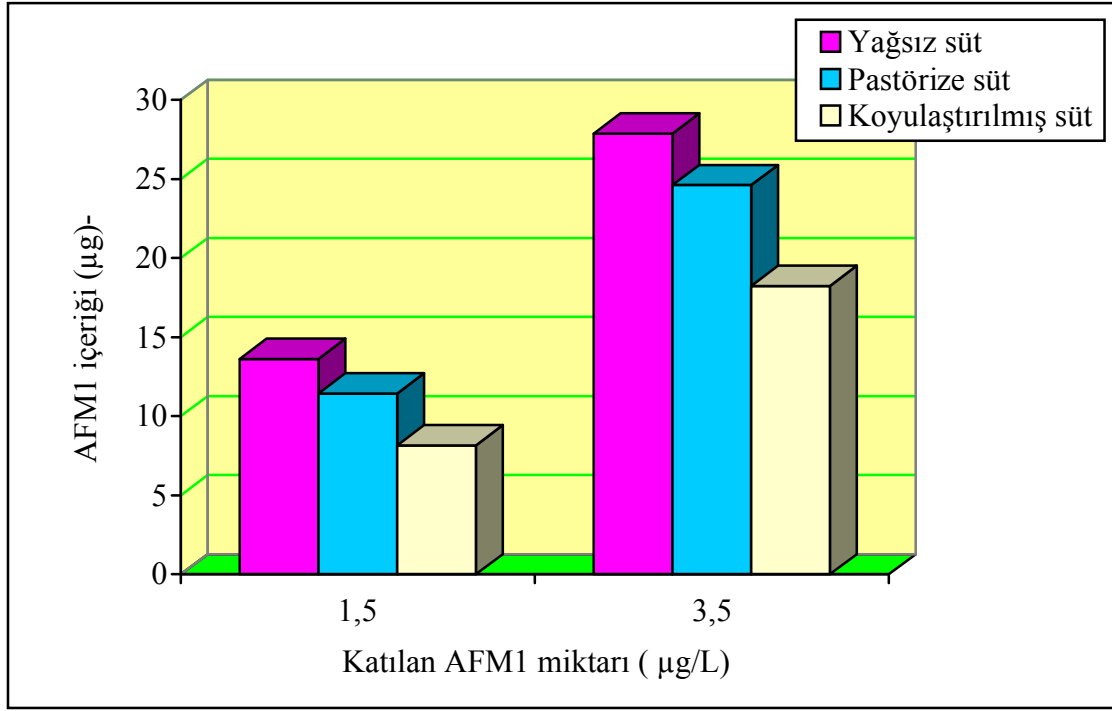
içeriğini 1. denemede % 38,96, 2. denemede ise % 41,28 oranında azaltmıştır. İstatistiksel analizler neticesinde bu azalışların $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu ortaya konmuştur.

Çizelge 4.6'nın yeniden incelenmesiyle de görüleceği gibi 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütün toplam M_1 içeriği 1. denemede 27,600 µg'dan 17,998 µg'a, 2. denemede ise 28,160 µg'dan 18,499 µg'a düşmüştür. 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütün toplam M_1 içeriği "100" kabul edildiğinde koyulaştırılmış sütün (KS35) toplam M_1 içeriği 1. denemede "65,21", 2. denemede "65,69" bulunmuştur. Bu azalış Şekil 4.2'den de izlenebilmektedir. Koyulaştırma işlemi AFM1 katkılı hammadde yağsız sütün (YS35) toplam M_1 içeriğinde 1. denemede % 34,79, 2. denemede ise % 34,31'lik bir kayba neden olmuştur. Gözlenen kayıplar $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Benzeri bir karşılaştırma pastörize sütler ile üretilen koyulaştırılmış sütler arasında yapılacak olursa; 1,5 µg/L AFM1 katkılı pastörize sütün 1. denemede 11,400 µg, 2. denemede 11,500 µg olan toplam AFM1 içeriklerinin koyulaştırma işleminden sonra sırasıyla 8,240 µg ve 8,068 µg'a düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.6). Bu 1. deneme için % 27,72, 2. deneme için ise % 29,84 oranında bir azalış anlamına gelmektedir. Benzer şekilde, 3,5 µg/L AFM1 katkılı pastörize sütün toplam AFM1 içeriği 1. denemede 24,770 µg, 2. denemede ise 24,450 µg tespit edilmiştir. Koyulaştırma işleminden sonra ise 3,5 µg/L AFM1 katkılı pastörize süttten üretilen koyulaştırılmış sütlerin (KS35) toplam M_1 içerikleri 1. denemede 17,998 µg, 2. denemede ise 18,499 µg bulunmuştur. Diğer bir ifadeyle 3,5 µg/L AFM1 katkılı pastörize sütlerden üretilen koyulaştırılmış sütlerin M_1 içeriklerinde 1. denemede % 27,34, 2. denemede ise % 24,34'lük bir azalış olduğu tespit edilmiştir. Hem 1,5 µg/L hem de 3,5 µg/L AFM1 katkılı pastörize sütlerden üretilen koyulaştırılmış sütlerin toplam AFM1 içeriklerinde görülen azalışlar istatistiksel bakımdan da önemli bulunmuştur ($p < 0,01$).

Özetle, koyulaştırma işleminin AFM1 içeriğine etkisi M_1 katkılı hammadde yağsız sütlere göre değerlendirildiğinde; 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin toplam M_1 içeriklerinde ortalama % 40,12'lik, 3,5 µg/kg AFM1 katkılı yağsız sütlerin toplam M_1 içeriklerinde ise ortalama % 34,55'lik bir azalış saptanırken, değerlendirme M_1 katkılı

yağsız sütlerden üretilen pastörize sütlere göre yapıldığında; 1,5 µg/L AFM1 katkılı pastörize sütlerin toplam M₁ içeriklerinde ortalama % 28,78, 3,5 µg/kg AFM1 katkılı pastörize sütlerin toplam M₁ içeriklerinde ise ortalama % 25,84 oranında azalış olduğu tespit edilmiştir. Bu durum Şekil 4.2'den de izlenebilmektedir.



Şekil 4.2. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı sütlerden üretilen pastörize sütler ve koyulaştırılmış sütlerin toplam M₁ içeriklerinde görülen değişimler

Tespit edilen azalışlara anılan proses aşamasının (koyulaştırmanın) etkisi, sütün suyunun düşük basınç altında buharlaştırılarak uzaklaştırılması ve sütün uzun bir süre (40 dakika) 62 – 65 °C sıcaklığa maruz bırakılması olmak üzere iki muhtemel nedene bağlanabilir. Bunlardan birincisi, yani koyulaştırma sırasında buharlaşarak uzaklaşan su molekülleri ile birlikte belirli oranda AFM1'in de uzaklaşması olasılığı pek mümkün görünmemektedir. Çünkü AFM1 sütteki kazein misellerine hidrofobik interaksiyonlarla bağlı bulunmaktadır (Applebaum vd. 1982, Blanco vd. 1988, Blanco vd. 1993, Hassanin 1994, Galvano vd. 1996, Rustom 1997). Ayrıca nispeten yüksek bir molekül ağırlığına (328) ve yüksek erime noktasına (299 °C) sahip olan AFM1'in uçuculuğuna ya da düşük sıcaklıklarda su buharı ile taşındığına ilişkin her hangi bir bilgiye de rastlanılmamıştır.

Koyulaştırma ile AFM1 içeriklerinde görülen düşüşün işlem esnasında uygulanan sıcaklık / süre (62 –65 °C’de 40 dakika) kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sütün ısıtılma maruz kalma süresi uzadıkça M₁ kaybı da artmaktadır (Rustom 1997). Örneğin, yapay yolla kontamine ettikleri sütlere 62 °C’de 30 dakikalık bir ısıtılma uygulayan Kiermeier ve Mashaley (1977), AFM1 kaybının % 35 olduğunu tespit etmişler, sıcaklığın 71 °C’ye çıkarılması, sürenin 40 saniye olması durumunda ise kaybın % 29 düzeyinde olduğunu vurgulamışlardır. Benzer şekilde 74 °C’de 30 dakika uygulanan ısıtılma işleminin % 40’lık bir kayıpla 120 °C’de 15 dakikalık sterilizasyondan bile daha fazla düzeyde AFM1 kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Sütü koyulaştırmanın AFM1 içeriğine etkisi üzerine yapılan sınırlı sayıda çalışmada farklı sonuçlar alınmıştır. Kiermeier ve Sabino, çalışmamızda elde edilen bulguların tersine koyulaştırmanın AFM1 stabilitesini değiştirmediğini bildirirken diğer bazı araştırmacılar % 60 – 75 arasında değişen oranlarda M₁ kaybı olduğunu bildirmişlerdir (Galvano vd. 1996).

4.2.3. Kurutma işleminin AFM1 içeriğine etkisine ilişkin sonuçlar

Çizelge 4.7’de farklı iki düzeyde (1,5 µg/L ve 3.5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen koyulaştırılmış sütlerin ve süttozlarının toplam M₁ içerikleri verilmiştir.

Çizelge 4.7’nin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere toplam AFM1 içeriği 1. denemede 8,240 µg, 2. denemede 8,068 µg bulunan 1,5 µg/kg AFM1 katkılı koyulaştırılmış sütler (KS15) sprey yöntemi ile kurutulduklarında elde edilen 1,5 µg/kg AFM1 katkılı süttozlarının (ST15) toplam AFM1 içerikleri sırasıyla 4,733 µg ve 4,095 µg bulunmuştur. Bu 1. deneme için % 42,56, 2. deneme için ise % 49,24’lük bir kayba işaret etmektedir.

Çizelge 4.7. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen koyulaştırılmış süt ve süttozlarının toplam M₁ içerikleri

Örnek*	1. Deneme				2. Deneme			
	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg, L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg, L)	Toplam AFM1 (µg)**	%***
YS15	10 L	1,350 ± 0,009	13,500 ^a	100	10 L	1,374 ± 0,014	13,740 ^a	100
KS15	2,50 kg	3,296 ± 0,035	8,240 ^b	61,04	2,45 kg	3,293 ± 0,064	8,068 ^b	58,72
ST15	470 g	10,070 ± 0,025	4,733 ^c	35,06	395 g	10,368 ± 0,058	4,095 ^c	29,80
YS35	10 L	2,760 ± 0,055	27,600 ^d	100	10 L	2,816 ± 0,021	28,160 ^d	100
KS35	2,136kg	8,426 ± 0,066	17,998 ^e	65,21	2,180	8,486 ± 0,071	18,499 ^e	65,69
ST35	475 g	24,900 ± 0,050	11,828 ^f	42,85	415 g	26,985 ± 0,078	11,198 ^f	39,77

* Bkz. Simgeler Dizini

** Farklı üst simgeyle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur (p<0,01).

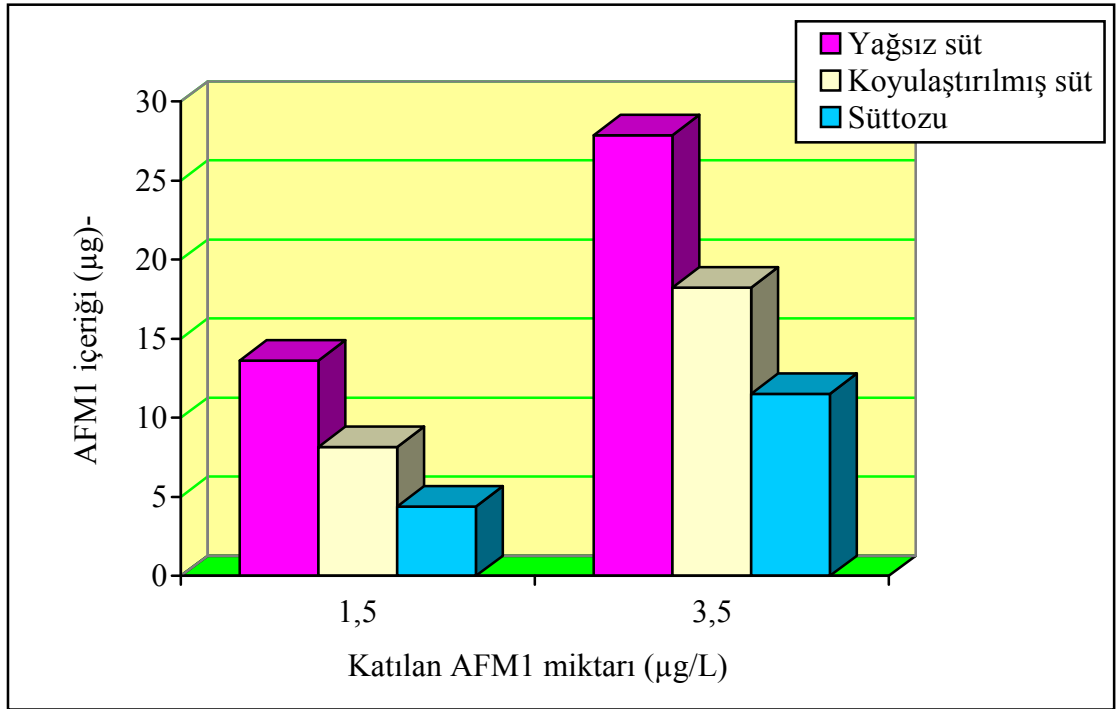
*** Başlangıçta AFM1 içeriği "100" kabul edildiğinde elde edilen değerler

3,5 Mg/kg AFM1 katkılı koyulaştırılmış sütlerin (KS35) kurutulmasıyla da belirli oranda M₁ kaybı olduğu Çizelge 4.7 ve Şekil 4.3'ün birlikte incelenmesiyle açıkça görülmektedir. 1. denemede toplam M₁ içeriği 17,998 µg, 2. denemede ise 18,499 µg olan KS35'in kurutulmasıyla M₁ içeriği 1. ve 2. deneme için sırasıyla 11,828 µg ve 11,198 µg'a düşmüştür. Başka bir ifadeyle kurutma işlemi koyulaştırılmış sütlerin toplam AFM1 içeriklerini istatistiksel bakımdan p<0,01 düzeyinde önemli sayılan oranlarda azaltmıştır. Bu azalışlar, 1. denemede % 34,28, 2. denemede ise % 39,47 bulunmuştur (Çizelge 4.7).

AFM1 katkılı yağsız süttten süttozu üretimi sırasında AFM1 içeriğinde meydana gelen toplam kayıplar irdelenecek olursa, 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütün (YS15) toplam M₁ içeriği 1. denemede 13,500 µg, 2. denemede ise 13,740 µg bulunmuştur. Bu sütlerden elde edilen süttozlarının toplam M₁ içeriklerinin ise sırasıyla 4,733 µg ve 4,095 µg olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). 1,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütün toplam M₁ içeriği 1. ve 2. denemede "100" kabul edildiğinde onlardan üretilen süttozlarının M₁ içerikleri 1. denemede "35,06", 2. denemede "29,80" bulunmuştur. Bu, 1. deneme için % 64,94, 2. deneme için ise % 70,2'lik bir kayıp anlamına gelmektedir.

Benzeri bir karşılaştırma ile, 3,5 µg/L AFM1 katkıli yağsız sütün (YS35) toplam M₁ içeriği 1. denemede (27,600 µg) ve 2. denemede (28,160 µg) “100” kabul edildiğinde bunlardan üretilen 3,5 µg/kg AFM1 katkıli süttozlarının (ST35) toplam M₁ içerikleri 1. denemede “42,85” (11,828 µg), 2. denemede ise “39,77” (11,198 µg) bulunmuştur (Çizelge 4.7). Yüzdesele kayıp olarak ifade etmek gerekirse, 3,5 µg/L AFM1 katkıli yağsız sütün süttozu üretildiğinde 1. denemede % 57,15, 2. denemede ise % 60,23 düzeyinde AFM1 kaybı ile karşılaşılmıştır.

Özetle, “3.1 Materyal ve Yöntem” bölümünde Şekil 3.1’de verilen üretim planı izlenerek iki farklı düzeyde AFM1 katkıli yağsız sütlerden süttozu üretildiğinde 1,5 µg/L AFM1 katkıli yağsız sütün toplam M₁ içeriklerinde ortalama % 67,57’lik, 3,5 µg/L AFM1 katkıli yağsız sütün toplam M₁ içeriklerinde ise ortalama % 58,69’luk bir kayıp olduğu gözlenmiştir. Kayıpların istatistiksel bakımdan p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu durum Şekil 4.3’den de izlenebilmektedir.



Şekil 4.3. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkıli sütlerden üretilen koyulaştırılmış sütün ve süttozlarının toplam M₁ içeriklerinde görülen değişimler

Sütün kurutulması ile AFM1 içeriğinde görülen söz konusu azalmaya pastörizasyon ve koyulaştırma işleminde olduğu gibi uygulanan sıcaklığın neden olduğu düşünülmektedir. Sütün kurutulması sırasında kurutma ünitesi içinde 180 – 200 °C gibi yüksek sıcaklıklara çıkılmaktadır. Ancak kuruma sırasında kurutucu odaya püskürtülen süt zerrecikleri içerisindeki nemin kapilar boşluklardan yüzeye taşınması ve oradan sürekli buharlaşarak uzaklaşması nedeniyle süttozu taneciklerinin iç sıcaklığı hiç bir zaman 70 –75 °C’yi geçmemektedir (Caric 1994). Dolayısıyla, bu çalışmada kurutma sırasında yapılan iş, AFM1 katkılı koyulaştırılmış sütlerin kısa bir süre 70 - 75 °C sıcaklığa maruz bırakılması olarak özetlenebilir.

Isı uygulaması, α -laktalbumin ve β -laktoglobulin arasında ve κ -kazein ile β -laktoglobulin arasındaki interaksiyonları teşvik etmektedir. Süt proteinlerinin bir araya gelmesinden disülfid köprüleri, kalsiyum bağları ve hidrofobik bağların sorumlu olduğu düşünülmektedir (Dzurec ve Robert 1985). AFM1’in de kazeinin hidrofobik bölümlerine hidrofobik interaksiyonlarla bağlandığı pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Applebaum vd. 1982, Blanco vd. 1988, Blanco vd. 1993, Hassanin 1994). Bu bağlamda değerlendirildiğinde yürütülen çalışmada ısı işlem uygulanan pastörizasyon, koyulaştırma ve kurutma gibi proses aşamalarında AFM1 miktarlarında görülen azalışın kısmen de ısı işlem uygulamasına bağlı olarak AFM1 ve kazein arasındaki interaksiyonlardaki değişimlerden kaynaklandığı düşünülebilir.

Isıl işlemin etkisi ile AFM1’in kazeine bağlanma oranında değişimlerin meydana gelebileceğini bildiren Blanco vd. (1988), bu bağlanmanın doğası tam olarak bilinmediğinden değişimi açıklamanın zor olduğunu belirtmişlerdir. Brackett ve Marth (1982)’da M_1 ’in kazeine ne şekilde bağlandığının ortaya konabilmesi için bu konuda ileri kimyasal araştırmalara ihtiyaç bulunduğunu vurgulamışlardır.

Choudhary vd. (1998)’de gerçekleştirdikleri çalışmalarında sütün kaynatılmasının ve sterilizasyonunun AFM1 içeriklerinde sırasıyla % 14,5 ve % 12,21’lik kayba neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, sütlerin M_1 içeriklerindeki ısı uygulaması ile görülen kayıpların belirli ölçüde denatürasyon ve kazein ile serum proteinleri arasında

meydana gelen interaksiyonların kazeine bağlı AFM1'in ekstraksiyonunu engellemesinden de kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.

Kurutmanın hammadde sütün AFM1 içeriğini ne yönde etkilediğine dair pek fazla çalışma yapılmamıştır. Bu konuda gerçekleştirilen ilk çalışmada (Allcroft ve Carnaghan 1963), silindir kurutmanın AFM1 stabilitesini değiştirmediği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamıza yakın sonuçlar bulan Purchase vd. (1972) ise vakum basıncında 40 °C'de silindir kurutmanın AFM1 içeriğini % 61 oranında, buhar ısıtmalı silindir kurutmanın ise % 75 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Sprey yöntemi ile kurutmada ise AFM1 kaybının % 86 olduğunu vurgulamışlardır.

4.2.4. Depolamanın süttozlarının AFM1 içeriklerine etkisine ilişkin sonuçlar

Çizelge 4.8'de farklı iki düzeyde (1,5 µg/L ve 3.5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen süttozlarının toplam M₁ içeriklerinde 3 ve 6 aylık depolama periyodu sonrasında elde edilen değerler verilmiştir.

Çizelge 4.8. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı yağsız sütlerden üretilen süttozlarının 3 ve 6 aylık depolama sonrası belirlenen toplam M₁ içerikleri

Örnek *	1. Deneme				2. Deneme			
	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg)	Toplam AFM1 (µg)**	%***	Örnek Miktarı	AFM1 (µg/kg)	Toplam AFM1 (µg)**	%***
ST15	470 g	10,070 ± 0,025	4,733 ^a	100	395 g	10,368 ± 0,058	4,095 ^a	100
ST15-D3	470 g	9,906 ± 0,029	4,656 ^a	98,37	395 g	10,240 ± 0,026	4,045 ^a	98,78
ST15-D6	470 g	9,510 ± 0,021	4,470 ^a	94,44	395 g	9,871 ± 0,044	3,899 ^a	95,21
ST35	475 g	24,900 ± 0,050	11,828 ^b	100	415 g	26,985 ± 0,078	11,198 ^b	100
ST35-D3	475 g	24,840 ± 0,093	11,799 ^b	99,75	415 g	26,257 ± 0,036	10,896 ^b	97,30
ST35-D6	475 g	24,078 ± 0,048	11,437 ^b	96,69	415 g	25,817 ± 0,063	10,714 ^b	95,68

* Bkz. Simgeler Dizini

** Farklı üst simgeyle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur (p<0,01).

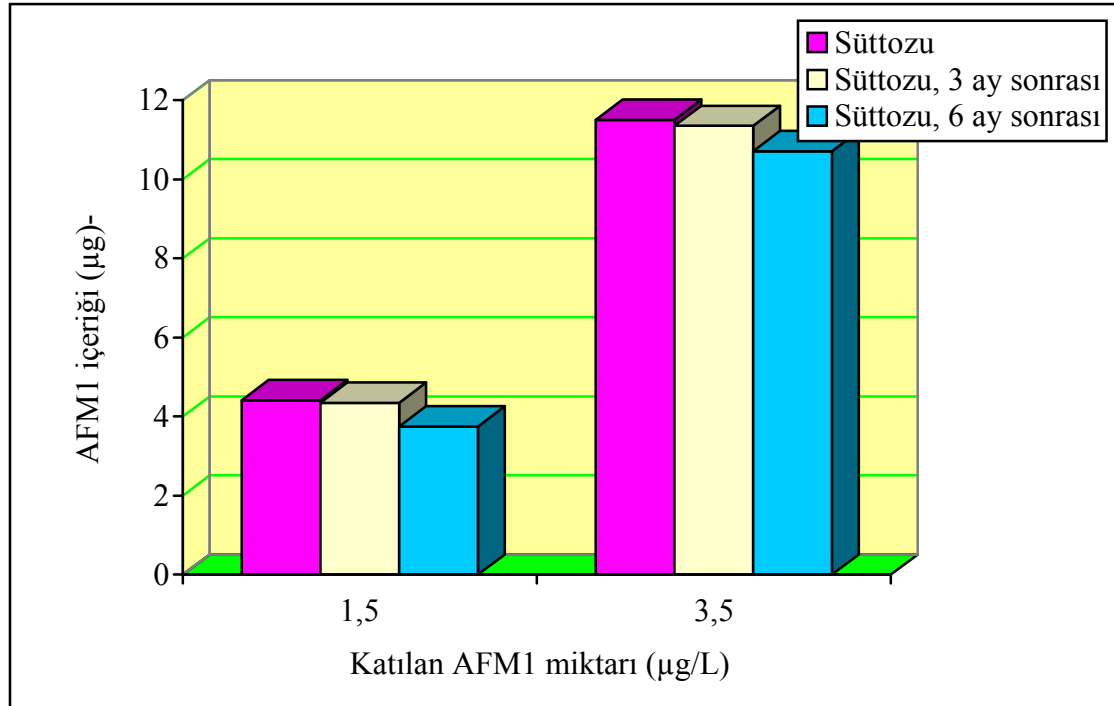
*** Başlangıçta AFM1 içeriği "100" kabul edildiğinde elde edilen değerler

İki farklı düzeyde AFM1 katkılı süttozlarının M_1 içeriklerinde başlangıca göre 3 ve 6 aylık depolama sonrasında düşüş olduğu Çizelge 4.8 ile Şekil 4.4'den izlenebilmektedir. 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM1 katkılı süttozu örneklerinin (ST15) toplam M_1 içerikleri 1. ve 2. denemede sırasıyla 4,733 μg ve 4,095 μg olarak tespit edilmiş, 3 aylık depolama sonrasında anılan değerler 4,656 μg ve 4,045 μg 'a, 6 ay depolama sonrasında ise 4,470 μg ve 3,899 μg 'a düşmüştür. 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM1 katkılı süttozu örneklerinin (ST15) toplam M_1 içerikleri "100" kabul edildiğinde, 3 aylık depolama sonrasında anılan değerlerin 1. ve 2. denemede sırasıyla "98,37" ve "98,78"e 6 aylık depolama sonrasında ise sırasıyla "94,44" ve "95,21"e düştüğü tespit edilmiştir. Bu 3 aylık depolama sonrasında ortalama % 1,43'lük, 6 aylık depolama sonrasında ise ortalama % 5,18'lik bir kayıp anlamına gelmektedir. Gerçekleştirilen istatistiksel analizler neticesinde hem 3 aylık, hem de 6 aylık depolama periyodunda süttozlarının M_1 içeriklerinde görülen azalışın istatistiksel bakımdan $p>0,01$ ve $p>0,05$ düzeyinde önemsiz olduğu bulunmuştur.

Benzer bir irdeleme 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM1 katkılı süttozları için yapılacak olursa; Çizelge 4.8'den de izlenebileceği gibi 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM1 katkılı süttozu örneklerinin (ST35) toplam M_1 içerikleri 1. ve 2. denemede sırasıyla 11,828 μg ve 11,198 μg bulunmuşken 3 aylık depolama sonrasında süttozlarının toplam M_1 içerikleri 1. ve 2. denemede sırasıyla 11,799 μg 'a ve 10,896 μg 'a, 6 ay depolama sonrasında ise 11,437 μg ve 10,714 μg 'a düşmüştür. 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM1 katkılı süttozu örneklerinin (ST35) toplam M_1 içerikleri "100" kabul edildiğinde, 3 aylık depolama sonrasında anılan değerlerin 1. ve 2. denemede sırasıyla "99,75" ve "97,30" a, 6 aylık depolama sonrasında ise sırasıyla "96,69" ve "95,68"e düştüğü görülmüştür. Bu azalış Şekil 4.4'den de izlenebilmektedir. 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM1 katkılı süttozlarının depolanması ile M_1 içeriklerinde görülen kayıpları % olarak ifade etmek gerekirse; 3 aylık depolama sonrasında ortalama % 1,48'lik, 6 aylık depolama sonrasında ise ortalama % 3,82'lik bir kayıp olduğu görülmektedir. Gerçekleştirilen istatistiksel analizler neticesinde hem 3 aylık hem de 6 aylık depolama sonrasında süttozlarının M_1 içeriklerinde görülen değişim istatistiksel bakımdan $p>0,01$ ve $p>0,05$ düzeyinde önemsiz çıkmıştır.

Depolama sırasında sütte AFM1 içeriklerinde görülen azalış, kazein misellerinde meydana gelen değişimlere bağlı olarak kazeine hidrofobik bağlarla bağlı bulunan M₁'in ekstraksiyonunun engellenmesinden kaynaklanıyor olabilir. Çünkü süt sisteminde yer alan hidrojen bağları ile hidrofobik bağlar depolama sırasında artabilmektedir (Dzurec ve Robert 1985).

Depolamanın sütlerin AFM1 içeriğini ne yönde etkilediğini belirlemek üzere gerçekleştirdikleri çalışmalarında Choudhary vd (1998), 120 saat depolamanın % 45,87, 168 saat depolamanın ise % 48,38 oranında M₁ kaybına neden olduğunu tespit etmiş ve bu azalışın sebebini de özellikle depolama sırasında düşük sıcaklıklara (< 37 °C) karşı duyarlı olan cryoglobulinlere bağlamışlardır. Araştırmacılar, cryoglobulinlerin depolama sırasında kazein miselleri üzerinde birikerek adeta bir bariyer oluşturduğunu, bundan da kazeine bağlı AFM1'in ekstraksiyonunu güçleştirdiğini ya da engellediğini düşündüklerini bildirmişlerdir.



Şekil 4.4. İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı sütlerden üretilen sütte AFM1 içeriğinin 3 ve 6 aylık depolama sonrası toplam M₁ içeriklerinde görülen değişimler

Doğal ve yapay yolla kontamine edilmiş sütleri dondurarak kurutan Kiermeier ve Mashaley (1977), bizim çalışmamıza benzer şekilde kurutulmuş sütlerin AFM1 içeriklerinde 15 günlük depolama süresince % 12'ye varan kayıpların olduğunu bildirmişlerdir. Blanco vd. (1993) de depolama sırasında kazeinin çözünebilirliğinde meydana gelen değişimlerin, M₁ ekstraksiyonunu engelleyebileceğini bildirmişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Süttozu üretiminde kullanılan hammadde sütlerin AFM1 içerikleri ortalama 0,020 µg/L düzeyinde tespit edilmiş, seperasyon işlemi ile kremanın ayrılmasından sonra M₁ içeriğinde istatistiksel bakımdan p>0,01 ve p>0,05 düzeyinde önemsiz kabul edilen % 5'lik bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu durum yarı-polar özelliğe sahip AFM1'in yağsız fazda baskın olması ile açıklanmıştır.

İki farklı düzeyde (1,5 ve 3,5 µg/L) AFM1 katkılı sütlerden üretilen koyulaştırılmış sütlerin M₁ içeriklerinde 2,4 ve 3 katlık, süttozlarının M₁ içeriklerinde ise sırasıyla 7,5 ve 8,9 katlık bir artış olduğu belirlenmiştir. AFM1 katkılı sütlerden üretilen koyulaştırılmış süt ve süttozlarının M₁ içeriklerinde görülen bu artışlar konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşen nispi değişimdir. Nitekim, 1,5 µg/L AFM1 katkılı deneme örneklerinin toplam kurumadde ve M₁ içerikleri arasında $r = 0,996$ 'lık; 3,5 µg/L AFM1 katkılı olanlarının ise $r = 0,998$ 'lik pozitif bir korelasyonun bulunduğu tespit edilmiştir. AFM1 içeriklerinde, ürünlerdeki konsantrasyon artışı ya da diğer bir ifadeyle hacim azalışına bağlı olarak ortaya çıkan değişimler, proses aşamalarının AFM1'e etkisini yansıtmamaktadır. Bu nedenle örneklerin M₁ içeriklerindeki değişimleri ortaya koymak için örnek miktarlarına göre belirlenen toplam AFM1 miktarlarından yararlanılmıştır.

Çizelge 5.1'de 1,5 µg/L ve 3,5 µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin pastörizasyonu, koyulaştırılması, kurutulması ve elde edilen süttozlarının 3 ve 6 ay süresince depolanmasıyla toplam M₁ içeriklerinde gözlenen ortalama kayıplar verilmiştir. Ayrıca kayıpların daha net izlenebilmesi amacıyla Çizelge 5.1'deki verilerden yararlanılarak oluşturulmuş grafik Şekil 5.1'de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. 1,5 ve 3,5µg/L AFM1 katkılı yağsız sütlerin pastörizasyonu, koyulaştırılması, kurutulması ve depolanmasıyla M₁ içeriklerinde gözlenen ortalama kayıplar.

	1,5 µg/L AFM1 katkılı		3,5 µg/L AFM1 katkılı	
	Toplam AFM1 içeriği* (Ortalama)	% Değişim (%)	Toplam AFM1 içeriği* (Ortalama)	% Değişim (%)
Yağsız süt	100	-	100	-
Pastörize süt	84,07	(-) 15,93	88,29	(-) 11,71
Koyulaştırılmış süt	59,88	(-) 40,12	65,45	(-) 34,55
Süttozu	32,43	(-) 67,57	41,31	(-) 58,69
Süttozu 3 ay depolama sonrası	31,97	(-) 68,03	40,72	(-) 59,28
Süttozu 6 ay depolama sonrası	30,75	(-) 69,26	39,75	(-) 60,26

*Başlangıçtaki toplam AFM1 içeriği 100 kabul edildiğinde elde edilen değerler

Çizelgeden de izlenebileceği gibi 1,5 µg/L AFM1 katkılı hammadde yağsız sütün toplam AFM1 içeriği “100” kabul edildiğinde ondan üretilen pastörize süt, koyulaştırılmış süt ve süttozlarının M₁ içerikleri sırasıyla ortalama “84,07”, “59,88” ve “32,43” olarak bulunmuştur. Bu da 1,5 µg/L AFM1 katkılı sütler için pastörizasyonun % 15,93, koyulaştırmanın % 40,12 ve sprey kurutmanın % 67,57 düzeyinde M₁ kaybına neden olduğu anlamına gelmektedir (Çizelge 5.1 ve Şekil 5.1). Gözlenen kayıplar istatistiksel bakımdan p<0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır.

Benzer şekilde, 3,5 µg/kg AFM1 katkılı hammadde yağsız sütün toplam AFM1 içeriği “100” kabul edildiğinde ondan üretilen pastörize süt, koyulaştırılmış süt ve süttozlarının ortalama M₁ içerikleri sırasıyla “88,29”, “65,45” ve “41,31” düzeyinde gözlenmiştir. Bu ise, 3,5 µg/L AFM1 katkılı sütler için pastörizasyonun %11,71, koyulaştırmanın % 34,55 ve sprey kurutmanın % 58,69’luk bir M₁ kaybına neden olduğu anlamını taşımaktadır (Çizelge 5.1 ve Şekil 5.1). Bu kayıpların istatistiksel bakımdan p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

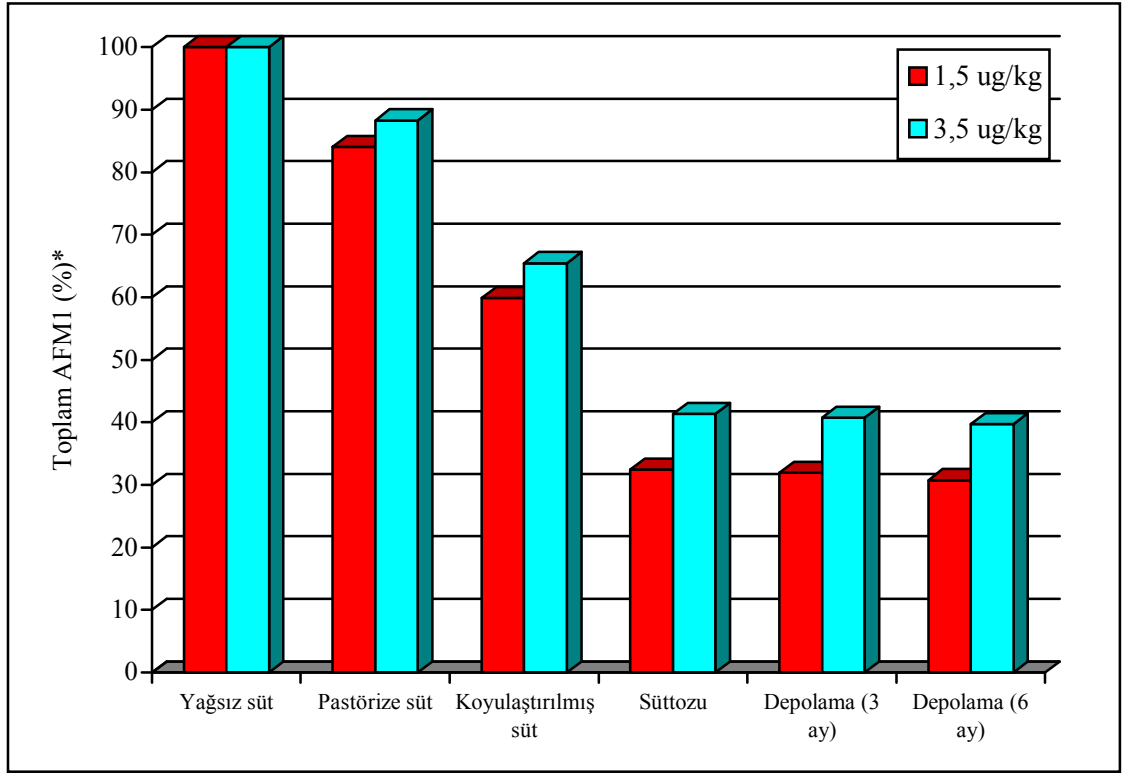
Toplam kayıplar incelendiğinde de 1.5 µg/L AFM1 katkılı sütlerden üretilen ürünlerde görülen M₁ kayıplarının 3,5 µg/L AFM1 katkılı sütlerden üretilen ürünlerde gözlenen

kayıplara göre daha fazla olduğu görülmüştür. Başka bir ifadeyle, proses aşamalarının (pastörizasyon, koyulaştırma, kurutma ve depolama) AFM₁ içeriğini azaltıcı yöndeki etkisi 1,5 µg/L AFM₁ katkılı örneklerde daha fazla olmuştur. Gerçekleştirilen istatistiksel analizler neticesinde ise iki düzey (1,5 ve 3,5 µg/L) arasında görülen farklılıkların önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0,01$ ve $p>0,05$).

Çizelge 5.1'in yeniden inlenmesiyle de görüleceği gibi 1.5 µg/kg AFM₁ katkılı süttozlarının M₁ içeriklerinde 3 aylık depolama sonrasında yaklaşık % 68,03'lük, 6 aylık depolama sonrasında ise % 69,26'lık bir kayıp olduğu belirlenmiş, 3 ve 6 aylık depolama sonrasında gözlenen kayıpların istatistiksel bakımdan $p>0,01$ ve $p>0,05$ düzeyinde önemsiz olduğu bulunmuştur. (Çizelge 5.1 ve Şekil 5.1).

Benzer şekilde 3.5 µg/kg AFM₁ katkılı süttozlarının M₁ içeriklerinde ise 3 aylık depolama sonrasında ortalama % 40,72'lik, 6 aylık depolama sonrasında ise ortalama % 39,75'lik bir kayıp olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.1 ve Şekil 5.1). İstatistiksel bakımdan irdelendiğinde 3 ve 6 aylık depolama sonrasında gözlenen kayıpların $p>0,01$ ve $p>0,05$ düzeyinde önemsiz olduğu saptanmıştır.

Özetle, toksijenik ve kanserojenik etkileri bilinen AFM₁ süte bulaşması durumunda o sütten üretilen süt ürünlerine de değişen oranlarda geçmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada yapay yolla AFM₁ ile kontamine olmuş sütlerden koyulaştırılmış süt ve sprey yöntemiyle yağsız süttozları üretilmiştir. Üretimde, ülkemizde yaygın olarak kullanılan proses parametrelerinden yararlanılmıştır. Sonuçta pastörizasyon, koyulaştırma, sprey kurutma ve depolamanın sütün AFM₁ içeriğini azaltıcı yönde etki ettiği saptanmıştır. Anılan proses aşamalarında uygulanan ısı işlemlere bağlı olarak AFM₁ içeriklerinde görülen azalışlara ısı işlemin yanı sıra kazein ve serum proteinleri arasında meydana gelen interaksiyonların kazeine bağlı AFM₁'in ekstraksiyonunu belirli ölçüde güçleştirmesinin de etkili olabileceği düşünülmektedir.



* Yağsız sütlerin toplam AFM1 içeriği "100" kabul edildiğinde elde edilen değerler

Şekil 5.1. 1,5 ve 3,5 µg/L AFM1 katkıyla yağsız sütlerin pastörizasyonu, koyulaştırılması, kurutulması ve depolanmasıyla M₁ içeriklerinde gözlenen değişimler.

5.1. Öneriler

- **Temel bulaşma kaynakları önlenmelidir:** Sütün ürünlere işlenmesi sırasında uygulanan proses aşamaları AFM1 içeriğinde belirli oranda azalışlara sebep olsa da M₁'in tamamen inaktivasyonu söz konusu değildir. Riski ortadan kaldırmanın tek yolu temel bulaşma kaynaklarının önlenmesidir.
- **Üreticiler ve tüketiciler bilinçlendirilmelidir:** Bulaşma kaynaklarının önlenmesi ancak aflatoksin B₁ içeriği kontrol altına alınmış yemlerin üretimi ve süt hayvanlarının bu yemlerle beslenmesi ile mümkündür. Bu nedenle özellikle kış aylarında yemlerin depolama şartlarına daha fazla önem verilmeli, düşük sıcaklık ve düşük nem ortamında muhafazaları sağlanmalı, yem üreticileri bu konuda bilinçlendirilmelidir. Ülkemizde üreticiler kadar tüketiciler de ne yazıkki bu konuda yeterli bilgiye sahip değildir. Örneğin, kendiliğinden küflenmiş peynirler halen toplumun büyük bir kesimi tarafından

tüketilmektedir. Oysaki bu çok yanlış ve riskli bir davranıştır. Peynirler üzerinde gelişen küflerin, Aspergillus türü, AFM1 üretim yeteneğine sahip küfler olmadığına hiç bir garantisi yoktur.

- ***Yemler ile süt ve süt ürünlerinin Aflatoksin içerikleri kontrol edilmelidir:*** Yemlerin aflatoksin içerikleri rutin analizlerle belirlenmelidir. Bu belki de aflatoksin içeriği kontrol altına alınmış yem üretiminin ilk adımı olacaktır. Bu son öneri süt ve ürünleri için de geçerlidir. Süt ve ürünlerinin AFM1 içerikleri de sürekli rutin analizler ile izlenmeli ve kamuoyu bu yönde bilgilendirilmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Anonymous. 1961. Determination of the dry matter content of evaporated and of sweetened condensed milk. International dairy Federation (IDF). Int. IDF Standard 15, p. 2, Brussels.
- Anonymous. 1964. Determination of the water content of dried milk. International dairy Federation (IDF)., Int. IDF Standard 26, p. 2, Brussels.
- Anonymous. 1971. Standards for grades of dry milks including methods of analysis. American Dry Milk Institute (ADMI). 53pp, Chicago, Illinois.
- Anonymous 1974. Süt tozu standardı. Türk Standardları Enstitüsü (TSE). TS 1329., 1-9. Ankara.
- Anonymous 1978. Analytical methods for dry milk products. Niro Atomizer Dairy Research Group (NADRG), fourth edition, A/S Niro Atomizer, p.109, Copenhagen.
- Anonymous 1981. Çiğ süt standardı. Türk Standardları Enstitüsü (TSE). TS 1018., 1-11. Ankara.
- Anonymous 1990. Koyulaştırılmış süt standardı. Türk Standardları Enstitüsü (TSE). TS 7790., 1-8. Ankara.
- Anonymous 1993. Milk. Determination of nitrogen content. International dairy Federation (IDF)., Int. IDF Standard 20B, p. 2, Brussels.
- Anonymous 1998a. International Standard (ISO) 14501: 1998(E). Milk and milk powder: Determination of aflatoxin M₁ content – clean up by immunoaffinity chromatography and determination by high performance liquid chromatography.

- Anonymous 1998b. Afla M₁ Instruction manual. Vicam sci. Tech. Vicam, 14pp., L.P. 313 Pleasant street Watertown, MA 02172, U.S.A.
- Allcroft, R. and Carnaghan, R.B.A. 1963. Examination for toxin in human food products from animals and toxic groundnut meal. *Vet. Rec.* 75;259-263.
- Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.V. and Marth, E.H. 1982. Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products – a review. *J. Food Protect.*, 45(8); 752-777.
- Ayçiçek, H., Yarsan, E., Sarımehtetoğlu, B. and Çakmak, O. 2002. Aflatoxin M₁ in white cheese and butter consumed in İstanbul, Turkey. *Vet. Human Toxicol.* 44(5); 295-296.
- Bakırcı, İ. 2001. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van Province of Turkey. *Food Control* 12: 47-51.
- Blanco, J.L., Dominguez, L., Gomez-Lucia, E., Garayzabal, J.F.F., Goyache, J. and Suarez, G. 1988. Behaviour of aflatoxin during the manufacture, ripening and storage of Manchego-type cheese. *J. Food Sci.*, 53;1373-1376.
- Blanco, J.L., Carrion, B.A., Liria, N., Diaz, S., Garcia, M.E., Dominguez, L. and Suarez, G. 1993. Behaviour of aflatoxins during manufacture and storage of yoghurt. *Milchwissenschaft* 48(7); 385-387.
- Bostan K., Çetin, Ö., Büyükuşal, S.K. ve Ergün, Ö. 2003. İstanbul'da satışa sunulan içme sütü örneklerinde aflatoxin M₁ düzeyleri üzerine bir araştırma. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu. 22-23 Mayıs 2003, İzmir. Bidiri no: p50; 425-428. İzmir.
- Brackett, R.E. and Marth, E.H. 1982. Fate of aflatoxin M₁ in cheddar cheese and in process chese spread. *J. Food Protection*, 45(6); 549-552.

- Caric, M. 1994. Concentrated and dried dairy products. VCH Publishers, Inc., 249p., NewYork.
- Choudhary, P.L., Sharma, R.S. and Borkartria, V.N. 1998. Effect of chilling and heating on aflatoxin M₁ content of contaminated Indian cow's milk. Egyptian J. Dairy Sci., 26;223-229.
- Ciapara, I.H., Esqueda, M.V. and Nieblas, J. 1995. Reduction of aflatoxin M₁ from artificially contaminated milk using ultrafiltration and diafiltration. J. Food Sci. Vol. 60, No. 3; 645-647.
- Çetin, T., Deveci, O. ve Sezgin, E. 2003. Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M₁. Gıda Teknolojisi. Yıl. 7, Sayı. 4; 42-48.
- Çoksöyler, N. ve Köşker, Ö. 1980. Süt ve Yemde aflatoksin oluşumu üzerine araştırmalar. A.Ü.Z.F. Diploma sonrası Y.O. İhtisas Tez Özetleri Vol.1 s:436-456.
- Dağoğlu, G., Keleş, O. ve Yıldırım, M. 1995. Peynirlerde aflatoksin düzeylerinin ELISA testi ile araştırılması. İ.Ü. Vet. Fak. Derg., 21(2), 313-317
- Demirer, M.A. 1973. Süt ve mamüllerinde AFLM₁ ve B₁ aranması üzerinde araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Derg. XX: (2-3) 421-443.
- Demirer, M.A. 1974. Bazı peynirlerimizden izole ettiğimiz küfler ve bunların aflatoksin yeteneklerinin araştırılması. A.Ü. Vet. Fak. Derg. XXI: (1-2) 180-189.
- Demirer, M.A., Dinçer, B., Kaymaz, Ş., Alperden, İ., Yalçın, S. ve Özer, E. 1989. Bazı gıda maddelerinde mycoflora ve mycotoxin araştırmaları. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 36 (1) ;85-107.

- Dragacci, S. and Fremy, J.M. 1996. Application of immunoaffinity column cleanup to aflatoxin M₁ determination and survey in cheese. *J. Food Protection*, vol.59, no.9, 1011-1013.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. 1987. Araştırma ve deneme metotları (İstatistik metotları II). A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları:2021, s:381, Ankara.
- Dzurec, D.J. and Robert R.Z. 1985. Effect of heating, cooling and storing milk on casein and whey proteins. *J. Dairy Sci.* 68(2); 274-280.
- Early, R. 1994. Milk powders. In: *The Technology of Dairy Products*. Ed. R Early. VCH Publishers, Inc., p.167-196. NewYork.
- Egmond-Van, H.P., Paulsch., W.E., Veringa, H.A. and Schuller, P.L. 1977. The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. *Extrait des Archives de l'institut Pasteur de Tunis*. 3-4, 381-390.
- Egmond-Van, H.P. and Paulsch., W.E. 1986. Mycotoxins in milk and milk products. *Neth. Milk Dairy J.* 40; 175-188.
- El-Deep, S.A., Zaki, N., Shoukry, Y.M.R. and Kheadr, E.E. 1992. Effect of some technological processes on stability and distribution of aflatoxin M₁ in milk. *Dairy Science Abstract*. 1993. Vol.55, No.6.
- Galvano, F., Galofaro, V. and Galvano, G. 1996. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: A worldwide review. *J. Food Protect.* Vol: 59, No: 10, 1079-1090.
- Galvano, F., Galofaro, V., Galofaro, G., Angelis, A.D., Galvano, M., Bognanano, M. and Galvano, G. 1998. Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products Marketed in Italy. *J. Food Protect.* Vol.61, 738-741.

- Govaris, A., Roussi, V., Koudis, P.A. and Botsoglou, N.A. 2001. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing, ripening and storage of teleme cheese. *Food Additives and Contaminants*, 18(5); 437-443.
- Günsen, U. and Büyükyörük, İ. 2002. Aflatoxins in retail food products in Bursa, Turkey. *Vet. Human Toxicol* 44 (5); 289-290.
- Hassanin, N.I. 1994. Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of yogurt, yoghurt-cheese and acidified milk. *J. Sci. Food Agric.*, 65; 31-34.
- Kaya, S. 1982. Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 29 (3-4); 443-457.
- Kendirci, P. ve Altuğ, T. 2003. Kefir ve kefir tanesinde aflatoksin M₁ tayin yönteminin geliştirilmesi ve kontamine sütlerden kefire ve kefir tanelerine aflatoksin M₁ geçişinin araştırılması. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, İzmir. Bildiri no: S26; 157-162.
- Kiermeier, F. and Meshaley, R. 1977. Einfluss der molkereitech-nishen behandlung der rohmilch auf des aflatoxin M₁ Gehalt derdaraus hergestellten produkte. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 164; 183-187.
- Kim, E.K., Shon, D.H., Ryu, D., Park, J.W., Hwang, H.J. and Kim, Y.B. 2000. Occurence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit. and Contam.*, vol.17, no.1, 59-64.
- Lopez, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L. and Perez, J. 2001. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. J. Food Microbiology*, 64;211-215.

- Mayes, L. and MacDonald, S. 1995. Aflatoxin M₁ in retail milk and milk products. CSL Food Sci. Lab. Norwich Research Park, Colney Norwich NR4 7 UQ.
- Moss, M.O. 1998. Recent studies of mycotoxins. J. Applied Microbiology Symposium Supplement. Vol:84(27), Supplement; 62-76.
- Neuman-Kleinpaul, A. and Terplan, G. 1972. Occurrence of aflatoxin M₁ in dried milk products Dairy Sci. Abstr. 35:83, 1973).
- Nikov, P.S., Bukharbaeva, A.S., Baimbetova, A.M. and Amireeva, N.T. 1991. Contamination with aflatoxins of milk and milk products in the South-East of Kazakhstan. Dairy Science Abstract. 1991. Vol.53, No.8.
- Oruç, H.H. and Sonal, S. 2001. Determination of aflatoxin M₁ levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey. Vet. Human Toxicol. 43 (5); 292-293.
- Özkaya, Ş., Başaran, A., Kaymak, T., Dikmen, O., Kocabey, M., Demirkazık, G., Altındiş, N. ve Ramis, R. 2002. Türkiye’de üretilmekte olan süt ve peynirlerde Aflatoksin M₁ aranması. (yayınlanmamış). Gıdalarda katkı kalıntı ve bulaşanların izlenmesi projesi alt projesi.
- Paul, R., Kalra, M.S. and Singh, A. 1976. Incidence of aflatoxins in milk and milk products. Dairy Science Abstract. 1977. Vol.39, No.10.
- Purchase, I.F.H., Steyn, M., Rinsma, R. and Tustin, R.C. 1972. Reduction of the aflatoxin M content of milk processing. Dairy Science Abstract. 1972. Vol.35, No.2.
- Rustom, I.Y.S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food chem., Vol.59, No.1, 57-67.

- Saitanu, K. 1997. Incidence of aflatoxin M₁ in Thai milk products. J. Food Prot., vol.60, no.8, 1010-1012.
- Sarimehmetoğlu, B., Kuplulu, Ö. and Çelik, T.H. 2003. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. Food Control. In press.
- Sherbon, W.J. 1988. Physical properties of milk. In: Fundamentals of dairy chemistry. 3th. Edition. Ed. N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, E.H. Morth. P.409-460. NewYork.
- Tumermann, L. and Webb, B.H. 1965. Coagulation of milk and protein denaturation. In: Fundamentals of Dairy Chemistry. Ed. B.H. Webb, A.H. Johnson. The AVI Publishing Company, Inc. P. 506-589. Westport, Connecticut.
- Weiss, G., Miller, M. and Behringer, G. 1978. Vorkommen und gehalt an aflatoxin M₁ in molkereiprodukten. Dairy Science Abstract. 1978. Vol.40, No.12.
- Wiseman, D.W. and Marth, E.H. 1983a. Behaviour of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of Queso Blanco and Bakers cheese. J. Food Prot., 46;910-913.
- Wiseman, D.W. and Marth, E.H. 1983b. Heat and acid stability of aflatoxin M₁ in naturally and artificially contaminated milk. Milchwissenschaft 38;464-466.
- Wiseman, D.W. and Marth, E.H. 1983c. Behaviour of aflatoxin M₁ in yoghurt, buttermilk and kefir. J. Food Prot. 46;115-118.
- Yetişmeyen, A., Deveci, O. 2000. Some quality characteristics of spray dried skim milk powders. Milchwissenschaft (Milk Science International), Volume 55 (4) p: 210 – 212, München, Germany.

7. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bu proje için BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü) tarafından 13.000.000.000 TL'si destek sağlanmıştır. Araştırma Projesi Öneri Formunda öngörüldüğü gibi anılan bütçenin tümü sarf malzemesi alımında kullanılmıştır. Proje döneminde beklenenden çok farklı bir nakit akışı gerçekleşmemiştir. İhtiyaç nedeniyle 12.11.2003 tarihinde 1.200.000.000 TL'si ek ödenek sağlanmıştır.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil)

BAP destekli bu proje kapsamında herhangi bir makine teçhizat alımı gerçekleştirilmemiş, sadece sarf malzemesi alınmıştır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

Uygulanan analizler ile ilgili tüm detay bilgiler, "Materyal ve Yöntem" bölümünde sunulmuştur.

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)

Bu proje ile ilgili olarak 24-28 Mayıs 2004 Tarihleri arasında Ispartada gerçekleştirilen uluslararası sempozyumda (Recent Developments In Dairy Science and Technology. International Dairy Synposium. Proceedings) "Variations of Aflatoxin M1 In Skim Milk Powder During Processes" isimli bir bildiri hazırlanmış ve sunulmuştur. Sempozyum programı ekte verilmiştir.

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler

Bu proje ile ilgili olarak Science Citation Index'çe taranan bir periyodikte yayınlanmak üzere bir yayın hazırlanmış ancak henüz basılmamıştır.