

45378.

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

SÜTLERDE AFLATOKSİN M₁ OLUŞUMU VE ÜRÜNLERE
GEÇİŞİ ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

Hazırlayan
İhsan BAKIRCI

DOKTORA TEZİ

JÜRİ ÜYELERİ

Başkan
Prof. Dr. Nurhan AKYÜZ
Üye
Doç. Dr. Salih ÖZDEMİR
Üye
Y. Doç. Dr. Yakup Can SANCAK

TEZ KABUL TARİHİ

14/8/1995

ÖZ

Bu çalışmada, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Fabrikası'na gelen çiğ süt örneklerinde aflatoksin M₁ (AFM₁) düzeylerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır. Ayrıca, bu sütlerden üretilen çeşitli ürünlerdeki AFM₁ düzeyleri ile geçiş oranları incelenmiştir. Analiz edilen 90 adet çiğ süt örneğinden 79'unda (% 87.77) AFM₁ oluştuğu tespit edilmiştir. AFM₁ bakımından pozitif çıkan örneklerin tamamı ülkemizde kabul edilen maksimum tolerans limiti olan 0.5 ppb düzeyinin altında kalmıştır. Pozitif örneklerde saptanan AFM₁ konsantrasyonları 0.0125 - 0.1236 ppb arasında değişirken, genel ortalama 0.0468 ppb değerini almıştır. Elde edilen sonuçlara göre; Mart - Nisan, Mart - Mayıs, Mart - Haziran (1995) aylarına ait ortalama AFM₁ miktarları arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde, Nisan - Haziran, Mayıs - Haziran ayları arasındaki fark ise $p < 0.01$ düzeyinde önemli çıkmıştır.

AFM₁ 'in ürünlere geçişini belirlemek amacıyla 93 adet süt ve süt ürününden oluşan örnekler üzerinde yapılan analizler sonucunda; kazan sütlerinin AFM₁ içeriği ile, pastörize süt, yağsız süt, yoğurt, yayık altı ve peynir altı suyunun AFM₁ içerikleri arasındaki fark önemsiz çıkmıştır. Buna karşılık, beyaz peynir ve kaşar peynirinde saptanan AFM₁ miktarları kazan sütlerindekiyle göre önemli ölçüde ($p < 0.01$) yüksek, krema ve tereyağında saptanan AFM₁ miktarları ise önemli ölçüde ($p < 0.01$) düşük çıkmıştır.

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the level of aflatoxin M₁ (AFM₁) in the raw milk samples obtained from the dairy plant of Agricultural Faculty of Yüzüncü Yıl University. In addition, the fate and carry-over of AFM₁ were searched in milk products manufactured by the same dairy plant. AFM₁ occurrence was found from 79 (87.77 %) of 90 of the examined milk samples. Levels of AFM₁ of positive milk samples were lower than 0.5 ppb level accepted by Turkish regulations as maximum tolerance limit. Concentrations of AFM₁ obtained from positive milk samples changed between 0.0125 - 0.1236 ppb, and the average was 0.0468 ppb. According to the results, differences were statistically significant in mean concentrations of AFM₁ obtained from milk samples of March - April, March - May, and March - June in the year of 1995 ($p < 0.05$). Also, the differences were found statistically significant between the samples of April - June and May - June ($p < 0.01$).

To determine the fate and carry-over of AFM₁ in milk products, 93 products were investigated. The results showed that there was no statistically differences between AFM₁ contents of bulk milk and pasteurized milk, skim milk, yogurt, buttermilk, and whey. However, while AFM₁ contents of White-pickled cheese and Kashar cheese samples were higher than those of bulk milk, the contents of cream and butter samples were lower than those of bulk milk samples ($p < 0.01$).

ÖNSÖZ

Süt veren hayvanların sütlerinde aflatoksin M₁ oluşumu önemli bir halk sağlığı problemidir. Çünkü, süt ve süt ürünleri bütün dünyada yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Toksikolojik çalışmalar, süt ve ürünlerinde oluşan Aflatoksin M₁'in yemlerde bulunan aflatoksin B₁ gibi kanserojenik etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu sebepten dolayı, bütün dünyada adı geçen toksinin süt ve ürünlerindeki konsantrasyonunun en düşük düzeylere indirilmesine çalışmaktadır. Günümüzde bir çok ileri batı ülkesi bunu başarmış gözükmektedir. Ancak problemin tamamen çözülmüş olduğunu da söylemek mümkün değildir. Çünkü aflatoksin oluşumu, tamamen çevre şartlarına bağlı bir olaydır. Bunun için sürekli denetim ve kontrollerin yapılması gerekmektedir. Örneğin, bazı Batı Avrupa ülkeleri yaklaşık 10 yıllık bir peryotta, çok geniş kapsamlı ve en yeni teknolojik imkanları kullanarak yaptıkları araştırmalar neticesinde önceden kabul ettikleri maksimum tolerans değerlerini daha aşağı düzeylere düşürmüşlerdir.

Konu, ülkemiz açısından da büyük önem taşımaktadır. Çünkü bu konudaki bilimsel araştırma sayısı yeterli düzeyde olmadığı gibi, konuyla ilgili mevcut mevzuat da aflatoksinlerin kontrol ve denetimi yönünden ihtiyaca cevap verebilecek düzeyde değildir. Ayrıca, hem üreticiler ve hem de tüketiciler, aflatoksinlerin oluşumu ve sağlık üzerindeki olumsuz etkileri konusunda yeterli bilgiye sahip değildirler.

Süt ve mamülleri üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, Aflatoksin M₁ 'in oluşumu ve ürünlerdeki durumu ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada, bulunduğumuz yörede, tüketime sunulan süt ve ürünlerimizin aflatoksin M₁ gibi sağlığa zararlı kontaminant içeriklerinin saptanması, böylece mevcut durumun ve buna bağlı olarak ortaya çıkan sorunların ve bunlara ait çözüm önerilerinin tespit edilmesi, sonuçta bilime katkıları yanında, kaliteli süt ve ürünlerinin imaline ve halk sağlığının korunmasına yardımcı olmak gibi önemli hedeflere varılması amaçlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Araştırma süresince değerli öneri ve her türlü yardımlarını esirgemeyen Y. Y. Ü. Ziraat Fakültesi Dekanı ve Gıda Mühendisliği bölüm başkanı Sayın Hocam **Prof. Dr. Nurhan AKYÜZ'e**, örneklerin analizleri sırasında ve tezin yazımında her türlü yardım ve katkılarını esirgemeyen değerli mesai arkadaşım Arş.Gör. Hayri COŞKUN' a, yardımlarını gördüğüm diğer mesai arkadaşlarıma ve bölümümüz Süt Fabrikası elemanlarına teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, çalışmaya gerekli maddi desteği sağlayan Y. Y. Ü. Araştırma Fonu Başkanlığı'na ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Van, 1995

İhsan BAKIRCI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
ÖNSÖZ.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	6
2.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M1 Oluşumu ve Kontaminasyon.....	6
2.2. Çeşitli Teknolojik İşlemlerin Aflatoksin M1 Üzerindeki Etkileri.....	12
2.2.1. Isıl İşlemlerin Etkisi.....	12
2.2.2. Sütün Diğer Ürünlere İşlenmesinin Etkisi.....	13
2.3. Bazı Fiziksel ve Kimyasal İşlemlerin AFM1 Üzerindeki Etkileri.....	18
2.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunmasına İzin Verilen Maksimum AFM1 Düzeyleri.....	18
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1 Materyal.....	20
3.1.1. Süt ve süt ürünleri örnekleri.....	20
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	22
3.1.3. Çözeltiler.....	22
3.1.4. Aflatoksin M1 Çözeltileri.....	23
3.1.4.1. Primer AFM1 Standart Çözeltisi.....	23
3.1.4.2. AFM1 Standardı (Çalışma Çözeltisi).....	23

3.1.5. Silica gel.....	24
3.1.6. İnce Tabaka Plakası	24
3.1.7.Ultraviolet Aparatı	24
3.2. METOD.....	24
3.2.1. Aflatoksin M1 Analizi	25
3.2.1.1. Süt ve Süt Ürünlerinin Ekstraksiyonu.....	25
3.2.1.2. Kolon Kromatografisi	26
3.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	27
3.2.1.4. Plakanın Geliştirilme İşlemi	28
3.2.1.5. Plakanın Değerlendirilmesi.....	28
3.2.1.6.Hesaplama	
3.2.1.7. Aflatoksin M1'in Varlığının Doğrulanması (Confirmation)	30
3.2.1.8.Kromatogramın Değerlendirilmesi.....	31
3.2.2. İstatistiksel Analizler.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Çiğ Sütlerde Aflatoksin M1 Oluşumu.....	33
4.1.1. Analiz Peryotları ve Üreticilere Göre AFM1 Miktarları ve Değişimi	33
4.1.2. İncelenen Çiğ Süt Örneklerinin Farklı Düzey ve Analiz Peryotlarına Göre Dağılımı.....	39
4.2. Aflatoksin M1' in Süt Ürünlerindeki Miktarları ve Geçiş Oranları	41
4.2.1. Birinci Grup Kazan Sütlerinden Yapılan Ürünler.....	41
4.2.2. İkinci Grup Kazan Sütlerinden Yapılan Ürünler.....	46
4.2.3. Üçüncü Grup Kazan Sütlerinden Yapılan Ürünler	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
6. ÖZET	60
7. SUMMARY	63

VII

KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1. Analiz edilen ürünlerin işlendiği kazan sütlerine göre tasnifi	21
Şekil 3.2. İki boyutlu ince tabaka kromatografisi için plakanın kullanım diyagramı	27
Şekil 3.3. Geliştirmeden sonra standartların ve örnek ekstraktının plaka üzerinde sürüklendiği yerler (R_f değerleri)	29
Şekil 3.4. AFM ₁ 'in TFA ile reaksiyonu sonucu meydana gelen reaksiyon ürünlerinin plaka üzerindeki yerleşimi	31
Şekil 4.1. Ortalama AFM ₁ konsantrasyonlarının analiz peryotlarına göre değişimi.....	35
Şekil 4.2. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunda saptanan AFM ₁ konsantrasyonlarındaki değişim	43
Şekil 4.3. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunda saptanan AFM ₁ konsantrasyonlarındaki değişim	49
Şekil 4.4. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM ₁ konsantrasyonlarındaki değişim	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Çeşitli tülkelerde süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen maksimum AFM ₁ düzeyleri (Van Figmond 1989, Anon 1990).	19
Çizelge 4.1. İncelenen çiğ süt örneklerine ait AFM ₁ miktarları (ppb)	33
Çizelge 4.2. Analiz periyotlarına göre ortalama AFM ₁ konsantrasyonlarının varyans analiz sonuçları	36
Çizelge 4.3. Analiz periyotlarına göre ortalama AFM ₁ konsantrasyonları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları	36
Çizelge 4.4. Üreticilere göre ortalama AFM ₁ konsantrasyonlarının varyans analiz sonuçları	37
Çizelge 4.5. Köylere ait en düşük, en yüksek ve ortalama AFM ₁ düzeyleri (ppb)	38
Çizelge 4.6. Analiz edilen süt örneklerinin farklı düzey ve analiz periyotlarına göre dağılımı	39
Çizelge 4.7. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunda saptanan AFM ₁ miktarları ve geçiş oranları	41
Çizelge 4.8. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunun AFM ₁ miktarlarına ait varyans analiz sonuçları	44
Çizelge 4.9. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunda tespit edilen ortalama AFM ₁ miktarları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları	45
Çizelge 4.10. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunda saptanan AFM ₁ miktarları ve geçiş oranları ..	46

Çizelge 4.11. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunda saptanan AFM ₁ miktarlarına ait varyans analiz sonuçları	49
Çizelge 4.12. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri, peyniraltı suyunda saptanan AFM ₁ miktarları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları	50
Çizelge 4.13. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM ₁ konsantrasyonları ve geçiş oranları ...	51
Çizelge 4.14. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM ₁ miktarlarıyla ait varyans analiz sonuçları	54
Çizelge 4.15. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM ₁ miktarları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

- ng : Nano gram (10^{-9} g)
nm : Nano metre (10^{-9} m)
ppb : Milyarda kısım
ppm : Milyonda kısım
R_f : Alıkonma faktörü
μg : Mikro gram

Kısaltmalar

- AFB₁ : Aflatoksin B₁
AFM₁ : Aflatoksin M₁
GO : Geçiş Oranı
HPLC : Yüksek Performans Likit Kromatografisi
IARC : Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
TFA : Trifloro Asetik Asit
TLC : İnce tabaka kromatografisi
UV : Ultra viole
WHO : Dünya Sağlık Teşkilatı
ZF : Zenginleştirme Faktörü

1. GİRİŞ

Gıdaların büyük bir çoğunluğu çeşitli şekillerde bulaşmalara maruz kalmakta ve kısa sürede tad, koku ve görünüş gibi kalite niteliklerini kaybetmektedirler. Bozulmalarda rol oynayan önemli etkenlerden biri hiç kuşkusuz mikroorganizmalardır. Bunlar arasında küflerin etkisi ise önemli yer tutmaktadır.

Küflerden bazıları özellikle sıcaklık ve rutubetin uygun olduğu durumlarda, tarım ürünleri veya bunların hammaddeleri ile, bunlardan hazırlanan gıda ve yemlerde gelişip çoğalmakta ve bir takım toksik metabolizma ürünleri meydana getirmektedirler. İnsan sağlığı için zararlı olan bu bileşiklere genel bir ifade olarak "mikotoksin" denilmektedir (Yaygın ve Demiryol 1980, Van Egmond 1989). Küf mantarları tarafından meydana getirilen mikotoksinler, sekonder metabolitler olup bu bileşikler; akut toksik, kanserojenik, mutajenik, teratojenik ve östrojenik etkilere sahip bileşiklerdir (Van Egmond and Poulsch 1986, Van Egmond 1991, Özdemir ve Sert 1994).

"Mycotoxin" terimi yunanca MYKHΣ (fungus) ve TOEIKON (ok zehiri) kelimelerinden elde edilmiştir. Bu bileşiklerin neden olduğu hastalıklara ise "mikotoksikozis" denilmektedir. Bilinen ilk mikotoksikozis organlarda çeşitli nekrozlara ve gangren'e sebep olan "ergotizm" dir. Bu hastalık *Claviceps purpurea* ile kontamine olmuş tahıl tanelerinin tüketilmesi ile ortaya çıkmış ve Orta Çağ Avrupasında "Kutsal Ateş" olarak tanınmıştır (Duru ve Özgüneş 1984). Öte yandan, İkinci Dünya Savaşı yıllarında küflü tahıl ürünlerinin tüketilmesi sonucu Rusyanın bazı bölgelerinde nüfusun yaklaşık % 10' undan fazlası bu tip mikotoksikozislerden etkilenmiş ve bir çok ölümler meydana gelmiştir. Ayrıca İkinci Dünya Savaşından sonra bir çok ülke tarafından Japonya'dan ithal edilen pirinçlerin tüketilmesiyle benzer problemlerin ortaya çıktığı

görülmüştür. Fakat bütün bunlar o yıllarda "önemsiz hastalıklar" olarak değerlendirilmiştir(Van Egmond 1989). Nihayet 1960' lı yıllarda İngiltere'de, "Hindi X Hastalığı" nın ortaya çıkmasıyla, bu konudaki kanaatler değişmiştir. Ortaya çıkan bu hastalıktan binlerce hindi palazı ölmüş ve yapılan araştırmalarda hastalığın etkeninin hindilere verilen yemlerde protein kaynağı olarak kullanılan ve Brezilya' dan ithal edilen yer fıstığı küspesindeki toksik bir faktörün olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraları bu konuda yapılan çalışmalar bu bileşiğin *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından meydana getirilen bir metabolit olduğu tespit edilmiş ve bundan sonra, toksine kendisini oluşturan fungusun adından dolayı "Aflatoksin" adı verilmiştir (Stoloff 1980, Applebaum et al 1982).

İlk yıllarda kağıt kromatografisi ile yapılan çalışmalarda, bu toksik materyal tek bir komponent gibi algılanmış; daha sonra İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile yapılan araştırmalarda adı geçen toksinin 4 farklı bileşikten meydana geldiği ortaya çıkmıştır. Ultra viyole (UV) ışığı altında mavi renkli floresans veren iki bileşen aflatoksin B₁ (AFB₁) ve aflatoksin B₂ olarak; sarı-yeşil renkte floresans veren diğer iki bileşen ise G₁ ve G₂ olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, aflatoksin ihtiva eden yemleri tüketen süt veren hayvanların sütlerinde bu toksinin bir türevinin salgılandığı ortaya çıkmış ve sütte bulunmasından dolayı da buna, "süt toksini" (milk toxin) "anlamında aflatoksin M" adı verilmiştir (Wood 1991, Van Egmond 1994). Aflatoksin M' in saptanmasının ardından yapılan çalışmalar bu metabolitin aflatoksin B₁ ve B₂' nin 4-hidroksi türevleri olduğunu ortaya koymuş ve böylece aflatoksin M₁ (AFM₁) ve M₂ diye iki ayrı bileşik izole edilmiştir (Van Egmond 1994).

Aflatoksin B₁' in bir metaboliti olan AFM₁' in oluşumu, karaciğerde gerçekleşmekte ve süt veren memelilerin sütleri ile idrarda salgılanmaktadır. Toksikolojik çalışmalar sonucunda AFM₁'in toksite

bakımından AFB₁' e çok yakın olduğu, her iki bileşiğin de özellikle karaciğerde önemli tahribatlar meydana getirdiği ortaya çıkmıştır (Cathey et al 1994).

Aflatoksinlerin halk sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin ortaya çıkması sonucunda, bu konuyla ilgili çeşitli uluslararası kuruluşlar harekete geçmiş ve 19 Haziran 1993 tarihinde Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ' na bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC) tarafından AFB₁ 'in birinci dereceden, AFM₁' in ise ikinci dereceden (Class 2B) kanserojen maddeler grubuna alınmıştır (Anon 1992, Anon 1993, Cathey et al 1994, Dragacci et al 1995). Ayrıca, halkın sağlığını yakından ilgilendiren bu konu üzerinde bir çok ülkede uzun yılları kapsayan çeşitli kontrol ve izleme programları yürütülmekte ve elde edilen sonuçlara göre, ülke şartları da dikkate alınarak çeşitli gıda ve hayvan yemlerinde bulunmasına izin verilen aflatoksinler için maksimum tolerans limitleri belirlenmiş ve buna göre mevzuat hazırlanmıştır (Stahr et al 1990, Stoloff 1991, Chen and Gao 1993, Tabata et al 1993). Ülkemizde ise bu konu ile ilgili hükümler 2 Mayıs 1990 tarih ve 20506 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan tebliğden ibarettir. Ayrıca, IARC tarafından yayınlanan başka bir raporda, tükettikleri gıdalarda aflatoksin kontaminasyonunun yaygın olduğu Çin ve Filipinler gibi toplumlarda, karaciğer kanseri vak'alarına daha sık rastlandığı bildirilmektedir (Anon 1993, Okumura et al 1993).

Bütün bu bulgular göstermektedir ki gıda ve yemlerin aflatoksinlerle kontamine olması potansiyel bir halk sağlığı problemidir. Ayrıca, bebek ve çocukların yetişkinlere göre daha fazla süt tüketmek zorunda oldukları ve bünyelerinin de yetişkinlere göre daha duyarlı olduğu dikkate alınacak olursa, süt ve süt ürünlerinde oluşabilen aflatoksin M₁' in sağlık açısından ne derece önemli bir endişe kaynağı olduğu ortadadır. Buna ilaveten, ülke ekonomilerinde her yıl ciddi kayıplar da ortaya çıkmaktadır. Örneğin başlıca

tahıl üretim bölgelerinden biri olan kuzey Karolina' da 1980 yılında, aflatoksin kontaminasyonundan dolayı meydana gelen zararın 200 milyon dolar civarında olduğu bildirilmektedir (Hagler et al 1983).

Yapılan araştırmalara göre, sütte oluşan AFM₁' in mevsimsel bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun sebebi, süt veren hayvanların rasyonlarında kesif yemlerin yaz aylarında daha düşük düzeylerde olması veya hiç bulunmamasıdır (Wood 1991). Kontamine olmuş sütler, çeşitli ürünlere işlendiğinde, AFM₁' in değişik oranlarda üretilen ürünlere geçtiği bilinmektedir. Çiğ sütte stabil bir halde bulunan AFM₁; pastörize süt, peynir, yoğurt, krema ve tereyağı gibi ürünlere de, değişik oranlarda olmak kaydıyla kararlılığını sürdürmektedir. Hatta peynirlerde, kazeine olan ilgisinden dolayı, sütteline göre 3 - 4 kat daha yükselmektedir (Yaygın ve Demiryol 1980).

Toksinle kontamine olmuş sütlerin işlenmeleri esnasında ısıl işlem, fermentasyon ve kurutma gibi normal muamelelerin toksini destabilize etmediğinin ortaya çıkmasıyla, AFM₁' in süt ve süt ürünlerinden uzaklaştırılması, için özel yöntemler kullanılmaya çalışılmıştır (Yousef and Marth 1989). Bu işlemler, toksinin bazı fiziksel yollarla uzaklaştırılmasını veya birtakım kimyasal yöntemlerle parçalanmasını kapsamaktadır. Ancak, bütün bu çabalar, çalışılan alanda ilk basamağı oluşturduğu için süt ve süt ürünlerinde gerek duyusal açıdan ve gerekse teknolojik nitelikler bakımından ne gibi değişiklikler meydana getirebileceği tam olarak bilinmemekte ve bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Sayılan nedenler dikkate alınarak yapılan bu çalışma, yöremizde üretilip tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin M₁ içeriklerinin ortaya konulması, çeşitli ürünlere işlemenin ve pastörizasyon gibi bazı teknolojik işlemlerin mevcut AFM₁ miktarı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, elde edilen sonuçların ülkemizde yürürlükte bulunan

maksimum tolerans limitleri ile karşılaştırılması ve alınması gereken önlemlerin ortaya konulması; böylece bilimsel değere sahip bulgular elde edilmesi yanında daha sağlıklı üstün kaliteli, her yönüyle güvenilir süt ve mamülleri üretimine katkıda bulunması açısından önem taşımaktadır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M₁ Oluşumu ve Kontaminasyon

Kaynakları

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* ' un bir çok suşu tarafından meydana getirilen toksik ve kanserojenik bileşiklerdir (Applebaum et al 1982, Wood 1989, Wood 1991, Van Egmond 1991, Chourasia and Sinha 1994, Ratt and Shantha 1994). Bu küf mantarları, sıcaklık ve su aktivitesi gibi çevre koşullarının uygun olduğu ortamlarda gelişip çoğalmakta ve aflatoksinleri meydana getirmektedirler. Toksin özelliğine sahip başlıca aflatoksinler (AF) B₁, B₂, G₁, G₂, ve M₁ olarak bilinmektedir. Bunlardan biri veya bir kaç doğal olarak tahıl tanelerinde, yer fıstığında, pamuk tohumunda ve diğer bir kaç gıda ve yemlerde oluşabilmektedir (Applebaum 1982, Wood 1991, Hansen 1993). İlk dört toksin ana bileşikler olarak kabul edilmektedir. Aflatoksin M₁(AFM₁) ise, Aflatoksin B₁ içeren yemlerin veya gıdaların tüketimi sonucu karaciğerde oluşan bir metabolit olup, genellikle idrarda ve süt veren memelilerin sütlerinde bulunmaktadır (Wood 1991).

Yem kontaminantları olarak aflatoksinlerin keşfinden kısa bir süre sonra, Allcroft and Carnaghan (1963), yemlerle birlikte aflatoksin tüketen hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinde, aflatoksin kalıntıları oluşabileceğini rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, daha sonra yaptıkları araştırmalarda, inek sütlerindeki bir faktörün, tıpkı yemlerdeki AFB₁ gibi, ördek palazları üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu ancak R_f değerlerinin AFB₁' e göre daha düşük olduğunu saptamışlardır.

De Iongh et al (1964) ise, bu konuda yaptıkları araştırmalarda, bu toksik faktörün AFB₁ gibi mavi floresans yaydığını, ince tabaka kromatografisi (TLC) yardımıyla silica gel üzerinde tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar, AFB₁, B₂, G₁ ve G₂'den oluşan bir karışımı tek doz halinde

koyunlara uygulamışlar ve yaptıkları analizler sonucunda karaciğer, böbrek ve idrarda adı geçen toksinin bulunduğunu belirlemişlerdir. İzole edilen toksinin orijinini göstermek amacıyla da onu "aflatoksin M" (milk toxin) diye isimlendirmişlerdir.

Holzapfel et al (1966) ise, yaptıkları araştırmada aflatoksin M' in iki farklı bileşikten oluştuğunu, kağıt kromatografisi yöntemiyle tespit etmişler ve bu iki bileşiğin kimyasal yapılarındaki farklılığa göre onları aflatoksin M₁ ve M₂ diye ayırmışlardır.

AFB₁'in kantitatif olarak süte geçişi üzerinde ilk araştırmayı Van der lind et al (1964) gerçekleştirmişlerdir. Bu bilim adamları araştırmalarında, iki adet yüksek verimli (28 lt/gün) süt ineği ile 2 adet düşük verimli (12 lt/gün) süt ineğinden her birine günde 4 mg/kg düzeyinde AFB₁ içeren yer fıstığı rasyonundan 2 kg, 18 gün süre ile yedirmişler ve daha sonra bu hayvanlardan elde edilen sütleri günlük olarak AFM₁ yönünden kimyasal testlere (ince tabaka kromatografisi yöntemiyle) ve biyolojik deneylere (1 günlük ördek palazları) tabi tutmuşlardır. Bu araştırmada, AFB₁'in tüketiminden sonra ilk 12-24 saat içinde sütlerde rahatlıkla "toksin" tayin edilmiş ve sütteki toksin içeriğinin belli bir süre sonra en yüksek değerine ulaştığı ve sütteki AFM₁' in ancak yemlerdeki AFB₁'in % 1' i kadar olduğu, 3 gün sonra ise artık sütteki AFM₁' in tayin edilemez düzeye indiği saptanmıştır.

Rodricks and Stoloff (1977) yaptıkları bir araştırmada, yemlerdeki AFB₁ konsantrasyonun sütteki AFM₁ den 34-1600 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Sieber and Blanc (1978) ise; AFB₁ ile AFM₁ arasındaki oranı, AFB₁'in yüzdesi (%) şeklinde ifade ederek, sütle salgılanan AFM₁ miktarının, yemlerdeki AFB₁'in ancak % 0-4'ü arasında bir değer alabileceğini ve bu değerlerin ortalama olarak ise % 1 civarında olduğunu ileri sürmektedirler.

Sütle birlikte salgılanan AFM₁ ile, yemdeki AFB₁ konsantrasyonları arasındaki ilişkinin süt hayvanına, sağım zamanına ve hatta sağım aralığına göre değiştiği bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir (Kiermeier et al 1975, Mertens 1979, Van Egmond 1989, Wood 1991). Bazı araştırmacılar bu farklılıkta deneysel tekniklerin de etkisinin olduğunu belirtmektedirler (Mertens 1979).

Aflatoksin B₁ ile kontamine olmuş yemlerin kesilmesinden sonra, aflatoksin M₁'in sütle salgılanma süresi ile ilgili olarak, literatürde farklı bildirimler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar (Van der Lind et al 1964, Masri et al 1968, Masri et al 1969), AFB₁'in yemle birlikte kesilmesinden sonra, 3-6 gün arasında AFM₁ salgılandığını ileri sürerken, bazıları (Van Egmond 1989 and Wood 1991), bu sürenin daha kısa olduğunu rapor etmektedirler. Yemle birlikte alınan AFB₁ ile sütte salgılanan AFM₁ arasında yüksek düzeyde pozitif ve doğrusal bir ilişkinin olduğu, bir çok araştırmacı tarafından tesbit edilmiştir (Masri et al 1969, Kiermier 1975, Sieber and Blanc 1978, Van Egmond 1994).

Blanc and Karleskind (1981), Fransa'da 10 aylık bir periyot boyunca farklı bölgelerden aldıkları 1046 süt ve süt ürünleri örnekleri üzerinde yaptıkları araştırmada, örneklerin % 40'ının 0.05 ppb' den daha yüksek AFM₁ içerdiğini, sıvı sütlerdeki AFM₁ konsantrasyonunun Eylül-Nisan ayları arasında bu düzeyin de üzerine çıktığını kanıtlamışlardır.

Aflatoksin M₁ üzerinde yapılan birçok araştırmaya göre sütte bulunan AFM₁ konsantrasyonunun yaz aylarında daha düşük düzeylerde olduğu, bunun sebebinin ise süt hayvanlarının yaz aylarında daha az bulaşık konsantre yem tüketmesinden kaynaklandığı rapor edilmektedir (Applebaum 1982, Van Egmond 1989, Wood 1991).

Heeschen et al (1983_a), Almanya'da yaptıkları bir araştırmada, toplam 418 süt örneğini AFM₁ yönünden analize tabi tutmuşlar ve AFM₁

miktarının 0.0033 - 0.333 ppb arasında değiştiğini, ortalama değerin ise 0.0381 ppb düzeyinde olduğunu bulmuşlardır. Bu araştırmacılar, sütteki AFM₁ konsantrasyonunun 0.05 ppb' nin altına dűřürülebilmesi için yemlerdeki AFB₁'in 2-3 ppm' in altında olması gerektiğini bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir araştırmada ise, analiz edilen sütlerdeki AFM₁ konsantrasyonun 0.003 - 0.300 ppb arasında değiştiği ve kontamine olmuş yemlerin çoğunun ithal yemler olduğu saptanmıştır (Heeschen et al 1983b).

Gilbert et al (1984), İngiltere'de yürüttükleri bir araştırmada, 1981-1983 yılları arasında ayda bir aldıkları 277 süt tozu örneğini ve 409 sıvı süt örneğini AFM₁ yönünden analiz etmişler ve sütteki örneklerinin % 98' inin 0.03 ppb' den, sıvı süt örneklerinin ise % 94' ünün 0.01 ppb' den dűřük AFM₁ içerdiğini ortaya koymuşlardır.

Piva et al (1985), Po ovasındaki çiftliklerden şubat-Nisan 1984 döneminde topladıkları 82 süt örneği ile, 1982-1983 kış döneminde üretilen peynirlerden aldıkları toplam 83 örnek üzerinde yaptıkları araştırmada; süt örneklerinin 48'inin 0.003 ppb' den az, 18'inin 0.003 - 0.01 ppb arasında, 7'sinin 0.01 - 0.05 ppb arasında ve 9 tanesinin 0.05 ppb' den daha yüksek düzeylerde AFM₁ içerdiğini tespit etmişlerdir. Analize tabi tutulan peynir örneklerinin ise, 12'sinin 0.003 ppb' den az, 62'sinin 0.003 - 0.25 ppb arasında ve 9 tanesinin de 0.25 ppb den yüksek düzeylerde AFM₁ içerdiği belirlenmiştir.

Quintavalla and Casolari (1985), İtalya'da yaptıkları bir araştırmada 70 adet süt ve süt ürününden 30'unun 0.18 - 0.75 ppb arasında AFM₁ içerdiğini tespit etmişlerdir.

İtalya'da yapılan başka bir araştırmada ise, 313 ithal süt örneğinde maksimum AFM₁ konsantrasyonunun 0.023 ppb olduğu, 159 peynir

örneğinden sadece iki örneğin 0.250 ppb düzeyini aştığı saptanmıştır (Piva et al 1987).

Bento et al (1989), Lizbon piyasasından topladıkları 143 pastörize süt örneği ile uluslararası orjinli 30 süt tozu örneği üzerinde yaptıkları bir araştırmada, süt tozu örneklerinin hiç birinde AFM₁ tespit edememişlerdir. Buna karşılık pastörize süt örneklerinin % 5'inde 0.10-0.40 ppb düzeyleri arasında AFM₁ saptamışlardır.

Tutelyan et al' ın (1989), Rusya'da iki yıl boyunca yürüttükleri bir araştırmada, çeşitli yiyecek ve içeceklerin yanısıra 250 adet süt ve süt ürünlerini AFM₁ yönünden analiz etmişlerdir. Analiz edilen süt örneklerinden hiç birinin, süt ve süt ürünleri için öngörülen maksimum tolerans limitini (0.5 ppb) aşmadığı gözlenmiştir. İncelenen 115 süt örneğinden 8' inde (% 6.9) 0.05 ppb' nin altında, 149 peynir örneğinden ise sadece 15 ' inde (% 10.1) AFM₁ bulunmuştur.

Wood (1989), Amerika Birleşik Devletleri'nin Güney Eyaletlerinde yaptığı bir araştırmada, diğer gıdalarla birlikte toplam 182 adet süt ve süt ürününü AFM₁ yönünden analiz etmiş ve hiç bir örnekte kalıntıya rastlanmadığını rapor etmiştir.

Heeschen et al' ın (1990) Almanya'da 1988-1989 yıllarında yaklaşık 2 yıl süre ile yürüttükleri bir araştırmada, Almanya piyasasında satışı sunulan pastörize sütlerden üç aylık bir peryoda yaklaşık 60 örnek düşecek şekilde aldıkları toplam 473 örnek üzerinde, AFM₁ aramışlardır. Araştırmada, 1988 yılında analiz edilen örneklerin % 70-90'ının 0.01 ppb limitinin altında bir değere sahip olurken, 1989 yılında analiz edilen örneklerin ancak % 50-60'ı bu değer altında çıkmıştır. İki yıl içinde toplam 473 örnekten sadece 19'unun 0.050 ppb limitini aştığı gözlenmiştir.

Stahr et al (1990), Iowa State Üniversitesi pilot tesislerinden ve bu yöredeki diğer süt üreticilerinden temin ettikleri sütler üzerinde yaptıkları

araştırmalarda, analiz edilen örneklerin % 30'unun 20 ppb düzeyinin üzerinde AFM₁ içerdığını ortaya koymuşlardır.

Haydar et al'in (1990) Suriye piyasasında satışa sunulan 19 farklı gıda grubu üzerinde yaptıkları araştırmada, çeşitli süt ürünleri AFM₁ yönünden analize tabi tutulmuş ve sadece mahalli bir süt ürünü olan Kojik (yoğurt ve yarı kaynatılmış buğdaydan yapılan bir ürün)'in AFM₁ içeriğinin 0.19 ppb düzeyinin üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Macho et al (1992), İspanya'nın Basque bölgesinde yaptıkları bir araştırmada, 61 adet çiğ süt örneği ile 33 adet UHT-sterilize süt örneğini analiz etmişler ve AFM₁ oluşumunun Ekim ve Nisan aylarında en yüksek düzeye ulaştığını (0.013 ve 0.030 ppb), diğer aylarda ise, 0.01 ppb düzeyinin altında kaldığını saptamışlardır.

Fransa'da 1976 yılında oluşturulan bir "İzleme Programı" çerçevesinde süt ve süt ürünleri AFM₁ yönünden sürekli kontrole tabi tutulmuş ve daha sonra 1978 yılında 6246 süt örneği analiz edilerek AFM₁ içeriklerine göre 3 sınıfa bölünmüştür. Bu araştırmada, 0.05 ppb'den az AFM₁ içerenler birinci sınıf, 0.05-0.5 ppb arasında olanlar ikinci sınıf ve 0.5 ppb'den fazla olanlar ise üçüncü sınıfa dahil edilmişlerdir. Bu sınıflandırma esas alınarak, daha sonraki yıllarda, bu konuda bir çok araştırma yapılmıştır (Dragacci and Fremy 1993).

Ülkemizde; 1973, 1974 ve 1977 yıllarında yapılan üç ayrı araştırmada 251 süt örneği, 50 beyaz peynir, 26 tulum peyniri, 12 kaşar peyniri, 14 eritme peyniri, 4 adet küflü tulum peyniri, 9 adet çökelek ve 24 adet süt tozundan oluşan 390 örnek analiz edilmiş ve hiçbirinde tayin edilebilir düzeyde AFM₁ bulunamamıştır (Yaygın ve Demiryol 1980).

Dağoğlu vd (1995) tarafından yapılan bir araştırmada, 50 tanesi Van bölgesinden, 25 tanesi de İstanbul marketlerinden olmak üzere toplam 75 adet peynir örneği, analize tabi tutulmuş ve örneklerden % 42.2'sinin

ortalama olarak 0.200 ppb düzeyinde AFM₁ içerdiği en yüksek değerin ise sadece bir örnekte 0.510 ppb düzeyinde olduğu ifade edilmiştir.

2.2. Çeşitli Teknolojik İşlemlerin Aflatoksin M₁ Üzerindeki Etkileri

2.2.1. Isıl İşlemlerin Etkisi

Sıcaklığın ve kurutmanın AFM₁ 'in stabilitesi üzerinde etkilerini belirlemek amacıyla yapılan ilk çalışmada, Allcroft and Carnaghan (1963) AFM₁ ile kontamine olmuş sütleri iki gruba ayırarak pastörize süte ve süt tozuna işlemişlerdir. Daha sonra bu ürünlerden ağız yoluyla ördek palazlarına vermişlerdir. Elde edilen bulgulara göre, ne pastörizasyon işleminin ve ne de süttozuna işleminin mevcut toksini azaltmada herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Ancak bu konu üzerinde daha sonra yapılan araştırmalar, bu bulguların güvenilirliği üzerindeki kuşkuları artırmıştır (Van Egmond 1989).

Purchase et al (1972), AFM₁ üzerinde ısıl işlemin ve kurutmanın etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada, AFB₁ ile kontamine olmuş yemleri tüketen ineklerden elde edilen sütleri, pastörizasyona, sterilizasyona ve evaporasyona tabi tutmuşlardır. Yapılan analizler sonucunda, sütlerdeki AFM₁ konsantrasyonu % 32-86 arasında azaldığı ve daha yüksek sıcaklıkların ise, AFM₁ miktarı üzerinde pek fazla etkili olmadığı belirlenmiştir .

Stoloff et al'ın (1975) yaptıkları bir araştırmada ise, AFM₁ içeren sütlerin 63°C'de 30 dakika süreyle pastörize edilmesinin AFM₁ miktarında herhangi bir düşüşe neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu konuda yapılan başka bir araştırmada ise, AFM₁ içeren sütler 64°C'de 30 dakika süreyle pastörize edilmiş ve ısıl işlemin AFM₁ üzerindeki etkisinin farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Bazı örneklerde AFM₁ içeriğinde önemli bir azalma

görülürken bazılarındaki azalma minimum düzeylerde kalmıştır (Wiseman et al 1983).

Kiermeier and Mashaley (1977), doğal ve suni olarak kontamine olmuş sütlerde pastörizasyon işleminin AFM₁ ' in stabilitesi üzerindeki etkisini belirlemek için yaptıkları bir araştırmada AFM₁ içeriğindeki kaybın % 12 - 40 arasında değiştiğini saptamışlardır. Süt örnekleri 71 derecede 40 saniye tutulmuş ve suni örneklerdeki kaybın % 17.9 - 39.9 arasında değiştiği, buna karşılık doğal olarak kontamine olan sütlerdeki kaybın ise % 6 - 13 arasında gerçekleştiği belirlenmiştir.

2.2.2. Sütün Diğer Ürünlere İşlenmesinin Etkisi

Bir çok ülkede, ticari süt ve süt ürünlerinde AFM₁ bulunduğu saptanmıştır. Yapılan araştırmalarda sütlerdeki AFM₁ miktarının mevsimsel bir varyasyon gösterdiği gibi, işlendiği ürünlerdeki miktarı da farklılık arz etmektedir (Wood 1991).

Süt ürünlerindeki AFM₁' in durumu üzerinde ilk araştırma yine, Allcroft and Carnaghan (1963) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar AFM₁ içeren sütlerden imal edilen peynirlerde ve yan ürün olan peynir altı suyundaki AFM₁ 'in durumunu incelemek amacıyla yürüttükleri araştırmada, sadece rennet ile pıhtılaşan kazeinin tıpkı sütteki gibi, ördek palazları üzerinde toksik etkide bulunduğunu, buna karşılık serum proteinlerden oluşan peynir altı suyunun herhangi bir etkide bulunmadığını, dolayısıyla AFM₁ 'in sadece pıhtıda kaldığını ve peyniraltı suyuna geçmediğini rapor etmişlerdir. Ancak bu araştırma bulgularının aksine, Purchase et al (1972), doğal olarak kontamine olmuş sütlerden imal ettikleri Cottage peynirinde, AFM₁ 'in tamamen peynir altı suyuna geçtiğini ve peynirde bulunmadığını ileri sürmüşlerdir.

İlk yıllarda yapılan, bu iki araştırmaya ait sonuçlar ekstrem değerler olarak kabul edilmiş ve daha sonra bu konuda yapılan diğer araştırmaların sonuçlarıyla bağdaştırılamamıştır. Çünkü sonraki çalışmalar göstermiştir ki, AFM₁ ile kontamine olmuş sütler peynire işlenince, toksin hem peyniraltı suyuna ve hem de pıhtıya geçmektedir (Stoloff 1975 , Van Egmond et al 1977, Van Egmond and Paulsch 1986, Yousef and Marth 1989, Wood 1991, Van Egmond 1994, Dracacci et al 1995).

Stubblefield and Shannon (1974) tarafından yapılan bir araştırmada sütteki AFM₁ 'in % 88-111 arasında değişen oranlarda peyniraltı suyu ve pıhtıya geçtiği saptanmıştır. Stoloff et al 'in (1975) bu konudaki araştırmalarında ise, sütteki AFM₁ 'in peyniraltı suyu ve pıhtıya eşit oranda geçtiği belirlenmiştir.

Peynir üretimi esnasında AFM₁ 'in parçalanmadan, yaklaşık orjinal sütteki kadar peyniraltı suyu ve pıhtıya geçtiği bilinmektedir. Ancak, AFM₁ 'in suda erimesine rağmen, kazeine olan ilgisinin daha baskın çıkması sebebiyle pıhtıdaki konsantrasyonu peyniraltı suyundan daha yüksek olmaktadır. Bu durum aynı zamanda, peynirdeki miktarın süttekinden daha fazla olmasına yol açmaktadır. Bu artış, "Zenginleştirme Faktörü" (Enrichment Factor-EF) olarak ifade edilmektedir (Yousef and Marth 1989, Egmond 1994). Bu konuda yapılan bir çok araştırmaya göre, EF değerinin yumuşak peynirlerde 2.5-3.3 arasında, sert peynirlerde ise 3.9-5.8 arasında olduğu tespit edilmiştir (Yousef and Marth 1989).

Polzhofer (1977) tarafından çeşitli peynirler üzerinde yapılan bir araştırmada; taze peynirlerde en düşük 0.10 ppb, en yüksek 0.51 ppb ve ortalama olarak 0.23 ppb düzeyinde, Camembert peynirinde en düşük 0.10 ppb, en yüksek 0.73 ppb ve ortalama olarak 0.31 ppb düzeyinde AFM₁ bulunmuştur.

Kieremeier and Buchner (1977), AFM₁ 'in peyniraltı suyu ve pıhtıya geçişini belirlemek amacıyla yaptıkları bir araştırmada, peyniraltı suyunda saptanan AFM₁ 'in, süttekinin taze peynirde % 38.5, Camembert peynirinde % 41.7' si ve Tilsit peynirinde % 50.7' si kadar olduğu, pıhtıdaki AFM₁ artışlarının (ZF değeri) ise, sırasıyla 3.2, 3.3 ve 3.7 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Van Egmond et al (1977), Gouda peyniri üzerinde yaptıkları araştırmada ise, sütteki AFM₁ 'in % 59'unun peynir altı suyuna geçtiğini ve peynir pıhtısındaki AFM₁ konsantrasyonunun, süttekenden yaklaşık 3.9 kat daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır.

Brackett and Marth (1982a), Parmesan ve Mozzarella peynirleri üzerinde yaptıkları bir araştırmada, Parmesan peynirine işlenen sütlerde 9.9 ppb, bu sütlerden imal ettikleri Parmesan peynirindeki AFM₁ konsantrasyonunun ortalama olarak 54.9 ppb, peyniraltı suyundakinin ise 3.8 ppb düzeyinde olduğu saptanmıştır. AFM₁ artışının süte göre 5.8 kat, Mozzarella peynirinde de 8.1 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Mozzarella peynirine işlenen sütlerde saptanan ortalama AFM₁ konsantrasyonu ise 1.4 ppb düzeyindedir. Bu sütlerden imal edilen peynirlerdeki AFM₁ miktarı ortalama olarak 9.96 ppb, peyniraltı suyunda ise 0.3 ppb düzeyindedir. Mozzarella peyniraltı suyuna geçen AFM₁ miktarının % 20, Parmesan peyniraltı suyunda ise % 38 olduğu bulunmuştur.

Brackett and Marth' ın (1982b), Cheddar peyniri üzerinde yaptıkları araştırmada kazan sütlerinde saptanan ortalama AFM₁ miktarı 1.76 ppb düzeyindedir. Bu sütlerden yapılan peynirlerde 7.68 ppb, peyniraltı suyunda 0.64 ppb düzeyinde AFM₁ tespit edilmiştir. Peynirdeki AFM₁ artışının 4.3 kat, peyniraltı suyuna geçen AFM₁ oranının da süttekinin % 36' sı kadar olduğu belirlenmiştir.

Brackett et al'in (1982) Brick ve Limburger peynirleri üzerinde yaptıkları araştırmada, kazan sütlerinde 4.23 ppb düzeyinde AFM₁ bulmuşlardır. Peynir pıhtısında 7.36 ppb, peynir örneklerinde 10.23 ppb ve peyniraltı suyunda ise 4.20 ppb düzeyinde AFM₁ saptamışlardır. AFM₁ miktarındaki artış 1.7 kat daha fazla, peyniraltı suyundaki AFM₁ miktarı ise süttekiye oldukça yakın olduğu bulunmuştur.

Van Egmond and Paulsch (1986), gerçekleştirdikleri bir araştırmada, pastörize süt, sterilize süt, yoğurt ve Gouda peynirine işlenen kazan sütlerinde 1.57 ppb düzeyinde AFM₁ bulmuşlardır. Bu sütlerden imal edilen peynir örneklerinde ortalama olarak 6.54 ppb (artış katsayısı 4.16), peyniraltı suyunda 0.93 ppb (kazan sütlerinin % 59' u kadar), pastörize sütte 1.58 ppb ve sterilize sütte 1.50 ppb düzeyinde AFM₁ saptamışlardır. Aynı araştırmada; krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltına işlenen kazan sütlerinde tespit edilen ortalama AFM₁ miktarı 0.73 ppb düzeyindedir. Bu sütlerden imal edilen % 20 yağlı kremada 0.49 ppb (kazan sütlerinin % 67' si kadarı), % 40 yağlı kremada 0.44 ppb (kazan sütlerindeki % 60' ı kadarı), yağsız sütte 0.76 ppb (kazan sütlerindeki % 4 fazla), tereyağında 0.17 ppb (kazan sütlerindeki % 23' ü kadarı) ve yayıkaltında 0.66 ppb (kazan sütlerindeki % 90' ı kadarı) düzeyinde AFM₁ tespit edilmiştir.

Blanco et al (1988), Manchgo peynirlerinde planlayıp sonuçlandırdıkları bir çalışmada, peynire işlenen sütlerde ortalama olarak 0.80 ppb düzeyinde AFM₁ saptamışlardır. Bu sütlerden imal ettikleri peynir pıhtısında 1.71 ppb, peyniraltı suyunda ise 0.66 ppb düzeyinde toksin belirlemişlerdir. AFM₁ 'in peynir pıhtısındaki artış miktarı yaklaşık 2.14 kat, peyniraltı suyundaki kayıp ise % 12.3 şeklinde bulunmuştur.

Dragacci et al (1995), 0.26 ppb düzeyinde AFM₁ içerdii tespit edilen sütlerden Camembert peyniri yapmışlar ve daha sonra peynir örneklerini AFM₁ yönünden analize tabi tutmuşlardır. Yapılan analizler sonucunda;

peyniraltı suyunda 0.12 ppb (süttekinin yaklaşık % 46'sı kadar), pıhtıda 1.12 ppb (süttekenden 4.3 kat daha fazla), taze peynirde 0.95 ppb (süttekenden 3.65 kat daha fazla) ve 15 gün süreyle olgunlaşmaya bırakılmış peynirde 0.68 ppb (2.6 kat daha fazla yüksek) düzeylerinde AFM₁ tespit edilmiştir.

Stubblefield and Shannon (1974), belli oranlarda AFM₁ ilave ettikleri kremadan tereyağı yapmışlar ve AFM₁ 'in ancak % 16'sının tereyağına geçtiğini, geri kalan kısmın ise yayık altında kaldığını saptamışlardır. Van Egmond et al (1977) tarafından yapılan diğer bir araştırmada ise, AFM₁ içerdiği tespit edilen sütler, krema ve tereyağına işlenmiş, daha sonra bu ürünler AFM₁ yönünden analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kremadaki AFM₁ konsantrasyonunun süttekine göre % 33-40 arasında, tereyağındaki AFM₁ 'in miktarının ise kremaya göre % 56-61 arasında daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Wiseman et al (1983) tarafından yapılan bir araştırmada, AFM₁ ile doğal olarak kontamine olmuş sütler, krema ve yağsız süte işlenmiş daha sonra bu ürünler 64 derecede 30 dakika pastörize edilmiştir. Çiğ sütlerde ortalama olarak 1.75 ppb, kremada 1.70 ppb ve yağsız sütte ise 2.66 ppb düzeyinde AFM₁ bulunmuştur. Kremada tespit edilen AFM₁ miktarı çiğ sütlerdekinin % 97' si kadar, yağsız sütlerde bulunan değer ise çiğ sütlerdekinden % 52 kadar daha yüksek çıkmıştır.

Wiseman and Marth (1983_a), AFM₁ ile kontamine olmuş sütlerden yoğurt ve kefir yapmışlar ve daha sonra bunları AFM₁ yönünden analiz etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, sütte bulunan AFM₁ miktarı ile, yoğurt ve kefirde saptanan AFM₁ miktarının hemen hemen eşit olduğu gözlenmiştir.

Wiseman and Marth'ın (1983_b), doğal yolla kontamine olmuş sütlerden yoğurt, kefir ve ayran imal etmişler ve daha sonra bu ürünleri AFM₁ yönünden analize tabi tutmuşlardır. Elde edilen sonuçlara göre;

yoğurttaki AFM₁ oranında herhangi bir değişme olmadığı belirlenirken, kefirdeki AFM₁ oranında bir miktar düşme, ayıranda ise yükselme olduğu saptanmıştır.

2.3. Bazı Fiziksel ve Kimyasal İşlemlerin AFM₁ Üzerindeki Etkileri

Bu konuda yapılan bir çok araştırmada, sütteki AFM₁ 'in parçalanması veya inaktif hale getirilmesi hususunda çeşitli yöntemler denenmiştir. Genel olarak bu işlemler; sülfite ve/veya bisülfitlerle kimyasal muamele (Doyle and Marth 1978a, Doyle and Marth 1978b, Hagler et al 1982, Hagler et al 1983), hidrojen peroksit ile inaktif hale getirme (Applebaum and Marth 1982) ve ultraviyole ile ışınlanmak suretiyle parçalama (Yousef and Marth 1985, Yousef and Marth 1986) gibi işlemlerden oluşmaktadır. Bu işlemler sonucu AFM₁ miktarında % 3.6-100 arasında bir azalma olduğu, ancak uygulanan metodların süt endüstrisinde kullanılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunduğu bildirilmektedir (Yousef and Marth 1989, Van Egmond 1994).

2.4. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunmasına İzin Verilen Maksimum AFM₁

Düzeyleri

Birçok ülkede; yemlerde, süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen maksimum AFM₁ tolerans değerleri ve bunlarla ilgili yasal hükümler bulunmaktadır (Çizelge 2.1.).

Bu tolerans değerleri belirlenirken aflatoksinlerin çeşitli özellikleri ve ülke koşulları dikkate alınmış ve bu konuda bir çok araştırma yapılmıştır (Stoloff et al 1991, Hansen 1993, Van Egmond 1994, Dracacci et al 1995).

Çizelge 2.1. Çeşitli ülkelerde süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen maksimum AFM₁ düzeyleri (Van Egmond 1989, Anon 1990).

Ülkeler	Ürün	Maksimum Limit (µg/kg-L)
Belçika	Süt, Süt tozu, Kondanse süt	0.1
Romanya	Süt ve Mamülleri	0
Avusturya	Çocuk ve bebekler için pastörize sütler	0.01
	Diğer sütler ve süt ürünleri	0.05
	Tereyağı	0.02
	Peynir	0.25
Çekoslovakya	Süt	0.05
ABD	Süt ve Ürünleri	0.5
Brezilya	Süt ve ürünler	0.5
İsviçre	Süt, süt tozu, kondanse süt	0.05
	Bebeklere ait sütler	0.01
İsveç	Sıvı süt ürünleri	0.05
Hollanda	Süt ve diğer sıvı süt ür.	0.05
	Peynir	0.2
	Tereyağı	0.02
Almanya	Süt	0.05
	Bebek sütleri	0.01
Rusya	Süt ve süt ürünleri	0.05
	Çocuk gıdaları	0
Türkiye	Süt ve süt ürünleri	0.5

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1. Süt ve süt ürünleri örnekleri

Araştırmanın amaçlarından biri, süt fabrikasına gelen sütlerde oluşan AFM₁ ' in aylara göre durumunu saptamaktır. Bu nedenle; küf mantarlarının gelişip çoğalması için sıcaklık ve rutubetin en uygun olduğu ilkbahar mevsiminde Mart ayından itibaren 2.5-3 aylık devrede Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Fabrikası'na devamlı süt veren üreticilerden, şansa bağlı olarak 4 farklı yerleşim biriminden (köyden) seçilen 15 üreticiden, 15'er günlük ara ile toplanan 90 adet çiğ süt örneği tekniğine uygun bir şekilde alınmıştır.

Araştırmanın diğer bir amacı ise, çiğ sütlerde saptanan AFM₁ miktarının bu sütlerden imal edilen ürünlere geçiş oranlarının belirlenmesi ve ürünler arası farklılığın ortaya konulmasıdır. Bu amaca yönelik olarak, kazan sütlerinden ve bu sütlerin işlendiği pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyu, yoğurt, kaşar peynir ve peyniraltı suyu, tereyağ, krema, yağsız süt ve yayık altından olmak üzere toplam 93 adet örnek hazırlanmıştır. Böylece araştırmada toplam 183 örnek, AFM₁ oluşumu ve ürünlerdeki miktarı yönünden analize tabi tutulmuştur. Bunun için şu yol izlenmiştir:

1- İşletmeye gelen sütlerin tümünü temsil etmesi bakımından önce kazan sütlerinden örnekler alınarak analiz edilmiştir,

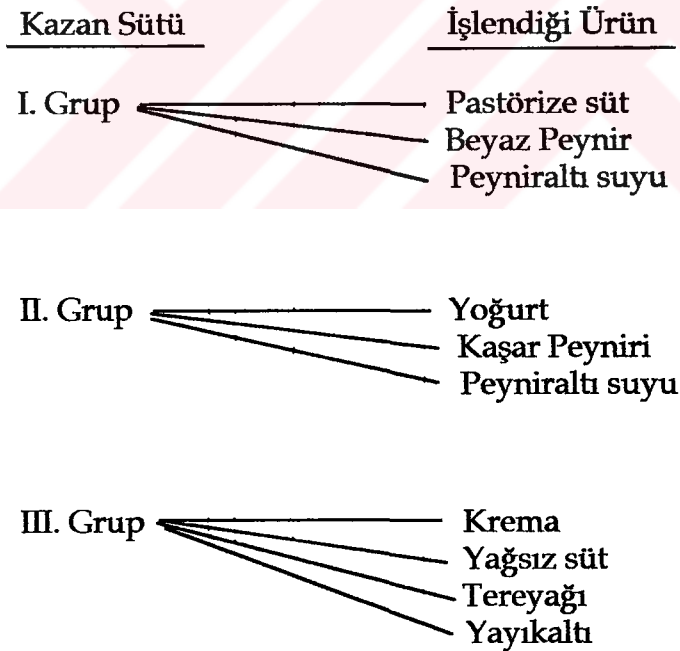
2- Eğer bu kazan sütleri AFM₁ yönünden pozitif çıkmış ise o günkü sütlerin hangi ürüne veya ürünlere işleneceği takip edilerek ilgili ürünlerden de örnekler alınmış ve analize tabi tutulmuştur,

3- Elde edilen sonuçlar herbir ürün için tespit edildikten sonra, kazan sütlerine göre de değerlendirilmiştir. Bunun için kazan sütünde tespit edilen AFM₁ miktarı 100 kabul edilmiş ve diğer ürünlerdeki AFM₁

miktarının buna göre aldığı değer belirlenmiştir. Bu değer çizelgelerde "Geçiş Oranı" (GO) şeklinde gösterilmiştir. Peynirlerde saptanan AFM₁ miktarı doğrudan doğruya kazan sütlerinde tesbit edilen AFM₁ değerine bölünerek, bir çok literatürde olduğu gibi "Zenginleştirme Faktörü" (Enrichment Factor) şeklinde ifade edilmiş ve çizelgelerde kısaca "ZF" değeri olarak verilmiştir.

4- Analizlerin bitiminden sonra; elde edilen sonuçları daha sağlıklı bir biçimde değerlendirmek amacıyla, kazan sütü aynı olan ürünler aşağıdaki gibi (Şekil 3.1.) tasnif edilmiş ve bu tasnife göre de tartışma bölümünde kullanılmıştır.

Şekil 3.1. Analiz edilen ürünlerin işlendiği kazan sütlerine göre tasnifi



Araştırma süresince alınan süt, yoğurt, krema, yayık altı ve peynir altı suyu örnekleri önceden yıkanmış ve kurutulmuş 250 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere, peynir ve tereyağı örnekleri ise 250 gr'lık ağzı kapaklı

plastik kaplara konularak, analiz zamanına kadar ve analiz süresince + 4°C'de saklanmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

3.1.2.1. Kloroform (% 96'lık etil alkolün % 0.5-10'luk kısmı ile stabilize edilmiş, Merck).

3.1.2.2. Toluen (Merck).

3.1.2.3. Glasiyal Asetik Asit (J. T. Baker Inc).

3.1.2.4. Asetonitril (Merck).

3.1.2.5. Dietileter (Peroksitsiz, etanol düzeyi < % 0.05, Merck).

3.1.2.6. n - Hekzan (Merck).

3.1.2.7. Aseton (Merck).

3.1.2.8. Metanol (Merck).

3.1.2.9. Sodyum klorür (Doymuş) (w/v).

3.1.2.10. Sodyum dodesil sülfat (% 5'lik) (w/v).

3.1.2.11. Trifluoroasetik asit (TFA).

3.1.3. Çözeltiler

Bütün çözeltiler Van Egmond et al 'ın (1986) verdikleri metoda göre hazırlanmıştır.

3.1.3.1. Sodyum Klorür (NaCl) (doymuş)

Yaklaşık 400 gr, saf (Merck) NaCl 1 lt suda çözülmüş ve 1 gece bekletilmiştir.

3.1.3.2. Sodyum dodesil sülfat çözeltisi (% 5'lik)

5 gr sodyum dodesil sülfat 100 ml saf suda çözülmüştür.

3.1.3.3. Toluen-glasiyal asetik asit (9+1) (v/v) çözeltisi

3.1.3.4. Asetonitril-dietil eter-n-hekzan (10+ 30+ 60) (v/v/v) çözeltisi

3.1.3.5. Kloroform - aseton (4+1) (v/v) çözeltisi

3.1.3.6. Dietileter-metanol-su (94 + 4.5 + 1.5) (v/v/v) çözeltisi (geliştirme solventi I)

3.1.3.7. Kloroform-aseton-metanol (87 + 10 + 3) (v/v/v) çözeltisi (geliştirme solventi II)

3.1.3.8. Kloroform-metanol-asetik asit (90 + 10 + 2) (v/v/v) çözeltisi (geliştirme solventi III)

3.1.3.9. Trifluoroasetik asit-n-hekzan (1 + 4) (v/v) (Sadece birkaç gün kullanılabilirdiği için taze hazırlanmaktadır).

3.1.4. Aflatoksin M₁ Çözeltileri

3.1.4.1. Primer AFM₁ Standart Çözeltisi

Özel ambalaj içinde 0.01 mg (10 µg) AFM₁ standardı (Sigma Chem. Co. Ltd. den satın alınmıştır) üzerine, 10 ml kloroform (Merck) ilave edilerek 1 µg/ml'lik çözeltisi hazırlanmıştır (stok çözelti). Bu çözelti + 4°C'de karanlıkta, aliminyum foil ile iyice kapatılmış (sarılmış) halde muhafaza edilmiştir.

3.1.4.2. AFM₁ Standardı (Çalışma Çözeltisi)

Stok AFM₁ çözeltisi (3.1.4.1) oda sıcaklığına ulaşınca kadar bekletilip bundan 0.5 ml alınarak 10 ml kloroform ilave edilmiştir. Böylece

konsantrasyon 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppb) olmuştur. Bu çözelti ağzı sıkıca kapalı, renkli cam şişelerde ve aliminyum foil ile sarılı halde karanlıkta oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve 14 günden fazla kullanılmamıştır. Gerektiği halde yeniden hazırlanmıştır.

3.1.5. Silica gel

60 Merck (kolon kromatografisi için) granül hacmi 0.05-0.20 mm. Kullanılmadan önce 1 saat 105°C'de kurutulup, konik bir cam balona aktarılmış ve kuvvetlice 1 dakika çalkalanarak kullanılmadan önce 15 saat bekletilmiştir.

3.1.6. İnce Tabaka Plakası

Silica gel (Merck) (aliminyum) 20 x 20 cm'lik. Bu plakalar 10 x 10 cm ebadında kesilerek kullanılmıştır.

3.1.7. Ultraviolet Aparatı

364 ve 254 nm 'ye ayarlanabilen, 10 cm mesafeden 0.1 ng AFM₁

lekesini plaka üzerinde görmeye imkan sağlayan özelliğe sahiptir (Philips LT.'den satın alınmıştır).

3.2. METOD

Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M₁ analizinde kullanılan metodların ortak 4 ayrı safhası bulunmaktadır. Bunlar; Ekstraksiyon işlemi, Kolon kromatografisi (purification/clean up), Kalitatif ve kantitatif Tayin ve Doğrulama testi (Confirmation)' dir (Stubblefield 1979, Anon 1986, Van Egmond et al 1986).

Araştırmada, Van Egmond et al (1986) ve Stublefield (1979)'un metodları aşağıdaki Şekilde uygulanmıştır.

3.2.1. Aflatoksin M₁ Analizi

3.2.1.1. Süt ve Süt Ürünlerinin Ekstraksiyonu

-Süt: Süt örneği, sodyum klorür çözeltisi (3.1.3.1.) ve kloroform (3.1.2.1.) yaklaşık + 4°C'ye kadar soğutulmuştur. 50 ml süt 250 ml'lik bir ayırıcı huniye aktarılmış ve 10 ml doymuş NaCl çözeltisi ve 125 ml kloroform ilave edilerek durmaksızın dikkatli bir Şekilde 1 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra tabakaların ayrılması için biraz beklenmiş ve ayırıcı huninin alt kısmında bulunan kloroform tabakası 250 ml'lik bir balona alınmıştır. Yaklaşık 5 gr susuz Na₂SO₄ ilave edilerek kuvvetlice çalkalanmış ve 15 dakika beklemeye terk edilmiştir. Daha sonra bir filtre yardımı ile (Ø 15 cm, Scleider and Schull, type 595 1/2) ile ölçü silindirine süzölmüş ve elde edilen filtrat miktarı kaydedilmiştir (Vf).

Peynir altı suyu, krema ve yoğurt için de aynı işlem basamakları izlenmiştir.

-Peynir: + 4°C'de tutulan peynir örneğinden 50 gr alınmış ve önce kübik Şekilde doğranarak blenderden geirilmış ve ayırıcı huniye aktarılmıştır. Daha sonra NaCl çözeltisi (3.1.3.1.)'nden 2.5 ml ve 100 ml kloroform (3.1.2.1.) ilave edilerek 1 dakika çalkalanmıştır. Tabakaların ayrılmasından sonra ayırıcı huniden kloroform tabakası 250 ml ile bir balona alınmıştır. 5 gr susuz Na₂SO₄ ilavesinden sonra kuvvetlice çalkalanmış ve 15 dakika beklemeye terkedilmiştir. Daha sonra süt ve diğer sıvı örneklerinde olduğu gibi bir filtre yardımıyla süzölerek elde edilen filtrat ölçü silindirinde toplanmış ve filtrat (Vf) kaydedilmiştir.

3.2.1.2. Kolon Kromatografisi

Bu safhada bütün örneklere aynı işlemler uygulanmıştır.

Silica gel kolonun hazırlanması: Bir parça cam yünü, cam kolonun (30 cm boyunda, 1 cm iç çaplı, yaklaşık 15 ml rezervuarlı) alt kısmına yerleştirilmiş ve kolon 10 ml kloroform ile doldurulmuştur. 1 gr susuz Na_2SO_4 ilave edilerek ve kolonun iç çeperleri yaklaşık 1 ml kloroform ile iyice yıkanmıştır. Daha sonra 2 gr silica gel kuru halde (3.1.5.) kolona ilave edilmiş ve 5 ml kloroform eklenerek silica gel'in kloroform içinde tamamen absorbe olması sağlanmıştır. Bu arada oluşan hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Kloroform, kolondan silica gel'in 3 cm yukarisına kadar alınmış ve silica gel tabakası yaklaşık 2 gr susuz Na_2SO_4 ile dikkatlice kapatılması sağlanmıştır. Ardından kloroform, kolondan sodyum sülfat tabakasının üst kısmına gelecek şekilde alınmış ve aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

a. Ekstraksiyon safhasında elde edilen ekstrakt (V_f) kolona ilave edilmiş ve yerçekiminden faydalanılarak sıvı düzeyinin Na_2SO_4 yüzeyine ulaşıncaya kadar, kolondan elue edilmiştir. Bu arada kolonun kurumamasına özen gösterilmiştir.

b. 25 ml toluen-glasiyel asetik asit (3.1.3.3.) ile sıvı düzeyi Na_2SO_4 yüzeyine ulaşıncaya kadar elue edilmiş ve eluat atılmıştır.

c. 25 ml n-hekzan (3.1.2.6.) ile elue edilmiş ve eluat atılmıştır.

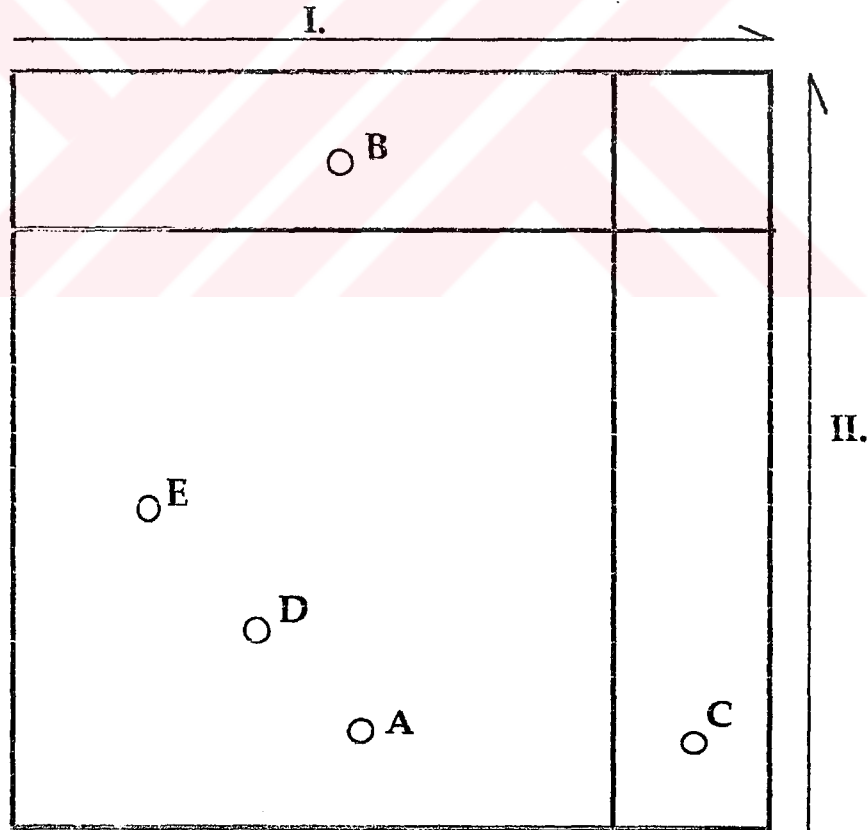
d. 25 ml asetonitril-dietileter-n-hekzan (3.1.3.4.) ile elue edilmiş ve aynı şekilde eluat atılmıştır.

e. 60 ml kloroform - aseton (3.1.3.5.) ile AFM1 elue edilmiş ve elde edilen eluat konik bir cam balonda biriktirilerek, Rotary Vakum Evaporatör'de kuruyuncaya kadar evaporasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen kalıntı (ekstrakt) bir miktar kloroform ile yaklaşık 4 ml'lik işaretli bir tüpe aktarılmıştır.

f. Bu safhada, tüp içeriği rotary vakum evaporatörde yaklaşık 35-40°C sıcaklıkta kuruyuncaya kadar evapore edilmiş ve evaporasyondan sonra bir enjeksiyon şiringası (Hamilton, 802 RN 27622) yardımıyla tüpe 100 µl kloroform ilave edilerek 1 dakika süreyle bir vortex mikserde karıştırılmıştır.

3.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

a. İnce tabaka plakalarının hazırlanmasında (silica gel 60, 20 x 20 cm, Merck, aliminyum, plaka kalınlığı 0.2 mm, 1.05553 DC Alufolien); Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi, 90 ° lik zıt iki kenarına paralel olarak 2'şer cm mesafelik hatlar çizilmiş ve A, B, C, D ve E noktaları işaretlenmiştir. Daha sonra işaretlenen noktalara standart ve örnek ekstraktından enjeksiyonlar yapılmıştır.



Şekil 3.2. İki boyutlu ince tabaka kromatografisi için plakanın kullanım diyagramı

- A: 20 μ l örnek ekstraktı
B: 12 μ l AFM₁ standart çözeltisi (0.05 μ g/ml) (3.1.4.2.)
C: 24 μ l AFM₁ standart çözeltisi (0.05 μ g/ml) (3.1.4.2.)
D: 3 μ l AFM₁ standart çözeltisi (0.05 μ g/ml) (3.1.4.2.)
E: 6 μ l AFM₁ standart çözeltisi (0.05 μ g/ml) (3.1.4.2.)

3.2.1.4. Plakanın Geliştirilme İşlemi

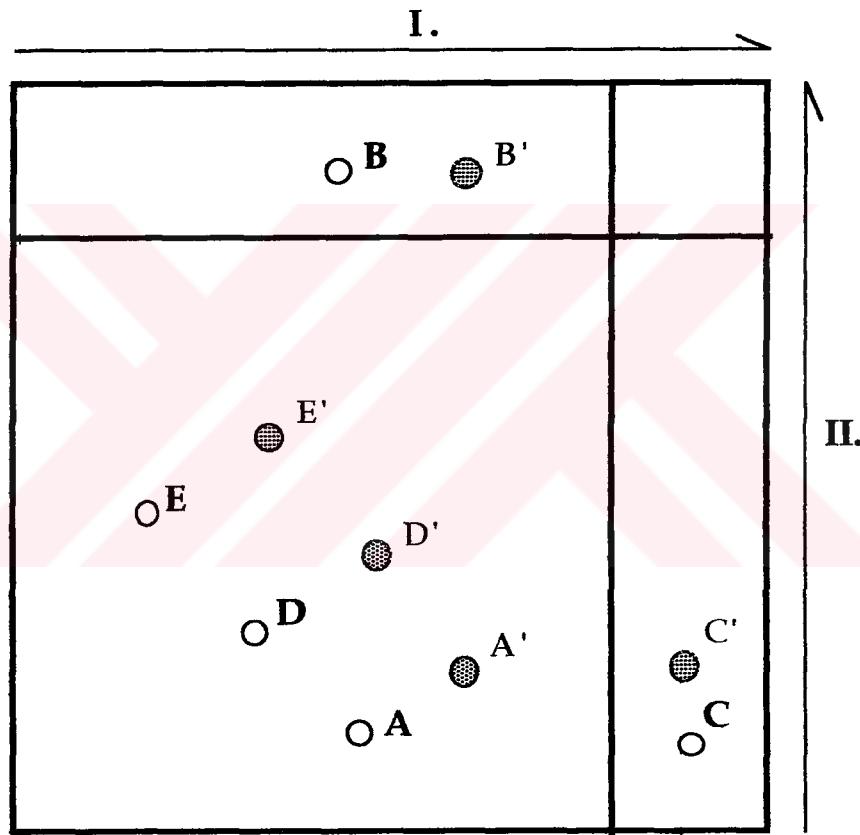
Geliştirme tankı olarak kullanılan 2 lt'lik bir beherglasa yaklaşık 1 cm derinliğine kadar I. Geliştirme Çözeltisi (3.1.3.6.)'nden doldurulmuş, plaka I. geliştirme yönünde olacak şekilde yerleştirilmiştir. Geliştirme karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Geliştirme, tamamlandıktan sonra plaka tanktan alınmış, karanlıkta 5 dakika süreyle havada kurutulmuş ve kuruma işlemi tamamlandıktan sonra da plaka 90° çevrilerek II. mobil faz yönünde tanka yerleştirilmiştir. I. mobil fazda olduğu gibi, II. Geliştirme Çözeltisi (3.1.3.7.) içinde işlem tekrarlanmıştır. Geliştirme tamamlandıktan sonra plaka 15 dakika süreyle karanlıkta havada kurutulmuştur.

3.2.1.5. Plakanın Değerlendirilmesi

İki yönlü geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra plaka, 364 nm dalga boylu ultraviyole ışığı altında, ışık kaynağından yaklaşık 10 cm mesafe uzaklıkta olacak şekilde incelenmiştir. AFM₁ lekeleri mavi floresans yaymaktadır. Gerekliğinde plaka üzerinde mavi floresans yayan diğer cisimcikler ve toz partikülleri plakadan uzaklaştırılmıştır.

Ekstarktan elde edilen AFM₁, E' - D' standartlarıyla birlikte hayali bir çizgi üzerinde bulunmaktadır. Buradan hareketle standartların yaydığı floresans intensiteleri ile örnek intensitesi mukayese edilerek değerlendirilmiştir (Şekil 3.3.).

Plaka üzerinde tespit edilen lekenin aflatoksin M₁ olup olmadığından şüphe edildiğinde, M₁'in doğrulanması amacıyla yeni bir plaka üzerinde, ekstraktan elde edilen örnekten 20 µl ve AFM₁ standart solusyonundan (0.05 µg/ml) (3.1.4.2.) 10 µl A noktasına, D, E, B ve C noktalarına ise sırasıyla 3, 6, 12 ve 24 µl M₁ standart çözeltisinden (0.05 µg/ml) spotlanmış ve plaka, daha önce tanımlanan şekilde geliştirilerek değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3. Geliştirilmeden sonra standartların ve örnek ekstraktının plaka üzerinde sürüklendiği yerler (R_f değerleri)

3.2.1.6. Hesaplama:

Örnekteki AFM₁ düzeyi, sıvı örnekler için µg/l (ppb) , katı örnekler için µg/kg (ppb) olarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ppb olarak ifade edilmiştir.

$$AFM_1 \text{ (ppb)} = \frac{V_{st} \times C_{st} \times V_{ext}}{V_m \times M \times V_f / 125}$$

V_{st}; örnek lekesine en yakın olan aflatoksin M₁ standardının hacmi (μl)

V_m; ekstraktan elde edilen örnek hacmi (μl)

C_{st} ; Aflatoksin M₁ standardının konsantrasyonu (μg/ ml)

M; Sıvı örnek hacmi (ml) veya katı örnek ağırlığı (gr)

V_{ext}; absorbe edilen ekstraktın hacmi (μl)

V_f; filtrat hacmi (ml)

125; ekstraksiyon esnasında kullanılan kloroform miktarı (ml)

3.2.1.7. Aflatoksin M₁'in Varlığının Doğrulanması (Confirmation)

Doğrulama deneyi en yaygın olarak kullanılan trifluoroasetik asit (TFA) - n- hekzan (3.1.2.10) ilavesiyle aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

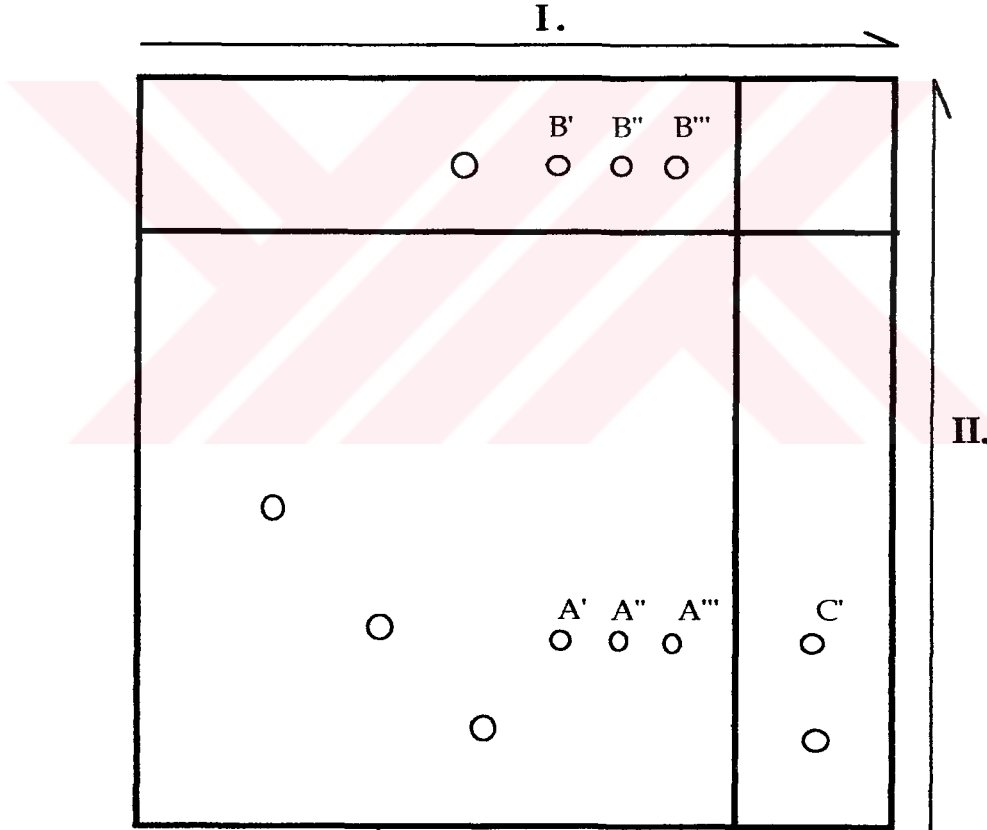
a. İki boyutlu olarak geliştirilen ince tabaka plakası UV ışığı altına yerleştirilmiş,

b. Ekstraktan elde edilen ve aflatoksin M₁ olduğu kabul edilen spotun merkezi (A') ile aflatoksin M₁ standardının (B') merkezi bir kalemle dikkatlice işaretlenmiştir. Daha sonra bir şırınga ile 5 μl TFA -n-hekzan'dan her iki noktaya ilave edilmiştir.

c. TFA -n-hekzan ilave edilen plaka, renkli - sıcak (75°C) bir cam ile kapatılarak etüvde 75°C'de 5 dakika tutulmuş, daha sonra plaka soğuk bir yüzey üzerinde karanlıkta 1 dakika kadar soğumaya terk edilmiştir. Bu işlemin ardından plaka I. mobil faz yönünde kloroform-metanol-asetik asit (3.1.3.8.) içinde karanlıkta geliştirmeye terkedilmiştir. Geliştirme tamamlandıktan sonra plaka 10 dakika süre ile karanlıkta kurumaya bırakılmış ve 364 nm dalga boylu UV ışığı altında incelenmiştir.

3.2.1.8.Kromatogramın Değerlendirilmesi

B'den elde edilen, B'' ve B''' reaksiyon ürünlerinin (mavi floresanslı) görülüp görülmediği kontrol edilmiş ve standart çözeltilerinin plaka üzerindeki taşınma uzaklıkları (R_f değerleri) esas alınarak, aynı şekilde örnekten elde edilen (A'den) A'' ve A''' reaksiyon ürünlerinin de plaka üzerinde görülüp görülmediği kontrol edilmiştir. Eğer adı geçen noktalarda lekeler tespit edilmiş ise, analiz edilen örnekteki AFM₁ doğrulanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. AFM₁'in TFA ile reaksiyonu sonucu meydana gelen reaksiyon ürünlerinin plaka üzerindeki yerleşimi

A''; I. reaksiyon ürünü (nisbeten kuvvetli floresanslı)

A''' ; II. reaksiyon ürünü (nisbeten zayıf floeranslı)

B''' ; TFA ile geliştirmeden sonra AFM₁'in R_f değerini veren ürün.

3.2.2. İstatistiksel Analizler

Fabrikaya gelen sütlerde AFM₁ oluşumunun aylara göre farklılık düzeylerini ortaya koymak amacıyla, Tam şansa Bağlı Deneme Planı uygulanmıştır. Ayrıca aylar arasındaki önem düzeyinin tespit edilmesi amacıyla da Duncan oklu Karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. Aynı istatistiksel metodlar AFM₁' in ürünlere geçiş oranlarının önem düzeylerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır (Devore and Peck 1993).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde elde edilen AFM₁ değerleri metin içerisinde ve tablolarda ppb olarak, istatistiksel analiz tablolarında ise ng/kg 'a çevrilerek kullanılmıştır. Bu çalışmada, kullanılan metodun tayin limiti olan 0.0100 ppb düzeyinin altında kalan değerler '0' (sıfır) olarak kabul edilmiş ve tez metninin ilgili bölümlerinde kullanılmıştır

4.1. Çiğ Sütlerde Aflatoksin M₁ Oluşumu

4.1.1. Analiz Peryotları ve Üreticilere Göre AFM₁ Miktarları ve Değişimi

Değişik üreticilerden farklı periyotlarda alınan çiğ süt örneklerine ait AFM₁ düzeyleri Çizelge 4.1.' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. İncelenen çiğ süt örneklerine ait AFM₁ miktarları (ppb)

Örnek Alma Peryodu									
Üretici No	15 Mart	1 Nisan	15 Nisan	1 Mayıs	15 Mayıs	1 Haziran	En düşük	En yüksek	\bar{X}
1	0.0125	0.0368	0.0893	0.0416	0.0583	0.0000	0.0000	0.0893	0.0449
2	0.0000	0.0717	0.0675	0.0599	0.0419	0.0233	0.0000	0.0717	0.0440
3	0.0500	0.0535	0.0446	0.0760	0.0393	0.0238	0.0238	0.0760	0.0478
4	0.0568	0.0347	0.0591	0.0900	0.0416	0.0250	0.0250	0.0900	0.0512
5	0.0390	0.1037	0.0411	0.0513	0.0562	0.0324	0.0324	0.0562	0.0539
6	0.0240	0.0000	0.0000	0.0280	0.0552	0.0283	0.0000	0.0552	0.0225
7	0.0535	0.1200	0.0542	0.0675	0.0646	0.0000	0.0000	0.1200	0.0599
8	0.0631	0.0646	0.0967	0.0229	0.0486	0.0000	0.0000	0.0967	0.0493
9	0.0146	0.0739	0.0919	0.0422	0.0236	0.0454	0.0236	0.0919	0.0486
10	0.0370	0.0257	0.0337	0.0986	0.0441	0.0000	0.0000	0.0986	0.0398
11	0.0270	0.0521	0.1209	0.0892	0.0344	0.0389	0.0270	0.1209	0.0604
12	0.0328	0.0000	0.0367	0.0675	0.0631	0.0000	0.0000	0.0675	0.0333
13	0.0182	0.0280	0.0373	0.0294	0.0447	0.0000	0.0000	0.0447	0.0262
14	0.0000	0.0614	0.0322	0.0447	0.0571	0.0234	0.0000	0.0614	0.0364
15	0.1236	0.0599	0.0852	0.0878	0.0307	0.0316	0.0307	0.1236	0.0698
En düşük	0.0000	0.0000	0.0000	0.0229	0.0236	0.0000	G e n e l O r t a l a m a 0.0468		
En yüksek	0.1236	0.1200	0.1209	0.0986	0.0646	0.0454			
\bar{X}	0.0368	0.0544	0.0593	0.0597	0.0468	0.0181			

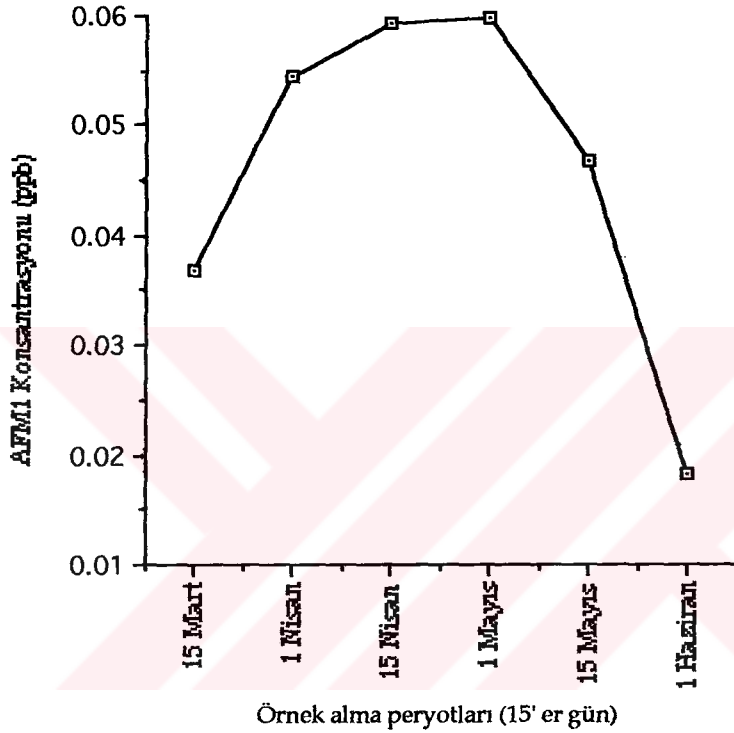
Çizelge 4.1.' den de izlenebileceği gibi analiz edilen çiğ süt örneklerinin AFM₁ düzeyleri; genel değerler dikkate alındığında, 0 - 0.1236 ppb arasında değişmiş ve genel ortalama 0.0468 ppb şeklinde bulunmuştur. Elde edilen ortalama değer, Blanc and Karleskind (1981) tarafından bulunan ortalama değerden düşük, Gilbert et al'ın (1984) tespit ettikleri değerden ise yüksek çıkmıştır.

Diğer taraftan, sonuçlar analiz periyotlarına göre değerlendirildiğinde; 15 Mart'da saptanan en düşük AFM₁ miktarı 0.000, en yüksek 0.1236 ppb ve ortalama 0.0368 ppb şeklindedir. Bu değerler sırayla, 1 Nisan' da 0.000, 0.1200 ve 0.0544 ppp; 15 Nisan' da 0.000, 0.1209 ve 0.0593 ppb; 1 Mayıs'ta 0.0229, 0.0986 ve 0.0597 ppb; 15 Mayıs'ta 0.0236, 0.0646 ve 0.0468 ppb ve 1 Haziran'da 0.000, 0.454 ve ortalama 0.0181 ppb' dir. Bu dönemlerden elde edilen değerler, Piva et al (1985) tarafından çiğ süt örneklerinde saptanan değerlerle uyum içerisindedir.

Analiz periyotlarına göre, AFM₁ konsantrasyonlarındaki değişim Şekil 4.1.' de verilmiştir. Şekilden de izlenebileceği gibi, 15 Mart - 1 Nisan arasında hızlı bir yükselme, 1 Nisan - 15 Nisan arasında nisbeten yavaş bir yükselme, 15 Nisan - 1 Mayıs arasında sabite yakın az bir artış ve 1 Mayıs - 1 Haziran arasında hızlı bir düşme olduğu gözlenmektedir. Bu durum yapılan diğer araştırmalarda da ortaya konulmuştur (Van Egmond 1989, Heeschen et al 1990, Wood 1991, Macho et al 1992).

Netice itibarıyla; 1 Mayıs' a kadar meydana gelen AFM₁ miktarındaki artış, bu dönemde süt hayvanlarının tükettiği depolanmış yemlerde oluşan AFB₁' in artışından kaynaklanmaktadır. Çünkü sütlerde oluşan AFM₁ miktarı ile yemlerdeki AFB₁ arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Van Egmond 1994). AFB₁ miktarındaki artış ise, bu dönemlerde sıcaklığın yükselmesi ve yağışın artmasıyla ilgilidir. Çünkü *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* gibi küf mantarları % 13-18 arasında rutubet içeren besinler ile,

çevre nisbi rutubetinin % 50-60' ın üzerinde olduğu durumlarda gelişip çoğalmaktadırlar. Toksin oluşturmaları için en uygun sıcaklık 24 ° C ve en uygun nisbi rutubet de % 85-90 arasındadır (Yaygın ve Demiryol 1980, Jay 1992).



Şekil 4.1. Ortalama AFM₁ konsantrasyonlarının analiz periyotlarına göre değişimi

1 Mayıs' tan başlayıp 1 Haziran' a kadar devam eden düşüş de, süt veren hayvanların bu dönemde merada otlatılmaları ile açıklanabilir. Çünkü mera yemleri AFB₁ içermediğinden veya miktarının çok düşük düzeylerde olmasından dolayı, süt hayvanının aldığı AFB₁ miktarı düşmekte, böylece sütle beraber salgılanan AFM₁ oranı da azalmaktadır (Sieber and Blanc 1978).

Yapılan istatistiksel analizler neticesinde, analiz periyotları arasında tespit edilen AFM₁ miktarlarının farklı ve önemli ($p<0.01$) olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Analiz periyotlarına göre ortalama AFM₁ konsantrasyonlarının varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F
Analiz periyotları	5	19524.96	3904.99	5.65 xx
Hata	84	57991.7	690.37	
Genel	89	77516.66		

xx: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Farklılığın hangi analiz periyotları arasında önemli olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.3.' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Analiz periyotlarına göre ortalama AFM₁ konsantrasyonları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları

Analiz periyotları	Ortalamalar Arası Fark
15 Mart - 1 Nisan	17.6
15 Mart - 15 Nisan	22.5 x
15 Mart - 1 Mayıs	22.9 x
15 Mart - 15 Mayıs	10.0
15 Mart - 1 Haziran	18.7
1 Nisan - 15 Nisan	4.9
1 Nisan - 1 Mayıs	5.3
1 Nisan - 15 Mayıs	7.6
1 Nisan - 1 Haziran	36.3 xx
15 Nisan - 1 Mayıs	0.4
15 Nisan - 15 Mayıs	12.5
15 Nisan - 1 Haziran	41.2 xx
1 Mayıs - 15 Mayıs	12.9
1 Mayıs - 1 Haziran	41.6 xx
15 Mayıs - 1 Haziran	28.7 xx

x: $p<0.05$ düzeyinde önemli

xx: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.3.' deki ortalama AFM₁ konsantrasyonları analiz periyotlarına göre incelendiğinde; 15 Mart - 15 Nisan ve 15 Mart - 1 Mayıs arasındaki farklar $p < 0.05$ düzeyinde, 1 Nisan - 1 Haziran, 15 Nisan - 1 Haziran, 1 Mayıs - 1 Haziran ve 15 Mayıs - 1 Haziran arasındaki farklar ise $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Buna karşılık, diğer periyotlar arasındaki farklar istatistiksel bakımdan önemsizdir. Analiz periyotlarına ait ortalama değerler arasındaki farklılığın, daha önce de değinildiği gibi, zamana bağlı olarak depo ve iklim koşullarındaki değişikliklerin kontamine olmuş yemlerdeki AFB₁ oluşum düzeylerini etkilemesiyle açıklanabilir. Benzer sonuçlar, Gilbert et al (1985) ve Heeschen et al (1990) tarafından da rapor edilmektedir.

Üreticilere ait en düşük ve en yüksek ortalama AFM₁ miktarları yine Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Çizelgenin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, en düşük ortalama değer 0.0225 ppb düzeyi ile 6 nolu üreticiye, en yüksek ortalama değer 0.0698 ppb düzeyi ile 15 nolu üreticiye aittir. Yapılan istatistiksel analizler neticesinde, üreticilere ait ortalama AFM₁ konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.4.)

Çizelge 4.4. Üreticilere göre ortalama AFM₁ konsantrasyonlarının varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F
Üreticiler	14	19524.96	1394.64	1.84
Hata	75	58191.7	755.88	
Genel	89	777516.66		

Bunun nedeni, üreticiler tarafından süt hayvanlarına verilen yemlerin hemen hemen aynı özellikte olması ve aynı koşullar altında depolanıp muhafaza edilmesi ile açıklanabilir. Nitekim araştırma süresince yapılan gözlem ve tespitler de bu sonucu doğrulamaktadır. Genellikle bir kaç istisna dışında, araştırmaya konu olan yöredeki aile işletmelerinde

hayvan yemlerinin depolandığı mekanlar havasız ve dam örtülü olması nedeniyle, yağın yağmur ve karların içeriye sızmasına müsait olup küf mantarlarının gelişip çoğalması için gerekli rutubet ortamının hazırlanmasına zemin oluşturmaktadır. Ayrıca, ucuza yem temini amacıyla piyasadan satın alınan yemler, genellikle sonbaharda toptan alınmakta, veya üreticilerin kendi mahsulleri olan çayırotu, yonca ve korunga gibi diğer kaba yemlerin yığın halinde uzun süre, her türlü olumsuz iklim koşullarına maruz bırakılması da, yemlerde ve buna bağlı olarak da sütlerde AFM₁ oluşumunun en önemli etkenlerinden birini teşkil etmektedir. Benzer durumlar, bu konuda daha önce yapılmış olan bazı araştırmalarda da rapor edilmektedir (Gilbert et al 1984, Van Egmond 1989, Macho et al 1992).

Araştırmaya konu olan köylere ait en düşük, en yüksek ve ortalama AFM₁ düzeyleri Çizelge 4.5.' de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Köylere ait en düşük, en yüksek ve ortalama AFM₁ düzeyleri (ppb)

Köy No	AFM ₁ Konsantrasyonları (ppb)		
	En düşük	En yüksek	Ortalama
1	0.0125	0.0893	0.0456
2	0.0250	0.1037	0.0425
3	0.0229	0.1200	0.0526
4	0.0182	0.1236	0.0443

Çizelge 4.5.' de görüldüğü gibi, tayin edilebilir en düşük AFM₁ miktarı 0.0125 ppb düzeyi ile 1 nolu köye ait süt örneklerinde saptanmıştır. En yüksek AFM₁ miktarı 0.1236 ppb düzeyi ile 4 nolu köyden alınan örneklerde bulunmuştur. Köylere ait ortalama AFM₁ düzeyleri dikkate alındığında ise; en düşük ortalama değer 0.0425 ppb düzeyi ile 2 nolu köye,

en yüksek ortalama değer 0.0526 ppb düzeyi ile 3 nolu köye ait örneklerde belirlenmiştir. Daha önce yapılan istatistiksel analizler sonucunda, üreticilere ait ortalama değerler arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur. Buna bağlı olarak, köylere ait ortalama AFM₁ miktarları arasındaki farklar da önemsiz çıkacağı için elde edilen değerler istatistiksel bakımdan analiz edilmemiştir.

4.1.2. İncelenen Çiğ Süt Örneklerinin Farklı Düzey ve Analiz Peryotlarına Göre Dağılımı

AFM₁ yönünden analiz edilen süt örneklerinin farklı konsantrasyon düzeyleri ve analiz periyotlarına göre dağılımı Çizelge 4.6.' da verilmiştir. Çizelgeye göre, analiz edilen 90 adet çiğ süt örneğinden 11' inde (%12.22) AFM₁ 'e rastlanmamıştır. Bu örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6. Analiz edilen süt örneklerinin farklı düzey ve analiz periyotlarına göre dağılımı

AFM ₁ Düzeyleri (ppb)	Analiz Peryotları (15 gün)							Toplam Örnek Sayısı	Toplam Örnek Yüzdesi
	15 Mart	1 Nisan	15 Nisan	1 Mayıs	15 Mayıs	1 Haziran			
0	2	2	1	0	0	6	11	12.22	
<0.05	8	3	6	6	9	9	41	45.56	
0.05 - 0.100	4	8	7	9	6	0	34	37.78	
>0.100	1	2	1	0	0	0	4	4.44	
Toplam	15	15	15	15	15	15	90	100	

Negatif örneklerin 6' sı (%54.55) Haziran ayına, 2' si (%18.18) Mart ayına, 3' ü (% 27.27) de Nisan ayına aittir. Mayıs ayında analiz edilen örneklerin tamamında AFM₁ saptanmıştır. Buna göre, Haziran ayında analiz edilen örneklere ait AFM₁ değerleri diğer aylara göre daha düşük olduğu gibi, negatif örnek sayısı da bu ayda en yüksek sayıdadır. Buna

karşılık; Mayıs ayına ait örneklerde AFM₁ konsantrasyonları yüksek bulunmuş ve negatif örneğe de rastlanmamıştır.

Çizelge 4.6.'dan izlenebileceği gibi, analiz edilen 90 adet çiğ süt örneğinden 79' unda (% 87.77) AFM₁ tespit edilmiş olup üç farklı düzeyde incelenmiştir. Pozitif örneklerin % 54.44 'ü, AFM₁ için uluslararası maksimum tolerans limiti olarak kabul edilen, 0.05 ppb düzeyinin üzerinde bir değer almıştır. Aylar dikkate alındığında, bu örneklerin yaklaşık %19.52' si Mart ayına, % 21.95' i Nisan ayına, %36.58' i Mayıs ayına ve % 21.95' i de Haziran ayına ait olduğu görülmektedir.

Örneklerin % 37.78' i 0.05 - 0.100 ppb arasında bir değer almıştır. Bu örneklerin aylara göre dağılımı ise şöyledir: % 11.76' sı Mart ayına, % 44.12' si Nisan ayına, % 44.12' si de Mayıs ayına aittir. Haziran ayında analiz edilen örneklerde bu düzeyler arasında bir değer alan olmamıştır. Pozitif örneklerin sadece % 4.44' ü 0.100 ppb' nin üzerinde bir değer almıştır. Bu örneklerin % 25' i Mart ayına % 75' i ise Nisan ayına aittir. Mayıs ve Haziran aylarında bu düzeyin üzerinde AFM₁ içeren süt örneğine rastlanmamıştır.

AFM₁ yönünden pozitif çıkan örneklerin hiçbirisi, ülkemizde 2 Mayıs 1990 tarih ve 20506 sayılı Resmi Gazete de yayınlanan tebliğde, süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen maksimum tolerans limitini (0.5 ppb) aşmamıştır. Ancak bu düzey günümüzde çok az sayıda ülke tarafından kabul edilen en yüksek tolerans sınırıdır (Bkz Çizelge 2.1.). Daha önce de işaret edildiği gibi, süt ve süt ürünleri için en yaygın olarak kabul edilen maksimum tolerans sınırı 0.05 ppb düzeyidir (Stoloff et al 1991). Kaldığı bir çok ileri batı ülkesi bu tolerans değerini de daha aşağılara indirmiş durumdadırlar (Wood 1991). Ayrıca bebek ve çocukların beslenmesinde kullanılan süt ve sütlü mamüllere ait tolerans değerleri ise bir çok ülkede 0.01 ppb olarak belirlenmiştir (Van Egmond 1994).

4.2. Aflatoksin M₁' in Süt Ürünlerindeki Miktarları ve Geçiş Oranları

4.2.1. Birinci Grup Kazan Sütlerinden Yapılan Ürünler

Bu grup kazan sütlerine ait AFM₁ değerleri Çizelge 4.7.' de verilmiştir. Çizelgeye göre birinci grup kazan sütlerinde saptanan en düşük AFM₁ miktarı 0.0295 ppb, en yüksek 0.0568 ppb ve ortalama 0.0470 ppb' dir.

Çizelge 4.7. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunda saptanan AFM₁ miktarları ve geçiş oranları

Örnek No	Kazan Sütü AFM ₁ Kons. (ppb)	Ü R Ü N L E R					
		Pastörize Süt		Beyaz Peynir		Peyniraltı	Suyu
		AFM ₁ Kons. (ppb)	GO (%)	AFM ₁ Kons. (ppb)	ZF Değeri	AFM ₁ Kons. (ppb)	GO (%)
1	0.0530	0.0440	83	0.1623	3.06	0.0260	49
2	0.0548	0.0517	94	0.1315	2.39	0.229	41
3	0.0568	0.0534	94	0.1500	2.64	0.0337	59
4	0.0506	0.0469	92	0.1193	2.35	0.0275	54
5	0.0493	0.0464	94	0.1403	2.84	0.0257	52
6	0.0373	0.0358	95	0.0806	2.16	0.0227	60
7	0.0447	0.0423	94	0.0896	2.00	0.0189	42
8	0.0295	0.0277	93	0.0766	2.59	0.0177	60
Endüşük	0.0295	0.0277	83	0.0766	2.00	0.0177	41
Enyüksek	0.0568	0.0534	95	0.1623	3.06	0.0337	60
Ortalama	0.0470	0.0435	92	0.1187	2.50	0.0243	52

Birinci grup kazan sütlerinden elde edilen pastörize sütlerde saptanan AFM₁ miktarları ve geçiş oranları Çizelge 4.7.' de verilmiştir.

Çizelge 4.7.' de görüldüğü gibi, pastörize sütlerde tespit edilen AFM₁ miktarları 0.0277 - 0.0534 ppb arasında değişmiş olup, ortalama değer 0.0435 ppb düzeyinde bulunmuştur. Elde edilen bu değerler Stoloff et al 'ın (1975)

pastörize sütlerde buldukları değerlere yakın, Heeschen et al 'ın (1990) elde ettikleri değerlerden yüksek, Van Egmond and Paulsch (1986) tarafından bulunan değerlerden ise düşük çıkmıştır. Bu araştırmadan elde edilen değerlerin literatürde verilen değerlerden farklı olmasının nedeni; uygulanan farklı analiz metodlarından, hayvanlara verilen yemlerden, mevsime bağlı olarak sütün bileşiminde meydana gelen değişimlerden ve kontaminasyon çeşidinden kaynaklanabilir. Doğal yolla kontamine olmuş sütlerde AFM₁' in suni olarak kontamine olanlara göre daha homojen dağıldığı ve bu durumun uygulanan ısı işleminin AFM₁ üzerindeki etkisinin farklı olmasına yol açtığı bilinmektedir (Yousef and Marth 1989)

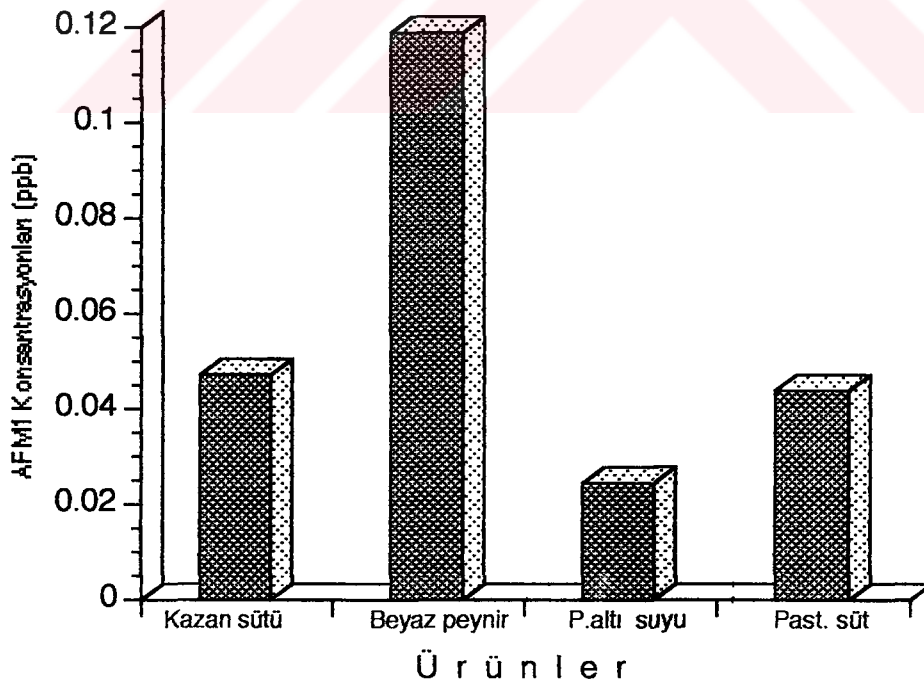
Elde edilen sonuçlar kazan sütlerine göre değerlendirildiğinde ise, pastörize sütlerdeki AFM₁ 'in % 5 - 17 arasında bir azalma gösterdiği, ortalama azalmanın ise % 8 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, Purchase et al (1972) tarafından aynı konuda yapılmış olan araştırma sonuçlarından düşük, Kiermeier and Mashaley (1977) tarafından verilen değerlere ise benzerlik göstermektedir.

Beyaz peynirlerde saptanan AFM₁ miktarları en düşük 0.0766 ppb, en yüksek 0.1623 ppb ve ortalama ise 0.1187 ppb şeklindedir. Elde edilen sonuçlar, Polzhofer (1977) tarafından Camembert peynirinde bulunan değerlere yakın, Dağoğlu vd' in (1995) otlu peynirlerde buldukları ortalama değerlerden düşüktür. Tutelyan et al (1989) tarafından Rusya piyasasından toplanan çeşitli peynirlere ait değerlerden ise yüksek çıkmıştır. Beyaz peynir örneklerinde saptanan en düşük ZF değeri 2.00, en yüksek 3.06 ve ortalama 2.50 olarak gerçekleşmiştir.

Yapılan araştırmalara göre, yumuşak peynirlerdeki ZF değeri genellikle 2.5 - 3.3 arasındadır (Yousef and Marth 1989). Bu araştırmada beyaz peynir için elde edilen ortalama 2.5 ZF değeri belirtilen literatürdeki minimum ZF değeri ile özdeştir.

Beyaz peynire ait peyniraltı suyundaki AFM₁ miktarları, en düşük 0.0177 ppb, en yüksek 0.0337 ppb ve ortalama 0.0243 ppb düzeyinde bulunmuştur. Saptanan değerler, Brackett and Marth'ın (1982b) Cheddar peynirinde ve Dragacci et al'ın (1995) Camembert peynirinde buldukları değerlerden düşük çıkmıştır. Bunun sebebi, peynirlere işlenen kazan sütlerinin AFM₁ düzeylerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Peyniraltı suyundaki AFM₁ miktarları kazan sütlerinde elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında, AFM₁ konsantrasyonunun % 48 oranında daha düşük olduğu görülmektedir. Bu değer Van Egmond et al (1977) tarafından Gouda peynirinde ve Blanco et al'ın (1988) Manchego peynirinde buldukları değerlere yakındır.

Kazan sütlerinde ve bu sütlerden elde edilen ürünlerde tespit edilen AFM₁ konsantrasyonlarındaki değişim Şekil 4.2.' te verilmiştir.



Şekil 4.2. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunda saptanan AFM₁ konsantrasyonlarındaki değişim

Şekil 4.2.' de görüldüğü gibi kazan sütlerinde saptanan AFM₁ miktarı ile pastörize sütte bulunan AFM₁ miktarı arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Buna karşılık, peyniraltı suyunda ortalama % 48 oranında bir azalma, beyaz peynirde ise 2.5 katlık bir yükselme olduğu gözlenmiştir.

Bu ürünlerde saptanan AFM₁ miktarlarındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8.' de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunun AFM₁ içerikleri arasındaki farklar $p < 0.01$ düzeyinde önemli çıkmıştır.

Çizelge 4.8. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunun AFM₁ miktarlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F
Ürünler	3	41145	13715	43.15 xx
Hata	28	8900	317.85	
Genel	31	50046		

xx: $p < 0.01$ düzeyinde önemli

Farklılığın hangi ürünler arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.9.' de verilmiştir.

Çizelge 4.9.' de verilen ürünler arası ortalama farklar incelendiğinde, kazan sütü ile pastörize sütün AFM₁ miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Aynı sonuç, Van Egmond (1977) ve Kiermeier and Buchner (1977) tarafından da ortaya konmuştur. Buradan pastörizasyon işleminin AFM₁ miktarına önemli etkide bulunmadığı sonucuna varılmıştır (Yousef and Marth 1989).

Buna karşılık, kazan sütünden peyniraltı suyuna daha az oranlarda AFM₁ geçtiği saptanmış ve aradaki farkın $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu

bulunmuştur. Peyniraltı suyunun kazan sütüne göre daha az AFM₁ içerdiği başka araştırmacılar tarafından da saptanmıştır (Brackett and Marth 1982a, Brackett and Marth 1982b). Bunun sebebi, toksinin peyniraltı suyu proteinlerine ilgisinin zayıf olmasıyla izah edilebilir (Brackett and Marth 1982a).

Çizelge 4.9. Kazan sütü, pastörize süt, beyaz peynir ve peyniraltı suyunda tespit edilen ortalama AFM₁ miktarları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları

Ürünler	Ortalamalar Arası Fark
Kazan sütü - Pastörize süt	3.5
Kazan sütü - Beyaz peynir	71.7 xx
Kazan sütü - Peyniraltı suyu	22.7 x
Pastörize süt - Beyaz peynir	75.2 xx
Pastörize süt - Peyniraltı suyu	19.2
Beyaz peynir - Peyniraltı suyu	94.4 xx

x: $p < 0.05$ düzeyinde önemli

xx: $p < 0.01$ düzeyinde önemli

Diğer yandan, beyaz peynir örneklerinde saptanan AFM₁ miktarları; kazan sütü, pastörize süt ve peyniraltı suyu örneklerinde saptanan AFM₁ miktarlarından önemli ölçüde yüksek çıkmıştır ($p < 0.01$). Benzer sonuçlar, Van Egmond and Paulsch (1986) tarafından, pastörize süt, Gouda peyniri ve onun peyniraltı suyu örneklerinde de saptanmıştır.

AFM₁ ile kontamine olmuş sütlerden peynir yapıldığında, adı geçen toksinin peynir pıhtısında daha fazla bulunduğu, buna kazein molekülünün sahip olduğu hidrofobik yüzeylerin neden olduğu ileri sürülmüştür. Netice olarak toksinin, kazein molekülünün hidrofobik yüzeylerine adsorbe olması sebebiyle bu fraksiyondaki AFM₁ konsantrasyonu, peyniraltı suyuna göre oldukça yüksek çıkmaktadır (Dosako et al 1980, Yousef and Marth 1989). Peynirdeki AFM₁ oranının, kazan sütü ve pastörize süte göre daha yüksek olması ise, kazein oranının

peynirde bu sütlere göre daha konsantre olmasıyla açıklanabilir (Wood 1991).

4.2.2. İkinci Grup Kazan Sütlerinden Yapılan rnler

İkinci grup kazan sütlerinde tespit edilen AFM₁ oranları Çizelge 4.10.'da sunulmuştur. Çizelgedeki verilerin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, ikinci grup kazan sütlerinde en düşük AFM₁ oranı 0.0234 ppb, en yüksek 0.0530 ppb ve ortalama 0.0341 ppb olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.10. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunda saptanan AFM₁ miktarları ve geçiş oranları

rnek No	Kazan Sütü AFM ₁ Kons. (ppb)	 R  N L E R					
		Y o ğ u r t		Kaşar	Peynir	Peyniraltı	Suyu
		AFM ₁ Kons. (ppb)	GO (%)	AFM ₁ Kons. (ppb)	ZF Değeri	AFM ₁ Kons. (ppb)	GO (%)
1	0.0530	0.0575	108	0.1453	2.74	0.0340	64
2	0.0330	0.0398	119	0.1600	4.80	0.0230	69
3	0.0300	0.0463	154	0.1050	3.50	0.0211	70
4	0.0248	0.0268	108	0.0750	3.02	0.0152	61
5	0.0268	0.0346	129	0.0700	2.60	0.0200	74
6	0.0357	0.0406	113	0.0839	2.35	0.0228	63
7	0.0362	0.0347	95	0.0833	2.30	0.0227	62
8	0.0234	0.0252	107	0.0605	2.58	0.0150	64
9	0.0438	0.0387	88	0.1415	3.23	0.0284	64
Endüşük	0.0234	0.0252	88	0.0605	2.30	0.0150	61
Enyüksek	0.0530	0.0575	154	0.1600	4.80	0.0340	74
Ortalama	0.0341	0.0382	113	0.1027	3.01	0.0224	65

İkinci grup kazan sütlerinden işlenen yoğurt örneklerine ait AFM₁ oranları Çizelge 4.10.' da verilmiştir. Çizelge 4.10.' da görüldüğü gibi, yoğurt örneklerindeki AFM₁ miktarları, en düşük 0.0252 ppb, en yüksek 0.0575 ppb ve ortalama olarak 0.0382 ppb şeklinde tespit edilmiştir.

Elde edilen değerler, Van Egmond and Paulsch (1986) tarafından yoğurt örneklerinde saptanan değerlerden düşük, Wiseman and Marth' ın (1983b) incelemeye aldıkları yoğurt örneklerinden elde ettikleri değerlere ise yakın çıkmıştır. Yoğurt örneklerindeki AFM₁ miktarlarının kazan sütlerindeki oranı % 88 - 154 arasında değişmiş, ortalama değer ise % 113 olarak tespit edilmiştir. Buna göre, analiz edilen yoğurt örneklerinde saptanan ortalama AFM₁ konsantrasyonları, kazan sütlerindeki göre % 13 daha yüksek çıkmıştır. Yoğurt örneklerinde saptanan bu artışın AFM₁ miktarında meydana gelen gerçek bir artış olmadığı, bunun daha çok yoğurt örnekleri üzerinde gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminin etkin olmasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Benzer sonuçlar Van Egmond and Paulsch (1986) tarafından da rapor edilmiştir. Ancak, iki yoğurt örneğinden elde edilen değerler kazan sütlerine göre daha düşük bulunmuştur (% 5 - 12). Bu farklılıklar, genellikle kullanılan sütün bileşimlerindeki değişkenlikten veya yoğurt yapımında kullanılan starter kültürlerin farklı etkilerinden ileri geldiği söylenebilir (Wiseman and Marth 1982b).

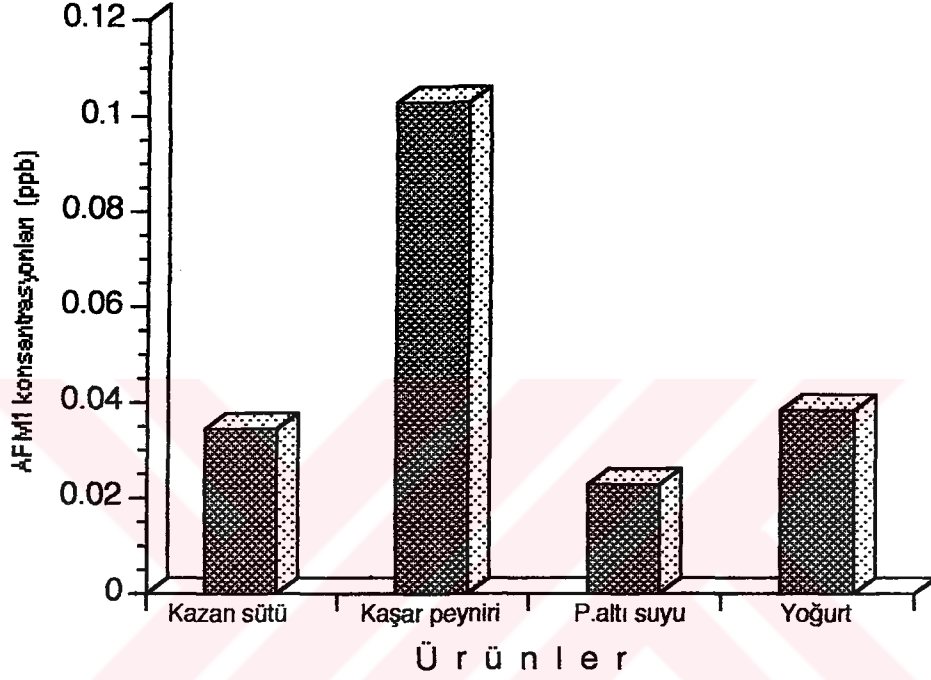
Kaşar peyniri örneklerinde en düşük AFM₁ konsantrasyonu 0.0700 ppb, en yüksek 0.1600 ppb ve ortalama 0.1027 ppb düzeyinde bulunmuştur. Elde edilen ortalama değerler, Piva et al'ın (1985) İtalya pitasasından topladıkları çeşitli peynir örneklerinden elde ettikleri AFM₁ değerlerine yakın çıkmıştır. Kaşar peynirine ait AFM₁ değerleri, kazan sütlerinde elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında, peynir örneklerinde saptanan ortalama AFM₁ miktarı kazan sütü örneklerine göre 3.01 kat daha yüksek

olduğu görülmektedir. Saptanan bu değer, Brackett and Marth' ın (1982a) Parmesan ve Mozzerella peynirlerinde buldukları değerlerden düşük, Brackett et al'ın (1982), Brick ve Limburger peynirlerinde tespit ettikleri değerlerden yüksek, Brackett and Marth'ın (1982b) Cheddar peyniri ile Buchner'ın (1977) Taze peynir, Tilsit ve Camembert peynirlerinde elde ettikleri değerlere yakın çıkmıştır. Sonuçların farklı olmasında değişik işleme metodları ve uygulanan sıcaklık normlarının rolü olduğu söylenebilir.

Kaşar peynirine ait peyniraltı suyunda saptanan AFM₁ miktarları ise, en düşük 0.0150 ppb, en yüksek 0.0340 ppb ve ortalama olarak 0.0224 ppb düzeyindedir. Araştırmadan elde edilen ortalama değerler, Van Egmond and Paulsch 'un (1986) Gouda ve Dragacci et al 'ın (1995) Camembert peynirinden elde ettikleri değerlerden düşüktür. Kaşar peynirine ait peyniraltı suyunda saptanan ortalama AFM₁ konsantrasyonu, kazan sütlerine ait ortalama değerın % 65 ' i kadar olmuştur. Bu değer, Stoloff et al (1975), Van Egmond et al (1977) ve Blanco et al (1988) tarafından bulunan değerlere yakındır.

Kazan sütleri, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunda saptanan ortalama AFM₁ miktarlarına ait değişim Şekil 4.3' te verilmiştir. Burada görüldüğü gibi kazan sütleri ile yoğurtta tespit edilen ortalama AFM₁ miktarları arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Bunun nedeni, AFM₁' in stabilitesi üzerinde asidik ortamın pek fazla etkili olamamasından kaynaklanmaktadır. Benzer durum, Wiseman and Mart (1983a) tarafından da ortaya konmuştur. Buna karşılık peyniraltı suyunda, ortalama % 35' lik bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum AFM₁'in yarı polar ve serum proteinlerine ilgisinin az oluşuyla izah edilebilir (Applebaum et al 1982). Kaşar peyniri örneklerinde ise ortalama 3.01 katlık bir yükselme olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar; Brackett et al'ın (1982)

Brick ve Limburger peynirleri ile Brackett and Marth'in (1982a) Parmesan ve Mozzarella peynirleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda da elde edilmiştir. Bunun sebebi daha önce beyaz peynirde açıklandığı gibi toksinin kazeine duyduğu ilgiden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.3. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunda saptanan AFM1 konsantrasyonlarındaki değişim

Bu ürünlerden elde edilen AFM₁ miktarlarındaki farklılığı istatistiksel olarak önemli olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.11' de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunda saptanan AFM₁ miktarlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F
Ürünler	3	35299	11766.33	29.51 xx
Hata	32	12757	398.65	
Genel	35	48056		

xx: p<0.01 düzeyinde önemli

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri ve peyniraltı suyunun AFM₁ içeriklerindeki farklılık $p<0.01$ düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılığın hangi ürünler arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise, Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Kazan sütü, yoğurt, kaşar peyniri, peyniraltı suyunda saptanan AFM₁ miktarları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları

Ürünler	Ortalamalar Arası Fark
Kazan sütü - Yoğurt	4.1
Kazan sütü - Kaşar peyniri	68.9 xx
Kazan sütü - Peyniraltı suyu	11.7
Yoğurt - Kaşar peyniri	64.5 xx
Yoğurt - Peyniraltı suyu	15.8
Kaşar peyniri - Peyniraltı suyu	80.3 xx

xx: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.15' da verilen ürünler arası farklar incelendiğinde anlaşılacağı gibi; kazan sütü, yoğurt ve peyniraltı suyunun AFM₁ içerikleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Buna karşılık, kazan sütü - kaşar peyniri, yoğurt - kaşar peyniri ve kaşar peyniri - peyniraltı suyunun AFM₁ içerikleri arasındaki farklar $p<0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılıkların sebepleri daha önce açıklanmıştır.

4.2.3. Üçüncü Grup Kazan Sütlerinden Yapılan Ürünler

Üçüncü grup kazan sütlerine ait AFM₁ değerleri Çizelge 4.13.'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği üzere kazan sütlerinde saptanan en düşük AFM₁ miktarı 0.0357 ppb, en yüksek 0.0568 ppb ve ortalama 0.0443 ppb'dir. Bu grup kazan sütlerinden imal edilen krema örneklerinden elde edilen AFM₁ miktarları ve geçiş oranları Çizelge 4.13.' de verilmiştir. Çizelgedeki verilerin incelenmesinden anlaşılacağı gibi, kremada en düşük AFM₁ miktarı 0.0213 ppb, en yüksek 0.0357 ppb ve ortalama 0.0285 ppb

değerlerini almıştır. Bulunan değerler, literatürle karşılaştırıldığında, Wiseman et al (1983) tarafından kremada ortaya konulan değerlerden düşük, Van Egmond and Paulsch (1986) tarafından elde edilen değerlere ise yakın çıkmıştır. Kremada tespit edilen AFM₁ miktarı, kazan sütlerindeki ortalama olarak % 36 daha düşük bulunmuştur. Bu değer Van Egmond and Paulsch (1986) tarafından bulunan değerlere yakın, Wiseman et al (1983) tarafından bulunan değerlerden ise düşüktür. Bunun nedeni çeşitli ürünlere işlenen kazan sütlerindeki AFM₁ düzeylerinin ve işleme tekniklerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Yousef and Marth 1989).

Çizelge 4.13. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM₁ konsantrasyonları ve geçiş oranları

Örnek No	Kazan Sütü AFM ₁ (ppb)	Ü R Ü N L E R							
		K r e m a		Yağsız Süt		T e r e y a ğ ı		Y a y ı k a l t ı	
		AFM ₁ (ppb)	GO (%)	AFM ₁ (ppb)	GO (%)	AFM ₁ (ppb)	GO (%)	AFM ₁ (ppb)	GO (%)
1	0.0568	0.0317	55	0.0583	102	0.0166	29	0.0451	79
2	0.0493	0.0357	72	0.0500	101	0.0151	30	0.0407	82
3	0.0357	0.0285	79	0.0375	105	0.0135	37	0.0315	88
4	0.0362	0.0213	58	0.0400	110	0.0138	38	0.0286	79
5	0.0438	0.0256	58	0.0441	100	0.0154	35	0.0392	89
En düşük	0.0357	0.0213	55	0.0375	100	0.0135	29	0.0286	79
En yüksek	0.0568	0.0357	79	0.0583	105	0.0166	38	0.0451	89
Ortalama	0.0443	0.0285	64	0.0459	103	0.0148	33	0.0370	83

Yağsız sütte saptanan en düşük AFM₁ miktarı 0.0375 ppb, en yüksek 0.0583 ppb ve ortalama 0.0459 ppb' dir. Bulunan bu değerler aynı üründe Wiseman et al' un (1983) bulduğu değerlerden düşük Van Egmond and

Paulsch 'un (1986) elde ettikleri değerlere yakın çıkmıştır. Yağsız sütlerdeki AFM₁ konsantrasyonu kazan sütlerindeki ortalama olarak % 3 kadar daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi, yağsız sütteki kazein oranının kazan sütlerindeki göre nisbeten daha yüksek olması, dolayısıyla toksinin bu üründe daha fazla tutunmasıyla izah edilebilir (Applebaum et al 1982). Elde edilen bu değer, Van Egmond and Paulsh 'un (1986) verdikleri değerlere yakın, Wiseman et al (1983) tarafından bulunan değerlerden düşüktür. Farklılık, elde edilen yağsız sütülerin içerdikleri yağ oranlarının değişik olmasıyla açıklanabilir (Wood 1991).

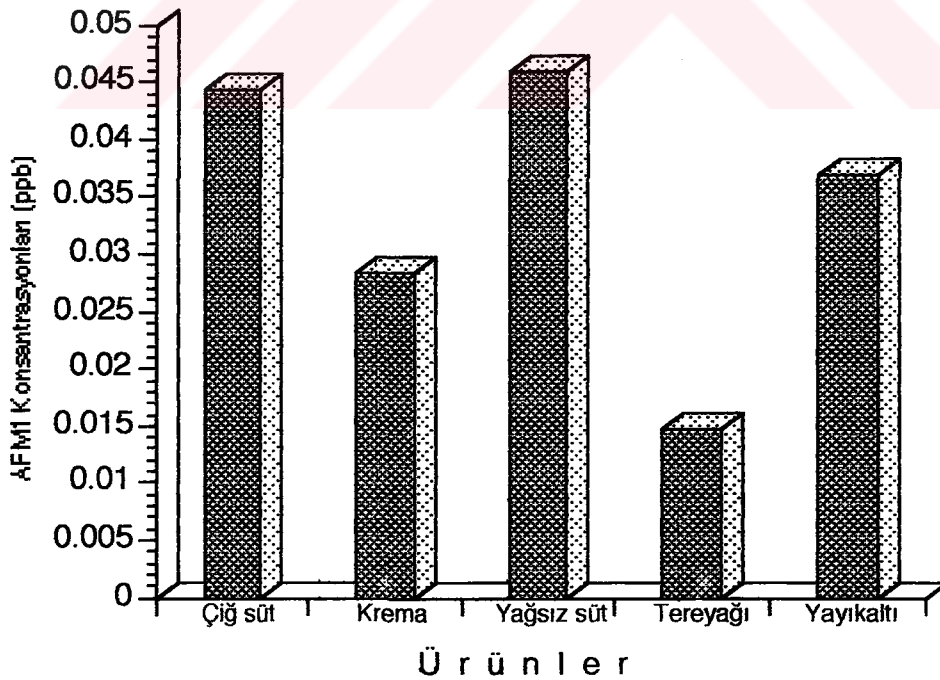
Tereyağı örnekleri için elde edilen AFM₁ miktarları, en düşük 0.0135 ppb, en yüksek 0.0154 ppb ve ortalama 0.0148 ppb şeklindedir. Saptanan AFM₁ miktarları, Van Egmond and Paulsh (1986) tarafından verilen değerlerden düşüktür. Tereyağı için saptanan AFM₁ miktarları kazan sütlerine göre % 62 - 71 oranları arasında daha düşük bulunmuştur. Bu durumun, tereyağı yapımı esnasında uygulanan işlemlerdeki farklılıklardan kaynaklandığı söylenbilir.

Yayıktında saptanan en düşük AFM₁ miktarı 0.0286 ppb, en yüksek 0.0451 ppb ve ortalama 0.0370 ppb düzeyindedir. Buna ilaveten, yayıktından elde edilen AFM₁ miktarı kazan sütlerindeki ortalama % 83' ü kadardır. Bulunan bu değerler, Grant and Carlson (1971) ve Stublefield and Shannon (1974) tarafından bulunan değerlere benzer, Wisemann et al 'ın (1983) elde ettikleri değerlerden yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Bilindiği gibi krema yapımı, sıvı faz içindeki yağ zerreciklerinin konsantre edilmesi sebebiyle sütteki sulu fazın bir kısmının ayrılmasını kapsamaktadır. Kremadan tereyağı yapımı ise, yayıklama işlemi esnasında yağ zerreciklerinin etrafındaki protein zarın parçalanması sonucu birbirine yapışması ve serum kısmının ayrılmasından ibarettir. AFM₁, kimyasal yapısından dolayı sütün sulu fazında bulunmakta, ve kazeine olan

ilgisinden dolayı da bu protein fraksiyonuna adsorbe olmaktadır. Bu durum; kremanın, imal edildiği sütte, tereyağının ise kremadan daha düşük oranlarda AFM₁ içermesine sebep olmaktadır. Bir çok araştırma sonucu AFM₁ 'in krema ve tereyağına izah edildiği şekilde geçtiğini ortaya koymaktadır (Yousef and Marth 1989).

Analiz edilen ürünlerdeki AFM₁ konsantrasyonlarının ürünlere göre dağılımı Şekil 4.4' de verilmiştir. Şekilden de izlenebileceği gibi kazan sütleri ile yağsız sütlerin AFM₁ içerikleri arasında önemli bir fark gözükmemektedir. Buna karşılık krema ve tereyağında saptanan AFM₁ miktarlarının kazan sütlerine göre oldukça düşük, yayıkaltı örneklerindeki ortalama AFM₁ miktarı ise kazan sütlerindeki yakını olduğu anlaşılmaktadır. Nitekim yapılan istatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar da bu bulguları doğrulamaktadır.



Şekil 4.4. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM₁ konsantrasyonlarındaki değişim

Üçüncü grup kazan sütlerinden elde edilen ürünlerde saptanan AFM₁ miktarları ve geçiş oranlarındaki farklılığın belerlenmesi amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.14' de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM₁ miktarlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F
Ürünler	4	3275.05	818.76	17.92 xx
Hata	20	913.85	45.69	
Genel	24	4188.86		

xx: p<0.01 düzeyinde önemli

yapılan istatistiksel analizler sonucunda ürünlerde saptanan AFM₁ arasındaki farklılık p<0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Farklılığın hangi ürünler arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.15' de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Kazan sütü, krema, yağsız süt, tereyağı ve yayıkaltında saptanan AFM₁ miktarları arasındaki farkların Duncan testi sonuçları

Ürünler	Ortalamalar Arası Fark
Kazan sütü - krema	15.80 xx
Kazan sütü - Yağsız süt	1.62
Kazan sütü - Tereyağı	24.48 xx
Kazan sütü - Yayıkaltı	7.34
Krema - Yağsız süt	17.42 xx
Krema - Tereyağı	13.68 xx
Krema - Yayıkaltı	8.46
Yağsız süt - Tereyağı	31.10 xx
Yağsız süt - Yayıkaltı	8.96 x
Tereyağı - Yayıkaltı	22.14 xx

xx: p<0.01 düzeyinde önemli

x: p<0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.15.'deki ürünler arası farklar incelendiğinde; kazan sütü, yağsız süt, yayıkaltı ve kremanın AFM₁ içerikleri arasındaki farkların istatistiksel olarak önemsiz çıktığı görülmektedir. Buna karşılık, kazan sütü-krema, kazan sütü-tereyağı, krema-yağsız süt, krema-tereyağı, yağsız süt-tereyağı ve tereyağı-yayıkaltının AFM₁ içerikleri arasındaki farklar $p<0.01$ düzeyinde, yağsız süt-yayıkaltı arasındaki fark ise $p<0.05$ düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılığın en önemli sebepleri, daha önce de değinildiği gibi AFM₁'in yarı polar, yağda çözünmez bir madde özelliği taşıması ve protein fraksiyonuna olan ilgisidir. Böylece, bu faktörlerin ortak etkileri sonucu olarak, sulu faz ve protein fraksiyonuna göre yağ fazındaki (tereyağı ve krema gibi) AFM₁ miktarı daha düşük çıkmaktadır (Grant and Carlson 1971, Yousef and Marth 1989, Wood 1991, Van Egmond 1994). Varyans analizi ve Duncan testi sonuçları da bu hükmü doğrulamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmadan elde edilen bulgulara göre;

1. Analiz edilen 90 adet çiğ süt örneğinden 79'unda (% 87.77) AFM₁ olduğu tespit edilmiştir. Bu örneklerin hiç birinde, AFM₁ miktarı ülkemizde kabul edilen maksimum 0.5 ppb tolerans düzeyini aşmamıştır. Ancak pozitif örneklerin % 42.22'si Avrupa Topluluğu ve dünyanın bir çok ülkesi tarafından kabul edilen 0.05 ppb maksimum tolerans düzeyinin üzerinde bir değer almıştır.

2. AFM₁ içeren kazan sütlerinin pastörize edilmesi sonucu, AFM₁ miktarında % 5-17 arasında bir azalma gözleendiği, ortalama düşüşün ise % 8 civarında olduğu saptanmıştır. Ancak bu azalma istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

3. Analiz edilen beyaz peynir örneklerindeki ortalama AFM₁ artışının kazan sütlerindeki göre 2.5 kat daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu artış, istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Kazan sütlerindeki AFM₁ miktarının ortalama olarak % 52'si peynir altı suyuna geçtiği ve ortalamalar arası farkın $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır.

4. Yoğurtlarda saptanan AFM₁ miktarının imal edildikleri kazan sütlerindeki göre, ortalama olarak % 13 daha fazla olduğu tespit edilmiştir; ancak kazan sütleriyle yoğurt örnekleri arasındaki ortalama farklar önemsiz çıkmıştır.

5. Kaşar peyniri örneklerinde tespit edilen AFM₁ miktarı, kazan sütlerindeki göre, ortalama olarak 3.01 kat daha yüksek çıkmış ve bu artış $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Kaşar peynir altı suyunda saptanan ortalama AFM₁ miktarı ise, kazan sütlerindeki % 65'i kadardır. Kazan sütü ve peyniraltı suyuna ait ortalamalar arası fark ise, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

6. Analiz edilen krema örneklerindeki ortalama AFM₁ miktarı, kazan sütlerindeki % 64'ü kadar olup, her iki ürüne ait ortalamalar arası fark $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir. Kazan sütlerine göre yağsız sütte ortalama % 3'lük bir artış gözlenmiş olup, bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ortaya konmuştur.

7. Tereyağında saptanan AFM₁ miktarlarının, kazan sütlerine göre, ortalama % 67 oranında daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu düşüşün $p < 0.01$ düzeyinde önemli olduğu anlaşılmıştır. Yayıltı altında saptanan AFM₁ 'in ise, kazan sütlerindeki göre ortalama % 17 kadar daha düşük olduğu, fakat bunun istatistiksel yönden önemli olmadığı belirlenmiştir.

8. Araştırmadan elde edilen sonuçlar, süt ve ürünlerinde AFM₁ oluşumunun toplum sağlığı açısından üzerinde durulması gerekli düzeylerde olduğunu göstermektedir. Bir çok ülke standartlarında yer alan maksimum tolerans düzeyinin üzerinde bulunan bu miktarların, sakıncalar doğurmayacak değerlere düşürülmesi zorunlu görülmektedir. Çünkü tespit edilen toksinin, kanserojenik bir madde olmasından başka, insan sağlığı üzerinde olumsuz bir çok etkileri vardır.

9. Halk sağlığının korunması açısından büyük önem arzeden bu konuda alınacak ilk tedbir yemlerde oluşan aflatoksinlerin kontrol altına alınmasıdır. Çünkü, kontamine olmuş yemlerin süt hayvanları tarafından tüketilmesinden sonraki çabalar, kontamine olmuş ürünün içerdiği aflatoksin; bisüfitlerle muamele, ultraviyole ışığına maruz bırakma gibi, bazı yöntemlerle parçalama işlemlerinden ibarettir. Bu tip işlemler ise, hem pahalı ve hem de tüketime sunulacak ürünler üzerinde birtakım olumsuz etkilere sahip bulunmaktadır. Dolayısıyla, sütlerde oluşan AFM₁ miktarının minimuma indirilmesinin en kolay ve kestirme yolu, yemlerde AFB₁ oluşumunu engellemekten geçmektedir. Bunun için de, bir çok ileri Batı ülkelerinde olduğu gibi, süt hayvanlarına verilen yemlerin iyi kontrol

edilmesi ve yemlerde bulunmasına izin verilen AFB₁ miktarının daha aşaşılara dūřürölmesi gerekmektedir. Ülkemizde yemlerde bulunmasına izin verilen en yüksek AFB₁ miktarı, karma yemler için 50 ppb, tarım ürünleri ve diğer gıda maddeleri için 20 ppb' dir. Ülkemizde kabul edilen tolerans değeri süt ve süt ürünleri için 0.5 ppb düzeyi olup, bebek ve çocukların tüketimine sunulan süt ve süt ürünleri için de aynı miktar geçerlidir. Bu düzey (0.5 ppb) değil bebek ve çocuklar için, yetişkinler için dahi tehlikeli bir değer olarak kabul edilmektedir. Bugün tedavisi mümkün olmayan hastalıklara sebep olmasından dolayı, bazı ülkeler süt ve süt ürünlerindeki AFM₁ 'in tolerans değerini sıfır olarak kabul etmişlerdir. Ancak, yapılan araştırmalar bunun pek mümkün olamayacağını gösterdiğinden, genel olarak kabul gören tolerans değeri 0.05 ppb düzeyidir. Bunun yanısıra bebek ve çocukların tüketimine sunulan süt ve sütlü mamüller için belirlenen tolerans değeri ise, genel olarak 0.01 ppb şeklinde kabul edilmiştir. Bundan dolayı bu tolerans değeri A.B.D ve ülkemizin dışında hemen hemen terk edilmiş ve daha düşük tolerans değerleri kabul edilmiştir. Yüksek tolerans değeri ülkemiz dışında bir çok ülkede terk edilmiş ve bunun yerine insan sağlığına zararlı etkide bulunmayacak standart değerler yürürlüğe konulmuştur. Ülkemiz açısından konunun bir başka önemi ise, denetim ve kontrollerin yetersizliğidir. Ayrıca, bu konu üzerindeki bilimsel araştırma ve incelemelerin azlığı da göz önünde bulundurulacak olursa, problemin ne ölçüde bir endişe kaynağı olduğu ortadadır. Bütün bu sebeplerden dolayı, süt ve mamüllerindeki AFM₁ miktarının minimum düzeylerde tutulabilmesi için, süt hayvanlarına verilen yemlerin depolanma koşulları uygun hale getirilmeli ve gerekli kontroller yapılmalı, süt üreticileri bu konuda bilgilendirilmeli ve bilinçlendirilmelidir.

10. Yapılan araştırmalar başlangıç kabul edilerek, bu konudaki bilimsel araştırmalar daha uzun süreli ve kapsamlı yapılmalı, ülkemizdeki

mevcut durum, sorunlar ve çözüm önerileri her yönüyle ortaya konulmalıdır. En önemlisi, bu konudaki mevzuat, bir çok ileri Batı ülkelerinin de kabul ettiği tolerans değerlerine göre yeniden düzenlenmelidir.

11. Belirtilen bu hususlar ilgili ve yetkililerce dikkate alınmadığı ve konuya gereken önemin verilmemesi halinde , toplum sağlığını yakından ilgilendiren bu konu önemini korumaya devam edecektir.



6. ÖZET

SÜTLERDE AFLATOKSİN M₁ OLUŞUMU VE ÜRÜNLERE GEÇİŞİ ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

Bu çalışmada, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Fabrikasına gelen sütlerde AFM₁ oluşumu ve bu sütlerden imal edilen çeşitli ürünlere geçiş durumu incelenmiştir. Araştırma, 4 farklı köyden şansa bağlı olarak seçilen 15 ayrı üreticiden 15 Mart - 1 Haziran (1994) döneminde, 2'şer hafta arayla alınan toplam 90 adet çiğ süt örneği ile, aynı dönemde fabrikaya gelen kazan sütleri ve bu sütlerin işlendiği pastörize süt, yoğurt, beyaz peynir, kaşar peyniri peyniraltı suları dahil, krema, yağsız süt ve tereyağı ve yayıkaltı'ndan alınan 93 adet örnek olmak üzere toplam 183 örnek üzerinde yapılmıştır. Araştırmanın istatistiksel değerini ortaya koymak için, sonuçlar Varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuş, elde edilen sonuçlar, daha önce bu konuda yapılan çalışma sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Bulgulara göre;

1. AFM₁ yönünden pozitif çıkan çiğ süt örneklerinin aldığı değerler 0.0125 - 0.1236 ppb düzeyleri arasında değişmiş olup, genel ortalama 0.0468 ppb olmuştur.

2. Sütlerde elde edilen sonuçlar, üretici ve köy ortalamalarına göre değerlendirildiğinde; en düşük ortalama değer, 0.0225 ppb düzeyi ile 6 nolu üreticiden alınan süt örneklerinde, en yüksek ortalama değer ise 0.0698 ppb düzeyi ile 15 nolu üreticiden alınan süt örneklerinde tespit edilmiştir. Araştırmaya konu olan köyler içerisinde en yüksek ortalama değer 0.0526 ppb düzeyi ile 3 nolu köyden alınan sütlerde, en düşük ortalama değer ise,

0.0425 ppb düzeyi ile 2 nolu köyden alınan örneklerde bulunmuştur. Üretici ve köy ortalamaları arasındaki farklar, istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

3. Analiz peryotlarına göre, en yüksek ortalama değer 0.0597 ppb düzeyi ile 1 Mayıs'da alınan örneklere ait olup bunu sırasıyla 15 Nisan (0.0593 ppb), 1 Nisan (0.0544 ppb), 15 Mayıs (0.0468 ppb), 15 Mart (0.0368 ppb) ve 1 Haziran'da (0.0181 ppb) alınan örneklere ait ortalama değerler izlemiştir.

4. Analiz edilen pastörize süt örneklerinde saptanan en düşük AFM₁ miktarı 0.0270 ppb, en yüksek 0.0534 ppb ve ortalama olarak 0.0435 ppb düzeyindedir. Pastörize süt örnekleri ile kazan sütlerinin AFM₁ içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

5. Beyaz peynir örneklerinde bulunan en düşük AFM₁ miktarı 0.0766 ppb, en yüksek 0.1623 ppb ve ortalama 0.1187 ppb' dir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kazan sütü ile beyaz peynir örneklerinin AFM₁ miktarları arasındaki fark $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Beyaz peynire ait peyniraltı suyu örneklerinde en düşük AFM₁ miktarı 0.0177 ppb, en yüksek 0.0337 ppb ve ortalama 0.0243 ppb şeklinde saptanmıştır. Kazan sütleri ile peyniraltı suyu örneklerinin AFM₁ oranları arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemli çıkmıştır.

6. Yoğurt örneklerinde tespit edilen en düşük AFM₁ miktarı 0.0252 ppb, en yüksek 0.0575 ppb ve ortalama 0.0382 ppb düzeyindedir. Yoğurt örnekleri ile kazan sütlerinin AFM₁ değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz çıkmıştır.

7. Kaşar peyniri örneklerindeki en düşük AFM₁ miktarı 0.0700 ppb, en yüksek 0.1600 ppb ve ortalama 0.1027 ppb şeklindedir. Kazan sütlerine göre, kaşar peyniri örneklerinde tespit edilen AFM₁ miktarı $p < 0.01$ düzeyinde önemli çıkmıştır. Kaşar peynirine ait peyniraltı suyu örneklerinde saptanan en düşük AFM₁ miktarı 0.0150 ppb, en yüksek 0.0340

ppb ve ortalama 0.0224 ppb düzeyindedir. Kazan sütü ile peyniraltı suyu örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

8. Yapılan analizler neticesinde krema örneklerinde en düşük 0.0213 ppb, en yüksek 0.0357 ppb ve ortalama 0.0285 ppb düzeyinde AFM₁ saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar kazan sütlerine göre değerlendirildiğinde ürünler arasındaki fark $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

9. İncelenen yağsız süt örneklerinde bulunan en düşük AFM₁ miktarı 0.0375 ppb, en yüksek 0.0583 ppb ve ortalama 0.0459 ppb düzeyindedir. Kazan sütü ile yağsız süt örnekleri arasındaki fark önemsizdir.

10. Analiz edilen tereyağı örneklerinde en düşük AFM₁ miktarı 0.0135 ppb, en yüksek 0.0154 ppb ve ortalama 0.0148 ppb düzeyinde tespit edilmiştir. Kazan sütleri ile tereyağı örnekleri arasındaki fark $p < 0.01$ düzeyinde önemli çıkmıştır. Yayıkaltı örneklerinde tespit edilen en düşük AFM₁ miktarı 0.0286 ppb, en yüksek 0.0451 ppb ve ortalama 0.0370 ppb düzeyindedir. Yayıkaltı rnekleri ile kazan sütü arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

11. Kazan sütünün dışında; pastörize süt-peyniraltı suyu (beyaz peynire ait), yoğurt-peyniraltı suyu (kaşar peynirine ait) ve krema-yayıkaltı'nın ortalama AFM₁ konsantrasyonlarına ait farklar önemsiz çıkarken, yağsız süt ile yayık altının AFM₁ ortalamaları arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

7. SUMMARY

A STUDY ON THE OCCURRENCE OF AFLATOXIN M₁ IN MILK AND ITS CARRY - OVER LEVEL IN THE MILK PRODUCTS

In this study, it was aimed to determine the level of aflatoxin M₁ (AFM₁) in the raw milk samples obtained from the dairy plant of Agricultural Faculty of Yüzüncü Yıl University. In addition, the fate and carry - over level of AFM₁ were searched in milk products manufactured by the same dairy plant. The research was conducted on the 90 milk samples obtained from 15 milk producers randomly chosen from 4 different villages to determine the concentration of AFM₁ between the period of 15 March and 1 June of 1995. The milk samples were taken in every two-week interval. Also, bulk milk and milk products (total 93 samples) produced from the same bulk milk, such as pasteurized milk, yogurt, white-pickled cheese, kashar cheese, whey, cream, skim milk, butter and buttermilk were analyzed to determine the carry-over level of AFM₁. The obtained results were evaluated with Analysis of Variance and Duncan multiple comparisons tests statistically.

The results obtained from the research are as the following;

1. The concentration of AFM₁ in positive raw milk samples changed between 0.0125 - 0.1236 ppb, and the average was 0.0468 ppb.

2. When producer's milk samples were evaluated, minimum AFM₁ concentration was obtained from 6th producer's milk samples as 0.0225 ppb averagely, and the maximum value was found from 15th producer's milk samples as 0.0698 ppb. On the other hand, minimum AFM₁ concentration (0.0425 ppb) was found from the second village's milk samples and maximum AFM₁ concentration was obtained from 3rd village as 0.0526 ppb

averagely. Differences between average AFM₁ concentrations of producer's milk samples were not statistically significant. The same result was found for those of village's milk samples.

3. When analysis periods were taken into consideration, maximum AFM₁ concentration (0.0597ppb) was found from the samples of May 1st, and it was followed by average values of the samples obtained from April 15th (0.0593 ppb), April 1st (0.0544 ppb), May 15th (0.0468 ppb), March 15th (0.0368 ppb), and June 1st (0.0181 ppb) respectively.

4. Pasteurized milk samples examined had 0.0270 ppb AFM₁ concentration as minimum, 0.0534 ppb as maximum, and 0.0435 ppb as average. Differences were insignificant between contents of AFM₁ of bulk milk and pasteurized milk samples.

5. AFM₁ concentrations of white-pickled cheese samples changed between 0.0766 and 0.1623 ppb. Average was 0.1187 ppb. It was found that cheese samples had more AFM₁ concentration than bulk milk samples, and differences was significant statistically ($p < 0.01$). AFM₁ concentrations of whey obtained from white-pickled cheese were between 0.0177 and 0.0337 ppb. Average was 0.0243 ppb. Differences were found significant between concentrations of AFM₁ of the whey and bulk milk samples statistically ($p < 0.05$).

6. Minimum AFM₁ concentration of yogurt samples was 0.0252 ppb, maximum was 0.0575 ppb, and average was 0.0382 ppb. Differences was not significant between AFM₁ contents of yogurt and bulk milk samples statistically.

7. Range of AFM₁ concentrations of Kashar cheese samples was between 0.0700 ppb and 0.1600 ppb. The average was found as 0.1027 ppb. It was understood that Kashar cheese samples had more AFM₁ rate than bulk milk samples, and the differences were significant statistically ($p < 0.01$). The

whey obtained from Kashar cheese had 0.0150 ppb AFM₁ concentration as minimum, 0.0340 ppb as maximum, and 0.0224 ppb as average. Differences were not significant between the contents of the whey and bulk milk samples statistically.

8. Cream samples examined had 0.0213 ppb AFM₁ concentration as minimum, 0.0357 ppb as maximum, and 0.0285 ppb as average. Cream samples had less AFM₁ concentration than bulk milk samples, and differences was significant in the level of $p < 0.01$ statistically.

9. Skim milk samples examined during analysis period had 0.0375 ppb AFM₁ level as minimum, 0.0583 ppb as maximum, and 0.0459 ppb as average. It was not found any differences between AFM₁ contents of skim milk and bulk milk samples statistically.

10. AFM₁ concentrations changed between 0.0135 ppb and 0.0154 ppb in butter samples, and average was 0.0148 ppb. Butter samples analyzed had less AFM₁ concentration than bulk milk samples, and the differences were significant statistically ($p < 0.01$). On the other hand, AFM₁ concentration changed between 0.0286 ppb and 0.0451 ppb in buttermilk samples. Average was found as 0.0370 ppb. No difference was found between the contents of buttermilk and bulk milk samples statistically.

11. Moreover, differences was not found between AFM₁ concentrations of pasteurized milk and whey of white-pickled cheese, yogurt and whey of kashar cheese, and cream and buttermilk samples statistically. In contrast, differences was significant between AFM₁ concentrations of skim milk and buttermilk samples statistically ($p < 0.05$).

KAYNAKLAR

- ALLCROFT, R. and CARNAGHAN, R. B. A. 1963. Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals feed toxic groundnut meal. *Vet. Res.* 75: 259-263.
- ANON, 1990. Aflatoxin kontrolüne dair tebliğ. *Resmi Gazete* 20506:21.
- ANON. 1986. Aflatoxin M₁. FAO food and nutrition paper 141. *Manuals of food quality control, 7. food analysis: general techniques, additives, contaminants and composition*, p. 85-202.
- ANON. 1992. Aflatoxin food protection report. 8 (10): 1. Publ. Mountly by Charles Felix Assoc.
- ANON. 1993. Technical profile: the quantitative advantage for mycotoxin testing. *World Grain the Inter. Mag. Grain, Flour and Feed*.
- APPLEBAUM, R. S. and MARTH, E. H. 1982. Inactivation of aflatoxin M₁ in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase. *J. Food Prot.* 45 (6): 557-560.
- APPLEBAUM, R. S., BRACKET, R. E., WISEMAN, D. V. and MARTH, E. H. 1982. Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk product-a review. *J. Food Protec.* 45 (8): 752-777.
- BENTO, H., FERNANDES, A. M. and BARBOSA, M. 1990. Detection of aflatoxin M₁ in goat milk. *Brief Comm. XXII Inter. Dairy Congress, Montreal*, vol. 1, 26. Brussels, IDF.
- BLANC, M., KARLESKIND, A. 1981. Contamination of milk and dairy products by aflatoxin M₁ in France. *Lait*, 61 (608): 481-493.
- BLANCO, J. L. DOMINGUEZ, L., LUCIA, E. G., GARAYZABAL, J. F. F. GOYACHE, J. and SUAREZ, G. 1988. Behavior of aflatoxin during the manufacture, ripening and storage of Manchego type cheese. *J. Food Sci.* 53 (5): 1373-1376.

- BRACKETT, R. E. and MARTH, E. H. 1982a. Fate of aflatoxin M₁ in Parmesan and Mozzarella cheese. *J. Food Prot.* 45 (7): 597-600.
- BRACKETT, R. E. and MARTH, E. H. 1982b. Fate of aflatoxin M₁ in Cheddar cheese and in process cheese spread. *J. Food Prot.* 45 (6): 546- 552.
- BRACKETT, R.E., APPLEBAUM, R.S., WISEMAN, D.W. and MARTH, E.H. 1982. Fate of Aflatoxin M₁ in Brick and Limburger-like cheese. *J. Food Prot.* 45(6): 553-556.
- CATHEY, C. G., HUANG, Z. G., SARR, A. B., CLEMENT, B. A. and PHILILIPS, T. D. 1994. Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M₁ in milk. *J. Dairy Sci.* 77: 1223-1231.
- CHEN, J. and GAO, J. 1993. The Chinese total diet study in 1990. Part I. chemical contaminants. *J. AOAC Inter.* 76 (6): 1193-1205.
- CHORARSIA, H. K. and SINHA, R.K. 1994. Potential of the biological copntrol of aflatoxin contamination in developing peanut (*Arachish hypogaea L.*) by atoxigenic strains *Aspergillus flavus*. *J. Food Sci. Technol.* 31 (5): 362-366.
- DAĞOĞLU, G., KELEŞ, O. ve YILDIRIM, M. 1995. peynirlerde aflatoxin düzeylerinin ELISA testi ile araştırılması. *İst. Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, (Baskıda).
- DE IONGH, H., VLES, R. D. and VAN PELT, J. G. 1964. Investigation of the milk of mammals fed on aflatoxin containing diet. *Nature (London)*, 202: 466-467.
- DEVORE, J. and PECK, R. 1993. *Statiscs the exploration and analysis of data.* Duxpury Press. An Imprint of Wadsworth Publ. Comp. p. 1-1881. California.

- DOSAKO, S., KAMINOGAWA, S., TANEYA, S. and YAMAUCHI, K. 1980. Hydrophobic surface areas and net charges of α_{s1} -k casein and α_{s1} -k casein casein complex. J. Dairy Research 47 :123-129.
- DOYLE, M. P. and MARTH, E. H. 1978_a. Bisulfite degrades aflatoxin: effect of temperatures and concentration of bisulfite. J. Food Prot. 41 (10): 774-780.
- DOYLE, M. P. and MARTH, E. H. 1978_b. Bisulfite degrades aflatoxin: effect of citric acid and methanol and possible mechanism of degradation. J. Food Prot. 41 (11): 891-896.
- DRAGACCI, S. and FREMY, J. M. 1993. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk. Results of fifteen years. Sci. des Aliments, 13 (4): 711-722.
- DRAGACCI, S., GLEIZES, E., FREMY, J. M. and CANDLISH, A. A. G. 1995. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. Food Add. and Cont. 12 (1): 59-65.
- DURU, S. ve ÖZGÜNEŞ, H. 1984. Mikotoksinlerin insan sağlığı açısından önemi. Gıda, 9 (6): 341-349.
- GILBERT, J., SHEPHERD, M. J., WOLWORK, M. A. and KNOWLES, M. E. 1984. A survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in UK-produced in milk for the period 1981-1983. Food Additives and Contaminants, 1 : 1, 23-28.
- GRANT, D. W. and CARLSON, F. W. 1971. Partitioning behavior of aflatoxin M in dairy products. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 6: 521-524.
- HAGLER, W. M. Jr., HUTCHINS, J. E. and HAMILTON, P. B. 1982. Destruction of aflatoxin in corn with sodium bisulfite. J. Food Prot. 45 (14): 1287-1291.

- HAGLER, W. M. Jr., HUTCHINS, J. E. and HAMILTON, P. B. 1983. Destruction of aflatoxin B₁ with sodium bisulfite: isolation of the major product aflatoxin B₁S. *J. Food Prot.* 46 (4): 295-300.
- HANSEN, T. J. 1993. Quantitative testing for mycotoxins. *Amer. Assoc. Cereal Chem. Inc.* 38 (3): 346-348.
- HAYDAR, M., BENELLI, L. and BRERA, C. 1990. Occurrence of aflatoxins in Syrian foods and foodstuffs. *Food Chem.* 37 (4): 261-268.
- HEESCHEN, W., BLÜTHGEN, A. H. and HAHN, G. 1990. Aflatoxin M₁ in pasteurized market milk. *Brief Communications of the XXII Inter. Dairy Congress, Montreal, vol. 1, 131. Brussels. IDF.*
- HEESCHEN, W., BUETGEN, A. and NIJHUIS, H. 1983_b. Importance of feeds in contamination of milk with hexachlorocyclohexane and aflatoxin. *Deutsch Milch.* 34 (31): 1027-1030.
- HEESCHEN, W., NIJHUIS, H. and BLÜTHGEN, A. 1983_a. Aflatoxin M₁-formation, analysis, carry-over from feedstuffs and occurrence in milk. *Deutsch-Molkerei-Zeitung*, 104 (46): 1434 / 1437 - 1440.
- HOLZAPFEL, C. W., STEYN, P. S. and PURCHASE, I. F. H. 1966. Isolation and structure of aflatoxin M₁ and M₂. *Tetrahedron Letters*, 25: 2799-2803.
- JAY, J. M. 1992. *Modern Food Microbiology*. Van Nostrand Reinhold. p. 1-701. New York.
- KIERMEIER, F. and BUCNER, M. 1977. Distribution of aflatoxin M₁ in whey and curd during cheese processing. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 164: 82-86.
- KIERMEIER, F. and MASHALEY, R. 1963. Influence of raw milk processing on the AFM₁ content of milk products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 164: 183-187.

- KIERMEIER, F., REINDARDT, V. and BEHRINGER, G. 1975. Zom vorkommen von aflatoxinen in rahmilch. Dtsch. Lebensm-Rdsc. 71: 35-38.
- MACIO, M.L., MUNOZ, P. and EGUILEOR, I. 1992. Aflatoxin M₁ analysis of milk and dairy products of total diet in the Basque Country. In M.R.A., Margon, C.J., Smith, P.A. Williams (Edits). Food Safety and Quality Assurance: applications of immunoassay systems Elsevier Applied Science. p.115-118, London.
- MASRI, M.S., PAGE, J.R. and GARCIA, V.C. 1968. Analysis for aflatoxin M in milk. J.Assoc. Anal. Chem. 51(3):594-600.
- MASRI, M.S., PAGE, J.R. and GARCIA, V.C. 1969. Modification of method for aflatoxins in milk. J.Assoc. Anal. Chem. 52(3):641-643.
- MERTENS, D. R. 1979. Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In Interactions of mycotoxins in Animal Production, Proceedings of a Symposium, National Academy of Sci. p. 118-136. Washington D. C.
- OKUMURA, H., KAVAMURA, O., KISHIMOTO, S., HASEGAWA, A., SHERESTHA, S. M., OKUDA, K., OBATA, H., OKUDA, H., HARUKI, K., UCHIDA, T., OGASAWARA, Y. and UENO, G. 1993. Aflatoxin M₁ in Nepalese sera, quantified by combination of monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and ELISA. Carcinogenesis, 14 (6): 1233-1235.
- ÖZDEMİR, S. ve SERT, S. 1994. Gıda Mikrobiyolojisi Tatbikat Notları. A.Ü.Z.F. Yayınları 128. s. 1-109, Erzurum
- PIVA, G., PIETRI, A. and CARINI, E. 1985. Presence of aflatoxin M₁ in milk products. Riv. Soc. Ital. Sci. Alim. 14 (1): 59-62.

- PIVA, G., PIETRI, A., GALAZZI, L. and CURTO, O. 1987. Aflatoxin M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy. *Food Add. and Cont.* 5 (2): 133-139.
- POLZHOFER, K.P. 1977. Thermal stability of AFM₁. *Z. lebensm. Unters. Forsh.* 164: 80-81.
- PURCHASE, I. F. H. STEYN, M., RINSMA, R. and TUSTIN, R. C. 1972. Reduction of aflatoxin M content of milk by processing. *Food Cosmet. Toxicol.* 10: 383-387.
- QUINTAVALLA, S. and CASOLARI, A. 1985. Investigation into the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products. *Industria-Conserve* 60(2): 85-91.
- RATT, E. R. and SHANTHA, T. 1994. Incidence of aflatoxin in groundnut-based snack products. *J. Food Sci. Technol.* 31 (4): 327-329.
- RODRICKS, J. V. and STOLOFF, L. 1977. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food producing animals. In: J. V. Rodricks, C. W. Hessestine and M. A. Mehman (Edit.). *Mycotoxins in Human and Animal Health* Pathotox Pub. Inc. p. 67-79. Illionis.
- SIEBER, R. and BLANCH, B. 1978. Zur ausscheidung von aflatoxin M₁ in die milch und dessen vorkommen in milch und milchproducten-eine literaturübersicht. *Hygiene*, 69: 477-491.
- STAHR, H. M., PFEIFFER, R. L., IMERMAN, P. J. BORK, B. and HURBURGH, C. 1990. Aflatoxins-the 1988 outbreak. *Dairy - Food and Enviro. Station*, 10: 1, 15-17.
- STOLOFF, L. 1980. Aflatoxin M in perspective. *J. Food Protec.* 43 (3): 226-230.
- STOLOFF, L., TRUCKESS, M., HARDIN, N., FRANCIS, O. J., HAYES, J. R., POLAN, C. E. and COMPBELL, T. C. 1975. Stability of aflatoxin M₁ in milk. *J. Dairy Sci.* 58 (12): 1789-1793.

- STOLOFF, L., VAN EGMOND, H. P. and PARKS, D. L. 1991. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Add. and Cont.* 8 (2): 231-222.
- STUBBLEFIELD, R. D. 1979. The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products. *J. American Oil Chem. Soc.* 56: 800-802.
- STUBBLEFIELD, R. D. and SHANNON, G. M. 1974. Aflatoxin M₁ : analysis in dairy products and distribution in dairy food made from artificially contaminated milk. *J. Assoc. Anal. Chem.* 57: 847-851.
- TABATA, S., KAMURA, H., IBE, A., HASHIMOTO, H. LIDA, M., TAMURA, Y. and NISHIMA, T. 1993. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo: 1986-1990. *J. AOAC Inter.* 76 (1): 32-35.
- TUTELYAN, V. A., SOBOLEV, V. S., RYBAKOVA, N. V. and ELLER, K. I. 1989. A survey using normal phase HPLC of aflatoxins in domestic and important foods and dairy products in the USSR. *J. Toxicology, Toxin Reviews*, 8: 1-2, 375-387.
- VAN DER LINDE, J. A., FRENS, A. M., DE IONGH, M. and VLES, R. O. 1964. Inspection of from milk cows fed aflatoxin-containing groundnut meal. *Tijdschr.-Diergeneesk*, 89: 1082-1088.
- VAN EGMOND, H. P. 1989. Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. In: V. H. P. Egmond (Edit.). *Mycotoxins in Dairy Products*, Elsevier, p. 11-54. London and New York.
- VAN EGMOND, H. P. 1991. Mycotoxins. *Inter. Dairy Fed. Special Issue*, 9101, 131-145.
- VAN EGMOND, H. P. 1994. Aflatoxin in milk. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Vet. Agric. Sig. Acad. Press. Inc.* p. 365-381.
- VAN EGMOND, H. P. and PAULSCH, E. 1986. Mycotoxins in milk and milk products. *Neth. Milk Dairy J.* 40: 175-188.

- VAN EGMOND, 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. *Arch. Inst. Pasteur (Tunis)*. 3 (4): 381-390.
- VAN EGMOND, V. H. P. LEUSSINK, A. B. and PAULSCH, V.E. 1986. The determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder. *Bulletin of the Inter. Dairy Fed. (IDF)*, 207: 150-179.
- WISEMAN, D. W. and MARTH, E. H. 1983_a. Heat and acid stability of aflatoxin M₁ in naturally and artificially contaminated milk. *Milchwissenschaft*, 38: 464-466.
- WISEMAN, D. W. and MARTH, E. H. 1983_b. Behavior of aflatoxin M₁ in yoghurt, buttermilk and kefir. *J. Food Prot.* 46 (2): 115-118.
- WISEMAN, D. W., APPLEBAUM, R. S., BRACKET, R. E. and MARTH, E. H. 1983. Distribution and resistance to pasteurization of aflatoxin M₁ in naturally contaminated whole milk, cream and skim milk. *J. Food Prot.* 46 (6): 530-532.
- WOOD, G. E. 1989. Aflatoxins in domestic and imported foods and feeds. *J. AOAC*. 72 (4): 543-548.
- WOOD, G. E. 1991. Aflatoxin M₁ in: R. P. Sharma and D. K. Salunkhe (Edit.). *Mycotoxins and phytoalexins*. CRC Press. Inc. p. 145-164. Florida.
- YAYGIN, H. ve DEMİRYOL, E. 1980. Süt ve mamüllerinde aflatoxin. *Ege Üniv. Zir. Fak. Dergisi*, 17 (3): 99-111.
- YOUSEF, A. E. and MARTH, E. H. 1985. Degradation of aflatoxin M₁ in milk by ultraviolet energy. *J. Food Prot.* 48 (8): 697-698.
- YOUSEF, A. E. and MARTH, E. H. 1986. Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M₁ in raw or heated milk with and without added peroxide. *J. Dairy Sci.* 69: 2243-2247.

YOUSTE, A. E. and MARTH, E. H. 1989. Stability and degradation of aflatoxin M₁ . In. H. P. Van Egmond (Edit.). Mycotoxins in Dairy Products, Elsevier, p.127-161. London.



ÖZGEÇMİŞ

1960 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum' da tamamladı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü'nden 1987 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 1988-1990 yılları arasında, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamlayarak Yüksek Mühendis ünvanını aldı. Ekim 1990 ' da aynı üniversitede doktora başladı.

1988 yılından beri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve dört çocuk babasıdır.