

**Aflatoksin M1 ve Patulin Miktarlarının Süt ve Elma Suyunda
Vurgulu Hidrostatik Basınç ile Düşürülmesi**

Proje No: 1100791

Prof.Dr. Faruk BOZOĞLU
Prof.Dr. Hami ALPAS
Yrd. Doç. Dr. M. Dilek AVŞAROĞLU ERKAN

Aralık 2012
ANKARA

ÖNSÖZ

Mikotoksinler gıda maddeleri ile vücuda alındığında insan sağlığını tehdit etmektedir. Bilinen en önemli mikotoksinler aflatoksinler, patulin, zearelenon, okratoksin gibi toksinlerdir. Aflatoksin grubunda yer alan aflatoksin M1 süt ve süt ürünleri; patulin ise elma suyu gibi gıda maddeleri ile birlikte tüketilebilmektedir. Bu toksinler için henüz uygulanan gıda proseslerinden hiç biri tam olarak etkili olamamıştır. Toksin miktarlarının azaltılmasında gıda teknolojisi uygulamalarının geliştirilmesi endüstriyel boyutta da bir eliminasyon sağlayacağından insan sağlığı korunmuş olacaktır.

Bu noktadan hareketle, tamamlanmış olan bu projede vurgulu-yüksek hidrostatik basınç uygulamasının seçilen iki mikotoksin (aflatoksin M1 ve patulin) miktarlarının model gıda sistemlerinde düşürülmesi amaçlanmıştır.

Bu proje, **2505 kodlu TÜBİTAK-FRANSA ULUSAL BİLİMSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ (CNRS) İKİLİ İŞBİRLİĞİ PROGRAMI** kapsamında, 110O791 kod numaralı proje olarak desteklenmiştir. Proje kapsamındaki çalışmalar 01/06/2011 – 01/12/2012 tarihleri arasında Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux - Bordo Üniversitesi I ile ODTÜ Gıda Mühendisliği arasında yapılan işbirliği ile tamamlanmıştır.

Proje ekibi olarak öncelikle TÜBİTAK-TOVAG ve CNRS tarafından ortaklaşa sağlanan desteğe teşekkür ederiz. Ayrıca ODTÜ Merkez Laboratuvarları ve Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Vural GÖKMEN'e de HPLC analizlerinde yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

PROJE GRUBU

Çalışma Grubu - TÜRKİYE:

Proje yürütücüsü: Prof.Dr.Faruk BOZOĞLU

Araştırmacı: Prof Dr. Hami ALPAS, Yrd. Doç. Dr. M. Dilek AVŞAROĞLU ERKAN

Çalışma Grubu - FRANSA:

Yardımcı Yürütücü: Dr. Alain LARGETEAU

Araştırmacı: Prof Dr. Gérard DEMAZEAU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
PROJE GRUBU.....	3
İÇİNDEKİLER.....	4
TABLO LİSTELERİ.....	5
ŞEKİL LİSTELERİ.....	6
ÖZET.....	7
ABSTRACT.....	8
1.GİRİŞ.....	9
2.GENEL BİLGİLER.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç.....	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Basınç Uygulaması.....	16
3.2.2. Örneklerden Aflatoksin M1'in Ekstraksiyonu.....	17
3.2.3. Örneklerden Patulinin Ekstraksiyonu.....	18
3.2.4. HPLC Analizleri.....	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	19
5. SONUÇ.....	34
6. REFERANSLAR.....	35
TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	39

TABLO LİSTELERİ

Tablo 1. YHB uygulanan sütlerde farklı konsantrasyonlarda bulunan aflatoksin M1'in uygulama sonrasındaki HPLC verileri.....	20
Tablo 2. Sütte aflatoksin M1 için uygulanan 6 vurgu X 50 saniye v-YHB için LC-MS/MS sonuçları.....	24
Tablo 3. Sütte aflatoksin M1 için uygulanan 2 vurgu X 150 saniye v-YHB için LC-MS/MS sonuçları.....	25
Tablo 4. HPLC analizleri sonucunda direkt basınç uygulaması ile berrak elma suyunda patulin miktarlarındaki değişimler.....	30
Tablo 5. Berrak elma suyunda patulin için uygulanan 6 vurgu X 50 saniye v-YHB sonuçları.....	32
Tablo 6. Berrak elma suyunda patulin için uygulanan 2 vurgu X 150 saniye v-YHB sonuçları.....	33

ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. Dalında duran mısırdaki <i>A. flavus</i>	11
Şekil 2. Aflatoxin B1 molekülü (BENNETT ve Klich, 2003).....	12
Şekil 3. Aflatoxin M1 molekülü.....	12
Şekil 4. Patulin molekülü (TURNER ve ark.2009).....	13
Şekil 5. Elma üzerinde <i>Penicillium expansum</i> gelişimi (PUEL ve ark., 2010).....	13
Şekil 6. v-YHB uygulamalarında kullanılan yüksek basınç cihazı: (a) Basınçlama ana gövde, (b) kontrol paneli.....	16
Şekil 7. v-YHB basınç haznesi: (a) Haznedeki sepetin çıkarılması, (b) Sepete örneklerin yerleştirilip cihaza konulması.....	17
Şekil 8. HPLC analizleri için oluşturulan kalibrasyon eğrisi (Konsantrasyonlar: 0,1 -0,25 -0,5 -5 -20 -50- 100- 200 ppb aflatoxin M1).....	19
Şekil 9. 0,5 ppb aflatoxin M1 konsantrasyonunda uygulanan farklı basınç /sıcaklık denemelerine ait HPLC sonuçları (1:400 MPa/40°C; 2:500 MPa/50°C; 3:500 MPa/40°C; 4:400 MPa/50 °C; 5:300 MPa/50 °C; 6:300 MPa/40 °C; 7:400 MPa/30 °C).....	21
Şekil 10. 50 ppb aflatoxin M1 denemelerinde 500 MPa / 20°C uygulamasının standart ve kontroller ile karşılaştırılması.....	22
Şekil 11. 50 ppb aflatoxin M1 denemelerinde 400 MPa / 30°C uygulamasının standart ve kontroller ile karşılaştırılması.....	23
Şekil 12. 1 ppb, 5ppb, 10ppb ve 20 ppb aflatoxin M1 içeren standart çözeltilerin LC-MS/MS kromatogramları.....	26
Şekil 13. v-YHB (2 X 150 saniye) ile 500MPa / 40°C işlem görmüş sütte 5ppb, 50 ppb ve 100 ppb aflatoxin M1 için LC-MS/MS kromatogramları.....	26
Şekil 14. Süte eklenen 100 ppb aflatoxin M1 (kontrol) ve 500MPa / 50°C (6 vuruğu X 50 saniye) işlem görmüş 100 ppb aflatoxin M1 eklenen süt için LC-MS/MS kromatogramları.....	27
Şekil 15. HPLC kalibrasyonu için kullanılan ve 100 ppb, 500 ppb, 1000 ppb olarak hazırlanan standart eğri.....	29
Şekil 16. HPLC analizlerinde kullanılan 500 ppb standart ve kontrol elma suyuna ait kromatogramlar.....	29
Şekil 17. 100ppb patulin eklenen elma suyu (kontrol) ve 500MPa / 50°C işlem görmüş elma suyunda eklenen 100 ppb patulin miktarındaki azalmaya ait HPLC verileri.....	31

ÖZET

Bu projede, birer mikotoksin olan aflatoksin M1 ve patulin miktarlarının ayrı ayrı süt ve elma suyunda vurgulu hidrostatik basınç kullanılarak düşürülmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, piyasadan sağlanan sütler farklı düzeylerde aflatoksin M1 ve berrak elma suyu farklı düzeylerde patulin ile kontamine edilmiştir. Ardından bu örneklere farklı Basınç / Sıcaklık / Vurgu kombinasyonlarında basınçlama prosesi uygulanmıştır. Basınçlanmış örneklerde toksin düzeyleri uygun ekstraksiyon işlemleri yapıldıktan sonra HPLC analizleri ile belirlenmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı koşullarda vurgu olmadan sabit basınçlama prosesi de yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre sütte aflatoksin M1 ve berrak elma suyunda patulin konsantrasyonlarının düşürülmesi için basınçlama işlemi kullanılabilir. Aflatoksin M1 için vurgusuz yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulaması toksinin yüksek konsantrasyonlarda olduğu sütler için tavsiye edilebilir. Berrak elma suyunda ise yüksek patulin konsantrasyonlarında YHB kullanılmalı iken, düşük konsantrasyonlarda vurgulu-YHB (v-YHB) daha etkili olmaktadır. Bu nedenle HHP işlemleri için 300-500 MPa basınç ve 20-30°C'lerde işletme ve mikotoksin miktarına göre optimize edilmelidir

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M1, patulin, süt, elma suyu, yüksek hidrostatik basınç, vurgulu yüksek hidrostatik basınç.

ABSTRACT

In this project, reducing the levels of mycotoxins aflatoxin M1 and patulin in milk and apple juice respectively by using pulse high hydrostatic pressure (**p-HHP**) was aimed. For this aim, commercially available milk was contaminated artificially with different levels of aflatoxin M1, and apple juice with patulin. Then the samples were subjected to different pressure / temperature / pulse combinations. Toxins were extracted from pressure applied samples, and toxin levels were determined with HPLC analyses. For comparison, static high hydrostatic pressure (**HHP**) process was also applied in same conditions.

According to the results, **p-HHP** and **HHP** were both effective to reduce the levels of aflatoxin in milk and patulin in clear apple juice. For aflatoxin M1, **HHP** is recommended for the milks having high toxin levels. In case of clear apple juice, **HHP** was effective in high patulin concentrations, while in low concentrations **p-HHP** was more effective. Therefore for **HHP** applications, the combination of 300-500 MPa pressure and 20-30°C temperature should be optimized according to the type of processing and amount of initial mycotoxin..

Keywords: Aflatoxin M1, patulin, milk, apple juice, high hydrostatic pressure, pulsed high hydrostatic pressure

1. GİRİŞ

Mikotoksinler çeşitli küf türleri tarafından üretilen toksik bileşenlerdir. Bu bileşenler insanlarda sebep oldukları çeşitli hastalıklar nedeniyle risk taşımaktadır. Hammadde ya da son gıda ürünü üzerinde gelişen küflerin bu bileşenleri üretmeleri ile gıdalara geçerler. Gıdalara uygulanan çeşitli prosesler, örneğin ısı işlem gibi, küfleri elimine etse de mikotoksinlere etki etmemektedir. Bu sebeple, gıda maddeleri ile birlikte mikotoksinler de vücuda alınarak başta mikotoksikoz olmak üzere insan sağlığına etki etmektedirler. Benzer şekilde bazı mikotoksinler hayvan yemlerinde de bulunabilmektedir. Örneğin aflatoksin M1'de olduğu gibi, bu yemlerle beslenen hayvanlarda toksin yine toksik olan farklı bir forma metabolize edilerek süt gibi hayvansal kaynaklı gıdalara geçebilmektedir. Bu sebeple, mikotoksin varlığı gıda ve yemlerde hem sağlığı tehdit ettiği ve hem de ekonomik kayıplara sebebiyet verdiği için kontrol altına alınmalıdır. Gıdalarda ya da yemlerde görülebilen bazı mikotoksinlere örnek olarak aflatoksinler, fumonisin, okratoksin, patulin, sitrinin ve zearalenon verilebilir.

Toksin düzeylerinin düşürülmesinde iki temel aşamada önlemler alınması gereklidir. Bunlardan birincisi tarımsal üretimin uygun koşullarda yapılması ve üretimde küf gelişimini engelleyici uygulamaların olmasıdır. Bitkisel ürünlerde hem hasattan önce tarlada ve hem de hasattan sonra bu ürünlerin uygun olmayan koşullarda depolanması ile küf gelişimi olabilmektedir. Bu gelişime bağlı olarak da mikotoksin üretebilmektedirler. Ürünün çeşidi, ortamın nemi, sıcaklık ve üründe böceklerin tahribatı başta olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak küflenme meydana gelmektedir. Bu ve diğer faktörlerin kontrol altına alınmasıyla gelişim sınırlandırılabilir.

İkinci aşama ise bu tarımsal ürünleri hammadde olarak kullanan gıda endüstrisinde hammaddenin işlenmesi sırasında uygulanan işlemler, uygulama koşulları ve depolama koşullarının küf gelişimini engelleyici olmasıdır. Ancak tüm bu uğraşlara rağmen küf gelişimi olabilir ve toksin üretimi gerçekleşebilir. Öte yandan, tarlada üretim sırasında ya da gıda fabrikasına ulaştırılırken hammaddede oluşan mikotoksin de gıda üretimini zorlaştırmaktadır. Her iki durumda da işlenecek son gıda ürünüde toksin miktarının sağlığı tehdit eden sınırların altına düşürülmelidir. Bu amaçla yine uygun ortam koşulları oluşturulmalı ve küf gelişimi engellenmelidir. Fakat bu sağlansa bile gıda endüstrisinde ikinci bir problem de zaten mikotoksin bulunan hammaddenin işlenmesidir.

Gıda üretimi sırasında bozulma etmeni ya da sağlık riski taşıyan biyolojik ve kimyasal ajanların eliminasyonuna yönelik çeşitli işlemler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi ısı işlem uygulamasıdır. Isıl işlem ile mikroorganizmalar inaktive edilmekte; enzim faaliyetleri durdurulmaktadır. Ancak, günümüze kadar yapılan çalışmalarda görülmüştür ki gıda muhafazası için uygulanan ısıl işlemin düzeyi bir mikotoksin çeşidi olan aflatoksinleri yeterince detoksifiye edememektedir. Başka bir deyişle aflatoksin gibi mikotoksinler ısıl işleme dirençlidir ve ısıl işlem uygulanmış gıdalarda sağlık riski olmaya devam etmektedir.

Bu amaçla araştırmacılar çeşitli detoksifikasyon yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. alışmalar özellikle toksisitesi oldukça yüksek olan aflatoksinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç grupta toplanabilir. Kimyasal detoksifikasyonda amonyak uygulaması başta gelmektedir. Aflatoksin B1'in amonyak ile reaksiyona girmesiyle detoksifiye olması esasına dayanmaktadır. Bunun yanı sıra klordioksit (ClO₂), sitrik asit, sülfhidril bileşenleri gibi çeşitli kimyasallar ile mikotoksinlerin detoksifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyolojik detoksifikasyon, bazı bakteri ve kf türlerinin ortamda bulunan mikotoksinleri parçalaması şeklinde olmaktadır. Fiziksel olarak kullanılan bazı gıda işleme prosesleri de detoksifikasyona neden olabilmektedir. Örneğin ekstruzyon prosesleri sırasında aflatoksin düzeylerinde düşüş olduğu bildirilmektedir. Öte yandan, gıda muhafazası alanında geliştirilen yeni engel teknolojilerinin kullanımı da mikotoksinlerin gıda işleme sırasında da düzeylerinin düşürülmesi açısından araştırılmalıdır. Bu yöntemlerden bir tanesi yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulamasıdır.

Bordeaux Üniversitesi I ve Orta Doğu Teknik niversitesi'nde (Bordeaux-ICMCB and Ankara-METU) bulunan çalışma gruplarının geliştirdiği yeterliliğin bir sonucu olarak, bu projenin amacı gıda kaynaklı toksinlerin azaltılması gibi olası sonuçlar ile süt ve elma suyu endüstrisinde yüksek hidrostatik basınç ve vurgulu-yüksek hidrostatik basıncın kullanımının geliştirilmesidir. Diğer bir amaç ise, Avrupa Bilimsel Alanının inşaasına, Avrupa Birliği'ne aday ülkelerin bilim adamlarının katılımına olanak sağlamaktır. Yüksek basıncın gıda kaynaklı toksinlerin inaktivasyonuna etkileri ile ilgili araştırma faaliyetleri Avrupa'da oldukça az sayıda laboratuvarda yürütülmektedir. Dolayısıyla, böyle bir ilgi alanında Avrupa Bilimsel faaliyetlerinin ilerletilmesi amacıyla iki grup arasında bilimsel bilgi alışverişi yararlı olacaktır. İki grup arasındaki bu işbirliklerinin sonuçları bilimsel yayınlar ve bilimsel kongrelere katılımlarla sonuçlanmıştır.

Yüksek hidrostatik basınç çalışmaları ve uygulamaları grubumuz tarafından son 10 yıldır yürütülmektedir. Fransız grup bu araştırma eksenini 1990 yılından bu yana geliştirmektedir ve daha çok kimya, biyokimya ve yüksek basınç teknolojileri (zellikle yüksek basınç-düşük sıcaklık uygulamaları) ile ilgilidirler. Türk araştırma grubunun Avrupa Bilimsel Komitesine entegrasyonu hala hazırda oluşturulmuştur. şimdi ise amacımız, işbirliğimizi yeni bilimsel alanlara doğru ilerleterek sürdürmektir.

2. GENEL BİLGİLER

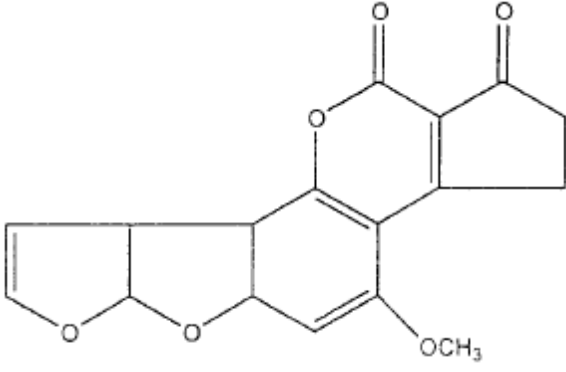
Mikotoksinler doğal bileşenler olup filament oluşturan küflerin ikincil metaboliti olarak üretilen küçük moleküllerdir. 1960'ların başından bu yana mikotoksinler bilinmektedir. Mikotoksinlerin çoğu insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etki yapmaktadırlar. Bilinen en yaygın mikotoksinler aflatoksinler, sitrinin, ergot alkaloidleri, fumonisinler, okratoksin, patulin, trikotesenler ve zearalenondur. Bu toksinler genellikle ilgili küf türleri ile kontamine olan gıda ve yemlerde bulunmaktadırlar. Gıda ve yem hammaddesi olan bitkilerin üzerinde hasat öncesinde ya da hasat sonrasında bu küf türleri gelişerek mikotoksin üretebilmektedirler. Tahıllar, kuru meyveler, baharatlar, yağlı tohumlar, meyveler özellikle elma ve üzüm, mikotoksin içeren yemlerle beslenen hayvanların sütleri gibi çeşitli ürünlerde mikotoksin türlerine rastlanmaktadır (TURNER ve ark., 2009). *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* türleri başlıca mikotoksin üreten küf türlerindedir (PEREYRA ve ark. 2010).

Mikotoksinler arasında en fazla çalışılan grup aflatoksinlerdir. İlk defa 1960 yılında İngiltere'de aflatoksin içeren yemlerle beslenen 100.000 hindinin ölümü sonucu anlaşılmış ve bu hastalığa Turkey X hastalığı adı verilmiştir. Aflatoksin adı ilk teşhis edilen üretici tür *Aspergillus flavus*'un cins ve tür adlarının ilk harfleri ve **-toksin** son ekini almasıyla türetilmiştir (RITCHIE, 2007). Hububatlar; özellikle mısır, pirinç ve buğday; baharatlar ve meyveler bu toksinlerin ana kaynaklarıdır. İki ana üretici tür olan *Aspergillus flavus* (Şekil 1) ve *A. parasiticus* ile nadiren de *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus nomius*, ve *Aspergillus pseudotamari* kuru gıda ve yemleri tehdit ettiği bilinmektedir (BENNETT ve KLICH, 2003).



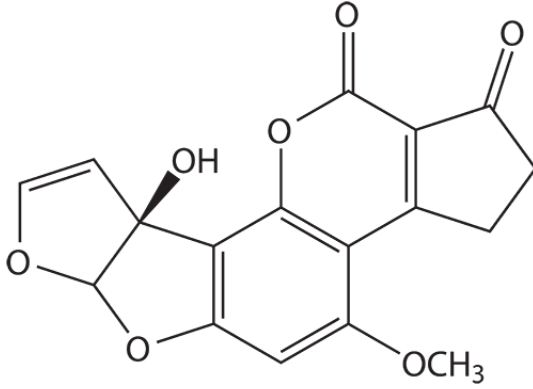
Şekil 1. Dalında duran mısırdaki *A. flavus*

Hububat taneleri bu küfler tarafından kontamine olduğunda temel dört farklı aflatoksini üretirler: aflatoksin B1, B2, G1, G2. Bu toksinler UV ışığı altında mavi veya yeşil floresan renginde görünmektedirler (blue: B1 ve B2; green: G1 ve G2). Bunlar arasında memeliler üzerinde bilinen en etkili hepatokarsinogenik olanı aflatoksin B1'dir (Şekil 2). Aflatoksin B1'in toksisitesi çok geniş bir hayvan grubunu kapsamaktadır. Bu toksin potansiyel olarak hepatotoksik ve hepatokarsinogeniktir (RAWAL ve ark., 2010). Bunun yanı sıra uzun süreli maruz kalındığında baskılanmış bağışıklık sistemi, malnütrisyon, safra kanallarında çoğalma, karaciğerde yağlanma, hepatik lezyonlar ve hatta hepatomlara neden olmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde yaşayan 4,5 milyar insanın aflatoksine maruz kalarak bağışıklık ve beslenmelerinin etkilendiği bildirilmektedir (YU, 2012).



Şekil 2. Aflatoksin B1 molekülü (BENNETT ve Klich, 2003).

Aflatoksin içeren gıdaların ya da yemlerin memeliler tarafından tüketimi ile bu toksinlerin hidrosillenmiş analog hali olan Aflatoksin M1 (Şekil 3) ve M2 sütte geçebilmektedir. Bu durum özellikle ticari süt üretiminde kullanılan süt ineklerinde de görülmekte; süt ve peynir gibi ürünlere işlenmesi ile bu ürünlere de görülmektedir. Aflatoksin M1'in toksisitesi aflatoksin B1'e göre bir derece daha azdır (SHEPHARD, 2009). Hayvan yemleri ile tüketilen aflatoksin B1'in yaklaşık % 0,3-6,2'si sütte aflatoksin M1'e dönüşmektedir (MOTAWEE ve ark., 2009). Aynı zamanda ineklerde aflatoksin içeren yemlemeyi takip eden 2-3 gün içerisinde sütte aflatoksin M1'in tespit edildiği bildirilmiştir (PRANDINI ve ark., 2009).

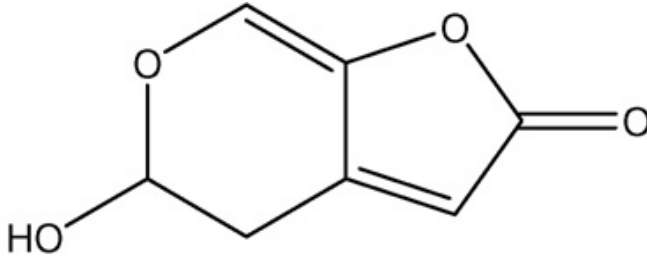


Şekil 3. Aflatoksin M1 molekülü.

İzin verilen aflatoksin M1 düzeyleri, Amerika'da Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA)'ne göre insan tüketimine sunulan sütlerde 500 ng/L (0,5 parts per billion (ppb)) ve Avrupa Birliği'nde Komisyon Yönetmeliği'ne göre 50ng/L (0,05 ppb)'dir (MENDONÇA ve VENÂNCIO, 2005). Ülkemizde ise Türk Gıda Kodeksi (TGK)'nde 0,05µg/kg olarak bildirilmiştir (TGK, 2011). Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M1 varlığının araştırılması ülkemizde de yoğun olarak çalışılmaktadır. Yüzüncü Yıl Üniversitesi süt işletmesinde yapılan bir çalışmada, analiz edilen çiğ süt örneklerinin yaklaşık %87'sinde aflatoksin M1 saptanmış olup bunların da %44'ü yasal limitlerin üzerinde bulunmuştur (BAKIRCI, 2001). ÖZDEMİR (2007) tarafından Kilis'de tüketilen keçi sütleri ile yapılan bir çalışmada, örneklerin %84,54'ünde aflatoksin M1 belirlenmiştir. Ancak örneklerin yalnızca %6,36'sınının 50 ng/L düzeyinin üzerinde aflatoksin M1 içerdiği bildirilmiştir (ÖZDEMİR, 2007). Burdur'da yapılan bir başka çalışmada ise 315 süt ürününden 16 çiğ süt, 2 pastörize süt, 1 süt tozu ve

3 peynir örneğinde aflatoksin M1 miktarı Türk Gıda Kodeksi sınırlarının üzerinde çıkmıştır (KOCASARI ve ark. 2012).

Patulin ilk olarak 1943 yılında bir antibiyotik olarak saptanmıştır. Ancak 1950-60'larda yapılan çalışmalarda aynı zamanda toksik bir metabolit olduğu ve kimyasal yapısının 4-hidroksi-4H-furo[3,2C]piran-2(6H)-on (Şekil 4) olduğu anlaşılmıştır (BENNET ve KLICH, 2003). Ana üretici organizmalar *Aspergillus* ve *Penicillium* türleridir. Ancak elma sularında pastörizasyon sonrasında ısıya dirençli olan *Byssoschlamys* türlerinin gelişmesi ile de patulin kontaminasyonu gerçekleşebilmektedir (SANT'ANA ve ark., 2008).



Şekil 4. Patulin molekülü (TURNER ve ark.2009).

Ekonomiyi ve sağlığı ilgilendiren benzer durum patulin ile kontamine olmuş ürünler için de geçerlidir. Patulin akut (havale, nefes darlığı, ödem, ülserleşme, sindirim sisteminde şişkinlik, bağırsaklarda kanama gibi), kronik (nörotoksik, immünotoksik, genotoksik, teratojenik gibi) ve hücre düzeyinde (plazma membranında hasar, protein sentezinde inhibisyon, DNA sentezinin inhibisyonu) olmak üzere farklı potansiyel sağlık riskleri taşımaktadır (MOAKE ve ark., 2005). FDA tarafından belirlenen en iyi tolere edilebilen düzeyler elma suyunda genellikle 50 µg/L (50 ppb)'nin altında, günlük maksimum alım düzeyi çocuklar için 0,2 µg/kg vücut ağırlığı ve yetişkinler için 0.1 µg/kg vücut ağırlığı'dır. Avrupa Birliği'nde limit hem elma suyunda hem de elma şarabında 50 µg/kg, katı elma ürünlerinde bunun yarısı olan 25 µg/kg ve bebek ile çocuk ürünlerinde ise 10 µg/kg olarak belirlenmiştir (SANT'ANA ve ark., 2008). Ülkemizde ise TGK tarafından belirlenen limitler meyve suları, nektarları ve konsantrelerinde 50 µg/kg, katı haldeki elma ürünlerinde ise 25 µg/kg'dır (TGK, 2011).

Patulin genellikle elma ve ürünlerinde bulunmakta olup, sık olmasa da armut, kayısı, ve üzüm gibi meyvelerde bulunmaktadır (PUEL ve ark., 2010). Şekil 5'de elma üzerinde gelişme gösteren ve patulin üretici bir tür küf türü olan *Penicillium expansum* görülmektedir. Üretim sırasında bu gibi çürümüş veya küflenmiş meyvelerin atılmasıyla mikotoksin seviyesinin minimize edilmesini sağlayan sürekli bir çabaya ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 5. Elma üzerinde *Penicillium expansum* gelişimi (PUEL ve ark., 2010).

Toksik etkileri nedeniyle gıda ve yemlerdeki mikotoksin düzeyleri otoriteler tarafından yasal olarak düzenlenmiştir. Gerekli bu yasal düzenlemelerin sonucunda insan sağlığını tehdit eden mikotoksin düzeylerinin altında üretim yapılması kontrol altına alınmıştır. Ancak tarım ürünleri ve gıda hammaddelerinin üretimlerinde mikotoksin içeriği sebebiyle ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Çünkü bazı durumlarda ürünler için geçerli olan yasal mikotoksin sınırları üretimin herhangi bir aşamasında küf gelişimine bağlı olarak aşılabilmekte ve son üründe yasal sınırların üzerine çıktığında ürün tüketime sunulmadığından atılmaktadır. Sağlığa ve ekonomiye olan her iki olumsuz etki de gıdaların ön- ve son-üretiminde bu toksinlerin düzeylerinin kontrol altına alınmasını gerektirmektedir.

Eğer aflatoksin konsantrasyonu sütte 0,5 ppb ve hayvan yemlerindeki hububatta 20 ppb'nin üzerinde tespit edilirse kanunlara göre atılmalıdırlar. Bu ise süt endüstrisinde kayıpları getirmektedir. Bu nedenlerle AFM1'in engellenmesi için alınması gereken önlemler hayvan yemlerinin üretimi sırasında iyi imalat ve depolama uygulamalarıdır. Benzer durum diğer mikotoksinler için de geçerlidir. Örneğin ısıtma işlemi, mikrodalga, UV-ışığı, inert materyallerle adsorbsiyon ve amonyum muamelesi gibi fiziksel ve kimyasal yöntemler bunların detoksifikasyonu ya da biyolojik varlıklarının düşürülmesi için uygulanan bazı yöntemlerdir (BOZOĞLU, 2009). Bu yöntemler için örneklere bulgular ve tartışma kısmında yer verilmiştir.

Isıl işlemler hala gıda sanayinde gıda koruma teknikleri arasında birinci sırada yerini korumasına rağmen, tüketiciye güvenli ve 'tazeye-en-yakın' olan ürünlerin sağlanması amacıyla alternatif teknikler ortaya çıkmaktadır. Isısız olmayan işleme teknolojileri içinde yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulaması uluslararası boyutta araştırma ve geliştirme çalışmalarına yol açmış, çok kısa bir süre içinde de çeşitli ürünlerin markete sunulmasını sağlamıştır. YHB uygulaması ile gıdaların mikrobiyal kalitesi yükseltilirken, organoleptik özellikleri korunmaktadır. Gıdalar yolu ile vücuda alındığında halk sağlığını tehdit eden pek çok patojen bakteri ve hatta bazı virüsler üzerinde etkilidir. (RENDUELES, 2010). Ayrıca MARGOSCH ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, basınç uygulamasının sıcaklık ile kombine edilerek, sıcaklığa dayanıklı kolera toksini (*Vibrio cholerae*), stafilokokal enterotoksinler A-E, hemolisin BL (*Bacillus cereus*) ve ısıya dayanıklı *E.coli* toksini (*Escherichia coli*) gibi bakteriyel toksinlerin inaktivasyonu üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. TOKUŞOĞLU ve ark. (2010), YHB uygulamasının siyah zeytinlerde bir mikotoksin olan sitrinin düzeylerinde %56'ya varan düşüşe sebep olduğunu bildirmiştir.

Öte yandan, gıdaların yapısındaki bozulmalar sebebiyle çok yüksek basınç uygulamaları gıdalar için uygun değildir. Bunun yerine, YHB uygulamaları sıcaklık ve antimikrobiyal ajanlar ile kombine olarak kullanıldığında basınç düzeyi düşürülebilmektedir. Bir diğer alternatif ise basıncın statik olarak değil, vurgular halinde uygulanmasıdır (vurgulu-YHB ya da v-YHB). PİLAVTEPE-ÇELİK ve ark. (2011)'nin yaptığı bir çalışmada, YHB ve v-YHB uygulanan *E.coli* hücrelerinde inaktivasyon açısından bir farklılık görülmesi de, bu hücrelerdeki hasarın ikinci uygulamada daha fazla olduğu ve v-YHB ile meydana gelen hasar sebebiyle hücrelerin kendini yenileyemediği bildirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada, süt ve elma suyu ayrı ayrı aflatoksin M1 ve patulin ile değişen konsantrasyonlarda yapay olarak kontamine edilmiştir. Stok standart aflatoksin M1 çözeltisi (R-Biopharm Rhône Ltd.) 1000 ng/ml (1000 ppb) konsantrasyonundadır. Piyasadan temin edilen UHT sütler kullanılmıştır. Sütte çalışılan son konsantrasyonlar ise 0,5 ppb, 5 ppb ve 50 ppb'dir. En yüksek konsantrasyon olan 50 ppb stok olarak sütte ve 5 ppb ile 0,5 ppb konsantrasyonları bu stoktan süt ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Basınçlama işlemine geçildikten sonra yüksek konsantrasyonlarda daha iyi sonuç alındığı gözlemlendiği için 0,5 ppb denemelerden çıkarılmış ve 100 ppb konsantrasyon eklenmiştir.

Konsantrasyonlar; $C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülünde

C1 stok konsantrasyonu (ppb);

C2 örnek konsantrasyonu (ppb),

V1 stok hacmi (ml) ve

V2 toplam örnek hacmi (ml)

olacak şekilde, yerine konarak hesaplanmıştır. Örnekler her işlem öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. basınçlama tüplerine (cryovials) ~2ml aktarılmış ve tüp içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır. Tüm örneklerden 2 paralel hazırlanmıştır. Basınçlama işlemi her iki paralele de eşit şekilde uygulanmıştır. Ayrıca kullanılan sütlerden hiç toksin eklenmemiş 20 ml'si de ayrılarak kontrol olarak HPLC analizlerine kadar -20°C'de karanlıkta saklanmıştır; basınç uygulanmamıştır.

Aynı şekilde piyasadan temin edilen pastörize berrak elma suları, ticari olarak temin edilen patulin ($\geq 98\%$ TLC, Sigma Life Sciences, USA) ile yapay olarak kontamine edilmiştir. Toz formda bulunan patulinden öncelikle 50 ppm stok solüsyonu etil asetat ile çözülmüştür. Daha sonra etil asetat N₂ gazı ile uçurularak yine son konsantrasyon 50 ppm olacak şekilde pH 4 olan (%1'lik (v/v) formik asit) steril distile suda çözelti hazırlanmıştır (GÖKMEN ve ACAR, 1999). Bu çözelti stok çözelti olarak -20°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Basınç işlemi uygulanacak elma suyu örnekleri stok patulin çözeltisinden 100 ppb'den azalan konsantrasyonlarda elma suyu ile seyreltmek suretiyle her işlem öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Sonuçta basınç işlemi uygulanan konsantrasyonlar berrak elma suyunda 5 ppb, 50 ppb, 100 ppb patulin olacak şekilde ayarlanmıştır. Kullanılan elma sularından patulin eklenmeden de örnek ayrılarak kontrolleri yapılmıştır. Bunlar kontrol elma suyu olarak HPLC analizlerinde kullanılmıştır ve basınç uygulanmamıştır. Örnekler basınçlama tüplerine (cryovials) ~2ml olacak şekilde aktarılmış ve tüp içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır. Tüm örnekler 2 paralel olacak şekilde hazırlanmıştır. Basınçlama işlemi her iki paralele de eşit şekilde uygulanmıştır. Tüm örnekler ve kontroller HPLC analizlerinden önce ve sonra -20°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

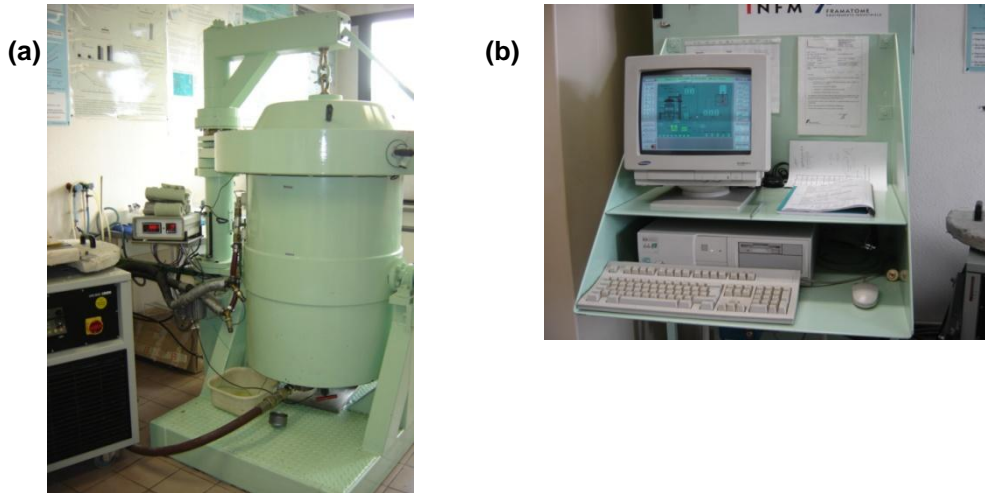
3.2. Yöntem

3.2.1. Basınç Uygulaması

Bu çalışmada iki temel basınç uygulaması yapılmıştır. Bunlardan birincisi yüksek hidrostatik basınç (**YHB**) uygulaması, diğeri ise vurgulu-yüksek hidrostatik basınç (**v-YHB**) uygulamasıdır. **YHB** çalışmaları ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde ve **v-YHB** çalışmaları ise Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux - Bordo Üniversitesi I, Fransa'da yürütülmüştür.

YHB uygulamasında, hazırlanan örnekler yüksek hidrostatik basınç cihazının haznesine yerleştirilerek basınçlama işlemi her uygulama için 5 dakika olacak şekilde yapılmıştır. Basınçlama işlemi için seçilen ve uygulanan değerler 300 MPa'da ayrı ayrı 20°C, 30°C, 40 °C ve 50 °C; 400 MPa'da ayrı ayrı 20°C, 30°C, 40 °C ve 50 °C; ve 500 MPa'da ayrı ayrı 20°C, 30°C, 40 °C ve 50 °C'dir. Örnekler basınçlama işleminden önce uygulama yapılacak sıcaklığa gelmeleri için uygun sıcaklıkta su banyosunda 5 dk. tutularak hemen ardından basınçlama işlemine geçilmiştir. Basınçlama uygulamasına tabi tutulan örnekler toksin ekstraksiyonlarına kadar -20°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

v-YHB basınç uygulaması için kullanılan basınçlama cihazı Şekil 6 ve 7'de verilmiştir [NFM-Technologies (Le Creusot, France) ve FRAMATOME (Paris, France) tarafından dizayn edilmiştir]. **v-YHB** yine 300 MPa, 400 MPa ve 500 MPa basınç düzeylerinde her basınç için ayrı ayrı 30°C, 40 °C ve 50 °C'lerde çalışılmıştır. 20 °C'deki uygulamalar çalışma kapsamına alınmamıştır. Uygulamaya başlamadan önce örnekler ilgili sıcaklık derecelerine gelmeleri için su banyosunda 5 dk. bekletilmiştir. Her bir parametre (örn. 300 MPa / 30 °C) için ayrı ayrı 6 vurgu X 50 saniye ve 2 vurgu X 150 saniye vurgu uygulanmıştır. Dolayısıyla toplam 5 dakikalık basınç uygulaması yapılmıştır.



Şekil 6. v-YHB uygulamalarında kullanılan yüksek basınç cihazı: **(a)** Basınçlama ana gövde, **(b)** kontrol paneli.



Şekil 7. v-YHB basınç haznesi: (a) Hazneden sepetin çıkarılması, (b) Sepete örneklerin yerleştirilip cihaza konulması.

3.2.2. Örneklerden Aflatoksin M1'in Ekstraksiyonu

YHB ve **v-YHB** uygulamaları sonrasında sütte aflatoksin M1 konsantrasyonlarının değişimini saptamak amacıyla aflatoksin M1'in HPLC öncesinde geri kazanılması gerekmektedir. Bu amaçla, ekstraksiyon işlemi için hazır olarak temin edilebilen immunoaffinite kolonları (Easi-Extract Aflatoxin; R-Biopharm Rhône Ltd.) kullanılmıştır.

Örnekler kolonlara verilmeden önce çözdürülmüş ve oda sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra, oda sıcaklığında 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yoğun pelet kalıntısı olan örneklerde süpernatant ayrıldıktan sonra yaklaşık 1 ml PBS (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich) eklenerek tekrar santrifüj edilmiş ve işlem iki kere tekrarlanarak peletteki olası toksin kalıntısı engellenmiştir.

Kolonların kullanımında üretici firmanın talimatları takip edilmiştir. Buna göre kolonlardan en az 50 ml örneğin geçirilmesi tavsiye edildiğinden santrifüjlenen örnekler PBS ile 50 ml'ye tamamlanmış ve 50 ml'lik şırıngalara doldurulmuştur. Örnekler şırıngalardan damla damla kolonlara aktararak 2-3 ml/dak akış hızında kolondan geçirilmiştir. Yavaş akış hızına, kolondaki antibadinin

toksini daha etkin bir şekilde tutması için özen gösterilmiştir. Ardından kolonlar 20 ml PBS ile 5 ml/dak akış hızında yıkanmıştır. Kolonlarda tutulan toksin önce 1,25 ml metanol:asetonitril (2:3) karışımı ardından 1,25 ml saf su kolondan geçirilerek (her 2-3 saniyede bir damla) ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır. Kolondan alınan toksin çözeltisi amber renkli HPLC tüplerine konularak, HPLC işlemine kadar -20°C'da muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Örneklerden Patulinin Ekstraksiyonu

YHB ve **v-YHB** uygulamaları sonrasında berrak elma suyunda patulin konsantrasyonlarının değişimini saptamak için patulinin HPLC öncesinde geri kazanılması amacıyla ekstraksiyon işlemi için hazır olarak temin edilebilen moleküler-damgalı-polimer-kolonlar (Easimip-Patulin; R-Biopharm Rhône Ltd.) kullanılmıştır.

Örnekler kolonlara verilmeden önce çözdürülmüş ve oda sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra 2,5 ml örnek için, 2,5 ml %2'lik asetik asit eklenerek 20 saniye vorteks ile karıştırılmıştır. Bu sırada kolonlardan dengeleme işlemi için damla damla toplam 2 ml %100'lük asetonitril ve hemen ardından 1 ml distile su aynı şekilde kolonlardan geçirilmiştir. Hazırlanan kolonlardan 4 ml örnek yavaş bir hızda (0,5 ml / dakika) geçirilmiştir. Bu işlemler için steril enjektörler kullanılmıştır. Örnekler geçtikten sonra kolonlar 1 ml %1'lik sodyum bikarbonat ve ardından 2 ml distile su ile yıkanmış ve kolonlarda kalan fazla sıvı, hava geçirilmesi ile tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 1 ml %100'lük dietileter geçirilmiştir. Son olarak toksini kolonlardan geri kazanmak için 2 ml %100'lük etil asetat kolonlardan geçirilerek amber renkli HPLC tüpleri içinde toplanmıştır. Etil asetat, nitrojen gazı altında uçurulmuş ve örnekler 1 ml %0,1'lik asetik asit ile yeniden çözülmüştür. HPLC işlemine kadar -20°C'da muhafaza edilmiştir.

3.2.4. HPLC Analizleri

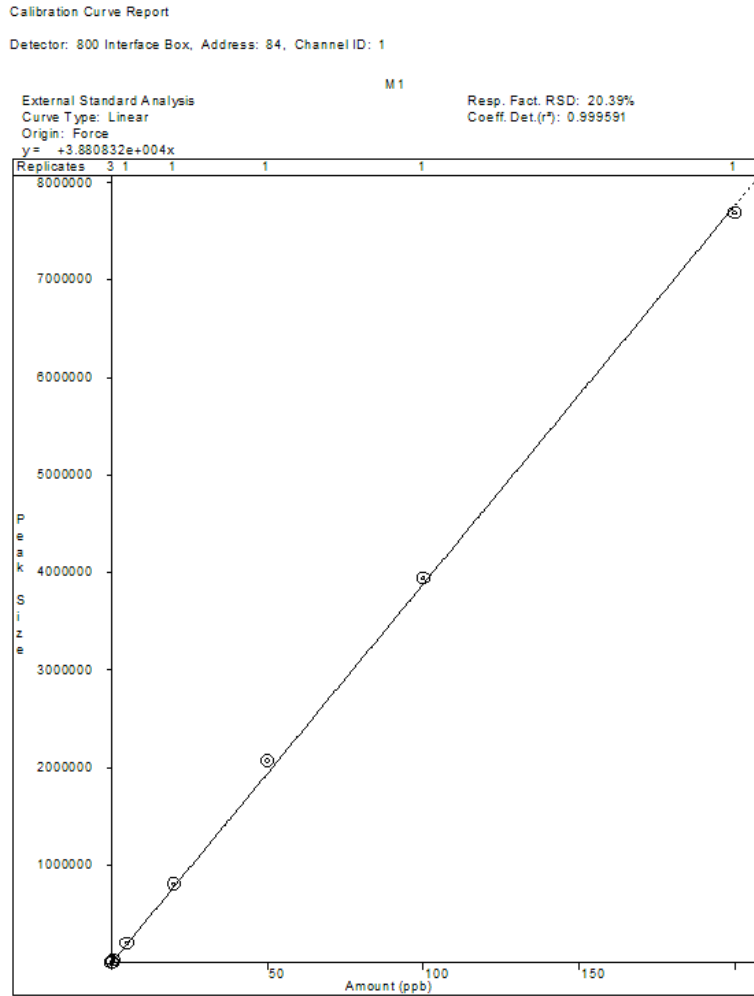
YHB uygulanan aflatoksin M1 örnekleri için HPLC analizleri ODTÜ Merkez Laboratuvarları'nda hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Analiz için ekstraksiyon kolonlarını üreten firmanın verdiği koşullar baz alınmıştır. Ekstraksiyonda immunoaffinite kolonları kullanılan firmanın önerdiği Inertstil ODS-3V (5 µm; 4.6 mm X 150 mm) kolonuna eşdeğer bir kolon ile çalışılmıştır. Tespit için florasan detektör (360 nm excitation ve 430 nm emmision) kullanılmıştır. Örnekler cihaza 100 µl hacimde çift enjeksiyon olacak şekilde aktarılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi için bir kalibrasyon eğrisi oluşturularak; örneklere ait her pik için geçerli olan alanlardan son konsantrasyonlar belirlenmiştir. Öte yandan, **v-YHB** uygulanan aflatoksin M1 örnekleri için HPLC yerine LC-MS/MS (Agilent 6130 LC-MS/MS) analizi Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde hizmet alımı yoluyla yapılmıştır.

Tüm patulin uygulamaları için ise HPLC analizleri Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi için bir kalibrasyon eğrisi oluşturularak; örneklere ait her pik için geçerli olan alanlardan son konsantrasyonlar belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Aflatoksin M1 in HPLC analizlerinde öncelikle kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi (Şekil 8) çizilirken 200 ppb Aflatoksin M1 eklenen süt immunoafinite kolondan geçirilerek daha sonra 100 ppb, 50 ppb, 20 ppb, 5 ppb, 0,5 ppb, 0,25 ppb, 0,1 ppb konsantrasyonlarında seyreltilip HPLC'ye verilmiştir. Eğriye ait denklem;

$$X (\text{M1,ppb}) = 0,2576 \times 10^{-4} \times Y (\text{ALAN}) \quad \text{olup; korelasyon katsayısı } r^2 = 0,99 \text{ 'dur.}$$



Şekil 8. Aflatoksin M1 HPLC analizleri için oluşturulan kalibrasyon eğrisi (Konsantrasyonlar: 0,1 -0,25 -0,5 -5 -20 -50- 100- 200 ppb aflatoksin M1).

Analizler sonucunda elde edilen veriler Tablo 1'de verilmektedir. Burada 2 paralel ve 2 enjeksiyon şeklinde çalışılan örneklerden (n=4) elde edilen verilerin ortalama, standart sapma ve % azalma oranları hesap edilmiştir. Toksin konsantrasyonları hesaplanırken kontrol olarak kullanılan basınçlanmamış süt örneklerinde bulunan kalıntı miktarları da eklenerek toplam konsantrasyondaki azalma oranı hesaplanmıştır.

Tablo 1. YHB uygulanan sütlerde farklı konsantrasyonlarda bulunan aflatoksin M1'in uygulama sonrasındaki HPLC verileri.

	Basınç-Sıcaklık	Ortalama	Standart Sapma	% Azalma*	Ortalama Azalma
0,5 ppb	300MPa-30°C [‡]	0.4659	0,0163	7,1	9,13
	300MPa-40°C [‡]	0.4345	1,5109	13,1	
	300MPa-50°C [‡]	0,4615	0,0674	7,2	
	400MPa-30°C [‡]	0,4552	0,0078	8,9	9,00
	400MPa-40°C ^{‡‡}	0,4490	0,0598	8,9	
	400MPa-50°C ^{‡‡}	0,4540	0,0399	9,2	
	500MPa-20°C [†]	0,4734	0,0561	5,3	7,48
	500MPa-30°C ^{‡‡}	0,4687	0,0466	9,3	
	500MPa-40°C [‡]	0,4989	0,0454	2,3	
500MPa-50°C ^{‡‡}	0,4351	0,0172	13,0		
5 ppb	300MPa-30°C [‡]	4,7862	0,0780	4,2	6,2
	300MPa-40°C [‡]	4,6781	0,2888	6,4	
	300MPa-50°C [‡]	4,5957	0,0662	8,0	
	400MPa-30°C [‡]	4,8116	0,2354	3,8	3,31
	400MPa-40°C ^{‡‡}	4,7808	0,0995	4,38	
	400MPa-50°C ^{‡‡}	4,9121	0,1552	1,75	
	500MPa-20°C [†]	4,6513	1,2431	7,0	10,23
	500MPa-30°C ^{‡‡}	4,6667	0,0067	6,6	
	500MPa-40°C [‡]	4,1480	0,1166	17,2	
500MPa-50°C ^{‡‡}	4,4958	0,0607	10,1		
50 ppb	300MPa-30°C [‡]	38,1566	3,2950	23,7	25,33
	300MPa-40°C [‡]	34,9138	1,2354	30,2	
	300MPa-50°C [‡]	38,9288	2,8089	22,1	
	400MPa-30°C [‡]	27,2151	0,0827	45,6	42,43
	400MPa-40°C ^{‡‡}	26,2937	1,8745	47,4	
	400MPa-50°C ^{‡‡}	32,8655	1,7141	34,3	
	500MPa-20°C [†]	24,7731	0,3177	50,5	47,70
	500MPa-30°C ^{‡‡}	23,6598	1,7495	52,7	
	500MPa-40°C [‡]	26,6307	0,6489	46,7	
500MPa-50°C ^{‡‡}	29,5682	1,6238	40,9		

*NA: Hiç azalma görülmeyen örnekler.

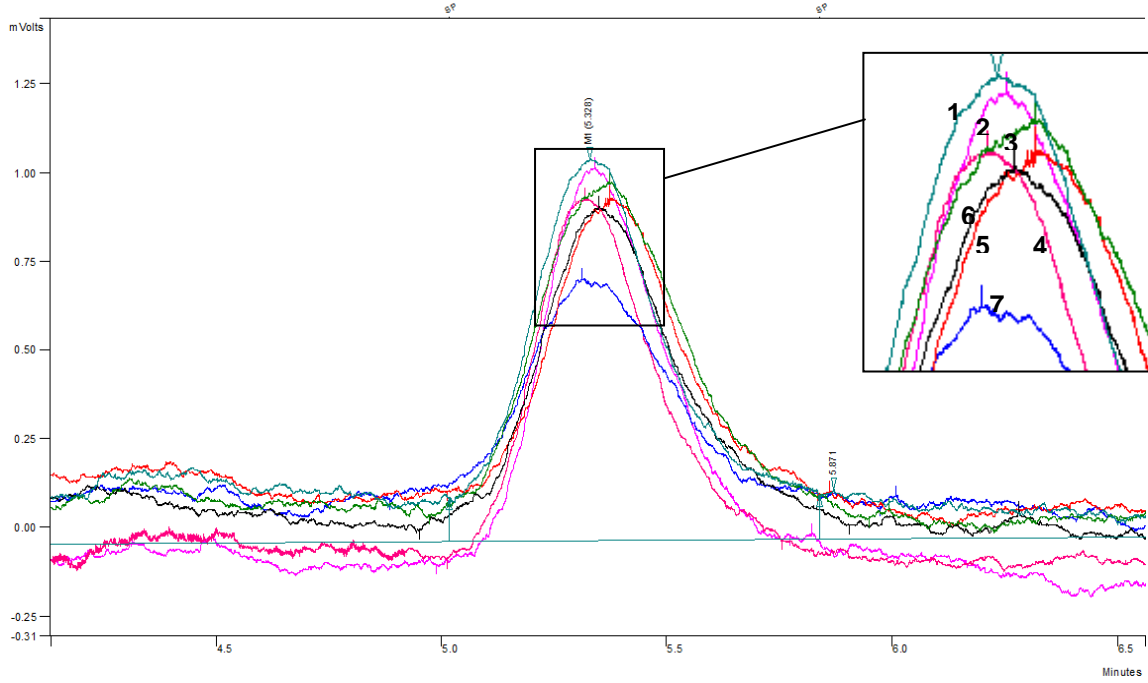
† Kontrol sütte bulunan aflatoksin M1 miktarı 0,34 ppb.

‡ Kontrol sütte bulunan aflatoksin M1 miktarı 0,31 ppb.

‡‡ Kontrol sütte bulunan aflatoksin M1 miktarı 0,24 ppb.

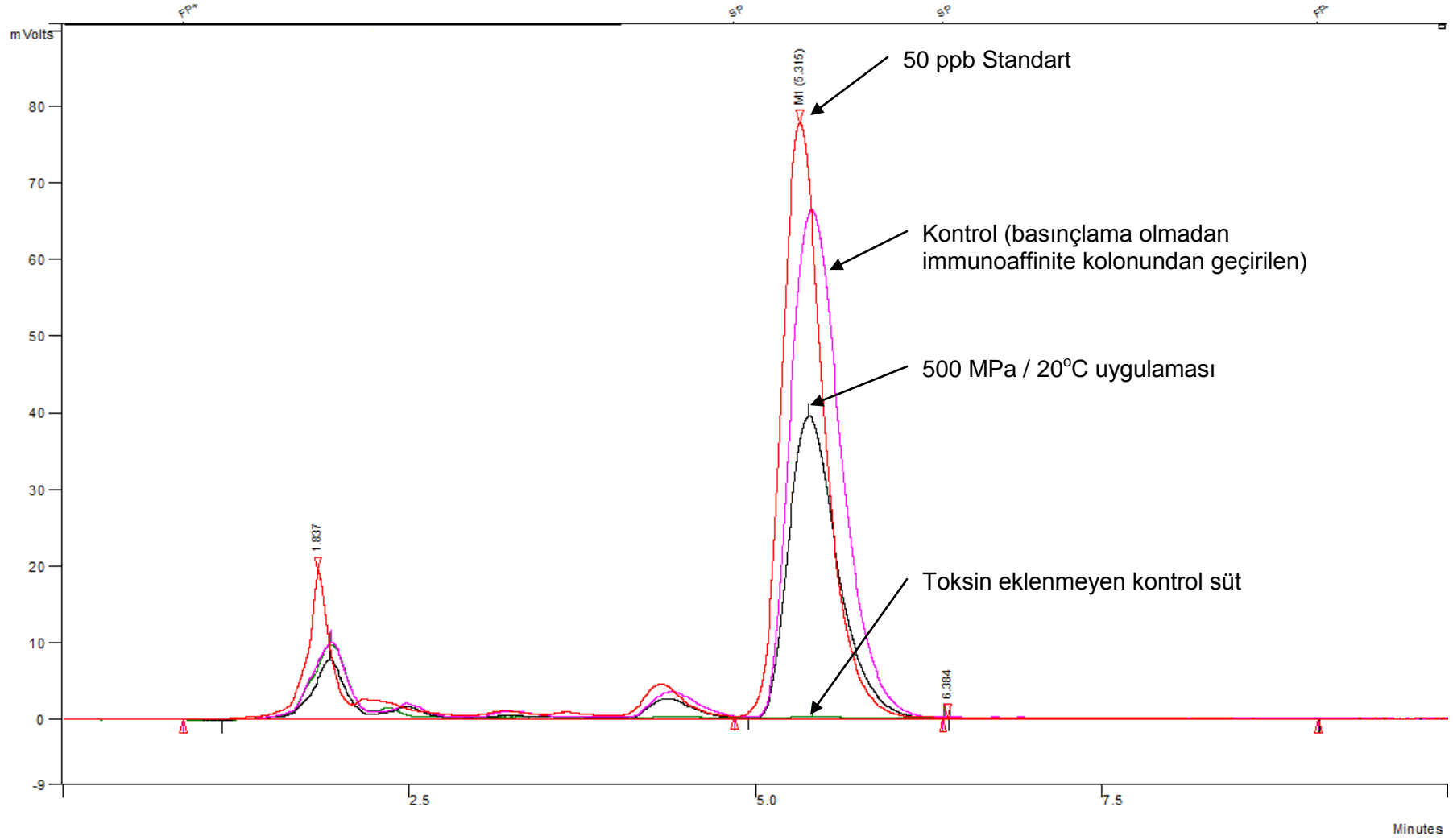
% azalma oranları farklı sıcaklık uygulamalarından bağımsız olarak değerlendirildiğinde en fazla azalma oranları 0,5 ppb için %9,13 (300 MPa) ve 5 ppb için %10,23 (500 MPa) ve 50 ppb için %47,70 (500 MPa)'dir. Bu sonuçlar basıncın etkisini 500 MPa'da yüksek olduğunu ancak bunu

gözetmek için deneylerin düşük M1 konsantrasyonları yerine 5 ppb ve üzerindeki konsantrasyonlarda yapılmasının gerekliliğini göstermektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda yapılan deneylerde M1'in geri kazanımı, enjeksiyonu ve analiz sistemin bu gibi düşük konsantrasyonlardaki ölçüm hassasiyetinin yetersiz olması gibi deneysel hatalar nedeni ile sonuçlar sanki uygulanan YHB'nin hiçbir etkisi olmadığı kanısını doğurmaktadır (Şekil 9). Bazı HPLC sonuçlarına ait örnekler Şekil 10-11'de verilmiştir.

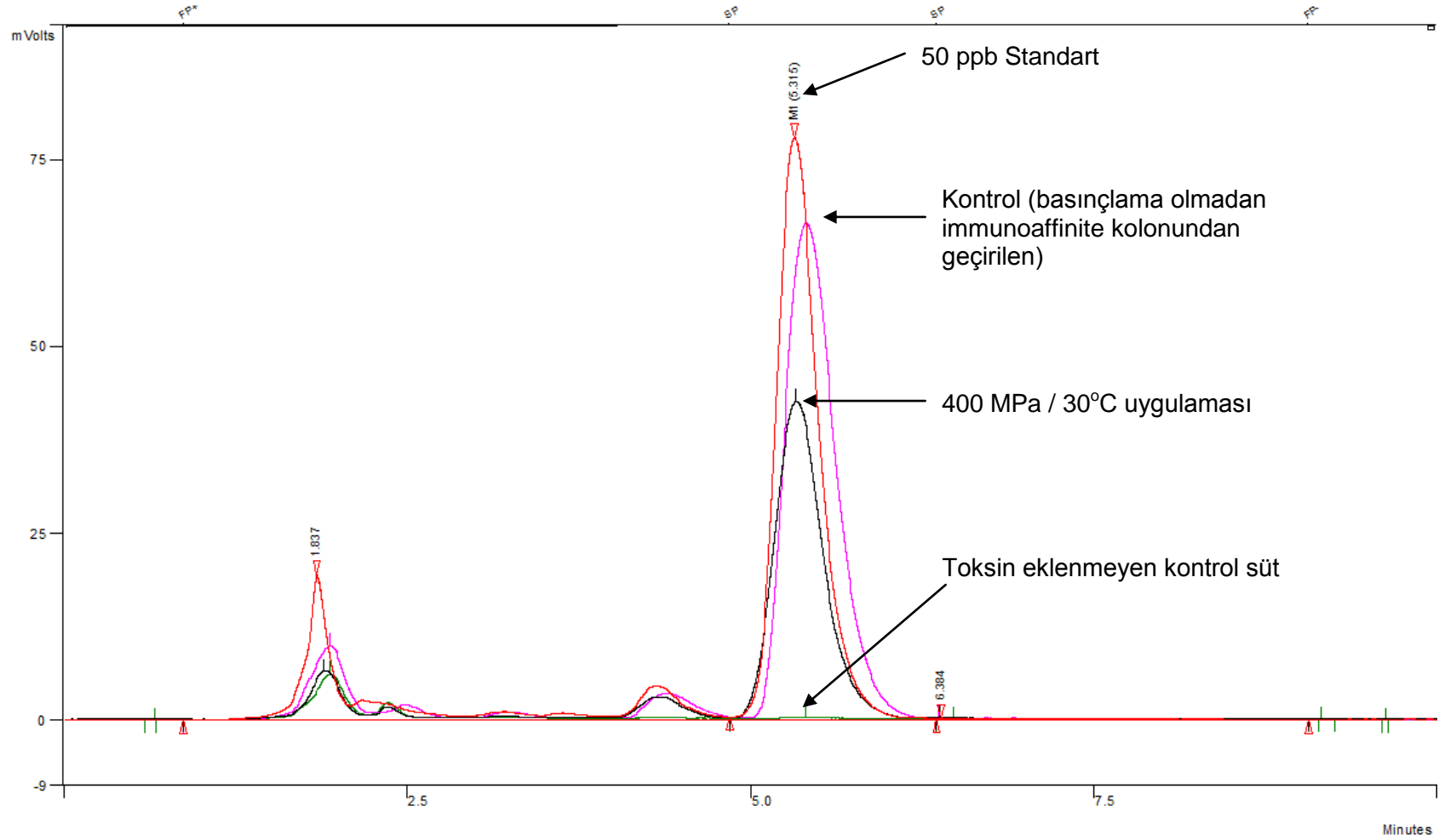


Şekil 9. 0,5 ppb aflatoxin M1 konsantrasyonunda uygulanan farklı basınç /sıcaklık denemelerine ait HPLC sonuçları (1:400 MPa/40°C; 2:500 MPa/50°C; 3:500 MPa/40°C; 4:400 MPa/50°C; 5:300 MPa/50°C; 6:300 MPa/40°C; 7:400 MPa/30°C).

Şekil 10. 50 ppb aflatoksin M1 denemelerinde 500 MPa / 20°C uygulamasının standart ve kontroller ile karşılaştırılması.



Şekil 11. 50 ppb aflatoksin M1 denemelerinde 400 MPa / 30°C uygulamasının standart ve kontroller ile karşılaştırılması.



Basıncın etkisi kullanılan en yüksek M1 konsantrasyonu olan 50 ppb'de daha rahat izlenmiştir. Bu konsantrasyonda hem basınç hem de kısmi olarak sıcaklığın inaktivasyon üzerine etkisi görülmektedir. Bu sebeple partner araştırma merkezinde (Bordo Üniversitesi I) yapılan **v-YHB** deneylerinde 5, 50 ve 100 ppb konsantrasyonları kullanılmıştır. **v-YHB** denemelerinden elde edilen sonuçlar ise Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmektedir. Toksin konsantrasyonları hesaplanırken kontrol olarak kullanılan basınçlanmamış süt örneklerinde bulunan kalıntı miktarları da eklenerek toplam konsantrasyondaki azalma oranı hesaplanmıştır. Bu sonuçlar Şekil 12-14'de görüldüğü gibi LC-MS/MS analizleri sonucunda elde edilmiştir.

Tablo 2. Sütte aflatoksin M1 için uygulanan 6 vurgu X 50 saniye **v-YHB** için LC-MS/MS sonuçları.

	Basınç-Sıcaklık	Ortalama	Standart Sapma	% Azalma	Ortalama Azalma
5 ppb	300MPa-30°C [†]	5,45	0,14	9,92	7,09
	300MPa-40°C [‡]	5,83	0,32	5,21	
	300MPa-50°C [‡]	5,77	0,54	6,14	
	400MPa-30°C [†]	6,24	0,60	NA	2,81
	400MPa-40°C [‡]	6,19	0,16	NA	
	400MPa-50°C [‡]	5,63	0,64	8,45	
	500MPa-30°C [†]	5,55	0,96	8,34	2,78
	500MPa-40°C [‡]	6,20	0,13	NA	
	500MPa-50°C [‡]	6,33	0,02	NA	
50 ppb	300MPa-30°C [†]	39,40	3,61	22,82	29,89
	300MPa-40°C [‡]	34,19	1,55	33,16	
	300MPa-50°C [‡]	33,93	2,44	33,68	
	400MPa-30°C [†]	40,63	2,44	20,42	25,74
	400MPa-40°C [‡]	35,28	0,53	31,04	
	400MPa-50°C [‡]	37,98	1,59	25,76	
	500MPa-30°C [†]	35,78	0,65	29,91	30,63
	500MPa-40°C [‡]	34,82	3,60	31,92	
500MPa-50°C [‡]	35,77	3,66	30,06		
100 ppb	300MPa-30°C [†]	81,20	4,81	19,64	24,78
	300MPa-40°C [‡]	75,18	3,71	25,68	
	300MPa-50°C [‡]	71,80	3,46	29,02	
	400MPa-30°C [†]	81,95	1,27	18,90	23,59
	400MPa-40°C [‡]	75,35	5,09	25,51	
	400MPa-50°C [‡]	74,50	1,48	26,35	
	500MPa-30°C [†]	73,38	3,15	27,39	26,73
	500MPa-40°C [‡]	74,89	1,11	25,96	
500MPa-50°C [‡]	73,99	5,00	26,85		

*NA: Hiç azalma görülmeyen örnekler.

[†] Kontrol sütte bulunan aflatoksin M1 miktarı 1,05 ppb.

[‡] Kontrol sütte bulunan aflatoksin M1 miktarı 1,15 ppb.

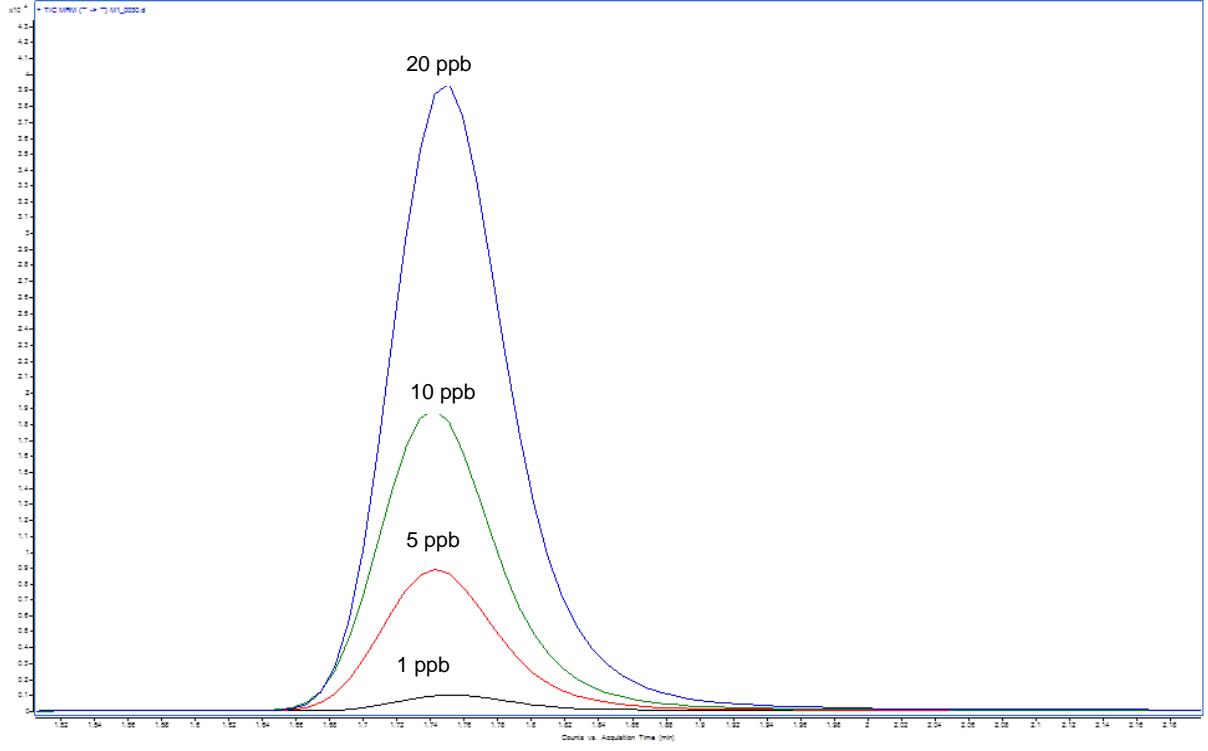
Tablo 3. Sütte aflatoksin M1 için uygulanan 2 vurgu X 150 saniye v-YHB için LC-MS/MS sonuçları.

	Basınç-Sıcaklık	Ortalama	Standart Sapma	% Azalma*	Ortalama Azalma
5 ppb	300MPa-30°C [†]	6,34	0,06	NA	
	300MPa-40°C [‡]	6,29	0,50	NA	
	300MPa-50°C [‡]	5,86	1,05	4,76	1,59
	400MPa-30°C [†]	6,42	0,26	NA	
	400MPa-40°C [‡]	6,31	0,46	NA	
	400MPa-50°C [‡]	5,83	0,36	5,15	1,72
	500MPa-30°C [†]	6,04	0,40	0,23	
	500MPa-40°C [‡]	5,62	0,03	8,67	
	500MPa-50°C [‡]	5,31	0,50	13,63	7,51
50 ppb	300MPa-30°C [†]	37,37	0,88	26,79	
	300MPa-40°C [‡]	33,60	4,04	34,32	
	300MPa-50°C [‡]	35,93	2,09	29,77	30,29
	400MPa-30°C [†]	36,95	0,85	27,62	
	400MPa-40°C [‡]	33,75	2,40	34,02	
	400MPa-50°C [‡]	38,63	4,28	24,49	28,71
	500MPa-30°C [†]	37,64	0,05	26,27	
	500MPa-40°C [‡]	34,80	1,27	31,96	
	500MPa-50°C [‡]	37,28	0,11	27,13	28,45
100 ppb	300MPa-30°C [†]	81,90	1,20	18,95	
	300MPa-40°C [‡]	64,18	1,94	36,55	
	300MPa-50°C [‡]	78,75	1,84	22,15	25,88
	400MPa-30°C [†]	69,48	1,59	31,25	
	400MPa-40°C [‡]	71,30	1,63	29,51	
	400MPa-50°C [‡]	77,45	5,02	23,43	28,06
	500MPa-30°C [†]	75,43	0,73	25,35	
	500MPa-40°C [‡]	71,38	3,36	29,44	
	500MPa-50°C [‡]	76,10	1,63	24,77	26,52

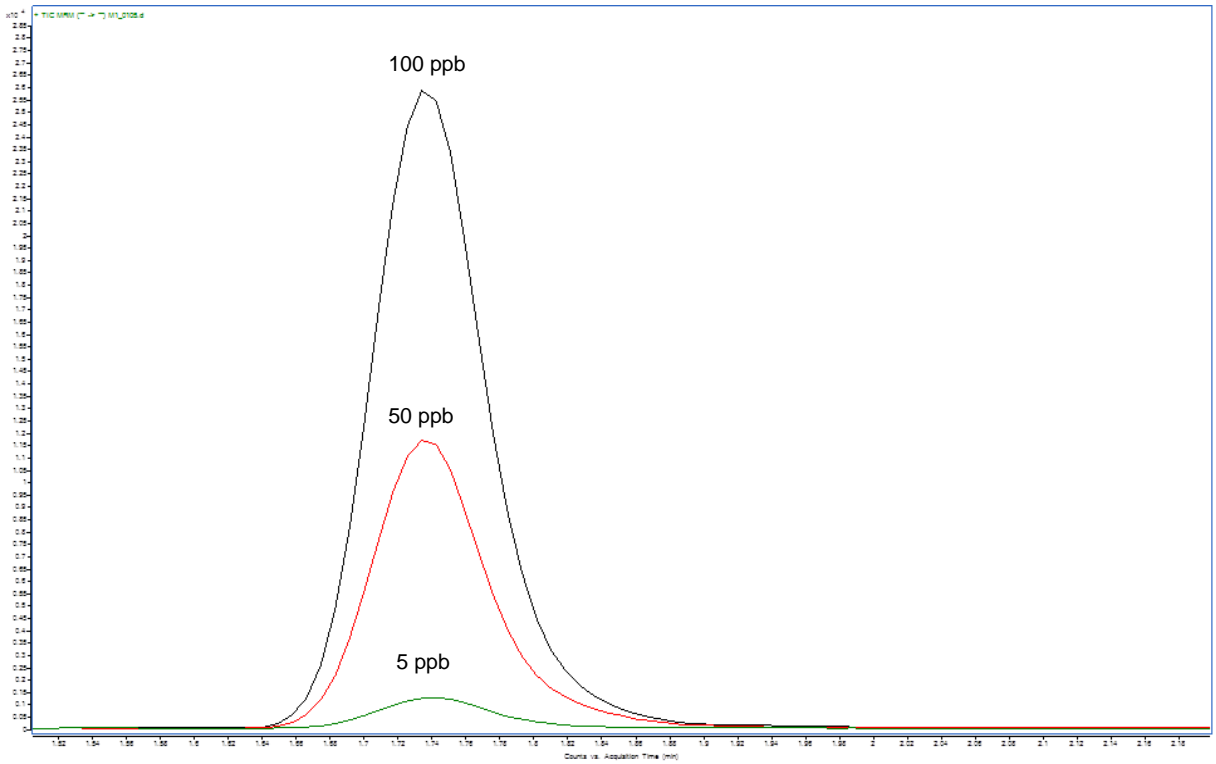
*NA: Hiç azalma görülmeyen örnekler.

[†] Kontrol sütte bulunan aflatoksin M1 miktarı 1,05 ppb.

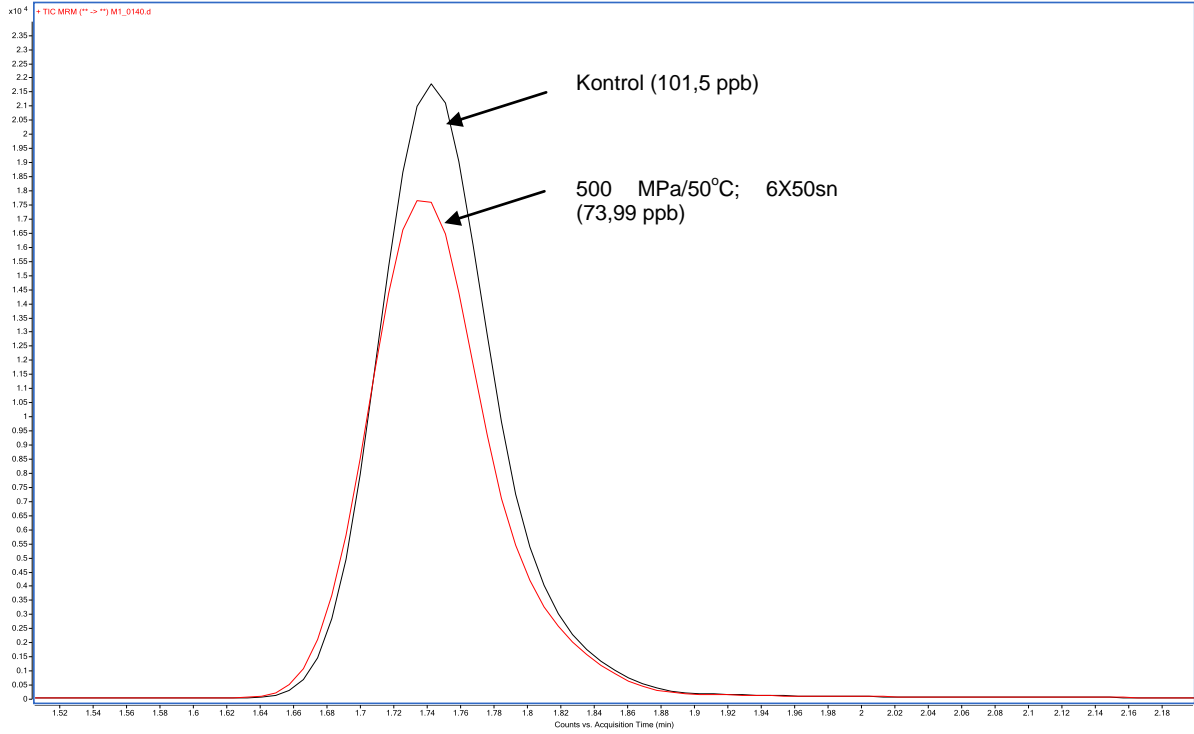
[‡] Kontrol sütte bulunan aflatoksin M1 miktarı 1,15 ppb.



Şekil 12. 1 ppb, 5ppb, 10ppb ve 20 ppb aflatoxin M1 içeren standart çözeltilerin LC-MS/MS kromotogramları.



Şekil 13. v-YHB (2 X 150 saniye) ile 500MPa / 40°C işlem görmüş sütte 5ppb, 50 ppb ve 100 ppb aflatoxin M1 için LC-MS/MS kromotogramları.



Şekil 14. Süte eklenen 100 ppb aflatoksin M1 (kontrol) ve 500MPa / 50°C (6 vurgu X 50 saniye) işlem görmüş 100 ppb aflatoksin M1 eklenen süt için LC-MS/MS kromotogramları.

v-YHB uygulamaları ile edilen sonuçlarda sütte aflatoksin M1 konsantrasyonlarındaki değişim **YHB** uygulamaları bir yönü ile paralellik göstermektedir. Yine **v-YHB** uygulamaları sonucunda da basıncın etkisi düşük konsantrasyonlarda sınırlı iken, yüksek aflatoksin M1 konsantrasyonlarında artmaktadır. 6 vurgu X 50 saniye uygulamasında azalma oranları 5 ppb için %0-9,92'ye kadar, 50 ppb için %20,42-33,68'e kadar ve 100 ppb için %18,90-29,02'ye kadar değişim göstermektedir. Öte yandan, 2 vurgu X 150 saniye uygulamasında da elde edilen sonuçlar 5ppb, 50ppb ve 100 ppb için sırasıyla %0-13,63, %24,49-34,32, %18,95-36,55'dir. Bu sonuçlar kullanılan farklı vurguların etkisinin sütte aflatoksin M1 seviyesini benzer şekilde basınç ve sıcaklık kombinasyonundan bağımsız olarak düşürdüğünü göstermektedir. Sütte bulunan aflatoksin M1 seviyesini düşürmek için kullanılan **v-YHB** ve **YHB** uygulamaları arasındaki farklılık ise sonuçların 50ppb konsantrasyonunda **YHB** uygulamasının daha etkin olduğunu göstermesidir. Bu konsantrasyonda **YHB** ile meydana gelen azalma sıcaklıktan bağımsız olarak en fazla %47,70 iken, diğer iki vurguda **v-YHB** için bu oran %30,29 ve %30,63'dür.

Aflatoksinlerin gıdalarda seviyelerinin düşürülmesi başka araştırmacılar tarafından da çalışılmıştır. Bu çalışmalar, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Biyolojik olarak detoksifikasyon, laktik asit bakterileri ya da mayalar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un, canlı hücreler ve sıcaklıkla öldürülen hücrelerin rekonstitüe sütte aflatoksin M1'e bağlanma oranları sırasıyla %7.85 -25.94 ve %12.85 -27.31 olarak bulunmuştur (KABAK ve VAR, 2010). TOPÇU ve ark. (2010) *Enterococcus faecium*'un iki farklı suşunu kullanarak %19,3 ile %37,5 arasında suşa göre değişen düzeylerde aflatoksin B1'in detoksifikasyonunu göstermişlerdir.

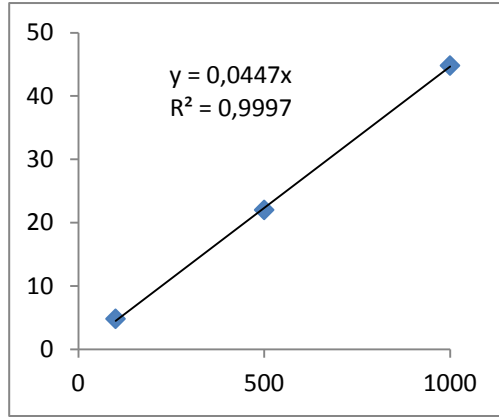
Amonyak uygulamasının aflatoksin seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (BREKKE, 1977). Kimyasal uygulamaların aflatoksin içeriğine olağan etkisi için bir diğer örnek ise kurutulmuş incirlerde ozon uygulaması verilebilir (ZORLUGENÇ ve ark., 2008). Bu çalışmada gaz halinde verilen ozonun kurutulmuş incirlerde aflatoksin B1 içeriğini düşürdüğü belirtilmiştir.

Aflatoksin M1 düzeyindeki değişim, süttten feta peyniri üretimi sırasında MOTAWEE ve McMAHON (2009) tarafından çalışılmıştır. Gıda işleme sırasındaki fiziksel uygulamaların bu değişime etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada 63 °C'de 30 dak. Uygulanan pastörizasyon işleminin aflatoksin M1 miktarında <%10 oranında bir azalma sağladığı görülmüştür. Benzer durum PRANDINI ve ark. (2009) tarafından yapılan bir derleme çalışmasında da belirtilmektedir. Yazarlar ayrıca düşük sıcaklıkta depolamada, aflatoksin M1 içeriğinde değişken verilerin olduğunu ve bir sonuca varmanın zor olduğunu; ancak dondurulmuş süt ve süt ürünlerinde birkaç aylık depolamanın aflatoksin M1 içeriğinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığını belirtmişlerdir.

YHB uygulamasının aflatoksin düzeyinin düşürülmesinde kullanımına literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ancak düşük basınç ve yüksek sıcaklık ile pirinçte yapılan bir çalışma bulunmaktadır (PARK ve KIM, 2006). Bu çalışma basınçlı bir pişiricide aflatoksin B1 içeren pirinçlerin pişirilmesi sırasında meydana gelen değişimi ölçmüş, ve araştırmacılar 0,10 MPa, 160°C'de 20 dak. pişirme işlemi sonucunda toksin düzeyinde %78-88 düzeyinde azalma tespit etmişlerdir. JALILI ve JINAP (2012)'in yaptığı çalışma ise basınç uygulamasının sıcaklık yanında sodyum hidrosülfid varlığında aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2) seviyelerinin düşürülmesi amaçlamıştır. İki fiziksel ve bir kimyasal faktörün yer aldığı bu çalışmada 0,15 MPa basınç, 121°C sıcaklık ve %2 sodyum hidrosülfid varlığında aflatoksinler için sırasıyla 96.1%, 77.7%, 100% and 100% azalma tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda yapılan basınç uygulamaları çok düşük olup sıcaklıklar yüksek tutulmuştur. Bu sıcaklıklarda tüm gıdaların işlenmesi mümkün değildir.

Proje kapsamında elde ettiğimiz bulgular, daha düşük sıcaklıklarda yüksek basınç uygulaması ile sütte aflatoksin M1 konsantrasyonlarında düşüş olabileceğini göstermektedir. **YHB** ve **v-YHB** uygulamaları açısından bakıldığında düşük konsantrasyonlardaki etkinin her iki basınç uygulaması için de düşük olduğu görülmektedir. 50 ppb aflatoksin M1 konsantrasyonlarında **YHB** uygulaması ile elde edilen azalma oranı yaklaşık %40'ı bulurken, **v-YHB**'de yaklaşık %30'dur. Basınç-sıcaklık ya da basınç-sıcaklık-vurgu kombinasyonlarında veriler değişken olduğundan öne çıkan bir uygulama bulunmamaktadır. Ancak aflatoksin M1 miktarının düşürülmesi için basınç uygulamasında pastörizasyon gibi fiziksel uygulamalara kıyasla daha yüksek oranda azalma tespit edilmiştir.

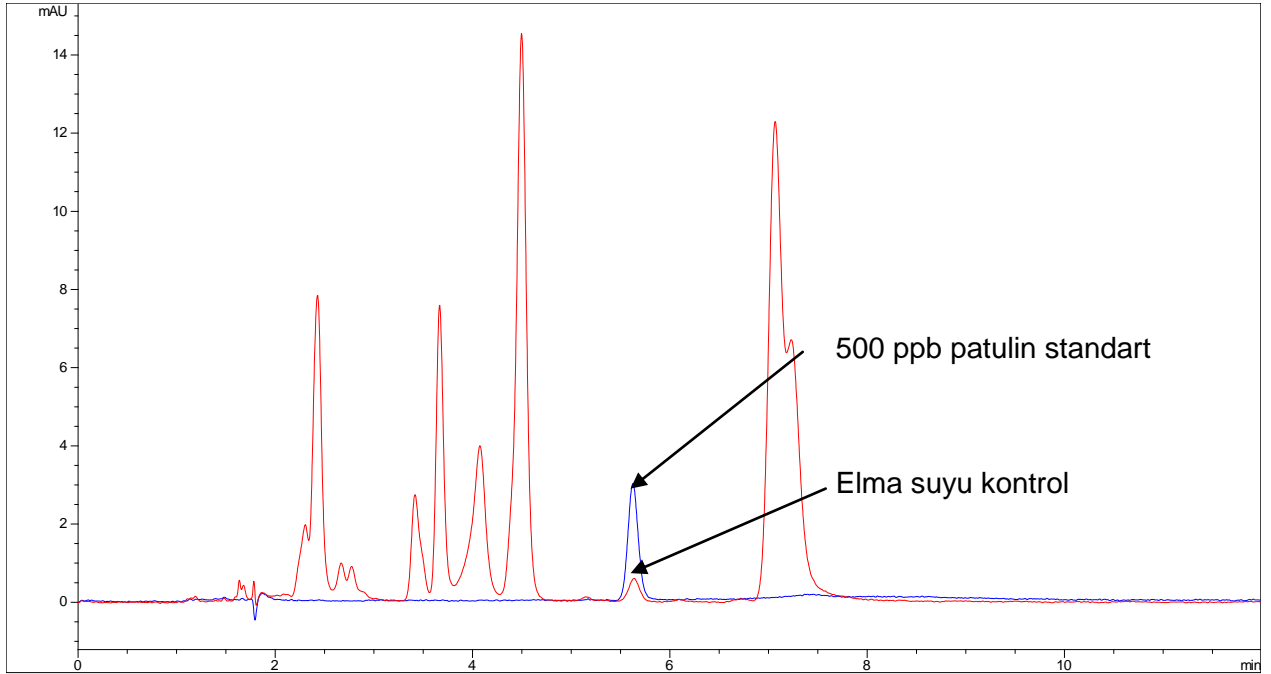
Patulin analizleri için HPLC kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi Şekil 15'de verilmiştir. Standart eğri çizilirken 100 ppb, 500 ppb, ve 1000 ppb konsantrasyonlarında patulin standardı kullanılmıştır. Eğriye ait denklem;



Y (Patulin,ppb) = 0,044 x X(Alan) olup;
korelasyon katsayısı $r^2 = 0,999$ 'dur.

Şekil 15. HPLC kalibrasyonu için kullanılan ve 100 ppb, 500 ppb, 1000 ppb olarak hazırlanan standart eğri.

Denemelerden elde edilen sonuçlar daima kontrol elma suyunda tespit edilen patulin miktarı (ppb) eklenerek veriler düzeltilmiştir. Şekil 16'da hazırlanan patulin standardı (500 ppb) ile kontrol elma suyundan elde edilen pik örnek olarak verilmiştir.



Şekil 16. HPLC analizlerinde kullanılan 500 ppb standart ve kontrol elma suyuna ait kromatogramlar.

Bu düzeltmeden sonra paralel denemelerden elde edilen verilerin ortalamaları alınarak %azalma miktarları hesaplanmıştır. Toksin konsantrasyonları hesaplanırken kontrol olarak kullanılan

basınçlanmamış elma suyu örneklerinde bulunan kalıntı miktarları da eklenerek toplam konsantrasyondaki azalma oranı hesaplanmıştır. Bu sonuçlar Tablo 4’de özetlenmiştir.

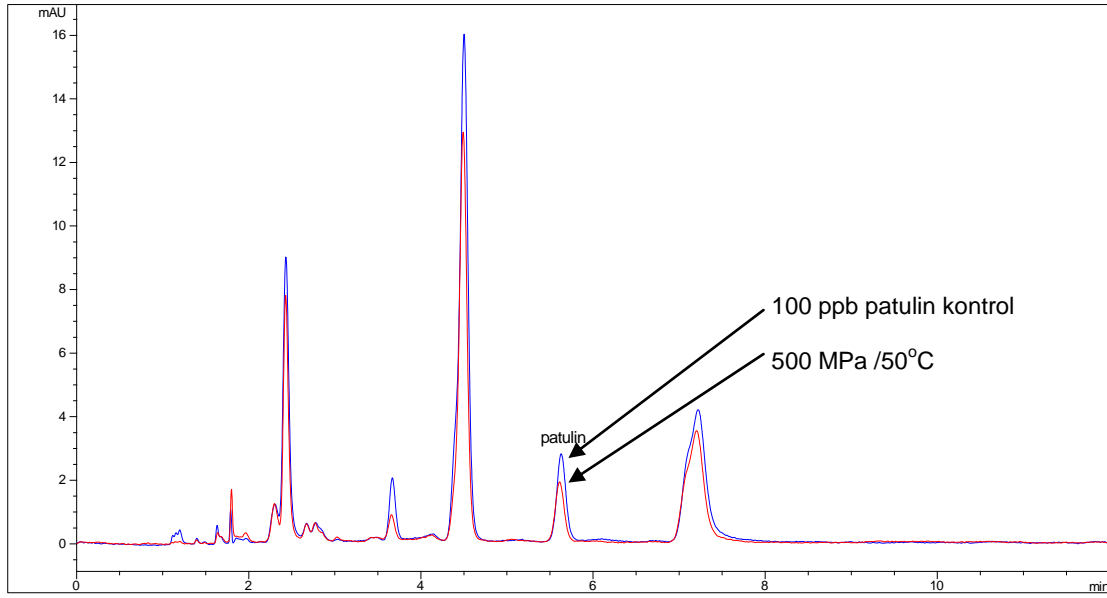
Tablo 4. HPLC analizleri **YHB** ile berrak elma suyunda patulin miktarlarındaki değişimler.

	Basınç-Sıcaklık	Ortalama[†]	Standart Sapma	% Azalma*	Ortalama Azalma
5 ppb	300MPa-20°C	29,58	5,52	NA	
	300MPa-30°C	25,39	6,71	11,53	
	300MPa-40°C	24,00	0,79	16,39	
	300MPa-50°C	27,06	6,71	5,70	8,41
	400MPa-20°C	26,79	5,52	6,67	
	400MPa-30°C	22,32	6,31	22,22	
	400MPa-40°C	26,23	2,37	8,61	
	400MPa-50°C	22,60	4,34	21,25	14,69
	500MPa-20°C	27,06	0,39	5,70	
	500MPa-30°C	32,37	3,95	NA	
	500MPa 40°C	20,65	3,95	28,06	
	500MPa-50°C	18,61	3,67	35,16	17,23
50 ppb	300MPa-20°C	61,38	14,99	16,71	
	300MPa-30°C	46,32	4,74	37,15	
	300MPa-40°C	54,13	14,21	26,55	
	300MPa-50°C	59,71	7,89	18,98	24,85
	400MPa-20°C	65,29	13,42	11,41	
	400MPa-30°C	35,99	10,65	51,16	
	400MPa-40°C	58,31	4,34	20,88	
	400MPa-50°C	66,13	4,34	10,28	23,43
	500MPa-20°C	63,34	5,13	14,06	
	500MPa-30°C	76,17	3,55	NA	
	500MPa-40°C	65,01	13,02	11,79	
	500MPa-50°C	47,43	17,36	35,64	15,37
100 ppb	300MPa-20°C	116,63	2,37	5,72	
	300MPa-30°C	86,50	23,68	30,08	
	300MPa-40°C	97,38	0,39	21,28	
	300MPa-50°C	89,84	28,41	27,37	21,11
	400MPa-20°C	110,77	21,70	10,45	
	400MPa-30°C	77,29	32,75	37,52	
	400MPa-40°C	91,80	13,81	25,79	
	400MPa-50°C	87,61	19,73	29,17	25,73
	500MPa-20°C	93,19	1,58	24,66	
	500MPa-30°C	110,49	26,04	10,68	
	500MPa-40°C	93,19	8,68	24,66	
	500MPa-50°C	92,91	16,18	24,89	21,22

*NA: Hiç azalma görülmeyen örnekler.

[†] Kontrol elma suyunda bulunan patulin miktarı 23,7 ppb.

Patulinin **YHB** uygulamasında seçilen parametrelere göre (basınç-sıcaklık) konsantrasyonundaki düşüş %0-51,2 arasında değişmektedir. Farklı sıcaklık uygulamalarının etkinliği göz ardı edildiğinde, yani uygulanan basınçların farklı konsantrasyonlara etkinliği açısından bakıldığında yine aflatoksin M1 için aldığımız sonuçlara benzer bir tablo çıkmaktadır. Bu da artan patulin konsantrasyonlarına bağlı olarak basıncın etkisinin daha iyi gözlemlenebildiğidir. Uygulanan basınç sıcaklık kombinasyonlarında 20°C'deki uygulamalarda basıncın etkinliğinin diğerlerine göre daha az olduğu görülürken, bu fark 500 MPa basınç uygulamasına geldiğinde azalmaktadır (Şekil 17). Buradan da artan basınç değerlerinde patulin konsantrasyonundaki düşüşe neden olan uygulamanın sıcaklıktan ziyade basınç olduğu sonucu çıkmaktadır.



Şekil 17. 100ppb patulin eklenen elma suyu (kontrol) ve 500MPa / 50°C işlem görmüş elma suyunda eklenen 100 ppb patulin miktarındaki azalmaya ait HPLC verileri.

Tablo 5 ve 6'da ise elma suyunda değişen patulin konsantrasyonlarına ait **v-YHB** uygulamalarının sonuçları verilmiştir. 6 vurgu X 50 saniye uygulamasında sıcaklıktan bağımsız olarak en fazla 5 ppb için %35,24 (300 MPa), 50 ppb için %22,89 (500 MPa) ve 100 ppb için %11,90 (400 MPa) azalma tespit edilmiştir. Öte yandan 2 vurgu X 150 saniye uygulamasında ise en fazla 5 ppb için %35,23 (300 MPa), 50 ppb için %14,02 (500 MPa) ve 100 ppb için %10,24 (400 MPa) azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar her iki **v-YHB** uygulaması arasında paralellik olduğunu göstermektedir.

Elma suyunda patulin için **v-YHB** ve **YHB** uygulamaları karşılaştırıldığında ise konsantrasyona bağlı olarak ters etki olduğu gözlenmektedir. **YHB** yüksek konsantrasyonlarda patuline etkili iken, **v-YHB** daha düşük konsantrasyonlardaki patuline etkilidir. Patulin için elde edilen basınç-sıcaklık ya da basınç-sıcaklık-vurgu kombinasyonlarında öne çıkan bir uygulama olmamasına rağmen, basıncın konsantrasyona bağlı olarak elma suyunda patulin seviyesinin düşürülmesinde etkili olduğu görülmektedir.

Tablo 5. Berrak elma suyunda patulin için uygulanan 6 vurgu X 50 saniye v-YHB sonuçları.

	Basınç-Sıcaklık	Ortalama	Standart Sapma	% Azalma	Ortalama Azalma
5 ppb	300MPa-30°C [†]	7,73	0,59	30,81	35,24
	300MPa-40°C	9,38	1,03	12,79	
	300MPa-50°C	4,07	1,26	62,11	
	400MPa-30°C [†]	6,61	2,64	40,80	32,77
	400MPa-40°C [‡]	8,57	1,78	20,32	
	400MPa-50°C [‡]	6,75	0,24	37,19	
	500MPa-30°C [†]	8,29	0,28	25,81	23,19
	500MPa 40°C [‡]	9,43	0,32	12,27	
	500MPa-50°C [‡]	7,37	0,87	31,48	
50 ppb	300MPa-30°C [†]	47,71	9,23	15,06	17,62
	300MPa-40°C [‡]	46,48	0,95	16,62	
	300MPa-50°C [‡]	43,95	3,67	21,17	
	400MPa-30°C [†]	45,42	1,03	19,13	18,88
	400MPa-40°C [‡]	47,24	3,28	15,27	
	400MPa-50°C [‡]	43,36	0,79	22,23	
	500MPa-30°C [†]	39,79	3,79	29,17	22,89
	500MPa-40°C [‡]	45,45	1,30	18,47	
	500MPa-50°C [‡]	44,03	2,68	21,02	
100 ppb	300MPa-30°C [†]	97,77	14,21	7,91	4,94
	300MPa-40°C [‡]	105,92	3,31	NA	
	300MPa-50°C [‡]	98,44	5,37	6,91	
	400MPa-30°C [†]	88,48	8,56	16,67	11,90
	400MPa-40°C [‡]	105,16	5,17	0,56	
	400MPa-50°C [‡]	86,22	6,23	18,47	
	500MPa-30°C [†]	103,01	4,66	2,97	0,99
	500MPa-40°C [‡]	108,48	6,08	NA	
	500MPa-50°C [‡]	107,28	1,85	NA	

*NA: Hiç azalma görülmeyen örnekler.

[†] Kontrol elma suyunda bulunan patulin miktarı 6,17 ppb.

[‡] Kontrol elma suyunda bulunan patulin miktarı 5,75 ppb.

Tablo 6. Berrak elma suyunda patulin için uygulanan 2 vurgu X 150 saniye v-YHB sonuçları.

	Basınç-Sıcaklık	Ortalama	Standart Sapma	% Azalma*	Ortalama Azalma
5 ppb	300MPa-30°C [†]	9,21	0,63	17,57	35,23
	300MPa-40°C	6,17	3,51	42,64	
	300MPa-50°C	5,86	3,71	45,49	
	400MPa-30°C [†]	9,07	0,28	18,82	27,78
	400MPa-40°C [‡]	6,31	1,10	41,34	
	400MPa-50°C [‡]	8,26	1,82	23,17	
	500MPa-30°C [†]	9,10	0,40	18,57	15,56
	500MPa 40°C [‡]	10,99	1,18	NA	
	500MPa-50°C [‡]	7,73	1,70	28,10	
50 ppb	300MPa-30°C [†]	45,28	5,25	19,38	12,07
	300MPa-40°C [‡]	47,07	1,30	15,57	
	300MPa-50°C [‡]	55,05	2,72	1,26	
	400MPa-30°C [†]	48,44	10,18	13,77	13,83
	400MPa-40°C [‡]	45,17	1,07	18,97	
	400MPa-50°C [‡]	50,86	4,62	8,76	
	500MPa-30°C [†]	46,60	5,68	17,04	14,02
	500MPa-40°C [‡]	45,98	0,24	17,52	
	500MPa-50°C [‡]	51,56	5,05	7,51	
100 ppb	300MPa-30°C [†]	87,39	9,55	17,69	9,13
	300MPa-40°C [‡]	102,65	10,22	2,93	
	300MPa-50°C [‡]	98,60	9,31	6,76	
	400MPa-30°C [†]	90,07	1,42	15,17	10,24
	400MPa-40°C [‡]	99,58	21,11	5,83	
	400MPa-50°C [‡]	95,48	12,55	9,71	
	500MPa-30°C [†]	90,32	16,22	14,93	5,01
	500MPa-40°C [‡]	105,64	22,02	0,11	
	500MPa-50°C [‡]	114,82	3,43	NA	

*NA: Hiç azalma görülmeyen örnekler.

[†] Kontrol elma suyunda bulunan patulin miktarı 6,17 ppb.

[‡] Kontrol elma suyunda bulunan patulin miktarı 5,75 ppb.

Elma suyunda patulin konsantrasyonunu düşürmek için yüksek basınç uygulamasını konu alan çalışmalardan biri BRUNA ve ark. (1997) tarafından yapılmıştır. Elma suyuna oda sıcaklığında 1 saat ayrı ayrı 300, 500 ve 800 MPa basınç uygulayarak patulin konsantrasyonlarında sırasıyla %42, %53 ve %62 azalma tespit etmişlerdir. Çalışmamızda basınçlama uygulaması yalnızca 5 dk. olarak yapılmıştır. Buna rağmen patulin konsantrasyonlarında azalmalar belirlenmiştir.

Elma suyu ve ürünlerinde patulin konsantrasyonunu düşürmek için farklı uygulamalar literatürde mevcuttur. FRUNES ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada elma ürünlerinde vurgulu-ışık kullanarak

patulin konsantrasyonunu azaltmaya çalışmıştır. Test edilen maksimum dozda elma suyunda %22 oranında azalma tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ

Proje kapsamında yürüttüğümüz çalışmalar, gıdaların işlenmesi sırasında düşük sıcaklık derecelerinde basıncın etkisi ile aflatoksin M1 ve patulin oranlarının düşürülmesini amaçlamıştır. Halihazırda bu toksinlerin gıdalarda ve yemlerde üretimi sırasında düşürülmesi için alınan pek çok önlem bulunmaktadır. Ancak bu önlemler mikotoksin problemini çözmekte yeterli değildir. Gıda işleme yöntemlerinin etkinliği de yine toksin seviyelerinin düşürülmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu sebeplerle, yeni geliştirilen teknolojilerin mikotoksin seviyelerini düşürmek için ne kadar etkili olduğu konusunda yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tamamlamış olduğumuz bu çalışmada basınç uygulamalarının sütte aflatoksin M1 ve elma suyunda patulin konsantrasyonlarının düşürülmesinde etkili olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda model bir çözelti kullanmak yerine bu toksinlerin sorun yarattığı sırasıyla süt ve berrak elma suyu kullanılmıştır. Böylece bu mikotoksinler risk teşkil ettikleri gıdalarda çalışıldığı için endüstriyel uygulamada ne kadar çözüm üretilebileceği de görülmüştür. Bu açıdan bakıldığında aşağıdaki sonuçlar ortaya çıkmıştır:

- Sütte aflatoksin M1 seviyesi basınç-sıcaklık uygulaması ile düşürülebilmektedir. Ancak basıncın etkisi değişken olup, 300-500 MPa basınçta ve 20-50°C sıcaklıkta en uygun kombinasyon belirlenememiştir.
- Basıncın etkisi sütte bulunan aflatoksin M1 konsantrasyonlarına göre değişmektedir. Ölçülebilen en fazla düşüş 50 ppb ve üzerindeki konsantrasyonlar içindir.
- **YHB** ve **v-YHB** uygulamaları arasında aflatoksin M1'in 50 ppb konsantrasyonu için **YHB** uygulaması daha iyi sonuç vermiştir.
- Berrak elma suyunda patulin seviyesinin düşürülmesinde basınç-sıcaklık uygulaması etkili bulunmuştur. Ancak yine patulin için de en uygun basınç-sıcaklık ya da basınç-sıcaklık-vurgu kombinasyonu belirlenememiştir. Sonuçlar değişkendir.
- Berrak elma suyunda patulinin konsantrasyonuna bağlı olarak basıncın etkisi de değişmektedir. **YHB** uygulaması yüksek konsantrasyonlara daha etkili iken, **v-YHB** uygulaması düşük konsantrasyonlara daha etkili bulunmuştur.
- Grubumuzun daha önceki çalışmalarında **v-YHB** nin bakteri sayısının azaltılmasında **YHB**'ye göre daha faydalı olduğunu gözlemlemiştik (BUZRUL ve ark., 2009). Fakat bu çalışmamızda mikotoksinler için **v-YHB**'nin **YHB** ile karşılaştırıldığında bir üstünlüğünün olmadığı görülmektedir. Bunun sebebi, toksin molekül yapılarının sadece kovalent bağları taşımaları ve **v-YHB** ile **YHB**'nin kovalent bağlara olan etkisinin farklı olmamasıdır.

Elde edilen bu sonuçlar ile sütte aflatoksin M1 ve berrak elma suyunda patulin konsantrasyonlarının düşürülmesi için basınçlama işleminin kullanılması önerilebilir. Aflatoksin M1 için **YHB** basınç uygulaması toksinin yüksek konsantrasyonlarda olduğu sütler için tavsiye edilebilir. Berrak elma suyunda ise yüksek patulin konsantrasyonlarında **YHB** kullanılmalı iken, düşük konsantrasyonlarda **v-YHB** kullanılmalıdır. Bu işlemler için 300-500 MPa basınç ve 20-30°C'lerde işletmeler tarafından optimize edilen bir kombinasyon belirlenebilir.

6. REFERANSLAR

BAKIRCI I., A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey, *Food Control* 12, 47–51, (2001).

BENNETT J.W., Klich M, Mycotoxins, *Clinical microbiology reviews*, 16, 497–516, (2003).

BOZOĞLU F., Different mycotoxin inactivation applications and their inactivation mechanisms, *Matica Srpsaka Proceedings for Natural Sciences*, 117, 27-35, (2009).

BOZOĞLU F., Inactivation mechanisms of different mycotoxins NATO advanced research workshop on advances in food security and safety against terrorist threats and natural disasters, *Advances in Food Protection: Focus on Food Safety and Defense Book Series: NATO Science for Peace and Security Series A-Chemistry and Biology*, 197-204, (2011).

BREKKE O. L., Sinnhuber O.R., Peplinski A.J., Wales J. H., Putnam G.B., Lee D.J., Ciegler A., Aflatoxin in corn: ammonia inactivation and bioassay with rainbow trout, *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 34-37, (1977).

BRUNA D., Voldrich M., Marek M., Kamar J., Effect of high pressure treatment on the patulin content of apple concentrate, ed: Oliveira J.C., Knorr D., *Process Optimisation and Minimal Processing of Foods, European Commission COPERNICUS PROGRAMME Concerted action CIPA-CT94-0195 Volume:4*, 19-22 (1997).

BUZRUL S., Alpas H., Largeteau A., Demazeau G., Efficiency of pulse pressure treatment for inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk, *European Food Research and Technology*, 229, 127–131, (2009).

FRUNES G.J., Gomez P.L., Resnik S.L., Alzamora S.M., Application of pulsed light to patulin reduction in McIlvaine buffer and apple products, *Food Control*, 30, 405-410, (2013).

GÖKMEN V., Acar J., Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 847, 69–74, (1999).

JALILI M., Jinap S., Role of sodium hydrosulphite and pressure on the reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black pepper, *Food Control*, 27, 11-15, (2012).

KABAK B., Var I., Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains, *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43, 617–624, (2008).

KOCASARI F.Ş., Taşçı F., Mor F., Survey of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Burdur, Turkey, *International Journal of Dairy Technology*, 65, 365-371, (2012).

MARGOSH D., Moravek M., Gänzle M.G., Märtilbauer E., Vogel R.F., Ehrmann M.A., Effect of high pressure and heat on bacterial toxins, *Food Technology and Biotechnology*, 43, 211–217, (2005).

MENDONÇA C., Venâncio A., Fate of aflatoxin M1 in cheese whey processing, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2067–2070, (2005).

MOAKE M.M., Padilla-Zakour O.I., Worobo R.W., Comprehensive review of patulin control methods in foods, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 8-21, (2005).

MOTAWEE M.M., McMahon D.J., Fate of aflatoxin M1 during manufacture and storage of feta cheese, *Journal of Food Science*, 74, T42-T45, (2009).

MOTAWEE M.M. Bauer J., McMahon D.J., Survey of aflatoxin M1 in cow, goat, buffalo and camel milks in Ismailia-Egypt, *Bull Environ Contam Toxicol*, 83, 766–769, (2009).

ÖZDEMİR M., Determination of aflatoxin M1 levels in goat milk consumed in Kilis province, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54, 99-103, (2007).

PARK J.W., Kim Y.B., Effect of pressure cooking on aflatoxin B1 in rice, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 2431-2435, (2006).

PEREYRA C.M. Cavaglieri L.R., Chiacchiera S.M., Dalcero A.M., Fungi and mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina, *Veterinary Medicine International*, 2010, 1-7, (2010).

PİLAVTEPE-ÇELİK M., Buzrul S., Alpas H., Largeteau A., Demazeau G., Multi-pulsed high hydrostatic pressure treatment for inactivation and injury of *Escherichia coli*, *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 6, 343–348, (2011).

PRANDINI A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva G., On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984–991, (2009).

PUEL O., Galtier P., Oswald I.P., Biosynthesis and toxicological effects of patulin, *Toxins*, 2, 613-631, (2010).

RAWAL S., Kim J.E., Coulombe Jr.R., Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention, *Research in Veterinary Science*, 89, 325–331, (2010).

RENDUELES E., Omer M.K., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R., Prieto M., Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review, *LWT- Food Science and Technology*, 44, 1251-1260, (2011).

RITCHIE J.C., Aflatoxin, *Molecules of Death*, ed: Waring R.H, Steventon G.B., Mitchell S.C., 2 Baskı, Imperial College Press, London UK, 1-18, (2007).

SANT'ANA A.S., Rosenthal A., Massaguer P.R., The fate of patulin in apple juice processing: A review, *Food Research International*, 41, 441–453, (2008).

SHEPHARD G.S. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1215–1224, (2009).

TGK, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, *Resmi Gazete*, 29.12.2011-28157, (2011).

TOKUŞOĞLU Ö., Alpas H., Bozoğlu F., High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 250–258, (2010).

TOPÇU A., Bulat T., Wishah R., Boyacı I.H., Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains, *International Journal of Food Microbiology*, 139, 202–205, (2010).

TURNER N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A., Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Analytica Chimica Acta*, 632, 168–180, (2009).

YU J., Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination, *Toxins*, 4, 1024-1057, (2012).

ZORLUGENÇ B., Zorlugenç F.K., Öztekin S., Evliya I.B., The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs, *Food and Chemical Toxicology and Chemical Toxicology*, 46, 3593–3597, (2008).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 110O791
Proje Başlığı: Aflatoksin M1 ve Patulin Miktarlarının Süt ve Elma Suyunda Vurgulu Hidrostatik Basınç ile Düşürülmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Faruk BOZOĞLU (Yürütücü); Prof. Dr. Hami ALPAS (Araştırmacı), Yrd. Doç. Dr. M. Dilek AVŞAROĞLU ERKAN (Araştırmacı)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: -
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.06.2011 – 01.12.2012
Öz (en çok 70 kelime) <p>Bu projede, birer mikotoksin olan aflatoksin M1 ve patulin miktarlarının ayrı ayrı süt ve elma suyunda vurgulu hidrostatik basınç kullanılarak düşürülmesi amaçlanmıştır. Örneklere farklı Basınç / Sıcaklık / Vurgu kombinasyonlarında basınçlama prosesi uygulanmıştır.</p> <p>Elde edilen sonuçlara göre sütte aflatoksin M1 ve berrak elma suyunda patulin konsantrasyonlarının düşürülmesi için basınçlama işlemi kullanılabilir. Aflatoksin M1 için vurgusuz yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulaması toksinin yüksek konsantrasyonlarda olduğu sütler için tavsiye edilebilir. Berrak elma suyunda ise yüksek patulin konsantrasyonlarında YHB kullanılmalı iken, düşük konsantrasyonlarda vurgulu-YHB kullanılabilir.</p>
Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M1, patulin, süt, elma suyu, yüksek hidrostatik basınç, vurgulu yüksek hidrostatik basınç.
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
Projeden Yapılan Yayınlar:
Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.