

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SÜTTEKİ ANTİBİYOTİK KALINTILARININ ISIL İŞLEM ETKİSİYLE VE
DEPOLAMA SÜRESİNCE DEĞİŞİMİ

Serap DURAKLI VELİOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK

ÖZET

Bu çalışmada sütte bulunan klortetrasiklin kalıntılarının ısı ile işlemin etkisi ve ısı ile işlem görmemiş, pastörize edilmiş ve kaynatılmış sütte bulunan kalıntıların buzdolabı sıcaklığında depolama ile değişimini incelenmiştir. Antibiyotik kalıntı miktarının tespitinde Enzim İmmunoassay yöntemi kullanılmıştır. Sütün pastörize edilmesi ve kaynatılması sonucunda, klortetrasiklin konsantrasyonunun sırasıyla, yaklaşık %41 ve %48 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca buzdolabı sıcaklığında depolamanın tüm örneklerin konsantrasyonlarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre tüm örneklerde depolama süresince klortetrasiklin miktarı % değişimlerinin önemli olduğu ve farklı ısı ile işlem uygulamalarının, klortetrasiklinin depolama stabilitesini farklı şekilde etkilemiş olduğu sonuçlarına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, Klortetrasiklin, Süt, Isıl İşlem, Depolama

DETERMINING THE CHANGES OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK
WITH HEAT TREATMENT AND DURING STORAGE

By Serap DURAKLI VELİOĞLU

M.Sc. Thesis

Trakya University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Main Science Branch of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Osman ŞİMŞEK

SUMMARY

In this research, the changes of chlortetracycline residues in pasteurized and boiled milk by heat treatment and during storage at refrigerator temperature were investigated. Enzyme Immunoassay Method was used in determining the antibiotic residue level. Pasteurization and boiling of milk caused a decrease of 41% and 48% in the chlortetracycline concentrations respectively. Storage of milk samples at refrigerator temperature also caused a decrease in the concentration of all samples. The variations in concentration values with heat treatment and the variations in values with storage were found to be significant. Also heat treatments were found to affect the chlortetracycline stability during storage.

Key Words: Antibiotics, chlortetracycline, milk, heat treatment, storage

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	4
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Çiğ Süt	17
3.1.2. Kimyasal Maddeler	17
3.2. Metod	18
3.2.1. Belirli Konsantrasyonda Antibiyotik İçeren Süt Örneklerinin Hazırlanması	18
3.2.2. Süt Örneklerine Isıl İşlem Uygulanması	18
3.2.3. Süt Örneklerinin Depolanması	19
3.2.4. Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması	19
3.2.5. Süt Örneklerindeki Antibiyotik Miktarının Belirlenmesi	19
3.2.6. Antibiyotik Miktarı Değişiminin Yoğurt Bakterilerinin Asit Geliştirme Özellikleri İle Belirlenmesi	22
3.2.6.1. Yoğurt Kültürü Hazırlanması	22
3.2.6.2. İnhibitör Aranması	22
3.2.6.3. Titre Edilebilir Asitlik Tayini	23
3.2.7. İstatistiksel Analizler	24
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	25
4.1. Süt Örneklerinin Antibiyotik Miktarlarındaki Değişimler	25
4.2. Süt Örnekleri İle Elde Edilen Yoğurtlardaki Asitlik Değerleri	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
6. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	
TEŞEKKÜR	

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u> <u>No.</u>
Çizelge 4.1. Isıl İşlem Etkisiyle Sütteki Klortetrasiklin Miktarındaki Değişim	25
Çizelge 4.2. Isıl İşlem Etkisiyle Klortetrasiklin Konsantrasyonundaki Değişime İlişkin Varyans Analiz Tablosu	27
Çizelge 4.3. Isıl İşlem Etkisiyle Klortetrasiklin Miktarındaki % Değişime İlişkin Varyans Analiz Tablosu	28
Çizelge 4.4. Depolama Boyunca Sütteki Klortetrasiklin Konsantrasyonundaki Değişim	30
Çizelge 4.5. Depolama Boyunca Klortetrasiklin Konsantrasyonundaki Değişime İlişkin Varyans Analiz Tablosu	33
Çizelge 4.6. Depolama Boyunca Sütteki Klortetrasiklin Miktarının % Değişimi	34
Çizelge 4.7. Depolama Boyunca Klortetrasiklin Miktarının % Değişimine İlişkin Varyans Analiz Tablosu	35
Çizelge 4.8. Depolama Boyunca Isıl İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları	36
Çizelge 4.9. Depolamanın 1. Gününde Isıl İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları	36
Çizelge 4.10. Depolamanın 2. Gününde Isıl İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları	37
Çizelge 4.11. Depolamanın 3. Gününde Isıl İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları	37
Çizelge 4.12. Depolamanın 4. Gününde Isıl İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları	38
Çizelge 4.13. Klortetrasiklin İçeren Örneklerin Yoğurt Kültür Testi Sonuçları	41

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 2.1. Tetrasiklinlerin Kimyasal Yapıları	5
Şekil 2.2. Sülfamethazinin Kimyasal Yapısı	6
Şekil 2.3. Streptomisinin Kimyasal Yapısı	7
Şekil 4.1. Isıl İşlem Etkisiyle Sütteki Klortetrasiklin Konsantrasyonunun Değişimi	26
Şekil 4.2. Isıl İşlem Etkisiyle ve Depolama İle Sütteki Klortetrasiklin Konsantrasyonunun Değişimi	31
Şekil 4.3. Isıl İşlem Görmemiş Örneklerde Depolama İle Klortetrasiklin Konsantrasyonunun Değişimi	32
Şekil 4.4. Pastörize Örneklerde Depolama İle Klortetrasiklin Konsantrasyonunun Değişimi	32
Şekil 4.5. Kaynatılmış Örneklerde Depolama İle Klortetrasiklin Konsantrasyonunun Değişimi	32

KISALTMALAR

AMPI	Ampisilin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EIA	Enzyme Immunoassay
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gas Chromatography
HPLC	High- Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
MRL	Maksimum Kalıntı Limiti
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NB	Nutrient Broth
OMP	Ormetoprim
ppb	Part per billion (µg/kg)
ppm	Part per million (µg/g)
SDM	Sulfadimethoxine
TLC	Thin Layer Chromatography
TSB	Trypticase Soy Broth

1. GİRİŞ

Antimikrobiyaller, anti enfeksiyöz ajanlar veya kemoterapötikler olarak da bilinen antibakteriyel ajanlar, hem sentetik hem de doğal bileşikleri içermektedir. Bu doğal bileşiklerin oluşturduğu grup, antibiyotikler olarak isimlendirilen, genellikle küfler veya bakteriler tarafından düşük konsantrasyonlarda üretilen ve diğer mikroorganizmaların gelişimini inhibe etme özelliğine sahip düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Temelde antibiyotikler beş farklı sınıftan oluşmaktadır. Ancak günümüzde, bu terim antibakteriyel terimi ile eş anlamlı kullanıldığı için, nitrofuranlar, nitroimidazoller gibi bir çok sentetik ilacı da içermektedir (Gentili v.d., 2005).

Antibiyotikler, diğer mikroorganizmaları inhibe etmek veya öldürmek amacıyla bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Çoğu küfler ve *Streptomyces* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedir (Anon., 2006).

Günümüzde birçok farklı antimikrobiyal, antibiyotik ve sülfonamid benzeri kemoterapötik ajanlar, farklı hayvan hastalıklarının önlenmesi ve tedavisi için olduğu kadar gıda üretiminde kullanılan hayvanların gelişmesini teşvik etmek için de kullanılmaktadır (Corcia ve Nazzari, 2002).

Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda en çok kullanılan antimikrobiyaller beş grup altında toplanmaktadır. Bunlar, beta-laktamlar, tetrasiklinler, aminoglikozitler, makrolidler ve sulfonamidlerdir (Güley ve Akbulut, 2000; Mellenberger, 1997). Türkiye’de yaygın olarak kullanılan antibiyotikler, penisilin, streptomisin, tetrasiklinler, sefalosporinler, eritromisin, amoxicillin, neomisindir. Özellikle süt inekçiliğinin yaygın olduğu Marmara, Trakya, Ege, İç Anadolu bölgelerinde süt hayvanlarındaki mastitis ve diğer enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacıyla sık sık penisilin, streptomisin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve tetrasiklin gibi antibiyotikler ile bunların karışımlarının kullanıldığı bilinmektedir (Durna, 2003; Temiz, 1985).

Hastalıkları iyileştirmek amacıyla çeşitli şekillerde süt veren hayvanlara uygulanan antibiyotikler süte geçerler. Adaleye enjekte edilen antibiyotiklerin kan

yoluyla süt hücrelerine gelip oradan süte geçtikleri belirlenmiştir. Mastitis adı verilen meme iltahabını tedavi etmek için krem veya solüsyon şeklinde hazırlanan antibiyotik preparatları, meme başından meme içine, süt kanal ve kanalcıklarına gönderilir. Söz konusu antibiyotiklerin büyük bir kısmı meme kanal ve kanalcıklarındaki sütle dışarı çıkar. Bu yüzden antibiyotik uygulandıktan sonra yapılan ilk sağımlarda elde edilen sütte antibiyotik konsantrasyonu çok yüksektir. Antibiyotik çeşidine, antibiyotik dozuna, memenin hastalık durumuna bağlı olarak bu antibiyotiklerin sütte bulunma süreleri 2-6 gün arasında değişmektedir (Yaygın, 1999). FDA araştırmaları, sütteki ilaç kalıntılarının temel kaynağının mastitisin kontrolünde yararlanılan antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı olduğunu belirtmektedir (Jones, 1999).

Antibiyotiklerin sütteki kalıntı miktarını; antibiyotik dozu, antibiyotiğin uygulanma şekli, tedavi süresi, birden fazla ilacın kullanımı, tedavi süresince tüketime süt vermeme kısıtlamasına uymama gibi faktörler etkileyebilmektedir (Jones, 1999). Antibiyotikler, çeşidine ve hayvana uygulanış şekline bağlı olarak belirli süreler içinde süte geçebilmekte ve uygulamayı takiben ancak belirli bir süre sonrasında süt güvenle kullanılabilir (Temiz, 1985). Antibiyotiklerin süte geçişini; antibiyotik çeşidi, antibiyotiğin verilme şekli, memenin hastalık durumu, hayvanın karakteri, sağım sayısı, mevsimin etkisi gibi birçok faktör etkiler (Uysal vd, 1995). Bununla birlikte, birçok ilacın, üzerinde yazan yasal arınma süresinden daha fazla zaman boyunca vücutta kalması nedeniyle, bazı durumlarda süt örnekleri tahmin edilenden daha yüksek miktarda kalıntı içerebilmektedir. Yasal olarak vücuttan atılma süresi 72 saat olarak belirlenen penisilin buna güzel bir örnektir. Çünkü penisilin kalıntısı yaklaşık 18 gün boyunca sütte bulunabilmektedir (Jones, 1999).

Hayvansal üretimde kullanılan ilaçlar, canlıların vücudunda kısmen parçalanarak etkisiz ve zararsız hale gelirken, bir kısmı vücutta birikip yumurta ve süt gibi gıdalara geçerek insanlar için risk oluşturur. Sürekli olarak ve yaygın biçimde kirlenmiş gıdaları tüketen toplumlarda vücut direnci düşebileceği gibi genel sağlık durumları da bozulabilir, hastalanma ve ölüm sıklığı artabilir (Anon., 2002; Doyran, 2000).

Hayvansal ürünlerin güvenilir ve kaliteli olmasını sağlamak amacıyla, hem Türk Gıda Mevzuatı'nda hem de Avrupa Birliği Mevzuatı'nda, tüketime sunulan ürünlerde bulunabilecek veteriner ilaçlarının maksimum kalıntı limitleri belirlenmiştir. Gıdalarda bulunan veteriner ilaç kalıntıları tüketici sağlığı açısından büyük öneme sahiptir.

Gıda üretiminin çeşitli basamaklarında kullanılan yöntemler bazı ilaçların kalıntı düzeylerinde değişimlere neden olmaktadır. Çalışmada gıda güvenliği açısından son derece önemli bir konu olan antimikrobiyal kalıntıları ile ilgili bir araştırma yapılması amacıyla sütteki klortetrasiklin kalıntılarının ısıtma işlemiyle ve depolama süresince değişimi incelenmiştir. Ayrıca klortetrasiklin içeren süt örneklerinde, yoğurt bakterilerinin asit geliştirme özellikleri incelenmiştir.

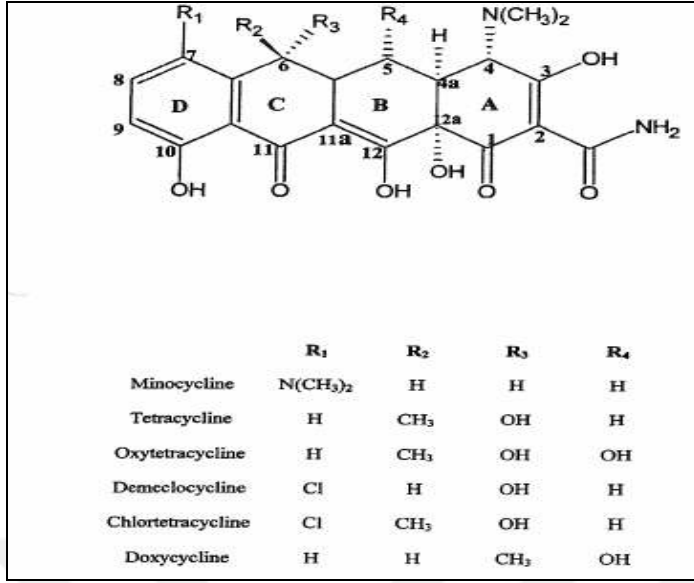
2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Gıdalarda Bulunan Antibiyotik Kalıntılarının Olumsuz Etkileri

Gıdalarda bulunan kalıntıların insan sağlığı açısından muhtemel birçok zararı bulunmaktadır. Göreceli olarak yüksek antibiyotik kalıntısı içeren gıdalar bazı hipersensitif kişilerde alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir (Anon., 2002; Doyran, 2000).

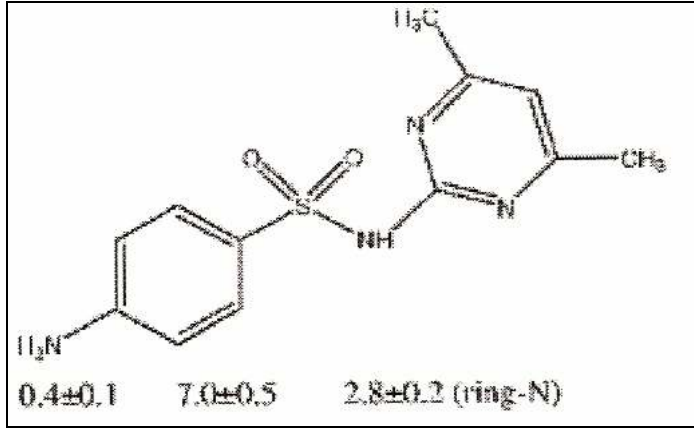
Ani yan etkilere ek olarak hala tam olarak bilinmeyen ve düşük kalıntı düzeylerine maruz kalma sonucu ortaya çıkan uzun dönemli etkiler de mevcuttur (Corcia ve Nazari, 2002). İnsanlarda hafif bir alerjiden başlayarak, çeşitli organlarda hasara ve anafilaktik şoktan (alerjenlere karşı gelişen şok) ölüme kadar değişik etkileri olabilen zehirlenmelere yol açabilirler. Yine antibiyotik kalıntılarının biriktiği ürünleri tüketen insanların ince ve kalın bağırsaklarındaki yararlı bakteri topluluğunun baskı altına alınması ve böylece zararlı bakterilerin üremesine yol açılması söz konusu olabilmektedir (Anon., 2002; Doyran, 2000).

Çok sık antibiyotikli süt ya da buna benzer gıdalar tüketen bireylerde antibiyotiklere dayanıklı mikroorganizma suşlarının çoğalacağı ve bu durumun antibiyotiklerin insan tedavisindeki etkinliğinin azalmasına neden olabileceği belirtilmektedir (Anon., 2002; Uysal ve ark., 1995).



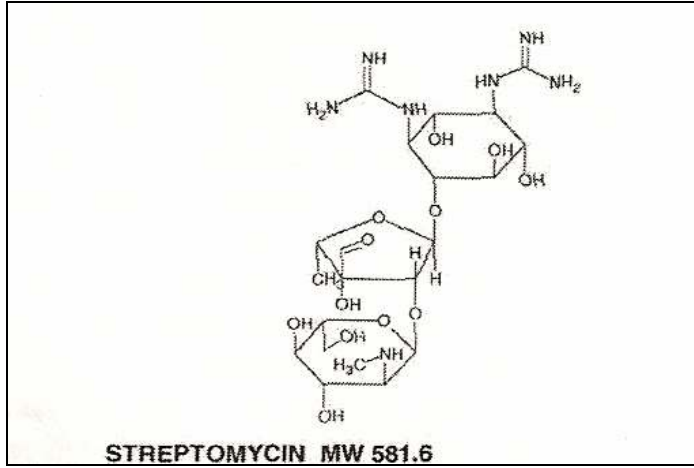
Şekil 2.1. Tetrasiklinlerin Kimyasal Yapıları
(Corcia ve Nazari, 2002)

Şekil 2.1’de tetrasiklinlerin kimyasal yapıları verilmiştir. Tetrasiklinler, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu ve oldukça ucuz antibiyotiklerdir. Bu sebeple sığırların hastalıklardan korunması, hastalıklarının tedavisi gibi amaçların yanında (Corcia ve Nazari, 2002), büyümeyi teşvik amacıyla, tıroapatik seviyelerin altında sığır yemlerine eklenmektedir. Bu gruba, klortetrasiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, doksisisiklin, minosiklin gibi bir çok antibiyotik dahildir (Schenck ve Callery, 1998). Bu gruptan çok az miktarda kalıntı bile, toksik ve alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir (Boatto vd., 1999).



Şekil 2.2. Sulfamethazinin Kimyasal Yapısı
(Msagati ve Nindi, 2004)

Şekil 2.2’de sulfamethazinin kimyasal yapısı görülmektedir. Sulfamethazinin dahil olduğu Sulfonamidler grubu, bakteriyostatik etkili sentetik bileşiklerdir. Dihidrofolik asidin enzimatik sentezinde p-aminobenzoik asit ile yarışarak etkisini gösterir. Bu gruba ait 10 farklı madde veteriner hekimlikte hayvanlardaki enfeksiyonları önlemek ve hastalıkları tedavi etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Corcia ve Nazari, 2002). Ayrıca, hayvanlarda büyümeyi teşvik amacıyla da kullanılabilir. Bazı kaynaklarda sulfamethazinin, tiroid kanseri nedeni olan muhtemel bir ajan olduğu belirtilmektedir. Sulfonamidlerin potansiyel karsinojenik karakteri nedeniyle, bu maddelerin gıdalarda analizi özel bir konudur. (Msagati ve Nindi, 2004).



Şekil 2.3. Streptomisinin Kimyasal Yapısı
(Anon., 2006b)

Şekil 2.3'te streptomisinin kimyasal yapısı verilmiştir (Anon., 2006b). Streptomisin aminoglikozid grubu antibiyotiklerdendir. Aminoglikozitlerin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı geniş bir etki alanı vardır. Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda en sık kullanılan aminoglikozitler, gentamisin, neomisin, dihidrostreptomisin ve streptomisindir. Aminoglikozitler, polar, hidrofilik özellikte bileşiklerdir. Antibakteriyal etkisini, 30S ribozoma bağlanarak bakteriyal protein sentezini engellemek suretiyle gösterir. Bu antibiyotikler, uygunsuz kullanımlarının kranial sinirlerde hasara neden olması nedeniyle ototoksik ve böbreklerde hasara neden olması nedeniyle de nefrotoksik olarak değerlendirilmektedir (Schenck ve Callery, 1998). Gıdalardaki kalıntıları da bu nedenlerle potansiyel tehlike yaratmaktadır (Corcia ve Nazari, 2002). Bunlara ek olarak aminoglikozid kalıntısı varlığı sebebiyle alerjik bazı reaksiyonların da oluşabileceği bildirilmektedir. Damar içi ve kas içi uygulamalar, yasal arınma süresine uyulduğunda, genellikle sütte çok az miktarda kalıntı oluşturmaktadır. Ancak intramamary ve intrauterine kullanım sütte kalıntı varlığının potansiyel nedenleridir (Gaudin ve ark., 2005).

Bu antibiyotiklere ek olarak veteriner hekimlikte en yaygın kullanılan grup olan β -laktamlar da penisilinleri ve sefalosporinleri içermektedir. Bunların gıdalardaki kalıntıları da, hassas kişilerdeki potansiyel alerjik reaksiyonlar nedeniyle önemlidir.

Antibiyotikler, süt endüstrisinde de bazı problemlere yol açmaktadır. Peynir, tereyağ ve yoğurttaki starterlerin aktivitesini geciktirmenin yanında, tereyağ üretiminde asit ve aroma maddelerinin üretimini azaltmakta; sütün pıhtılaşmasını etkilemekte ve peynirin olgunlaşmasında problemlere neden olmaktadır (Jones, 1999). Özellikle yoğurt bakterileri antibiyotiklere karşı çok duyarlıdır. Antibiyotikli süt yoğurda işlendiği zaman, bunların faaliyetleri düşük antibiyotik dozunda yavaşlar, yüksekte ise tamamen durur. Yapılan alışmalar, düşük dozlardaki antibiyotiğin *Lactobacillus delbrueckei subsp. bulgaricus* ile *Streptococcus thermophilus* arasındaki simbiyotik çalışmayı engellediğini, sütte asitlik oluşumunu yavaşlattığını göstermiştir. Böyle sütlerle yoğurt yapıldığı zaman inkübasyon süresi uzamaktadır. Yüksek dozlarda ise, bakteriler hiç faaliyet gsteremediklerinden sütlerde asitlik yükselmez. Ayrıca antibiyotikli ortamlarda bakterilerin morfolojik görünüşlerinin de değiştiği saptanmıştır (Yaygın, 1999). Süt endüstrisinde fermentasyon söz konusu olduğunda inhibisyona en duyarlı starter bakteri olan *Streptococcus thermophilus*'un hassasiyeti göz önünde bulundurulmaktadır (Temiz, 1985; Yamani ve ark., 1999).

Lactobacillus delbrueckei subsp. bulgaricus ile *Streptococcus thermophilus*'un ortak kültürlerinin yani saf yoğurt kültürünün, 0.01 IU/ml penisilin, 1.0 IU/ml streptomisin bulunan sütlerde faaliyetinin yavaşlamakta olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 0.008 IU/ml penisilin, 0.1 µg/ml basitrasin ve 0.08 µg/ml tirotrisin bulunan sütlerde yoğurt bakterilerinin ortak faaliyetinin yavaşladığı, yoğurt oluşumunun zorlaştığı belirlenmiştir (Yaygın, 1999).

Bazı antibiyotiklerin yoğurt bakterilerinin sütteki asit geliştirme özellikleri üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırmada; yoğurt kültürünün 0.1 IU penisilin/ml ve 10 µg oksitetrasiklin/ml süt konsantrasyonlarında hemen hemen hiç asit gelişimi göstermediği; sütün ml'sindeki 1 µg tetrasiklin, 10 µg klortetrasiklin ve 1 µg oksitetrasiklin dozlarında da başlangıca göre fazlaca bir asit gelişiminin belirlenmediği belirtilmektedir (Temiz, 1985).

Türk Gıda Kodeksi'nde antienfeksiyöz ajanlar, kemoterapatikler ve antibiyotikler olarak sınıflandırılmıştır. İlgili tebliğde tetrasiklin grubu için maksimum

kalıntı limiti sütte 100 µg/kg'dır (Anon., 2004). Avrupa Birliği Mevzuatı'nda da tetrasiklin kalıntı limiti ise 100 ppb olarak belirlenmiştir (Corcia ve Nazzari, 2002).

Gıdalardaki Antimikrobiyal Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Günümüzde gıdalardaki antimikrobiyal madde kalıntılarının belirlenmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; mikrobiyal inhibisyon testleri, mikrobiyal reseptör testleri, enzimatik kolorimetrik testler, kromatografik metodlar ve immunolojik testlerdir. Kalıntı testleri kalitatif, kantitatif ya da yarı kantitatif özellik taşımaktadır (Güley ve Akbulut, 2000).

İmmunolojik ve mikrobiyal inhibisyon tarama testleri gıdalarda antibiyotiklerin aranması için en çok kullanılan yöntemlerdir. Hassasiyeti yüksek olan bu mikrobiyal metodların bazı dezavantajlarının olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal yöntemler ile farklı antibiyotiklerin ayrılabilmesi nedeniyle spesifikliğinin düşük olması (Boatto v.d.,1999), yüksek somatik hücre sayısı varlığının hatalı pozitif sonuçlara neden olabilmesi gibi bazı dezavantajlar söz konusudur (Schenck ve Callery, 1998). Bu nedenlerden dolayı, sütteki antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde hassas ve spesifik sonuç veren özel analitik tekniklerden yararlanılmaktadır. Sıvı Kromatografisi (LC) ve Gaz Kromatografisi (GC) bu amaçla en sık kullanılan yöntemlerdir (Schenck ve Callery, 1998).

Biyoassay yöntemlerine kıyasla, fizikokimyasal yöntemler çok daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Bunlar arasında, GC-LC (Gas- Liquid Chromatography), HPLC (High- Performance Liquid Chromatography), TLC (Thin Layer Chromatography), jel elektroforezi ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metodları sayılabilir (Schnack ve Callery,1998; Boroğlu ve Çakmakçı, 2003).

Gıdalardaki Antibiyotik Kalıntı Miktarlarının Çeşitli Uygulamalarla Değişimi

Farklı ısı işlemlere tabi tutulduktan sonra tüketilen hayvansal gıdalarda ve su ürünlerinde antibiyotik kalıntıları ile sıklıkla karşılaşmaktadır. Gıda üretiminin çeşitli basamaklarında kullanılan yöntemler, bazı antimikrobiyal maddelerin kalıntı düzeylerinde değişimlere neden olmaktadır. Bu nedenle farklı antibiyotiklerin farklı ısı işlemler sonrası stabiliteleri ile ilgili bilgiler, proses boyunca bu maddelerin parçalanıp parçalanmayacağına değerlendirilmesinde önemlidir.

Tetrasiklin, penisilin, kloramfenikol gibi antibiyotiklerin pişirme sırasındaki stabiliteleri ile ilgili az miktarda bilgi mevcuttur (Shakila et al., 2006). Önceleri bu araştırmalarda mikrobiyolojik analiz yöntemleri kullanılmaktaysa da günümüzde yapılan çalışmalarda HPLC gibi daha hassas yöntemlerin kullanıldığı belirtilmektedir (Rose v.d., 1996).

Isıl işlemin tetrasiklin grubu antibiyotikler üzerindeki etkisi ile ilgili yapılmış çalışmalar, tetrasiklinlerin hayvansal kaynaklı gıdalarda ısıya çok dayanıklı olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda, kemiklere bağlı halde bulunan tetrasiklin kalıntılarının 130 °C’de stabil olduğunun belirlendiği belirtilmektedir (Kühne v.d., 2001).

Brander (1970), etteki klortetrasiklin ve oksitetrasiklin kalıntılarının pişirme sırasında yok edildiğini; Shirk v.d., (1957) ise pişirme sırasında klortetrasiklinin izo-klorotetrasikline parçalandığını bildirmişlerdir. Feinman ve Matheson (1978) tarafından ise, pişirilmiş balık ve karideste klortetrasiklin ve oksitetrasiklin kalıntılarının varlığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Katz v.d., (1973), pişirme sırasında, oksitetrasiklinin α ve β - apoksitetrasiklinlere dönüştüğünü bildirmiştir.

Etteki ve kemik unundaki tetrasiklin ve klortetrasiklin kalıntılarının ısı işlem sonrası stabilitesinin araştırıldığı bir çalışmada, örnekler 133 °C’de 20, 30, 45 dakika ve 100 °C’de 20 ve 30 dakika boyunca ısı işleme tabi tutulmuştur. Örneklerdeki ısı işlem öncesi ve sonrası tetrasiklin konsantrasyonu HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. 133 °C’de

tetrasiklin konsantrasyonunun yaklaşık %50 oranında azaldığı belirtilmektedir. Klortetrasiklinin ise ısıya tetrasiklinden daha duyarlı olduğu ve yaklaşık %90 - %100 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen bulguların toksikolojik geçerliliği tartışılmış ve tetrasiklin türevlerinin parçalanma ürünleri ile ilgili daha ileri çalışmalar yapılması tavsiye edilmiştir (Künhe v.d.,2001).

Tetrasiklin türevlerinin hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılması sebebiyle, bu maddelerin yemlerdeki stabilitesi ile ilgili de çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, Klortetrasiklin HCl ve Klortetrasiklin kalsiyum kompleksi kullanılarak 300 ppm klortetrasiklin aktivitesine sahip hayvan yemi hazırlanmış, 1 ay depolamayı takiben, hiç ısı işlem görmeden, 105 °C'de 6 saat kuru ve 115 °C'de 15 dakika ıslak sıcaklığa maruz bırakıldıktan sonra analiz edilmiştir. Örneklerdeki Klortetrasiklin HCl miktarında, ısı işlem görmemiş örnekte depolama ile %10, kuru sıcaklığa maruz bırakılmış örnekte %14, ıslak sıcaklığa maruz bırakılmış örnekte %35 azalma belirlendiği bildirilmektedir. Klortetrasiklin kalsiyum kompleksi içeren örneklerdeki antibiyotik miktarında ise, ısı işlem görmemiş örnekte depolama ve kuru sıcaklığa maruz bırakılmış örnekte azalma belirlenemezken, ıslak sıcaklığa maruz bırakılmış örnekte %8'lik azalma tespit edildiği belirtilmektedir. Klortetrasiklin HCl'in, Klortetrasiklin kalsiyum kompleksine göre ısı işleme daha duyarlı olduğu sonucuna varıldığı açıklanmıştır. Bu çalışma antibiyotiklerin stabilitesinin kimyasal formlarıyla da ilgili olduğunu göstermektedir (Anon., 2006c).

Yapılan bir çalışmada, 100°C'de 10, 20 ve 30 dakika pişirme ve 121 °C'de 10 ve 15 dakika fırınlama işlemlerine tabi tutulan beyaz karidesdeki kloramfenikol kalıntılarının stabilitesi mikrobiyal assay yöntemiyle incelenmiştir. Bu yöntemle, 10, 20 ve 30 dakika pişirme işlemine tabi tutulan karideslerde, 1 µg/ml duyarlılıkla, kloromfenikol kaybı sırasıyla %6, %12 ve %29 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, 10 ve 15 dakika fırınlama işlemi uygulanan karideslerde ise kayıp sırasıyla %9 ve %16 olmuştur. Kloromfenikol kaybının, sıcaklık ve ısıtma süresindeki artışla doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Farklı konsantrasyona sahip örneklerde, kloramfenikolün geri kazanım oralarında istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmediği belirtilmektedir (Shakila et al., 2006).

Balık dokularında yapılan bir çalışmada ise, ormetoprim (OMP) ve sulfadimethoxine (SDM) kalıntılarının pişirmenin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, balık filetolarında pişirmeden önce ve sonraki antibiyotik kalıntı düzeyleri HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Filetolar 160 - 200 ° C’de dumanlama, 190° C’de pişirme, 190° C’de kanola yağında kızartma ve %6 polifosfat çözeltisi enjekte edilerek 4 hafta dondurularak depolandıktan sonra 190° C’de bitkisel yağda kızartma olmak üzere dört farklı yöntemle hazırlanmıştır. Filetoların pişirilmesi, OMP seviyesinin ortalama %54, SDM seviyesinin de % 46.1 oranında azalmasına neden olmuştur. Çalışma sonucunda pişirmenin filetolarında kalıntı OMP ve SDM düzeylerini önemli ölçüde azalttığının ve bunun tüketiciler açısından ek bir güvence sağladığının belirlendiği bildirilmektedir. Ayrıca, dört farklı pişirme metodu ile elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olmadığı da belirtilmektedir (Dehai ve ark., 1996).

Hayvansal dokularda olduğu kadar süt ve süt ürünlerinde de antimikrobiyal kalıntıları oldukça önemlidir. Bununla birlikte, sütteki antibiyotik kalıntılarının ısı işlem etkisiyle değişimleri ve depolama koşullarındaki stabiliteyi ile ilgili sınırlı sayıda veri mevcuttur. Antibiyotikler, ürüne işleme aşamasından önce çiğ sütlere uygulanan ısı işlemlerde genellikle bir kayba uğramamakta, ısıya dayanıklılık göstermektedir (Temiz, 1985). Bununla birlikte sütlerin ısıtılması bazı antibiyotiklerin aktivitesini etkilemektedir.

Araştırmalar penisilin aktivitesinin 72° C’de 15 saniye ısıtılan sütte %8; 87.7 °C’de 30 dakika ısıtılan sütte %20; ticari sterilizasyonda %50 azaldığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, 85 °C’de 30 dakika ısıtılan sütte oksitetrasiklin (terramisin) aktivitesinin 2/3 oranında azaldığı, fakat streptomisin ve kloramfenikole ısıtmanın etkili olmadığı bildirilmektedir (Yaygın, 1999).

Hassas bir süt ürünü olan süttozu üzerinde yapılan bir çalışmanın sonucunda ise, sütte bulunan bazı antibiyotik kalıntılarının miktarında herhangi bir değişiklik olmaksızın doğrudan süttozuna geçtiği, kurutma işleminin antibiyotik kalıntılarını etkilemediği belirlenmiştir (Güley ve Akbulut, 2000).

Gıdalardaki Antibiyotik Kalıntı Miktarlarının Depolama Boyunca Değişimi

Çiğ sütün alımı sırasında, sütteki antibiyotik kalıntılarının yasal sınırlara uyup uymadığının tespiti ve tüketiciler için sağlık riski oluşturan konsantrasyonlarda kalıntının gıda zincirine katılmasının engellenmesi için birçok hızlı test yöntemi geliştirilmiştir. Bununla birlikte, alternatif analitik teknikler kullanılarak (örnek, LC-UV, GC-MS, LC-MS) ek doğrulama testleri gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu yöntemler kullanıldığında, örneklerin laboratuvara taşınması, uygun depolama koşullarında analize kadar bekletilmesi gerekmektedir. Optimal depolama koşulları ile ilgili bilgiler, kalıntı stabilitesinde kilit öneme sahiptir (Riediker v.d., 2004). Depolama boyunca, farklı çözümlerde ve farklı biyolojik matrislerde veteriner ilaçlarının stabilitesine ilişkin çalışmalar daha çok optimal depolama koşullarının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır (Croubels v.d., 2003).

Antibiyotiklerin ve sülfonamid kemoterapötiklerin de bulunduğu bir grup ilacın stabilitesinin test edildiği bir çalışmada, örneklerin proses sıcaklıklarının kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir (Croubels v.d., 2003).

Depolama veya analiz boyunca, örnekteki matris bileşenlerinin veya analitin yetersiz stabilite göstermesi, analiz sonucunun önemli deviasyonlar oluşturmaya neden olur. Analitlerin, çözümlerde veya biyolojik örneklerdeki stabilitesinin izlenmesi, normal laboratuvar akreditasyon sisteminin bir parçasıdır. Avrupa Birliği direktiflerine göre, analitin depolama boyunca çözümlerdeki; depolama boyunca ve/veya örnek hazırlama boyunca matrisdeki; depolama boyunca ve/veya analiz boyunca ekstrakttaki stabilitesi test edilmelidir (Croubels v.d., 2003).

Avrupa Birliği direktiflerine göre, analitin bir çözeltideki stabilitesinin analizinde, analit miktarı, taze hazırlanmış çözeltide ölçülmeli, daha sonra her seferinde 10 parça örnek alınmalı ve bunlar -20, +4 ve +20 ° C'lerde karanlıkta ve +20 ° C'de gün ışığında depolanmalıdır. Depolama zamanının 1-4 hafta olarak seçilebileceği bildirilmektedir (Anon., 2000).

Farklı antibiyotiklerin farklı gıda matrislerinde stabilitesine ilişkin az sayıda çalışma mevcuttur. Bu yapılan çalışmaların çoğunda karaciğer, böbrek, kaslar gibi hayvansal dokular kullanılmıştır (Riediker vd., 2004).

Hayvan dokularında ve plazmada Penisilin G'nin -20°C ve -76°C 'de 3- 6 ay boyunca stabilitesi ile ilgili yapılmış iki çalışmada, -20°C 'de depolama ile farklı doku matrislerinde farklı oranlarda kayıp olduğu bildirilmektedir. -76°C 'de depolama ile ise kalıntı seviyelerinin stabil olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir başka çalışmada -75°C 'de 8 ay boyunca depolanan kas dokusundaki ampisilin (AMPI) düzeyinin önemli bir değişim göstermediği, fakat -25°C 'de depoanan örneklerin konsantrasyonlarında 3 ay sonrasında azalma belirlendiği bildirilmektedir. 4°C 'de depolama ile de AMPI düzeyinde azalma belirlendiği ve dondurma öncesi örnek hazırlama metodlarının, β -laktam antibiyotiklerin stabilitesi üzerinde önemli etkileri olduğu rapor edilmiştir (Riediker v.d., 2004).

Riediker v.d, Guay ve diğerlerinin 1987 yılında yaptıkları bir çalışmada, Penisilin G'nin %60'ının 2°C 'de 48 saat içinde parçalanabildiğini belirttiklerini, bunun yanında, Wiese ve Martin ve ayrıca Boison vd. tarafından yapılan çalışmalar sonucunda ise, 20 ve 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Penisilin G içeren süt örneklerinde, 4°C 'de 6 gün boyunca sabit bir kalıntı düzeyi belirlendiğini bildirmektedir (Riediker v.d., 2004).

Reikider v.d., sütteki bazı β -laktamların belirlenmesi ile ilgili yeni geliştirdikleri metodun validasyonunda, pastörize sütte ve süt ekstraktlarında hedef analitlerin stabilitesini incelemiştir. Amoxisilin, ampisilin, kloksasilin, oxasilin ve penisilin G ile MRL'ye yakın konsantrasyonlarda olacak şekilde kontamine edilen örneklerin, 4°C 'de 3 gün depolama boyunca stabil olduğu, 7. günden itibaren istatistiksel olarak önemli düşüşlerin tespit edildiği bildirilmektedir. Amoxisilinin ve ampisilinin -20°C 'de stabil olduğu bulunurken, aynı sıcaklıkta depolanan kloksasilin, oxasilin ve penisilin G içeren örneklerde, 3 gün sonrasında az fakat istatistiksel olarak önemli düşüşler (%10-20 arasında) tespit edilmiştir. - 76°C 'de 4 hafta boyunca hiçbir analitte düşüş belirlenmemiştir. Buzdolabı sıcaklığında, pastörize süte kıyasla süt ekstraktlarındaki stabilite daha yüksek bulunmuştur. Süt ekstraktlarında pH ayarlandığı ve pH dalgalanmalarının tamponlama sistemleri sayesinde engellendiği için stabilitenin yüksek

olduğu, buna karşılık pastörize sütün çok daha kompleks, bakteriyel ve enzimatik faaliyetlerin gerçekleşebileceği steril olmayan bir sistem olduğu belirtilmektedir (Riediker v.d., 2004).

Yapılan bir çalışmada, tetrasiklin ve klortetrasiklin antibiyotiklerinin duyarlılık testlerinde kullanılan sıvı besiyerlerinde, başlangıç konsantrasyonları 25 µg/ml olacak şekilde ayarlanan bu antibiyotiklerin 37 °C’de stabiliteleri HPLC yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçlar, tetrasiklinin incelenen her iki besiyerinde de önemli bir düşüş göstermediğini, klortetrasiklinin ise tetrasikline kıyasla daha az stabil olduğunu belirtmektedir. TSB (Trypticase soy broth) besiyerinde klortetrasiklin miktarındaki azalma, 3 saat içinde % 50; 7 saat içinde %77 olarak tespit edilmiş; 24 saat sonrasında ise azalma miktarı %99 olarak belirtilmiştir. NB (nutrient broth) besiyerinde ise konsantrasyondaki azalma, 3 saat içinde % 7; 7 saat içinde %22 olarak tespit edilmiş; 24 saat sonrasında ise azalma miktarı %75; 48 saat sonra da %89 olarak belirlenmiştir. Suda hazırlanan çözeltilerinde, tetrasiklin miktarı 24 saat sonra başlangıç konsantrasyonunun % 93’ü; klortetrasiklin miktarı ise 24 saat sonra %97’si; 48 saat sonra da %96’sı olarak belirlenmiştir. Böylece, bu antibiyotiklerin her ikisinin suda stabil olduğunun tespit edildiği ve stabiliteyi etkileyen en önemli faktörün sıcaklık ve inkübasyon süresinden çok, daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi ortam kompozisyonu olduğu vurgulanmaktadır (Ray ve Newton, 1991). TSB ve NB besiyerlerinde klortetrasiklin stabilitesinin incelendiği bu çalışmada, üç farklı konsantrasyon kullanıldığı ve bu üç farklı konsantrasyon için bulunan antibiyotik miktarı % değişim değerlerinde önemli bir farklılık belirlenmediği bildirilmektedir (Ray ve Newton, 1991).

Tetrasiklin içeren süt örneklerinin laboratuvar koşullarında depolanması boyunca stabilitesi ile ilgili bir çalışmada, 50 ppb (ng/ml) klortetrasiklin, demeklosiklin, methasiklin, minosiklin, oksitetrasiklin ve tetrasiklin içeren çiğ süt örnekleri kullanılmıştır. Örnekler 4 ° C’de ve 25 ° C’de depolama sonrasında HPLC yöntemi ile incelenmiştir. Bu alışmada, 4 ° C’de 48 saat ve 25 ° C’de 24 saat depolama sonrası önemli bir kayıp gözlenmediği bildirilmektedir. Deneyin yapıldığı koşullarda, 4 ° C’de 72 saat depolama sonrasında %4 ve %13 arasında değişen oranlarda ve 25 ° C’de 48

saat depolama sonrasında ise %0 ve %18 arasında değişen oranlarda kayıp belirlendiği belirtilmektedir (Podhorniak v.d.,1999).

Sütte bulunan farklı veteriner ilaçlarının depolama boyunca değişimlerinin incelendiği bir çalışmada, aynı gruba ait bazı ilaçlarda, depolama boyunca farklı oranlarda parçalanma belirlenmesine rağmen tetrasiklin grubundaki ilaçlarda genelde yaklaşık olarak aynı parçalanma oranları belirlendiği bildirilmektedir (Croubels v.d., 2003).

Tetrasiklin grubuna ait antibiyotiklerden olan oksitetrasiklinin saf sudaki çözeltisinin (1000–0.01 mg ml) -25  C'de 1 ay boyunca stabil olarak depolandığı belirtilmektedir (Boatto vd, 1999).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çiğ Süt

Araştırma materyali, uzun zamandır antibiyotik tedavisi görmediği kesin olarak bilinen bir hayvandan temin edilerek soğuk zincir altında laboratuara getirilen çiğ süttür. Süt örneği, antibiyotik testi uygulanarak kalıntı içermediği doğrulandıktan sonra kullanılmış ve çapraz kontaminasyonu engellemek için gerekli önlemler alınmıştır. Süt örneklerine farklı konsantrasyonlarda klortetrasiklin ilave edilmiş, ısı işlem görmemiş, pastörize ve kaynatılmış süt olarak ayrılmıştır. Antibiyotik eklenmeyen kontrol numunesi antibiyotik bulaşısının engellenmesi için ayrı bir yerde depolanmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan antibiyotik, tetrasiklin grubuna dahil olan klortetrasiklindir (klortetrasiklin hidroklorit). Bu antibiyotik özel bir firmadan temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Belirli Konsantrasyonda Antibiyotik İçeren Süt rneklerinin Hazırlanması

Çalışmada klortetrasiklin antibiyotiğini, Maksimum Kalıntı Limitinin (MRL) yaklaşık 1 ve 2 katı olacak şekilde içeren süt örnekleri hazırlanmıştır (Gaudin ve ark., 2005).

Öncelikle 1 mg/l (ppm) klortetrasiklin içeren 1000 ml'lik süt rneği hazırlanmıştır. Bu özeltiden 50 ml alıp 500 ml'ye süt ile tamamlayarak 100 ppb'lik, 100 ml alınıp 500 ml'ye süt ile tamamlayarak da 200 ppb'lik süt örnekleri hazırlanmıştır (Gaudin ve ark., 2005). Her iki çözelti üçer eşit parçaya bölünmüş ve farklı balon jodelere aktarılmıştır.

3.2.2. Süt rneklerine Isıl İşlem Uygulanması

100 ppb klortetrasiklin içeren 3 örnekten biri ısıl işlem görmemiş, biri 65° C'de 30 dakika (LTLT) tutularak pastörize edilmiş, biri ise 10 dakika 95° C'de kaynatma işlemine tabi tutulmuştur. 200 ppb klortetrasiklin içeren 3 örneğe de aynı işlemler uygulanmıştır. Antibiyotik içermeyen kontrol numunesi de üçe ayrılmış ve aynı işlemler bu örneklere de uygulanmıştır.

3.2.3. Süt Örneklerinin Depolanması

Farklı oranlarda antibiyotik içeren ve farklı ısıl işlem görmüş süt örnekleri buzdolabı sıcaklığında (0- +4 °C'de) depolanmıştır. Süt örneklerindeki antibiyotiklerin 0- +4 °C'de stabilitelerinin tespiti, buzdolabı koşullarında kısa süreli depolamanın etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır (Riediker v.d., 2004).

3.2.4. Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması

Örnekler analize Competitive Enzyme Immunoassay (EIA) (RIDASCREEN®) prosedüründe belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Yağlı süt örneklerinin yağını almak için 10 °C'de 10 dakika yaklaşık 3,000 rpm'de soğutmalı santrifüjde (Hettich Universal 32 R) santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenmiş süt örneğinin yağı ayrılarak testte kullanılmak üzere buffer 1 ile 1:40 oranında dilüe edilmiştir. Testte kuyu başına 50 µl çözelti kullanılmıştır (Anon.,2005).

3.2.5.Süt Örneklerindeki Antibiyotik Miktarının Belirlenmesi

Klortetrasiklin içeren süt örneklerindeki antibiyotik miktarları, Competitive Enzyme Immunoassay (EIA) (RIDASCREEN®) prosedürüne göre belirlenmiştir. Isıl işlem görmeden, pastörize edildikten sonra ve kaynatma işlemine tabi tutulduktan sonra buzdolabı sıcaklığında (0- +4 °C'de) depolanan süt örneklerindeki antibiyotik kalıntı miktarları, depolamanın 0., 1., 2., 3. ve 4. günlerinde belirlenmiş ve analizler ikişer paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

İlk gün yapılan tespit ile elde edilen iki paralel örneğin konsantrasyonlarının aritmetik ortalaması C_0 , iki paralel örneğin t_i zamanındaki konsantrasyonlarının aritmetik ortalaması C_i olarak kaydedilmiş ve her analiz periyodu için C_i / C_0 oranı hesaplanmıştır (Gaudin vd., 2004).

Antibiyotik miktarlarının belirlenmesinde RIDASCREEN® Antibiyotik test kitleri kullanılmıştır. Test yöntemi, yüksek duyarlılığa sahip, güvenilir, kolay uygulanabilen ve çabuk sonuç veren bir teknik olması nedeniyle önerilmektedir. Testin prensibi, antijen antikor reaksiyonudur.

Bu yöntemle, süt örneklerinde klortetrasiklin 1.5 µg/l düzeyinde belirlenebilmektedir (Anon., 2005).

Analize başlanmadan önce, tüm reaktifler, oda sıcaklığına getirilmiş, kullanıldıktan sonra derhal buzdolabına konulmuştur.

1. Her test serisi için taze standart çözeltilerin hazırlanmasında test kitleri ile birlikte sağlanmış olan standart konsantreler kullanılmıştır. Bu amaçla 50 µl standart konsantre 1 (0 ppb)'e 450 µl buffer 2 eklenerek 0 ppb lik ; 50 µl standart konsantre 2 (0,5 ppb)'ye 450 µl buffer 2 eklenerek 0,05 ppb lik ; 50 µl standart konsantre 3 (1,5 ppb)'e 450 µl buffer 2 eklenerek 0,150 ppb lik ; 50 µl standart konsantre 4 (4,5 ppb)'e 450 µl buffer 2 eklenerek 0,450 ppb lik ; 50 µl standart konsantre 5 (13,5 ppb)'e 450 µl buffer 2 eklenerek 1,350 ppb lik ; 50 µl standart konsantre 6 (40,5 ppb)'ya 450 µl buffer 2 eklenerek 4,050 ppb lik standart çözeltiler hazırlanmıştır (Anon., 2005).

2. Standartlar ve örnekler için yeterli sayıda mikrotiter kuyucuğu pleyte yerleştirilmiş, ayrı ayrı kuyulara 50 µl standart çözeltilerden ya da hazırlanmış örnekten sırasıyla eklenmiştir.

3. Her kuyuya 50 µl Anti-tetrasiklin antibody solüsyonundan ilave edilerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

4. Kuyucuklardaki suyu dışarı boşaltılıp, kuyular 250 µl PBS-T (PBS tween buffer) ile 3 kez yıkanmıştır.

5. Her kuyuya 100 µl enzim konjugat eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

6. Kuyular 250 µl PBS-T (PBS tween buffer) ile 3 kez yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 50 µl substrat ve 50 µl kromojen ilave edilmiştir.

7. İyice karıştırıldıktan sonra 15 dk. oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.

8. Her bir kuyucuğa 100 µl stop solusyonu eklenerek iyice karıştırılmıştır. 60 dakika içinde 'ELx800 Serisi Microplate Reader'da 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (Anon., 2005).

Örneklerin veya standartların elde edilen absorbans değerleri ilk standardın (sıfır standart) absorbans değerine bölünmüş ve 100 ile çarpılmıştır. Böylece sıfır standart, %100'e eşleştirilmiş ve absorbans değerleri yüzde olarak verilmiştir.

$$\frac{\text{Standardın (veya örneğin) Absorbans değeri} \times 100}{\text{Sıfır Standardının Absorbans Değeri}} = \% \text{ Absorbans}$$

Standart çözeltiler ile elde edilen değerler ile çizilmiş olan grafik kullanılarak, örneğin absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon değeri hesaplanmıştır. Örneklerin konsantrasyonu hesaplanırken dilüsyon faktörü (1/40) göz önünde bulundurulmuştur. Bilgisayar ortamında standart grafiklerin çiziminde ve sonuçların hesaplanmasında, Ridawin® programı kullanılmıştır (Anon., 2005).

3.2.6. Antibiyotik Miktarı Değişiminin Yoğurt Bakterilerinin Asit Geliştirme Özellikleri İle Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren süt örneklerinde, depolama boyunca meydana gelen antibiyotik miktarı değişimlerinin, yoğurt bakterilerinin asit geliştirme özellikleri üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla TS 1018 Çiğ İnek Sütü Standardında açıklanan İnhibitör Testi uygulanmıştır (Anon.,1994). Taze yoğurt kültürü hazırlama aşamasında Yamani vd.(1999) tarafından önerilen Yoğurt Kültür Testi (YKT) kullanılmıştır.

3.2.6.1. Yoğurt Kültürü Hazırlanması

Yoğurt Kültür Testinde, Tekirdağdaki bir süt işletmesinde kullanılan yoğurt kültürü (eşit miktarda *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* sub-sp *bulgaricus* içermektedir) kullanılmıştır. Her kültür, 1 g iyi karıştırılmış taze yoğurdun 95 °C de 5 dk ısıl işlem görmüş 99 ml yağsız süt (%10 kuru madde, w/v) ile karıştırılması ile hazırlanmıştır. 42 °C de 4 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, kültürler 5 °C de depolanmıştır. Taze kültürler aynı metodla hazırlanıp bir sonraki gün kullanılmıştır (Yamani vd., 1999).

3.2.6.2. İnhibitor Aranması

Süt örneklerinden ve antibiyotik içermeyen kontrol örneklerinden 25'er ml alınmıştır. Örnekler 45 °C de 5 dk ısıtılmış ve 10 ml süt alınarak içine 1 ml yoğurt

kültürü ilave edilmiştir. 42-44 °C lik etüvde 3 saat inkübasyon sonunda, örneklerin titre edilebilir asitliği tespit edilmiştir.

Şahit ile örneğin asitlikleri arasındaki farkın %0.2 laktik asitten fazla olması durumunda, örnekte inhibitör maddelerin (antibiyotik, deterjan kalıntısı vb.) herhangi birinden önemli miktarda bulunduğu anlaşılmaktadır (Anon., 1994).

3.2.6.3. Titre Edilebilir Asitlik Tayini

Fermentasyon sonrasında, yoğurt numunelerinden 10'ar gram tartılıp, üzerlerine kaynatılarak 40°C'ye kadar soğutulmuş saf sudan 10 ml ilave edilmiştir. Bir cam baget ile ezilip karıştırılan örneğin içerisine 0,5 ml fenolftalein belirteç çözeltisi ilave edilmiştir. Örnek, 0,1 N sodyum hidroksit çözeltisi ile açık pembe renk 30 saniye kaybolmayan pembe renk meydana gelinceye kadar titre edilmiştir. Harcanan NaOH çözeltisi miktarı kaydedilmiştir (Anon., 1999).

Titre edilebilir asitlik, aşağıdaki formül ile kütlece % laktik asit cinsinden hesaplanır (Demirci ve Gündüz, 2004; Anon., 1999).

$$\%Asitlik = \frac{V \times N \times 0.09 \times 100}{G}$$

G

V= Titrasyonda kullanılan NaOH miktarı (ml)

N= Titrasyonda kullanılan NaOH normalitesi

G= Alınan örnek miktarı (g)

3.2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistik analizlerde SPSS paket programı kullanılmıştır. Varyans analizi (ANOVA) sütteki antibiyotik kalıntılarının stabilitesi üzerinde farklı ısıl işlemlerin ve depolama süresinin önemini test etmek için yapılmıştır (Soysal, 1992). Önemli bulunan faktörler için LSD değerleri hesaplanmıştır.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

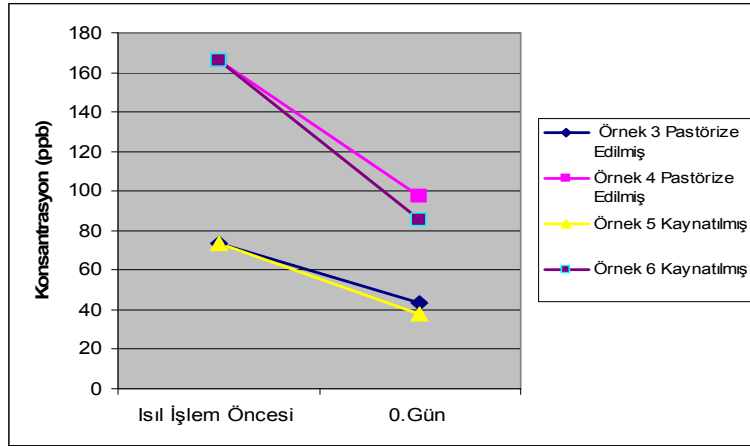
4.1. Süt Örneklerinin Antibiyotik Miktarlarındaki Değişimler

İki farklı konsantrasyonda hazırlanan süt örneklerine iki farklı ısı işlem uygulanmıştır. Isıl işlem sonrası örneklerdeki klortetrasiklin konsantrasyonları, örneklerin absorbans değerlerinden yararlanılarak Çizelge 4.1'deki gibi bulunmuştur. Çizelge 4.1'de örneklerdeki klortetrasiklin miktarının başlangıca göre % değerleri de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Isıl İşlem Etkisiyle Sütteki Klortetrasiklin Miktarındaki Değişim

ÖRNEK NO	GÖRDÜĞÜ ISIL İŞLEM	KONSANTRASYON			
		Isıl İşlem Öncesi Co	Isıl İşlem Sonrası C	Isıl İşlem Öncesi Co/Co*100	Isıl İşlem Sonrası C/Co*100
		(ppb)	(ppb)	%	%
3	Pastörize (65 Derecede 30 dak.)	73,263	43,346	100,000	59,165
4		165,878	97,137	100,000	58,559
5	Kaynatılmış (90 Derecede 10 dak.)	73,263	37,789	100,000	51,580
6		165,878	85,342	100,000	51,449

Çizelge 4.1'den de görüleceği gibi sütün pastörize edilmesi ve kaynatılması sonucunda, klortetrasiklin miktarının sırasıyla, yaklaşık % 41 ve % 48 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada klortetrasiklin miktarının ısıl işlemle önemli ölçüde azaldığının belirlenmesi, klortetrasiklinin parçalandığını veya mevcut yöntem ile tespit edilemeyen diğer ürünlere dönüştüğünü göstermektedir.



Şekil 4.1. Isıl işlem etkisiyle sütteki klortetrasiklin konsantrasyonunun değişimi

Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi her iki ısıl işlem konsantrasyonda azalmaya neden olmuştur. Ancak 95 °C'de 10 dakika işlem gören örneklerde klortetrasiklin miktarındaki azalma ve 65 °C'de 30 dakika işlem gören örneklerdekine göre daha fazladır.

Isıl işlem etkisiyle klortetrasiklin miktarında oluşan farklılıkları belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Tespit edilen klortetrasiklin konsantrasyonuna ilişkin değerler kullanılarak yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Isıl İşlem Etkisiyle Klortetrasiklin Konsantrasyonundaki Değişime İlişkin Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	p Değeri
Isıl işlem türü	1	75,273	75,273	60,226**	0,000
Konsantrasyon	1	20531,164	20531,164	16426,991**	0,000
Isıl işlem varlığı	1	11520,588	11520,588	9217,626**	0,000
Isıl işlem türü x Konsantrasyon	1	9,728	9,728	7,784	0,024
Isıl işlem türü x Isıl işlem varlığı	1	75,273	75,273	60,226**	0,000
Isıl işlem varlığı x Konsantrasyon	1	1759,215	1759,215	1407,549**	0,000
Isıl işlem varlığı x Konsantrasyon x Isıl işlem türü	1	9,728	9,728	7,784	0,024
Hata	8	9,999	1,250		
Toplam	15	171593,387		-	

**p< 0,01 düzeyinde önemli

Konsantrasyon değerleri kullanılarak yapılan varyans analizi sonucunda, örneklerdeki ısıl işlem öncesi ve sonrası antibiyotik konsantrasyonu değişimleri arasındaki farklılıklar, ısıl işlem türleri arasındaki farklılıklar ve konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar %1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Buna ek olarak Isıl işlem türü x Isıl işlem varlığı, Isıl işlem varlığı x Konsantrasyon interaksyonları da önemli bulunmuştur (p<0,01).

Kaynaklarda geri kazanım çalışmalarına ilişkin sonuçların, % değişim değerleri olarak da verilmesi nedeniyle, elde edilen veriler ile % değişim değerleri hesaplanmıştır. Antibiyotik miktarındaki % değişim değerleri kullanılarak yapılan varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Isıl İşlem Etkisiyle Klortetrasiklin Miktarındaki % Değişime İlişkin Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	p Değeri
Isıl işlem türü	1	53,982	53,982	38,231**	0,000
Konsantrasyon	1	0,136	0,136	0,096	0,765
Isıl işlem varlığı	1	8032,417	8032,417	5688,618**	0,000
Isıl işlem türü x Konsantrasyon	1	5,629E-02	5,629E-02	0,040	0,847
Isıl işlem türü x Isıl işlem varlığı	1	53,982	53,982	38,231**	0,000
Isıl işlem varlığı x Konsantrasyon	1	0,136	0,136	0,096	0,765
Isıl işlem varlığı x Konsantrasyon x Isıl işlem türü	1	5,629E-02	5,629E-02	0,040	0,847
Hata	8	11,296	1,412	-	-
Toplam	15	104485,477	-	-	-

**p< 0,01 düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda, örneklerdeki ısıl işlem öncesi ve sonrası antibiyotik miktarı % değişimleri arasındaki farklılıklar ve ısıl işlem türleri arasındaki farklılıklar %1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Buna ek olarak ısıl işlem türü ve ısıl işlem varlığı interaksyonu da önemli bulunmuştur (p<0,01). İki farklı konsantrasyon değeri için elde edilen % değişim değerleri arasındaki farklılıklar ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,01).

Buna göre klortetrasiklin içeren süt örneklerinin 65 °C'de 30 dakika pastörize edilmesi ve 95 °C'de 10 dakika kaynatılması ile klortetrasiklin miktarında önemli bir azalma olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, kaynatma işlemi ile meydana gelen azalma

ve pastörizasyon işlemi ile meydana gelen azalmanın birbirinden önemli miktarda farklı olduğu; kaynatma işleminin klortetrasiklin miktarında daha fazla bir azalma meydana getirdiği gösterilmiştir.

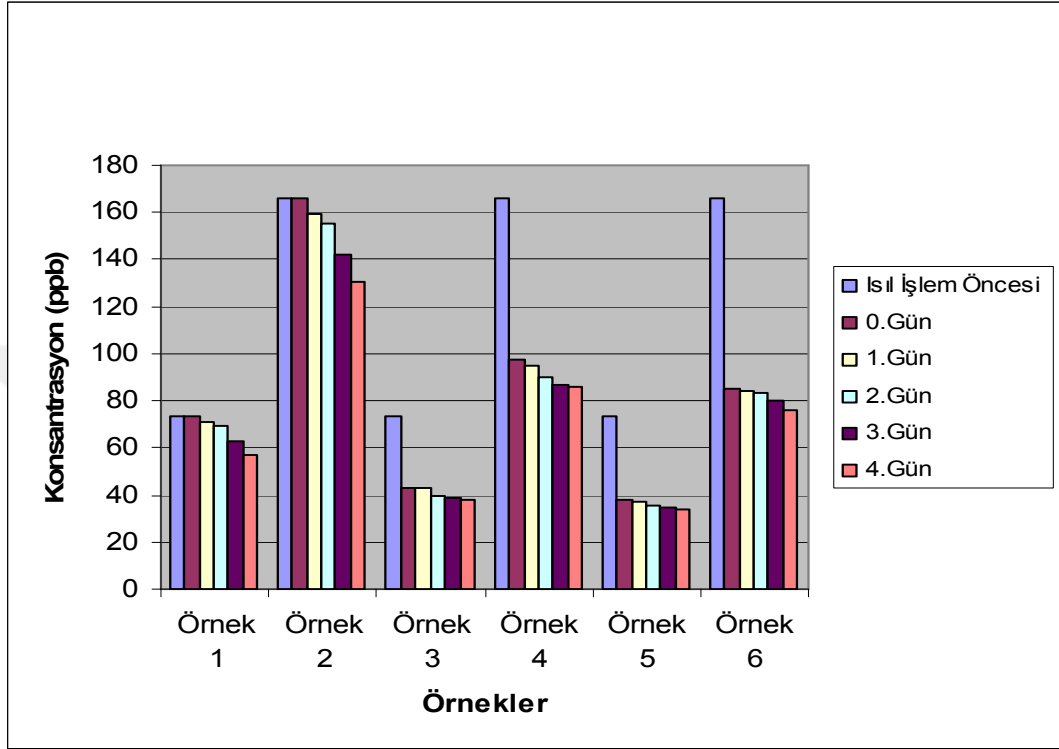
Elde edilen bu sonuçlar, mevcut olan az sayıdaki literatür bilgisiyle paralellik göstermektedir. Sonuçların karşılaştırılabileceği; sütteki klortetrasiklinin ısı işlem etkisiyle değişimini gösteren bir çalışma bulunmamasına rağmen, klortetrasiklinin başka matrislerde ısı işleme gösterdiği stabilite değerleri konu ile ilgili fikir verebilmektedir. Örneğin, Brander (1970), etteki klortetrasiklin ve oksitetrasiklin kalıntılarının pişirme sırasında yok edildiğini; Shirk vd., (1957) ise klortetrasiklinin izo-klortetrasikline parçalandığını bildirmişlerdir. 115 °C'de 15 dakika ıslak sıcaklığa maruz bırakılarak 1 ay depolandıktan sonra analiz edilen yem örneğindeki klortetrasiklin miktarında % 35 azalma belirlendiği belirtilmektedir (Anon., 2006c). Buna ek olarak klortetrasiklin ile birlikte tetrasiklin grubuna ait olan ve benzer kimyasal yapıya sahip oksitetrasiklinin 85 °C'de 30 dakika ısıtılan sütteki aktivitesinin yaklaşık % 67 azaldığı bildirilmektedir (Yaygın, 1999). Deneyde, 65 °C'de 30 dakika ısı işlemine tabi tutulan örneklerdeki klortetrasiklin miktarının % 41 azalması, aynı sürede daha yüksek sıcaklıkta ısı işlemine maruz kalan oksitetrasiklinin % 67 azalması ile paralellik göstermektedir.

Çizelge 4.4'te depolama ile süt örneklerindeki klortetrasiklin konsantrasyonundaki değişim verilmiştir.

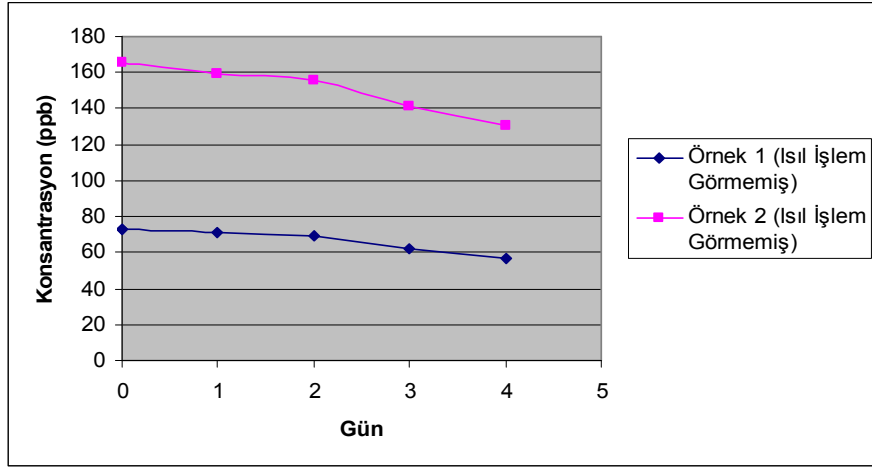
Çizelge 4.4. Depolama Boyunca Sütteki Klortetrasiklin Konsantrasyonundaki Değişim

ÖRNEK NO	İŞLEM	KONSANTRASYON (ppb)				
		0. Gün (Isıl İşlem Sonrası)	1. Gün (C1)	2. Gün (C2)	3. Gün (C3)	4. Gün (C4)
1	Isıl İşlem Görmemiş	73,263	71,186	69,269	62,345	56,653
2		165,878	159,483	155,392	141,680	130,236
3	Pastörize (65 Derecede 30 Dak.)	43,346	42,754	40,023	38,736	38,113
4		97,137	95,236	90,163	86,507	86,012
5	Kaynatılmış (95 Derecede 10 dak.)	37,789	36,974	35,829	34,708	34,065
6		85,342	84,548	83,302	80,080	75,967

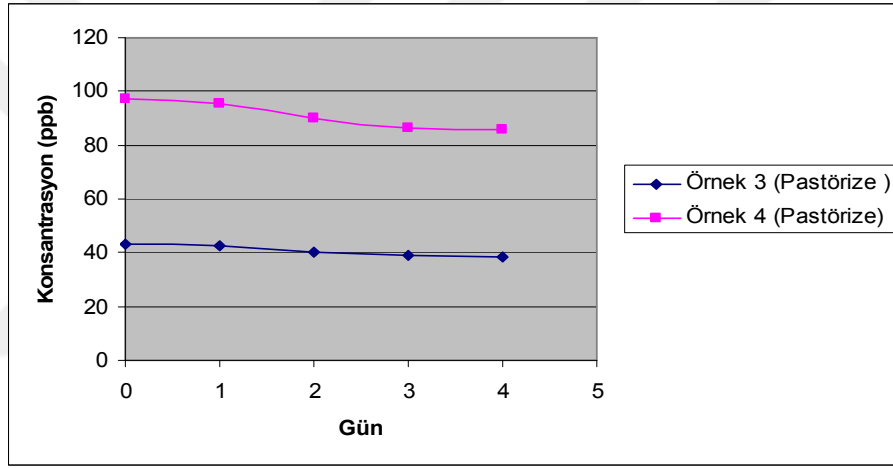
Şekil 4.2, sütteki klortetrasiklin konsantrasyonunun ısıtma işlemiyle ve depolama ile değişimini göstermektedir.



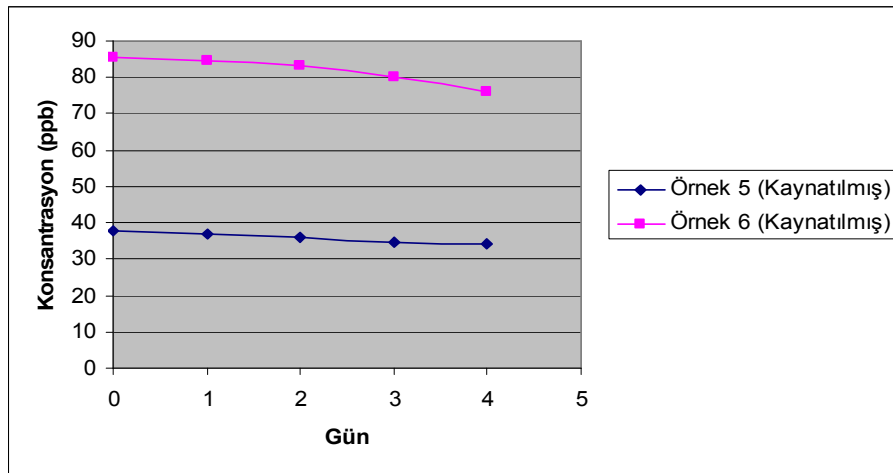
Şekil 4.2. Isıtma işlemiyle ve depolama ile sütteki klortetrasiklin konsantrasyonunun değişimi



Şekil 4.3. Isıl işlem görmemiş örneklerde depolama ile klortetrasiklin konsantrasyonunun değişimi



Şekil 4.4. Pastörize örneklerde depolama ile klortetrasiklin konsantrasyonunun değişimi



Şekil 4.5. Kaynatılmış örneklerde depolama ile klortetrasiklin konsantrasyonunun değişimi

Şekil 4.3, Şekil 4.4, ve Şekil 4.5'ten de görüldüğü gibi depolama, tüm örneklerdeki klortetrasiklin konsantrasyonunda azalmaya neden olmuştur.

Depolama boyunca elde edilen klortetrasiklin konsantrasyonu değerleriyle yapılan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Depolama Boyunca Klortetrasiklin Konsantrasyonundaki Değişime İlişkin Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	p Değeri
Isıl işlem türü	2	28949,718	14474,859	6677,317**	0,000
Konsantrasyon	1	54229,443	54229,443	25016,286**	0,000
Depolama süresi	4	1500,296	375,074	173,023**	0,000
Isıl işlem türü x Konsantrasyon	2	4320,240	2160,120	996,473**	0,000
Isıl işlem türü x Depolama süresi	8	641,907	80,238	37,014**	0,000
Konsantrasyon x Depolama süresi	4	203,509	50,877	23,470**	0,000
Isıl işlem türü x Konsantrasyon x Depolama süresi	8	77,267	9,658	4,455**	0,001
Hata	30	65,033	2,168	-	-
Toplam	59	452540,655	-	-	-

**p< 0,01 düzeyinde önemli

Varyans analizi sonuçlarına göre depolama süresince örneklerdeki klortetrasiklin konsantrasyonları arasındaki farklılıklar, %1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Aynı zamanda farklı ısıl işlem görmüş ve farklı konsantrasyona sahip örnekler arasındaki farklılıklar da %1 olasılık düzeyinde önemlidir. Bunlara ek olarak tüm interaksyonlar da önemli bulunmuştur (p< 0,01).

Kaynaklarda geri kazanım çalışmalarına ilişkin sonuçların % değişim değerleri olarak da verilmesi nedeniyle, elde edilen veriler ile % değişim değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplanmasında 0. gün değeri olarak ısıtılma işlem sonrası tespit edilen konsantrasyon değeri kullanılmıştır. Çizelge 4.6'da depolama ile süt örneklerindeki klortetrasiklin miktarı % değişimleri verilmiştir.

Çizelge 4.6. Depolama Boyunca Sütteki Klortetrasiklin Miktarının % Değişimi

ÖRNEK NO	İŞLEM	% KONSANTRASYON DEĞİŞİMİ				
		0. Gün (Isıl İşlem Sonrası)	1. Gün (C1/Co*100)	2. Gün (C2/Co*100)	3. Gün (C3/Co*100)	4. Gün (C4/Co*100)
1	Isıl İşlem Görmemiş	100,000	97,165	94,548	85,098	77,328
2		100,000	96,145	93,678	85,412	78,513
3	Pastörize (65 Derecede 30 dak.)	100,000	98,634	92,334	89,365	87,927
4		100,000	98,043	92,820	89,057	88,547
5	Kaynatılmış (95 Derecede 10 dak.)	100,000	97,843	94,813	91,847	90,145
6		100,000	99,070	97,610	93,834	89,015

Çizelge 4.6'da, depolama boyunca tüm örneklerdeki klortetrasiklin miktarının farklı oranlarda azaldığı görülmektedir. Buzdolabı sıcaklığında depolamanın 4. günündeki konsantrasyon değerleri, ısıtılma işlem görmemiş örneklerde depolama başlangıcındaki konsantrasyonun ortalama % 78'i olarak tespit edilmiş; bu değer pastörize edilmiş örneklerde depolama başlangıcındaki konsantrasyonun ortalama %88'i; kaynatılmış örneklerde ise depolama başlangıcındaki konsantrasyonun ortalama %90'ı olarak belirlenmiştir. Depolama sonunda klortetrasiklin konsantrasyonlarında, ısıtılma işlem görmemiş örneklerde ortalama %22; pastörize örneklerde ortalama %12; kaynatılmış örneklerde ise ortalama %10 azalma olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, çiğ sütte klortetrasiklin stabilitesinin, ısıtılma işlem görmüş örneklere kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür.

Farklı ısı işlem görmüş örnek gruplarında depolama boyunca antibiyotik miktarı % değişimlerdeki farklılıkları belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Çizelge 4.7’de örnekler için yapılan varyans analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.7. Depolama Boyunca Klortetrasiklin Miktarının % Değişimine İlişkin Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	p Değeri
Isıl işlem türü	2	220,963	110,481	15,751**	0,000
Konsantrasyon	1	1,331	1,331	0,190	0,666
Depolama süresi	4	1779,442	444,860	63,424**	0,000
Isıl işlem türü x Konsantrasyon	2	3,585	1,793	0,256	0,776
Isıl işlem türü x Depolama süresi	8	257,407	32,176	4,587**	0,001
Konsantrasyon x Depolama süresi	4	1,887	0,472	0,067	0,991
Isıl işlem türü x Konsantrasyon x Depolama süresi	8	12,422	1,553	0,221	0,984
Hata	30	210,421	7,014	-	
Toplam	59	524908,874			

**p< 0,01 düzeyinde önemli

Varyans analizi sonuçlarına göre depolama süresince örneklerdeki klortetrasiklin miktarı % değişimleri arasındaki farklılıklar %1 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Aynı zamanda farklı ısı işlem görmüş örneklerin % değişimleri arasındaki farklılık da %1 olasılık düzeyinde önemlidir. Bunlara ek olarak ısı işlem türü ve depolama süresi interaksyonu da önemli bulunmuştur (p< 0,01).

İki farklı konsantrasyon değeri için elde edilen % değişim değerleri arasındaki farklılıklar ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,01). Bu sonuç, Ray ve Newton (1991) tarafından klortetrasiklin stabilitesinin incelendiği çalışmada elde edilen sonuç ile paralellik göstermektedir.

Buna göre, tüm örneklerde depolama süresince klortetrasiklin miktarı % değişimlerinin önemli olduğu; farklı ısıl işlem uygulamalarının, klortetrasiklinin depolama stabilitesini farklı şekilde etkilemiş olduğu anlaşılmaktadır.

Depolama boyunca elde edilen % değişim değerleri arasındaki farklılığın seviyesini belirlemek için yapılan LSD analizi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Depolama Boyunca Isıl İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları (a)

Isıl İşlem	Ortalama Değerler	Sonuçlar
Isıl İşlem Görmemiş	90,789	b
Pastörize Edilmiş	93,706	a
Kaynatılmış	95,440	a

(a) Farklı harflerle gösterilen ısıl işlemler, % değişim değerleri yönünden istatistiksel olarak farklıdır. (p=0,01)

Isıl işlem faktörü için yapılan LSD analizine göre; ısıl işlem görmüş ve görmemiş örnekler farklı gruplarda yer almaktadır. Pastörize edilmiş ve kaynatılmış örneklerde ise, klortetrasiklin % değişim değerleri benzer özellik göstermiş ve bunlar aynı grupta yer almıştır.

Varyans analizinde ısıl işlem türü ve depolama süresi interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli bulunması (p<0,01) nedeniyle, depolamanın her günü için elde edilen değerler kullanılarak LSD analizi yapılmıştır.

Depolamanın 1. gününde elde edilen % değişim değerleri arasındaki farklılığın seviyesini belirlemek için yapılan LSD analizi sonuçları Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Depolamanın 1. Gününde Isıl İşleme Bağlı Tetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları (a)

Isıl İşlem	Ortalama Değerler	Sonuçlar
Isıl İşlem Görmemiş	96,655	a
Pastörize Edilmiş	98,360	a
Kaynatılmış	98,493	a

(a) p=0,01

Depolamanın 1. günü elde edilen değerler için yapılan LSD analizine göre; ısıtım işlem görmüş ve görmemiş örnekler aynı grupta yer almaktadır. Buna göre, ısıtım işlem görmemiş, pastörize edilmiş ve kaynatılmış örneklerde klortetrasiklin % değişim değerleri benzer özellik göstermiş ve tüm örnekler aynı grupta yer almıştır.

Depolamanın 2. gününde elde edilen % değişim değerleri arasındaki farklılığın seviyesini belirlemek için yapılan LSD analizi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Depolamanın 2. Gününde Isıtım İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları (a)

Isıtım İşlem	Ortalama Değerler	Sonuçlar
Isıtım İşlem Görmemiş	94,113	a
Pastörize Edilmiş	92,573	a
Kaynatılmış	96,235	a

(a) $p=0,01$

Depolamanın 2. gününde elde edilen değerler için yapılan LSD analizine göre; ısıtım işlem görmüş ve görmemiş örnekler aynı grupta yer almaktadır. Buna göre, ısıtım işlem görmemiş, pastörize edilmiş ve kaynatılmış örneklere ait klortetrasiklin % değişim değerleri benzer özellik göstermiş ve tüm örnekler aynı grupta yer almıştır.

Depolamanın 3. gününde elde edilen % değişim değerleri arasındaki farklılığın seviyesini belirlemek için yapılan LSD analizi sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Depolamanın 3. Gününde Isıtım İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları (a)

Isıtım İşlem	Ortalama Değerler	Sonuçlar
Isıtım İşlem Görmemiş	85,255	a
Pastörize Edilmiş	89,340	ab
Kaynatılmış	92,855	b

(a) Farklı harflerle gösterilen ısıtım işlemler, % değişim değerleri yönünden istatistiksel olarak farklıdır ($p=0,01$).

Depolamanın 3. gününde elde edilen değerler için yapılan LSD analizine göre; ısıt işlem görmemiş ve kaynatılmış örnekler arasındaki fark önemli bulunmuştur. Bu örnekler birbirlerinden farklı gruplarda yer almaktadır. Bununla birlikte, ısıt işlem görmemiş örnekler pastörize edilmişler ile; pastörize edilmiş örnekler kaynatılmış süt örnekleri ile benzer özellik göstermektedir.

Depolamanın 4. gününde elde edilen % değişim değerleri arasındaki farklılığın seviyesini belirlemek için yapılan LSD analizi sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Depolamanın 4. Gününde Isıt İşleme Bağlı Klortetrasiklin Miktarı % Değişimi LSD Testi Sonuçları (a)

Isıt İşlem	Ortalama Değerler	Sonuçlar
Isıt İşlem Görmemiş	77,921	a
Pastörize Edilmiş	88,254	b
Kaynatılmış	89,616	b

(a) Farklı harflerle gösterilen ısıt işlemler, % değişim değerleri yönünden istatistiksel olarak farklıdır (p=0,01).

Depolamanın 4. gününde elde edilen değerler ile yapılan LSD analizine göre; ısıt işlem görmüş ve görmemiş örnekler farklı gruplarda yer almaktadır. Pastörize edilmiş ve kaynatılmış örneklere ait klortetrasiklin % değişim değerleri ise, benzer özellik göstermiş ve bu örnekler aynı grupta yer almıştır.

Elde edilen bu sonuçlar, mevcut olan az sayıdaki literatür bilgisiyle paralellik göstermektedir. 4 ° C’de depolamanın 3. gününde tespit edilen değerler Podhorniak v.d. (1999)’nin elde ettiği değerler ile karşılaştırılmıştır. Depolamanın 3. gününde çiğ, pastörize ve kaynatılmış örneklerdeki klortetrasiklin miktarında sırasıyla %15, %11, %7 azalma tespit edilmiştir. Podhorniak v.d. (1999) de tetrasiklin içeren süt örneklerinin laboratuvar koşullarında depolanması boyunca stabilitesi ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, tetrasiklin grubu antibiyotikleri içeren (50 ppb klortetrasiklin, demeklosiklin, methasiklin, minosiklin, oksitetrasiklin ve tetrasiklin) çiğ süt örneklerinin 4 ° C’de 72 saat depolanması sonrasında %4 ve %13 arasında değişen oranlarda kayıp belirlemişlerdir (Podhorniak v.d.,1999). Çalışmada çiğ sütte % 15 düzeyinde tespit edilen azalma değeri, bu sonuçlara yakın bir değerdir. Aradaki fark kullanılan çiğ süütün

mikroflorasındaki ve kompozisyonundaki veya kullanılan tespit yönteminin hassasiyetindeki farklılıktan kaynaklanmış olabilir.

Farklı ısıl işlem uygulamalarının ortam kompozisyonunu etkilemesi nedeniyle ısıl işlem görmüş örneklerde klortetrasiklinin daha stabil olması da, Ray ve Newton tarafından (1991) klortetrasiklin stabilitesinin incelendiği ve stabilitede ortam kompozisyonunun öneminin vurgulandığı çalışma ile paralellik göstermektedir. Süt kompozisyonunun, antibakteriyel maddelerin aktiviteleri üzerindeki etkileri ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Birçok araştırmacı, çiğ sütün protein, lipid, pH gibi komponentlerinin mikrobiyal inhibitörlere potansiyel etkilerine işaret etmiştir (Van Natta v.d., 1970). Çiğ sütte, mikrobiyal yük ve gelişme, somatik hücrelerin mevcudiyeti, pH düşüşü, mevcut enzim aktivitesi gibi birçok faktörün her antibiyotiğin parçalanma hızı ve yolu üzerinde farklı etkiler oluşturabileceği belirtilmektedir. Pastörize sütün ise çiğ süte kıyasla daha kontrollü bir matriks oluştuğu belirtilmiştir (Riediker v.d., 2004).

4.2. Süt Örnekleri İle Elde Edilen Yoğurtlardaki Asitlik Değerleri

Örnekler, taze hazırlanmış yoğurt kültürü ilave edilerek, 42-44 °C lik etüvde 2-3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her gün için asitlik değerleri ve kontrol örnekleri ile arasındaki fark değerleri hesaplanmıştır. Süt örnekleri ile elde edilen yoğurtlardaki asitlik değerleri Çizelge 4.13'te verilmiştir.



Çizelge 4.13. Klortetrasiklin İçeren Örneklerin Yoğurt Kültür Testi Sonuçları

ÖRNEK NO	GÖRDÜĞÜ ISIL İŞLEM	% ASİTLİK (laktik asit)							
		1. GÜN	Kontrolden Farkı	2. GÜN	Kontrolden Farkı	3. GÜN	Kontrolden Farkı	4. GÜN	Kontrolden Farkı
1	Isıl İşlem Görmemiş	0,576	0,054	0,788	0,045	0,540	0,023	0,563	0,023
2		0,414	0,216	0,630	0,203	0,405	0,158	0,495	0,090
3	Pastörize (65 ° C'de 30 dak.)	0,540	0,072	0,653	0,068	0,450	0,090	0,405	0,045
4		0,412	0,200	0,540	0,180	0,405	0,135	0,383	0,068
5	Kaynatılmış (95 ° C'de 10 dak.)	0,414	0,036	0,495	0,000	0,428	0,000	0,428	0,023
6		0,396	0,054	0,473	0,023	0,405	0,023	0,428	0,023
19	KONTROL (Isıl İşlem Görmemiş)	0,630		0,833		0,563		0,585	
20	KONTROL (Pastörize)	0,612		0,720		0,540		0,450	
21	KONTROL (Kaynatılmış)	0,450		0,495		0,428		0,450	

Çizelge 4.13'ten genel olarak depolama boyunca örneklerdeki asitlik değerleri ile kontrol örneğine ait değerler arasındaki farkın azaldığı görülmektedir. Klortetrasiklin içeren örnekler arasında en fazla inhibitör etki gözlenen örnekler, 2. ve 4. örneklerdir. 2. örnekteki inhibitör etki 4. örnekte gözlenenden daha fazladır.

Başlangıçta 2. ve 4. örnekler ile eşit konsantrasyonda antibiyotik içeren kaynatılmış süt örneği (6. örnek) için hesaplanan fark değeri % 0,2' den küçüktür. Buradan kaynatma ile klortetrasiklinin inhibitör etkisinin pastörizasyona göre daha fazla azaldığı görülmektedir. Bu değerler, ısıl işlem sonrası antibiyotik miktarlarının tespit edilmesi ile elde sonuçlar ile uyumludur. Antibiyotik miktarı fazla olarak belirlenen süt örneği ile elde edilen yoğurtta oluşan asitlik değeri, düşük antibiyotik miktarına sahip örnek ile elde edilen yoğurttaki asitlik değerinden daha azdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Isıl işlem görmeden, pastörize edildikten sonra ve kaynatma işlemine tabi tutulduktan sonra buzdolabı sıcaklığında depolanan süt örneklerindeki klortetrasiklin kalıntı miktarları, depolamanın 0., 1., 2., 3. ve 4. günlerinde belirlenmiştir.

Sütün pastörize edilmesi ve kaynatılması sonucunda, klortetrasiklin konsantrasyonunun sırasıyla, yaklaşık % 41 ve % 48 oranlarında azaldığı, kaynatma işlemi ve pastörizasyon işlemi ile meydana gelen azalmanın birbirinden önemli miktarda farklı olduğu görülmüştür.

4°C'de depolama, klortetrasiklin içeren tüm örneklerin konsantrasyonlarında azalmaya neden olmuştur. Varyans analizleri sonuçlarına göre depolama süresince elde edilen farklılıklar ve ısıl işlemler arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. 4 gün depolama sonunda klortetrasiklin konsantrasyonunda, ısıl işlem görmemiş örneklerde ortalama %22; pastörize örneklerde ortalama %12; kaynatılmış örneklerde ise ortalama %10 azalma olduğu tespit edilmiştir. Depolama boyunca elde edilen değerler ile ısıl işlem faktörü için yapılan LSD analizine göre; ısıl işlem görmüş ve görmemiş örnekler farklı gruplarda yer almıştır. Buna göre depolama boyunca, pastörize edilmiş ve kaynatılmış örneklerde klortetrasiklin % değişim değerlerinin benzer özellik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Antibiyotik tespiti yapılacak bir örnekte depolama boyunca stabilitenin analiz sonucu için önemli olduğu, farklı antibiyotiklerin farklı gıda matrislerindeki stabiliteyi ile ilgili ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Asitlik oluşturma durumlarına göre örnekler incelendiğinde, klortetrasiklin içeren örneklerde kayda değer inhibitör etki belirlenmiştir. Ayrıca örneklerde, kaynatma ile antibiyotiğin inhibitör etkisinin pastörizasyon işlemine göre daha fazla azaldığı görülmüştür.

Farklı antibiyotiklerin farklı ısıl işlemler sonrası stabiliteyi ile ilgili bilgiler, proses boyunca bu maddelerin parçalanıp parçalanmayacağına değerlendirilmesinde

önemlidir. Bu çalışmada klortetrasiklin miktarının ısı ile işleme önemli ölçüde azaldığının belirlenmesi, klortetrasiklinin parçalandığını veya mevcut yöntem ile tespit edilemeyen diğer ürünlere dönüştüğünü göstermektedir. Isıl işleme veya depolama ile bazı antibiyotiklerin aktivitesinin azalması, bu maddelerin parçalanması, tüketiciler için ek bir güvence sağlayabilmektedir. Ancak, bu uygulamaların her gıda matriksi için ayrı ayrı incelenip, parçalanma sonucu oluşan ürünler için toksikolojik çalışmalar yapılmadan bu konuda kesin sonuca varılamayacağı da açıktır.

Hayvansal gıdalardaki farklı veteriner ilaç kalıntılarının depolama ve farklı işlemler etkisiyle değişimi, gıda güvenliği ile ilişkili faydalı bilgiler sunan önemli bir çalışma alanıdır. Farklı gıda matrikslerinde farklı veteriner ilaçlarının stabilitesi, farklı ısıl işlemler ile bu maddelerin parçalanmasında sıcaklık ve sürenin öneminin tespiti ve antibiyotik türevlerinin parçalanma ürünleri ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalar yapılması önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

Anonymous, 1994, TS 1018 Nisan 1994, Çiğ İnek Sütü Standardı

Anonymous, 1999, TS 1330 Şubat 1999, Yoğurt Standardı

Anonymous, 2000, Commission Decision laying down analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animal and animal products according to Council Directive 96/23/EC (Revision of Commission Decision 93/256/EC), European Commission, Directorate General for Agriculture VIBII2, SANCO/1805/2000.

Anonymous, 2002, www.tb-yayin.gov.tr/basili/2002/tarimda_insan_sagligi_I_orta.htm

Anonymous, 2004, Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitlerinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, Tebliğ No: 2004/4

Anonymous, 2005, www.r-biopharm.de

Anonymous, 2006, <http://www.rcw.raiuniversity.edu/biotechnology/BTechbiotech/foodmicrobiology/lecture-notes/lecture-27.pdf>

Anonymous, 2006a, www.sigmaaldrich.com

Anonymous, 2006b, <http://www.serva.de>

Anonymous, 2006c http://www.ecoanimalhealth.com/g/g_news09.html

BRANDER, G. C., 1970, Possible hazards to man from the use of drugs in and on animals. Br. Med. Bull. 26, 217-221

BOATTO, G.; PAU, A.; PALOMBA, M.; ARENARE, L.; CERRI, R., 1999, Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20 : 321–326

BOROĞLU, E.; ÇAKMAKÇI, S., 2003, Sütte Antibiyotik Aranmasında Kromatografik Yöntemler, Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, Bildiriler El Kitabı, Sayfa: 143-148

CORCIA, Di A., NAZZARI, M., 2002, Liquid Chromatographic- Mass Spectrometric Methods for Analyzing Antibiotic and Antibacterial Agents in Animal Food Products, *Journal of Chromatography A*, 974: 53- 89

- CROUBELS, S.; BAERE, S. De; BACKER, P. De, 2003, Practical Approach for the Stability Testing of Veterinary Drugs in Solutions and in Biological Matrices During Storage, *Analytica Chimica Acta*, 483 : 419–427
- DEHAI, XU; GRIZZLE, J.M.; ROGERS, W.A.; SANTERRE, C.R., 1996, Effect of Cooking on Residues of Ormetoprim and Sulfadimethoxine in the Muscle of Channel Catfish, *Food Research International*, 29: 339- 344
- DEMİRÇİ, M.; GÜNDÜZ, H., 2004, Süt Teknoloğunun El Kitabı, Hasad Yayıncılık, İstanbul, 4. Baskı, Sayfa: 34-35
- DOYRAN, M., 2000, Veteriner İlaçlarında Sorunlar, *Bursa'da Tarım*, 8:23-24
- DURNA, Ş., 2003, Farklı Antibiyotik Çeşitlerinin ve Oranlarının Yoğurt ve Peynir Kalitesi Üzerine Etkisi, TAGEM GYAD Devam Eden Projeler
- FEINMAN, S.E., MATHESON III, J.C., 1978, Draft Environment Impact Statement Subtherapeutic Antibacterial Agents in Animal Feeds. Food and Drug Administration, Department of Health, Education and Welfare, Rockville, Maryland
- GAUDIN, V.; CADIEU, N.; SANDERS, P., 2005, Results of a European Proficiency Test for The Detection of Streptomycin/Dihydrostreptomycin, Gentamicin and Neomycin in Milk by ELISA and Biosensor Methods, *Analytica Chimica Acta*, 529: 273-283
- GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S., 2005, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends in Analytical Chemistry*, 24:704-733
- GÜLEY, Z.; AKBULUT, N., Antimikrobiyal Maddeler ve Süt Teknolojisindeki Önemi, 6. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, 2000, sayfa: 254-265
- JONES, G. M., 1999, On-farm Tests for Drug Residues in Milk, Milk Quality & Milking Management, Department of Dairy Science, *Virginia Tech.*, 404-401
- KATZ, S.E.; FASSBENDER, C. A.; DOWLING Jr, J.J., 1973, Oxytetracycline residues in tissue, organs and eggs of poultry fed supplemented rations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56,77-81
- KÜHNE, M.; KÖRNER, U.; WENZEL, S., 2001, Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: The effect of heat treatments on bound tetracycline residues, *Food Additives & Contaminants*, 18: 593 - 600
- MELLENBERGER, R. W., 1997, Antibiotic Violations Incerease in Michigan!, *Michigan Dairy Rewiew*, 2

- MSAGATI, T.A. M.; NINDI, M.M., 2004, Multiresidue determination of sulfonamides in a Variety of Biological Matrices by Supported Liquid Membrane with High Pressure Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry Detection, *Talanta*, 64: 87-100
- PODHORNIAK L.V.;LEAKE S.; SCHENK, F. J., 1999, Stability of Tetracycline Antibiotics in Raw Milk Under Laboratory Storage Conditions. *J Food Prot.*, 62(5):547-8.
- RAY, A.; NEWTON, V., 1991, Use of High-Performance Liquid Chromatography To Monitor Stability of Tetracycline and Chlortetracycline in Susceptibility Determinations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(6):1264-1266
- RIEDIKER, S., RYTZ, A., STADLER, R. H., 2004, Cold- Temperature Stability of Five β -laktam Antibiotics in Bovine Milk and Milk Extracts Prepared for Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Analysis, *Journal of Chromatography A*, 1054: 359-363
- ROSE, M. D., BYGRAVE, J., FARRINGTON, W. H.H., and SHEARER, G., 1996, The Effect of Cooking on Veterinary Drug Residues in Food: 4. Oxytetracycline. *Food Additives and Contaminants*, 13, 275±286.
- SCHENK, F. J.; CALLERY, P.S., 1998, Chromatographic Methods of Analysis of Antibiotics in Milk, *Journal of Chromatography A*, 812: 99-109
- SHAKILA, J. R., VYLA, S. A. P., KUMAR, R. S., JEYASEKARAN, G., JASMINE, G. I., 2006, Stability of Chloramphenicol Residues in Shrimp Subjected to Heat Processing Treatments. *Food Microbiology*, 23: 47-51.
- SHIRK, R. J.; WHITEHALL, H.R.; HINES, L.R., 1957, A degradation product in cooked chlortetracycline-treated poultry. *Antibiot. Annu. 1956-1957*, 843-845.
- SOYSAL, İ., 1992, Biometrinin Temel Prensipleri, T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No:95, Tekirdağ.
- TEMİZ, A.; 1985, Bazı Antibiyotiklerin Yoğurt Bakterilerinin Asit Geliştirme Özellikleri Üzerine Etkileri, *Gıda*, 6:377- 388
- UYSAL, H.; KINIK, Ö.; GÖNÇ, S., 1995, Yoğurda İşlenecek Sütün Özellikleri ve Antibiyotiklerin Yoğurt Teknolojisine ve Kalitesine Etkileri, 3. Milli Süt Ürünleri Sempozyumu Kitabı, Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları, Ankara, no:548 sayfa: 26-37
- VAN NATTA, J. P., LO, P. W., CHANG, T. S., 1970, Determination of Untreated Whole-Milk Effects on In Vitro Antibacterial Activity, *Applied Microbiology*, 19:220-223.

YAMANI, M.I.; AL-KURDI, L. M. A.; HADDADIN, M.S.Y.; ROBINSON, R.K., 1999, A Simple Test for the Detection of Antibiotics and other Chemical Residues in ex- Farm Milk, *Food Control*, 10: 53-39

YAYGIN, H., 1999, Yoğurt Teknolojisi, Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya, sayfa: 28-31

