

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Bülent KABAK

**BAZI MİKOTOKSİNLERİN DETOKSİFİKASYONUNDA *LACTOBACILLUS*
VE *BIFIDOBACTERIUM* SUŞLARININ KULLANIMI**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI MİKOTOKSİNLERİN DETOKSİFİKASYONUNDA *LACTOBACILLUS*
VE *BIFIDOBACTERIUM* SUŞLARININ KULLANIMI**

Bülent KABAK

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez / / 2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile
Kabul Edilmiştir.**

İmza..... Yard. Doç. Dr. Işıl VAR DANIŞMAN	İmza Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER ÜYE	İmza Doç.Dr. Zerrin ERGİNKAYA ÜYE
--	---	---

İmza.....
Prof. Dr. Bülend EVLİYA
ÜYE

İmza.....
Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No :

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.**

Proje No: ZF2004D13

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

BAZI MİKOTOKSİNLERİN DETOKSİFİKASYONUNDA LACTOBACILLUS VE BIFIDOBACTERIUM SUŞLARININ KULLANIMI

Bülent KABAK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Danışman: Yard. Doç. Dr. Işıl VAR
Yıl: 2007, Sayfa: 149

Jüri : Yard. Doç. Dr. Işıl VAR
Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER
Doç. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Prof. Dr. Bülend EVLİYA
Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Bu çalışmada, bazı *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68) ve *Bifidobacterium* (*B. bifidum* Bb 13, *B. bifidum* NCC 381) suşlarının fosfat tamponu (PBS) ve gıda modelinde aflatoksin M₁ (AFM₁) ve okratoksin A (OTA)'yı bağlama yetenekleri araştırılmıştır. 10⁸ ve 10⁷ kob ml⁻¹ yoğunluğunda canlı bakterilerin PBS'de AFM₁'i bağlama yetenekleri toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak sırasıyla %10.22-26.25 ve %0-5.02 arasında bulunmuştur. *B. bifidum* Bb 13 AFM₁'i en yüksek oranda bağlarken, *Lb. acidophilus* NCC 68'in en düşük bağlama yeteneği gösteren suş olduğu görülmüştür. Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin PBS'de AFM₁ bağlama yetenekleri %14.04-28.97 olarak saptanmıştır. Canlı ve ısıl işleme maruz bırakılan bakteriler rekonstitüe sütte 4 saat içinde AFM₁'i sırasıyla %7.85-25.94 ve %12.85-26.27 arasında bağlamıştır. Canlı ve ısıl işleme maruz bırakılan bakterilerin AFM₁'i bağlama yeteneklerinde PBS ve rekonstitüe süt ortamları arasında istatistiksel açıdan (p>0.05) önemli bir fark görülmemiştir (*Lb. acidophilus* NCC 68'in 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneği hariç). Canlı ve ısıl işleme maruz bırakılan bakterilerin rekonstitüe sütte AFM₁'i bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun önemli bir etkisi bulunmamıştır. Bakteri/AFM₁ kompleksinin yıkanması sonucu, bağlanan AFM₁'in %5.62-8.54'ü PBS'ye geri dönerken, rekonstitüe sütte bağlanmanın geri dönüşümsüz olduğu görülmüştür.

Canlı test bakterilerinin (10⁸ CFU ml⁻¹) PBS ve beyaz şarapta OTA bağlama yetenekleri sırasıyla %4.43-20.71 ve %15-23.40 arasında bulunmuştur. PBS'de *Lb. rhamnosus* en yüksek bağlama yeteneğini gösteren suş olurken, *Lb. acidophilus* NCC 36 nispeten düşük bağlama yeteneği göstermiştir. Test bakterilerinin 10⁷ kob ml⁻¹ yoğunluğunda kullanılması durumunda PBS'de OTA bağlama yeteneklerinde önemli düşüş (p<0.05) görülmüştür. Bakterilere ısıl işlem uygulanması, PBS (%9.60-25.17) ve beyaz şarapta (%15.24-26.11) OTA bağlama yeteneklerini artırmıştır. Toksin konsantrasyonunun canlı ve ısıl işleme maruz bırakılan bakterilerin beyaz şarapta OTA bağlama yetenekleri üzerine etkisi bulunmamıştır. Beyaz şarapta OTA *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus* tarafından kuvvetli (geri dönüşümsüz) bağlanırken, diğer bakteriler tarafından bağlanan OTA'nın %1.91-7.06'sı tekrar beyaz şaraba geçmiştir.

Anahtar kelimeler: aflatoksin M₁, okratoksin A, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, bağlama

ABSTRACT

PhD THESIS

USING OF *LACTOBACILLUS* AND *BIFIDOBACTERIUM* STRAINS FOR DETOXIFICATION OF SOME MYCOTOXINS

Bülent KABAK

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Işıl VAR

Year: 2007, Pages:149

Jury : Assist. Prof. Dr. Işıl VAR

Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER

Assoc. Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Prof. Dr. Bülend EVLİYA

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

In this study, the ability of some *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68 and *Lb. rhamnosus*) and *Bifidobacterium* (*B. bifidum* Bb 13 and *B. bifidum* NCC 381) to bind aflatoxin M₁ (AFM₁) and ochratoxin A (OTA) in phosphate-buffered saline (PBS) and food model was investigated. The binding abilities of AFM₁ by viable test strains at 10⁸ and 10⁷ CFU ml⁻¹ in PBS were ranged from 10.22 to 26.25% and from 0 to 5.02%, respectively, depending on contamination level and incubation period. While *B. bifidum* Bb 13 was the best binder, the poorest removal was achieved by *Lb. acidophilus* NCC 68. The binding capacities of heat-killed bacteria in PBS were found to range from 14.04 to 28.97%. The binding abilities of AFM₁ were found to range from 7.85 to 25.94% and from 12.85 to 26.27% for viable and heat-killed bacteria in reconstituted milk, respectively, within 4 h. No significant differences (p>0.05) in AFM₁ removal ability of both viable and heat-killed bacteria were observed between PBS and reconstituted milk, except for heat-killed *Lb. acidophilus* NCC 68 for 10 ng ml⁻¹. The toxin concentration had no effect on the removal of AFM₁ levels by both viable and heat-killed bacteria in reconstituted milk. When washing the bacteria/AFM₁ complexes, 5.62-8.54% of AFM₁ was released back into the solution. In contrary, binding process was irreversible in reconstituted milk.

The binding abilities of OTA by viable (10⁸ CFU ml⁻¹) test strains were found to range from 4.43 to 20.71% and 15 to 23.40% for PBS and white wine, respectively. While *Lb. rhamnosus* was the most efficient binder in PBS, *Lb. acidophilus* NCC 36 bound more OTA than other strains in white wine. A significant decrease (p<0.05) was observed in the percentage of OTA removal by test strains at 10⁷ CFU ml⁻¹ in PBS when compared to activity at 10⁸ CFU ml⁻¹. Heating of the bacterial strains improved their ability to remove more OTA from PBS (9.60-25.17%) and white wine (15.24-26.11%). The toxin concentration had no effect on the removal of OTA by viable and heat-killed bacteria in white wine. While OTA bound strongly by *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 and *Lb. rhamnosus* in white wine, OTA was released in the range of 1.91-7.06% of bound OTA by other strains back into the white wine.

Keywords: aflatoxin M₁, ochratoxin A, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, binding

TEŐEKKÜR

Doktora çalıőmam sırasında beni yönlendiren, araőtırmamın düzenlenmesi ve değerlendirilmesinde engin deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam sayın Yard. Doç. Dr. Işıl VAR'a ve katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi Üyeleri Doç. Dr. Zerrin ERGİNKAYA ve Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER'e teőekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalıőmam süresince sonsuz destek ve yardımlarını gördüğüm, acısıyla tatlısıyla pek çok şeyi paylaőtığım dostlarım Gıda Yük. Müh. Özgür GÖLGE ve Arő. Gör. Adnan BOZDOĞAN'a ve arkadaşlarıma minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Aflatoksin M₁ standardını sağlayan Hollanda Halk Sağlığı ve evre Araştırma Enstitüsü'nden Prof. Dr. Hans P. Van Egmond'a ve tez çalıőmamı maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu'na teőekkürlerimi sunarım.

Ve beni yetiőtiren, hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan anne ve babama ve sevgili kardeőime sonsuz őükranlarımı sunarım.

İlgi, sabır ve desteği ile her zaman benimle olan

Sevgili eşime ve biricik kızıma...

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Küfler Hakkında Genel Bilgi	5
2.2. Mikotoksinler	7
2.2. 1. Aflatoksinler.....	11
2.2.1.1. Aflatoksin B ₁	13
2.2.1.2. Aflatoksin M ₁	14
2.2.2. Okratoksin A	18
2.3. Mikotoksin Kontrol Stratejileri.....	21
2.3.1. Mikotoksin Oluşumunun Engellenmesi.....	22
2.3.2. Mikotoksinlerin Detoksifikasyonu.....	23
2.3.3. Sindirim Sisteminde Mikotoksin Absorbsiyonunun Engellenmesi	25
2.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri.....	27
2.4.1. <i>Lactobacillus</i> spp.	28
2.4.2. <i>Bifidobacterium</i> spp.	29
2.5. Probiyotik Bakterilerin Mikotoksinleri Bağlama Yeteneği	31
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Aflatoksin M ₁ Standardı.....	36
3.1.2. Okratoksin A Standardı.....	36
3.1.3. AFM ₁ Immunoaffinity Kolonu	36
3.1.4. OTA immunoaffinity kolonu	36
3.1.5. Test Bakterileri.....	37
3.1.6. Besiyeri ve Kimyasal Maddeler	37
3.1.7. Süt Tozu	37
3.1.8. Beyaz Şarap.....	38
3.2. Metot	38
3.2.1. Liyofilize Bakteri Kültürlerinin Aktivasyonu	38
3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	39

3.2.3. Test Bakterilerinin Hücre Yüzeyinin Hidrofobik Karakterinin Belirlenmesi	39
3.2.4. Test Bakterilerinin AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği.....	40
3.2.4.1. AFM ₁ Standart Çözeltisinin Hazırlanması.....	40
3.2.4.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin AFM ₁ ile Kontamine Edilmesi	41
3.2.4.3. Rekonstitüe Sütün AFM ₁ ile Kontamine Edilmesi	41
3.2.4.4. Test Bakterilerinin AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Belirlenmesi..	41
3.2.4.5. Bakteri-AFM ₁ Stabilesinin Belirlenmesi	42
3.2.4.6. Test Bakterilerinin Canlılığının AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği Üzerine Etkisi	42
3.2.4.7. AFM ₁ Ekstraksiyonu.....	43
3.2.4.8. AFM ₁ Analizi.....	43
3.2.5. Test Bakterilerinin OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	45
3.2.5.1. OTA Standart Çözeltinin Hazırlanması	45
3.2.5.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin OTA ile Kontamine Edilmesi.....	45
3.2.5.3. Beyaz Şarapta OTA Varlığının Araştırılması	46
3.2.5.4. Beyaz Şarabın OTA ile Kontamine Edilmesi	47
3.2.5.5. Test Bakterilerinin OTA'yı Bağlama Yeteneğinin Belirlenmesi.....	47
3.2.5.6. Bakteri-OTA Kompleksi Stabilesinin Belirlenmesi	48
3.2.5.7. Test Bakterilerinin Canlılığının OTA'yı Bağlama Yeteneği Üzerine Etkisi	48
3.2.5.8. OTA Analizi.....	48
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	51
4.1. Test Bakterilerinin AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği.....	51
4.1.1. Test Bakterilerinin Fosfat Tamponunda AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği	51
4.1.1.1. Canlı Test Bakterilerinin Fosfat Tampounda AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği	51
4.1.1.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Fosfat Tamponunda AFM ₁ 'i Bağlama Yetenekleri.....	59

4.1.1.3. Fosfat Tamponu Ortamında Bakteri-AFM ₁ Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi	65
4.1.2. Test Bakterilerinin Rekonstitüe Sütte AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği	68
4.1.2.1. Canlı Test Bakterilerinin Rekonstitüe Sütte AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği	68
4.1.2.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Rekonstitüe Sütte AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneği	73
4.1.2.3. Rekonstitüe Sütte Bakteri-AFM ₁ Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi	80
4.2. Test Bakterilerinin OTA'yı Bağlama Yetenekleri	82
4.2.1. Test Bakterilerinin Fosfat Tamponunda OTA'yı Bağlama Yeteneği	82
4.2.1.1. Canlı Test Bakterilerinin Fosfat Tamponunda OTA'yı Bağlama Yeteneği	82
4.2.1.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Fosfat Tamponunda OTA'yı Bağlama Yeteneği	89
4.2.1.3. Fosfat Tamponu Ortamında Bakteri-OTA Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi	98
4.2.2. Test Bakterilerinin Beyaz Şarap Ortamında OTA'yı Bağlama Yeteneği	100
4.2.2.1. Canlı Test Bakterilerinin Beyaz Şarap Ortamında OTA'yı Bağlama Yeteneği	100
4.2.2.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Beyaz Şarap Ortamında OTA'yı Bağlama Yeteneği	104
4.2.2.3. Beyaz Şarap Ortamında Bakteri-OTA Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi	111
4.3. Test Bakterilerinin Hücre Yüzeyinin Hidrofobik Yapısı	113
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	121
KAYNAKLAR	130
ÖZGEÇMİŞ.....	149

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1.	Bazı Önemli Toksikjenik Küf Türleri, Ürettikleri Mikotoksinler ve Riskli Gıda Maddeleri.....	8
Çizelge 2.2.	Süt ve Süt Ürünlerinde Saptanan AFM ₁ Miktarları.....	17
Çizelge 2.3.	Ülkemizde ve Çeşitli Ülkelerde Şaraplarda Saptanan OTA Miktarları.....	20
Çizelge 2.4.	Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksinleri Bağlama Yeteneği.....	32
Çizelge 3.1.	Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulmasında Kullanılan AFM ₁ Konsantrasyonu ve Pik Alanları.....	44
Çizelge 3.2.	Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulmasında Kullanılan OTA Konsantrasyonları ve Pik Alanları.....	49
Çizelge 4.1.	Canlı Test Bakterilerinin (10 ⁸ ve 10 ⁷ kob ml ⁻¹) PBS Ortamında AFM ₁ 'i Bağlama Yetenekleri.....	52
Çizelge 4.2.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin PBS Ortamında AFM ₁ 'i Bağlama Yetenekleri.....	60
Çizelge 4.3.	Fosfat Tamponu Ortamında Canlı Test Bakterilerinin (10 ⁸ kob ml ⁻¹) 4 Saat İçinde Bağladığı AFM ₁ 'in (5 ng ml ⁻¹) Tekrar Fosfat Tamponuna Geçme Oranları.....	66
Çizelge 4.4.	Test Bakterilerinin Rekonstitüe Süt Ortamında 4 Saat İnkübasyon Süresi İçinde AFM ₁ 'i Bağlama Yetenekleri.....	68
Çizelge 4.5.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin Rekonstitüe Süt Ortamında 4 Saat İnkübasyon Süresi İçinde AFM ₁ 'i Bağlama Yetenekleri.....	74
Çizelge 4.6.	Rekonstitüe Süt Ortamında Canlı Test Bakterilerinin (10 ⁸ kob ml ⁻¹) 4 Saat İçinde Bağladığı AFM ₁ 'in (5 ng ml ⁻¹) Tekrar Reskonstitüe Süte Geçme Oranları.....	81
Çizelge 4.7.	Canlı Test Bakterilerinin (10 ⁸ ve 10 ⁷ kob ml ⁻¹) PBS Ortamında OTA'yı Bağlama Yetenekleri.....	83

Çizelge 4.8.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin PBS Ortamında OTA'yı Bağlama Yetenekleri.....	91
Çizelge 4.9.	Fosfat Tamponu Ortamında Canlı Test Bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 4 Saat İçinde Bağladığı OTA'nın (5 ng ml^{-1}) Tekrar Fosfat Tamponuna Geçme Oranları.....	99
Çizelge 4.10.	Canlı Test Bakterilerinin Beyaz Şarap Ortamında 4 Saat İçinde OTA'yı Bağlama Yeteneği.....	100
Çizelge 4.11.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin Beyaz Şarapta 4 Saat İçinde OTA'yı Bağlama Yeteneği.....	105
Çizelge 4.12.	Beyaz Şarapta Canlı Test Bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 4 Saatte Bağladığı OTA'nın (5 ng ml^{-1}) Tekrar Bayaz Şaraba Geçme Oranları.....	111
Çizelge 4.13.	Test Bakterilerinin Hücre Yüzeylerinin Hidrofobik Karakteri...	113
Çizelge 4.14.	Laktik Asit Bakterilerinin Hücre Yüzeylerinin Hidrofobik Yapısı.....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Bazı Önemli Mikotoksin Türlerinin Kimyasal Yapıları.....	10
Şekil 2.2.	AFB ₁ 'in Metabolize Edilmesi Sonucu Akut Toksik ve Kanserojenik Aktivite Göstermesi.....	14
Şekil 3.1.	Süt Tozu Örneğine Ait HPLC Kromatogramı.....	38
Şekil 3.2.	Test Bakterilerinin OTA'yı Gıda modeli İçinde Bağlama Yeteneklerini Belirlemede Kullanılan Beyaz Şaraba Ait HPLC Kromatogramı.....	46
Şekil 4.1.	Canlı <i>B. bifidum</i> Bb 13'ün (10 ⁸ kob ml ⁻¹) PBS'de 4 Saatte 5 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %25.02 (a), 10 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %24.16 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %4.02 (c) Oranlarında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	54
Şekil 4.2.	Canlı <i>B. bifidum</i> Bb 13'ün (10 ⁷ kob ml ⁻¹) PBS'de 4 Saatte 5 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %1.15 (a), 10 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %0 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %1.93 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	56
Şekil 4.3.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan <i>B. bifidum</i> Bb 13'ün PBS'de 4 Saatte 5 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %26.42 (a), 10 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %27.36 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'i %27.68 (c) Oranlarında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	61
Şekil 4.4.	PBS Tamponunda 5 (a), 10 (b), 20 (c) ng ml ⁻¹ AFM ₁ 'in Geri Alınmasına Ait Pozitif Kontrol ve AFM ₁ Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.....	65
Şekil 4.5.	Canlı <i>Lb. acidophilus</i> NCC 12'nin (10 ⁸ kob ml ⁻¹) PBS'de 4 Saatte 5 ngml ⁻¹ AFM ₁ 'i %17.47 Oranında Bağlama Yeteneğine (a) ve Hücrelerin 5 ml PBS İle Yıkanması Sonucu Serbest Kalan AFM ₁ Oranına (%8.18) Ait (b) HPLC Kromatogramları.....	66

Şekil 4.6.	Canlı <i>B. bifidum</i> Bb 13'ün (10^8 kob ml^{-1}) Rekonstitüe Sütte 4 Saatte 5 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i %25.94 (a), 10 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i %23.97 (b) ve 20 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i %24.59 (c) Oranlarında Bağlamasına Ait HPLC Kromatogramları.....	69
Şekil 4.7.	Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 5 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	70
Şekil 4.8.	Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 10 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.9.	Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 20 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	72
Şekil 4.10.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan <i>B. bifidum</i> Bb 13'ün Rekonstitüe Sütte 4 Saat İçinde 5 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i %25.41 (a), 10 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i %25.64 (b) ve 20 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i %27.31 (c) Oranlarında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları	75
Şekil 4.11.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 5 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.12.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 10 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.13.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 20 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.14.	Rekonstitüe Sütte 5 (a), 10 (b), 20 (c) ng ml^{-1} AFM ₁ 'in Geri Alınmasına Ait Pozitif Kontrol ve AFM ₁ Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.....	79
Şekil 4.15.	Canlı <i>Lb. acidophilus</i> NCC 36'nın Rekonstitüe Sütte 4 Saatte 5 ng ml^{-1} AFM ₁ 'i %22.70 Oranında Bağlama Yeteneğine (a) ve Hücrelerin 5 ml Rekonstitüe Süt İle Yıkanması Sonucu (b) Serbest Kalan AFM ₁ Oranına Ait HPLC Kromatogramları.....	81

Şekil 4.16.	Canlı <i>Lb. rhamnosus</i> 'un (10^8 kob ml ⁻¹) PBS'de Başlangıçta 5 ng ml ⁻¹ OTA'yı %20.71 (a), 10 ng ml ⁻¹ OTA'yı %16.53 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ OTA'yı %16.37 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	85
Şekil 4.17.	Canlı <i>Lb. rhamnosus</i> 'un (10^7 kob ml ⁻¹) PBS'de Başlangıçta 5 ng ml ⁻¹ OTA'yı %3.90 (a), 10 ng ml ⁻¹ OTA'yı %2.16 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ OTA'yı %0.00 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	88
Şekil 4.18.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan <i>Lb. rhamnosus</i> 'un PBS'de Başlangıçta 5 ng ml ⁻¹ OTA'yı %23.67 (a), 10 ng ml ⁻¹ OTA'yı %24.43 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ OTA'yı %25.17 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	92
Şekil 4.19.	Fosfat Tamponunda 5 (a), 10 (b) ve 20 (c) ng ml ⁻¹ OTA Pozitif Kontrol ve OTA Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.....	97
Şekil 4.20.	Canlı <i>Lb. rhamnosus</i> 'un (10^8 kob ml ⁻¹) PBS'de 4 Saatte 5 ngml ⁻¹ OTA'yı %16.67 Oranında Bağlama Yeteneğine (a) ve Hücrelerin PBS İle Yıkanması Sonucu Serbest Kalan %1.98 OTA Oranına (b) Ait HPLC Kromatogramları.....	99
Şekil 4.21.	Canlı <i>Lb. acidophilus</i> NCC 36'nın 4 Saat İçinde Beyaz Şarapta 5 ng ml ⁻¹ OTA'yı %21.27 (a), 10 ng ml ⁻¹ OTA'yı %23.40 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ OTA'yı %19.11 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	102
Şekil 4.22.	Canlı Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarapta 5 ng ml ⁻¹ OTA Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	102
Şekil 4.23.	Canlı Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarapta 10 ng ml ⁻¹ OTA Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	103
Şekil 2.24.	Canlı Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarapta 20 ng ml ⁻¹ OTA Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	104

Şekil 4.25.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan <i>Lb. acidophilus</i> NCC 36'nın 4 Saat İçinde Beyaz Şarapta 5 ng ml ⁻¹ OTA'yı %24.64 (a), 10 ng ml ⁻¹ OTA'yı %26.11 (b) ve 20 ng ml ⁻¹ OTA'yı %24.32 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.....	106
Şekil 4.26.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarap Ortamında 5 ng ml ⁻¹ OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	107
Şekil 4.27.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarap Ortamında 10 ng ml ⁻¹ OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	107
Şekil 4.28.	Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarap Ortamında 20 ng ml ⁻¹ OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	108
Şekil 4.29.	Beyaz Şarapta 5 (a), 10 (b), 20 (c) ng ml ⁻¹ OTA Pozitif Kontrol ve OTA Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.....	109
Şekil 4.30	<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12'nin Beyaz Şarapta 4 Saatte 5 ng ml ⁻¹ OTA'yı %20.13 Oranında Bağlama Yeteneğine ve Beyaz Şarapla (OTA içermeyen) Yıkanması Sonucu Serbest Kalan OTA'ya (tespit edilemedi) Ait HPLC kromatogramları.....	112
Şekil 4.31.	Gram-Pozitif Bakterilerin Hücre Duvarının Görünümü.....	117

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 3.1. AFM ₁ ve OTA Analizlerinde Kullanılan HPLC Cihazı.....	45
--	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

- WHO : World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü
- IARC : International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kansere Araştırma Enstitüsü)
- AFB₁ : Aflatoksin B₁
- AFM₁ : Aflatoksin M₁
- OTA : Okratoksin A
- FAO : Food and Agricultural Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
- ND : Not Detected (Tespit Edilemedi)
- TLC : Thin-Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
- HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- HSCAS : Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicates (Susuz Sodyum Kalsiyum Aluminosilikatlar)
- LAB : Laktik Asit Bakterileri
- Lb.* : *Lactobacillus*
- B.* : *Bifidobacterium*
- P.* : *Propionibacterium*
- PBS : Fosfat Buffered Saline
- RIVM : Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Halk Sağlığı ve Çevre Araştırma Enstitüsü)
- MRS : De Man Rogosa and Sharpe
- kob : Koloni Oluşturma Birimi

1. GİRİŞ

Gıda maddelerinde mikotoksin varlığı halk sağlığını ilgilendiren ve gelecek nesillerin de sağlığını tehdit eden önemli bir problemdir. Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* başta olmak üzere bazı patojenik ve bozulma etmeni küfler tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleridir (EC Report, 1999). Doğada 100'ün üzerinde küf tarafından üretilen 400 kadar ikincil metabolitin toksik aktiviteye sahip olduğu ve dünyada üretilen tarım ürünlerinin yaklaşık dörtte birinin mikotoksinlerle kontamine olduğu öne sürülmektedir (McLean ve Dutton, 1995; Galvano ve ark, 2001; Atroshi ve ark, 2002). Bunlar arasında aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin M₁ (AFM₁), okratoksin A (OTA), fumonisin B₁ (FB₁), trikotesenler ve patulin, sağlık ve ekonomik açıdan yarattığı sorunlar nedeniyle üzerinde en fazla durulan mikotoksin türlerini oluşturmaktadır (Van Egmond, 2004).

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* tarafından üretilmekte olup, doğada 18 farklı türevinin bulunduğu belirtilmektedir (Jay, 1992; Pittet, 1998). AFB₁, mikotoksinler içerisinde insanlara karşı kanserojenik aktivite gösterdiği Dünya Sağlık Örgütü-Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (WHO-IARC) tarafından kanıtlanmış (1A grubu) tek mikotoksin olması bakımından ayrı bir önem taşımaktadır. Bu konuda IARC tarafından Asya ve Afrika'da yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda AFB₁ ile kontamine olmuş gıda tüketimiyle karaciğer kanserine yakalanma riski arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (Hussein ve Brasel, 2001). AFB₁, yer fıstığı, Antep fıstığı, fındık gibi yağlı kuru meyveler, kırmızıbiber başta olmak üzere çeşitli baharatlarda, özellikle ikinci ürün mısır ve incirde sorun yaratmaktadır.

AFB₁ ile kontamine olmuş yemlerin süt veren hayvanlar tarafından tüketimiyle metabolizma faaliyeti sonucunda AFM₁ oluşmaktadır. AFB₁'in hidrosillenmiş metaboliti olan AFM₁ "süt toksini" olarak da adlandırılmaktadır (Frobish ve ark, 1986; Galvano ve ark, 1996a). AFM₁'in toksik ve kanserojenik potansiyelinin AFB₁'e yakın olduğu bildirilmektedir (Barbieri ve ark, 1994; Moss, 2002). Süt ve süt ürünlerinin bebek ve gelişme çağındaki çocukların temel besin kaynakları arasında yer aldığı ve kanserojenik maddeleri biyotransformasyon mekanizmasının

yetişkinlere oranla yeterince gelişmediği düşünüldüğünde tehlikenin boyutları büyümektedir (Pierides ve ark., 2000).

Doğada sıkça rastlanılan diğer bir mikotoksin grubu olan OTA, özellikle *A. ochraceus*, *A. carbonarius* ve *P. verrucosum* tarafından üretilmektedir (FAO/WHO, 2001). Nefrotoksik bir ajan olan OTA'nın "Balkan Endemic Nephropathy" etmeni olduğu, insanlarda öldürücü böbrek hastalıklarına ve üriner bölgede çeşitli tümörlere neden olduğu ileri sürülmektedir (Derberghes ve ark, 1995; Thuvander ve ark, 2001). Bunun yanı sıra, deney hayvanlarına karşı genotoksik, teratojenik, hepatoksik ve kanserojenik aktivite gösterdiği saptanmıştır (Ng ve ark, 2004). OTA açısından sorun olan başlıca ürünler; kakao tohumu, kahve, kuru üzüm, incir, şarap ve mısır, buğday başta olmak üzere tahıllardır. Kodeks Alimentarius Komisyonu OTA açısından en önemli iki kontaminant kaynağının tahıl ve şarap olduğunu bildirmiştir (Serra ve ark., 2003).

Mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yem maddelerinin insan ve hayvanlar tarafından tüketimi söz konusu sağlık problemlerine ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle mikotoksinlerin sağlık üzerine olumsuz etkilerini önlemeye yönelik çalışmalar son derece önemli ve gerekli bir konuyu oluşturmaktadır.

Mikotoksinlerin sağlık ve ekonomik yönden yarattığı sorunlar, araştırmacıları mikotoksin oluşumunun engellenmesi ve/veya mikotoksinlerin ortamdaki uzaklaştırılmasına yönelik kontrol stratejilerine yöneltmiştir. (Rustom, 1997; Yılmaz ve Özyay, 2001). Mikotoksinlerin toksik etkisinin giderilmesinde en iyi yolun, mikotoksin oluşumunun engellenmesi olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla; dayanıklı ürün çeşidi kullanımı, iyi tarım tekniklerinin uygulanması, biyolojik ve kimyasal ajanların kullanımı vb çeşitli stratejiler önerilmesine karşın mikotoksin oluşumu çoğu zaman engellenememektedir. Diğer yandan, mikotoksinlerin gıda ve yem maddelerinden uzaklaştırılması amacıyla çeşitli detoksifikasyon yöntemleri üzerinde de çalışılmaktadır. Mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yem maddelerinden toksini uzaklaştırmaya veya etkisiz hale getirmeye yönelik fiziksel (ısı işleme, ışınlama vb) ve kimyasal (amonyum hidroksit, ozon, hidrojen peroksit, indirgeyici ajan vb) yöntemlerin insan sağlığına ve gıda kalitesine olumsuz etkide bulunmaları

nedeniyle etkin bir yöntem olarak kullanımları kısıtlanmaktadır (Samarajeewa ve ark, 1990; Piva ve ark, 1995; Bata ve Lasztity, 1999). Mikotoksinlerin gıda maddelerinden uzaklaştırılması amacıyla kimyasal yöntemlerin uygulanmasına Avrupa Birliği ülkelerinde izin verilmemektedir (Galvano ve ark., 2001). *Flavobacterium aurantiacum* başta olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik yöntemlerin ise gıdanın renginde değişikliğe neden olması, son üründe toksik ve/veya mutajenik bir kalıntıya neden olup olmadığı konusunda şüphelerin olması kullanımını sınırlandırmaktadır (Özkaya, 2001).

Buradan yola çıkarak mikotoksinlerin toksik etkisinden kurtulmak amacıyla etkin ve güvenilir alternatif yöntemlerin arayışına gidilmiştir. Bu amaçla geliştirilen stratejilerden birisi bağırsak koşullarında mikotoksin absorpsiyonunun engellenmesidir. Bu amaçla aktif karbon, bentonit, susuz sodyum kalsiyum aluminosilikat, zeolit vb. çeşitli adsorban maddelerin *in vitro* koşullarda ve *in vivo* olarak bağırsak koşullarında belirli oranlarda mikotoksin absorpsiyonunu engellediği bildirilmektedir. Buna karşın, bu maddelerin yalnızca hayvan yemlerine belirli oranda kullanılabilmesi ve gıda sanayinde kullanımının söz konusu olmaması başka alternatiflere yönelme ihtiyacını doğurmuştur (Galvano ve ark., 2001). Bu proje kapsamında bağırsak koşullarında doğal olarak bulunan bazı laktik asit bakterilerinin bu amaçla kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Bazı probiyotik laktik asit bakterilerinin fosfat tamponu ortamında AFB₁'i belirli oranlarda bağlama yeteneği gösterdiği çeşitli araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur. Bu araştırmalar genellikle fosfat tamponu ortamında gerçekleştirilmiş olup, gıda matriksinde ve bağırsak koşullarında nasıl bir etki göstereceği konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, mikotoksinlerin laktik asit bakterileri tarafından bağlanması konusunda yapılan çalışmalar özellikle AFB₁ üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu kapsamda AFM₁ ve OTA ile ilgili olarak ise sınırlı düzeyde veriye ulaşılmıştır.

Bu çalışmada, sağlık üzerine olumsuz etkileri ve ekonomik açıdan yarattığı sorunlar nedeniyle mikotoksinlerin, fonksiyonel gıda ürünlerinin üretiminde kullanılan bazı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarıyla biyolojik olarak ortamdaki uzaklaştırılmasının mümkün olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, çalışmada kullanılan test bakterilerinin *in vitro* ortamda (fosfat tamponu ve gıda modeli) önemli mikotoksinlerden olan AFM₁ ve OTA'yı bağlama yetenekleri araştırılmıştır.

Araştırma kapsamında, canlı ve ısıtma işleme maruz bırakılan bazı laktik asit bakterilerinin AFM₁'i fosfat tamponu ve rekonstitüe süt ortamında, OTA'yı fosfat tamponu (PBS) ve beyaz şarapta bağlama yeteneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Proje kapsamında ayrıca, bağlama yeteneği üzerine bakteri yoğunluğunun, toksin konsantrasyonunun, inkübasyon süresinin ve hücre yüzeyinin hidrofobik yapısının etkisi araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, fosfat tamponu ve gıda modeli içinde bakteri-toksin kompleksinin stabilitesi belirlenerek, bakterinin tekrar fosfat tamponu/gıda modeline geçme eğilimi incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde küfler, ürettikleri mikotoksinler ve oluşum koşulları hakkında genel bir bilgi verildikten sonra AFM₁ ve OTA üzerinde durulmuş olup, bu toksinlerin neden olduğu toksik ve kanserojenik etkiler, riskli gıda maddeleri, oluşum koşulları ve gıdalarda bulunmasına izin verilen miktarlar belirtilmiştir. Bundan sonraki aşamada, mikotoksinlerin toksik ve kanserojenik etkilerinden korunmak amacıyla geliştirilen stratejiler özetlenmiş ve bu amaçla laktik asit bakterilerinin kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur. Son olarak gıda endüstrisinde kullanılan laktik asit bakterileri ve özellikleri hakkında kısa bir bilgi verilerek laktik asit bakterilerinin mikotoksinleri bağlama yetenekleri konusunda yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

2.1. Küfler Hakkında Genel Bilgi

Küfler, doğada hemen her yerde yayılmış olan, heteretrof, filamentli (uzantılı) ve çok hücreli funguslardır (Banwart, 1989). Küflerin sınıflandırılmasında temel olarak eşeyli sporlar ve bunlarla ilgili organeller dikkate alınmakta ve genel olarak, Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota ve Basidiomycota olmak üzere 6 sınıfa ayrılmaktadır (Deacon, 1997).

Küfler gelişimleri için temel olarak su, oksijen ve makro elementlere (karbon, nitrojen, fosfor, potasyum) gereksinim duymaktadır (Onions ve ark, 1981). Küfler suda erimiş halde bulunan besinleri difüzyon yoluyla sağlarlar ve zengin enzim sistemleri sayesinde çok sayıda besin maddesinden yararlanabilirler. Küfler karbon ve enerji kaynaklarını karşılamak amacıyla genellikle glikozdan yararlanırlar. Bunun yanı sıra, sakaroz, nişasta ve maltoz gibi kompleks karbon bileşikleri de küfler tarafından kullanılabilir. Bazı küfler yağ asitlerini, organik asitleri, gliserolü, heksoz ve pentoz şeker türevlerini (üronik asit ve şeker alkolleri) de kullanılabilmektedir (Arda, 1997; Özkaya ve ark, 1999).

Küfler aerobik mikroorganizmalar olup, 0-60°C gibi oldukça geniş sıcaklık aralığında gelişebilmelerine rağmen, genellikle mezofiliktirler ve optimum olarak 22-

32°C’de gelişirler. Küflerin gelişebildikleri pH sınırları 2-11 arasında olmakla birlikte optimum olarak 5-6 arasında gelişmektedirler (Doyle ve ark, 1997; Özkaya ve ark, 1999).

Küfler gıdalarda oluşturdukları çeşitli olumlu ve olumsuz değişiklikler nedeniyle gerek sağlık gerekse endüstriyel açıdan önemli yer tutmaktadırlar. Küflerin birincil metabolitleri olan enzimlerle protein, yağ ve karbonhidratlar küçük moleküllere parçalanırken, ortamda yeni bileşikler sentezlenmektedir. Ayrıca endüstriyel mikrobiyolojide sitrik asit, glukonik asit, itakonik asit vb. organik asitler, bazı enzimler, pigment ve antibiyotik üretiminde de küflerden yararlanılmaktadır. Küfler ürettikleri çeşitli biyoaktif metabolitlerinden dolayı tıp alanında da önem taşıyan mikroorganizmalardır. Küflerin gıdalar üzerindeki olumsuz etkileri ise; renk bozulmaları, acılık, istenmeyen kokuların oluşumu gibi dıştan gözlenebilen değişimler, besin elementleri kaybı ve mikotoksin oluşumu olarak gösterilebilir (Topal ve ark, 1999).

Küfler metabolik etkinlikleri sırasında oldukça fazla sayı ve çeşitlilikte metabolit üretmektedirler. Bu metabolitler oluşum miktarlarına göre birincil ve ikincil metabolitler olmak üzere iki ayrı grup altında incelenebilmektedir. Küfler tarafından üretilen birincil ürünler, organizmanın gelişimi için gereklidir. Bunlar arasında yağ asitleri, steroller, proteinler ve aromatik aminoasitler yer almaktadır. Diğer yandan küfler, düşük molekül ağırlığına sahip daha az miktarda çeşitli ikincil metabolizma ürünleri de oluşturmaktadır (Heathcote ve Hibbert, 1978; Jay, 1992; Moss, 1992; Deacon, 1997). Bu ikincil metabolizma ürünlerinin, küfün normal metabolik faaliyeti açısından önemli bir etkisinin bulunmadığı bilinmektedir (Pitt, 2000).

İkincil metabolitler küfün logaritmik gelişme fazının sonunda üretilmeye başlamaktadır. Küfler tarafından üretilen ikincil metabolitlerin biyosentezinde polyketid, terpenoid ve aminoasit sentezi olmak üzere başlıca 3 biyosentez yolu bulunmaktadır. Mikotoksijenik küfler tarafından sentezlenen mikotoksinlerin polyketid yoluyla oluştuğu bildirilmiştir (Jay, 1992). Küfler tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünlerinin kimyasal yapılarını incelediğimizde, aromatik ve heterosiklik yapı, alifatik yapı ve nitrojen içeren yapı olmak üzere başlıca 3 yapı

görülmektedir. Mikotoksinlerin çoğunun aromatik yapıda olduğu, küçük bir kısmının da alifatik bileşiklerden oluştuğu bilinmektedir (Heathcote ve Hibbert, 1978).

2.2. Mikotoksinler

Mikotoksinler, bitki patojeni olarak bilinen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* spp.'nin toksijenik türleri başta olmak üzere bazı patojenik ve bozulma etmeni küfler tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleridir (EC Report, 1999; Sweeney ve Dobson, 1999). Bu toksijenik küfler, “tarla küfleri” ve “depo küfleri” olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. *Fusarium*, *Claviceps* ve *Alternaria* cinsine ait küfler bitki patojeni olarak bilinmekte olup, bitki yetiştirme aşamasında veya hasat sırasında ürüne kontamine olduğundan “tarla küfleri” olarak adlandırılmaktadır (EC Report, 1999). Bu küfler özellikle dane neminin %20'nin üzerinde bulunduğu değerlerde dane çürüklüğüne ve toksin oluşumuna neden olmaktadır (Bankole ve Adebajo, 2003). *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler ise saprofitiktir ve özellikle hasat sonrası depolama aşamasında %70-90 nispi nem değerlerinde (tahıl nemi %18) sorun yarattıklarından “depo küfleri” terimi ile nitelendirilmektedir (EC Report, 1999). Bu ayırımı karşın bazı istisnalar da bulunmaktadır. Örneğin, *Aspergillus flavus*'un hem bitki yetiştirme aşamasında, hem de depolama aşamasında uygun sıcaklık ve nem koşullarında ürüne kolonize olabildiği ve toksin oluşturduğu belirtilmektedir (Placinta ve ark, 1999).

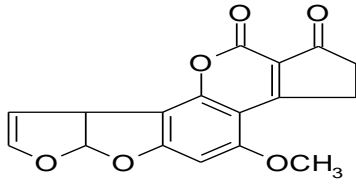
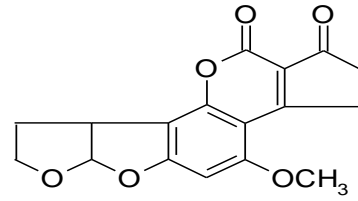
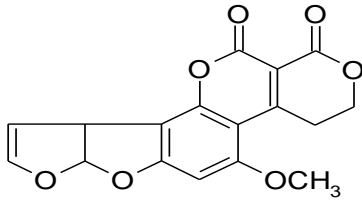
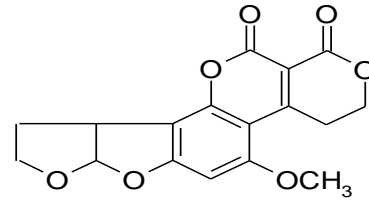
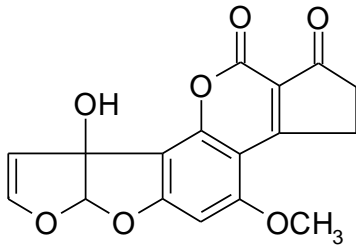
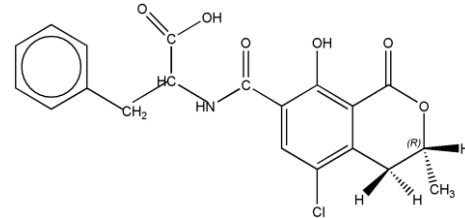
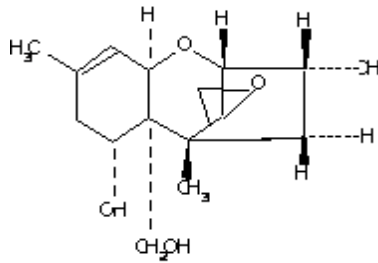
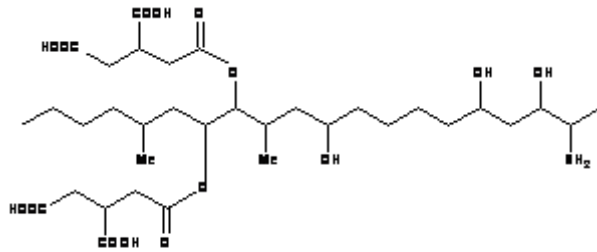
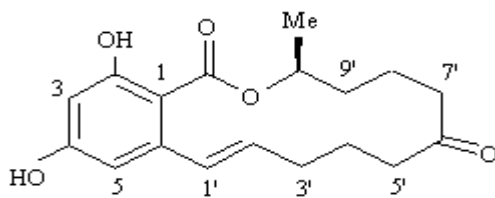
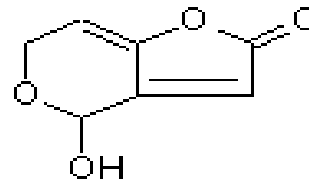
Doğada 100'ün üzerinde küf türü tarafından üretilen 400 kadar ikincil metabolitin toksik aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (McClean ve Dutton, 1995; Wang ve Groopman, 1999). FAO (Food and Agricultural Organization) dünyada üretilen tarım ürünlerinin yaklaşık %25'inin mikotoksinlerle kontamine edildiğini rapor ederek konunun önemini ortaya koymuştur (Galvano ve ark, 2001). Halk sağlığı ve ekonomik açıdan yarattığı sorunlar nedeniyle aflatoksinler, okratoksin A (OTA), trikotesenler (deoksinivalenol, T-2 toksin), fumonisin B₁ (FB₁), zearalenon (ZEA) ve patulin üzerinde en fazla durulan mikotoksin türlerini oluşturmaktadır (Galvano ve ark, 2001; Van Egmond, 2004). Çizelge 2.1'de biyolojik ve ekonomik yönden önemli olan bazı küf türleri, ürettikleri mikotoksinler ve riskli gıda maddeleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı Önemli Toksikjenik Küf Türleri, Ürettikleri Mikotoksinler ve Riskli Gıda Maddeleri.

Küf türleri	Mikotoksin	Riskli Gıda Maddesi	Kaynak
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Aflatoksin	Yağlı kuru meyveler, hububat, kırmızı biber ve çeşitli baharatlar, incir, süt ve ürünleri	EC Report, 1999
<i>A. carbonarius</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>P. viridicatum</i>	OTA	Mısır, kakao tohumu, kahve, kuru üzüm, incir, üzüm suyu ve şarap	EC report, 1999
<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	DON	Buğday, mısır, arpa, ekmek	FAO/WHO, 2001
<i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i>	T-2 toksin	Buğday, pirinç ve diğer hububatlar, ekmek	FAO/WHO, 2001
<i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>	Fumonisin	Mısır, pirinç, sorgum	EC report, 2000
<i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Zearalenon	Mısır, buğday, arpa, yulaf	EFSA, 2004
<i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Sitrinin	Buğday, çavdar, pirinç, mısır, meyve suları	Delage ve ark., 2003
<i>A. versicolor</i> , <i>A. rugolosis</i> , <i>A. ruber</i>	Sterigmatosistin	Hububat, kahve	EC Report, 1999
<i>P. expansum</i> , <i>Byssochlamys fulva</i> , <i>B. nivea</i>	Patulin	Elma suyu, işlem görmüş meyveler, meyve suları	EC Report, 1999

Mikotoksinlerin tüketimi sonucu insan ve hayvan gibi yüksek yapıllı canlılarda görülen toksik sendromlara “mikotoksikozis” adı verilmektedir (EC Report, 1999). Mikotoksinlerin insanlara geçiş yolu iki şekilde olmaktadır. Doğrudan mikotoksin içeren gıdaların tüketimi sonucu insan ve hayvanlarda oluşan mikotoksikozise “birincil mikotoksikozis” adı verilmektedir. Hayvanlar tarafından mikotoksinlerle kontamine olmuş yemlerin tüketimi sonucu bu mikotoksinler ete, süte ve yumurta gibi hayvansal ürünlere geçebilmektedir. Hayvansal ürünlerin tüketimi sonucu görülen mikotoksikozis ise “ikincil mikotoksikozis” olarak ifade edilmektedir (Özkaya ve ark, 1999).

Mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yem maddelerinin insan ve hayvanlar tarafından tüketilmesi sonucu akut, kronik, mutajenik ve teratojenik olmak üzere 4 çeşit toksik etki görülmektedir (Pitt, 2000). Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara karşı toksik etkisi; alınan doza, toksine maruz kalma süresine, toksin türüne, etki mekanizmasına, cinsiyete, yaşa, metabolizmaya ve savunma mekanizmasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Hussein ve Brasel, 2001; Galvano ve ark, 2001). Dünya Sağlık Örgütü-Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (WHO-IARC) 1993 yılında mikotoksinleri insanlara karşı kanserojenik potansiyellerine göre sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmaya göre; AFB₁ “yeterli kanıt elde edilmiş insan kanserojenleri” (1A grubu) grubunda yer alırken, AFM₁, OTA ve FB₁ “muhtemel kanserojenik mikotoksin” (2B grubu) olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, trikotesen ve ZEA'nun ise insanlara karşı kanserojenik aktivitesinin bulunmadığı (3. Grup) belirtilmiştir (Hussein ve Brasel, 2001). Bazı önemli mikotoksin türlerinin kimyasal yapıları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

**Aflatoxin B₁****Aflatoxin B₂****Aflatoxin G₁****Aflatoxin G₂****Aflatoxin M₁****Okratoksin A****Deoksinivalenol****Fumonisin B₁****Zearalenon***** Patulin**

Şekil 2.1. Bazı Önemli Mikotoksin Türlerinin Kimyasal Yapıları (Hussein ve Brasel, 2001; *Delage ve ark., 2003).

2.2. 1. Aflatoksinler

Aflatoksinler *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius*'un toksijenik türleri tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleridir. Bu üç küf cinsi birbirine çok benzemekte olup, tanımlanmalarında sınırlı sayıda karakteristik fark bulunmaktadır. Doğada *A. flavus* ve *A. parasiticus*'a yaygın olarak rastlanmasına karşın *A. nomius* seyrek olarak bulunmaktadır (Doyle ve ark, 1997; Pitt, 2000).

Aflatoksinler, toksik ve kanserojenik potansiyeli nedeniyle üzerinde en fazla durulan mikotoksin grubunu oluşturmaktadır. Aflatoksinlerin varlığı ilk olarak 1960'lı yıllarda İngiltere'nin güney doğu bölgesinde 100.000'den fazla hindi palazı ve on binlerce ördek ve sülünün ölümü sonu yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Hayvanlar tarafından tüketilen yer fıstığı küspelerinde yoğun miktarda *A. flavus* ve bu küf tarafından üretilen toksin izole edilmiştir. Bu nedenle bu toksine (A-fla-toksin) adı verilmiştir (Moss, 1992).

Ülkemizde aflatoksin sorunu ilk defa 1967 yılında gündeme gelmiş, Kanada'ya ihraç edilen 10 ton iç fındık aflatoksin içerdiği gerekçesi ile geri çevrilmiştir. 1971 yılında Amerika'ya ihraç edilen Antep fıstıklarında, 1972 yılında Danimarka'ya ihraç edilen kuru incirlerde oldukça yüksek miktarda aflatoksin saptanmıştır. Bu geri dönme olayları üzerine Türkiye'de aflatoksin çalışmaları başlamıştır (Denizel ve ark., 1976). Daha sonraki yıllarda, 1987'de kuru incir ve 1994 yılında kuru kırmızı pul biber ihracatında aflatoksin nedeniyle büyük sorunlar yaşanmıştır (Özkaya ve ark., 1999). Avrupa Birliğine girme girişimlerinde bulunduğumuz şu günlerde de, çeşitli ihraç ürünlerinde yüksek oranda aflatoksin varlığıyla ilgili uyarılar zaman zaman gündemde yer almaktadır (RASFF, 2004; RASFF, 2005).

Aflatoksin oluşumunu etkileyen faktörler arasında; sıcaklık, oksijen, karbon ve nitrojen gibi çevre ve besin kaynağı etmenleri yer almakla birlikte en önemli iki faktörün ürünün nem içeriği ve sıcaklık olduğu vurgulanmaktadır (Jay, 1992; D'Mello ve Macdonald, 1997). Aflatoksin üretiminin optimum olarak 25-30°C arasında olduğu saptanmıştır (Doyle ve ark, 1997; D'Mello ve Macdonald, 1997). Su aktivitesi açısından ise aflatoksin üretiminin optimum olarak 0.98-0.99

değerlerinde gerçekleştiği, su aktivitesi değerinin 0.85 civarına düştüğünde ise toksin üretiminin durduğu belirtilmektedir (Doyle ve ark, 1997).

Aflatoksin açısından risk oluşturan başlıca ürünler; yer fıstığı, Antep fıstığı, fındık, incir, kırmızı pul biber başta olmak üzere çeşitli baharatlar, buğday ve mısırdır (Pittet, 1998; Doyle ve ark., 1997). Son yıllarda araştırmaların artmasıyla, süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin varlığı da önem kazanmıştır (Pittet, 1998; Nachtmann ve ark., 2007).

Aflatoksinler insan ve hayvanlara karşı akut ve kronik toksik aktivite göstermektedir. Aflatoksinle kontamine olmuş ürünlerin tüketimi sonucu insan ve hayvanlarda akut karaciğer hasarı, karaciğer sirozu, tümör oluşumu ve teratojenik (düşük oluşumu) etki görülebilmektedir (Doyle ve ark, 1997; Pitt, 2000). İnsanlarda aflatoksin kaynaklı akut toksisite vakalarına nadiren rastlanmaktadır. Tarihte ilk olarak 1967 yılında Tayvan'da $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ konsantrasyonunda AFB₁ ile kontamine olmuş pirinç tüketimi sonucu 26 kişide gıda zehirlenmesi vakası meydana gelmiş ve 19 çocuktan 3'ü ölmüştür. 1974 yılında ise Hindistan'da aflatoksinle kontamine olmuş ürün tüketimi sonucu 400 kişi hepatit hastalığından etkilenmiş ve bunlardan 100'ü ölmüştür (Doyle ve ark, 1997).

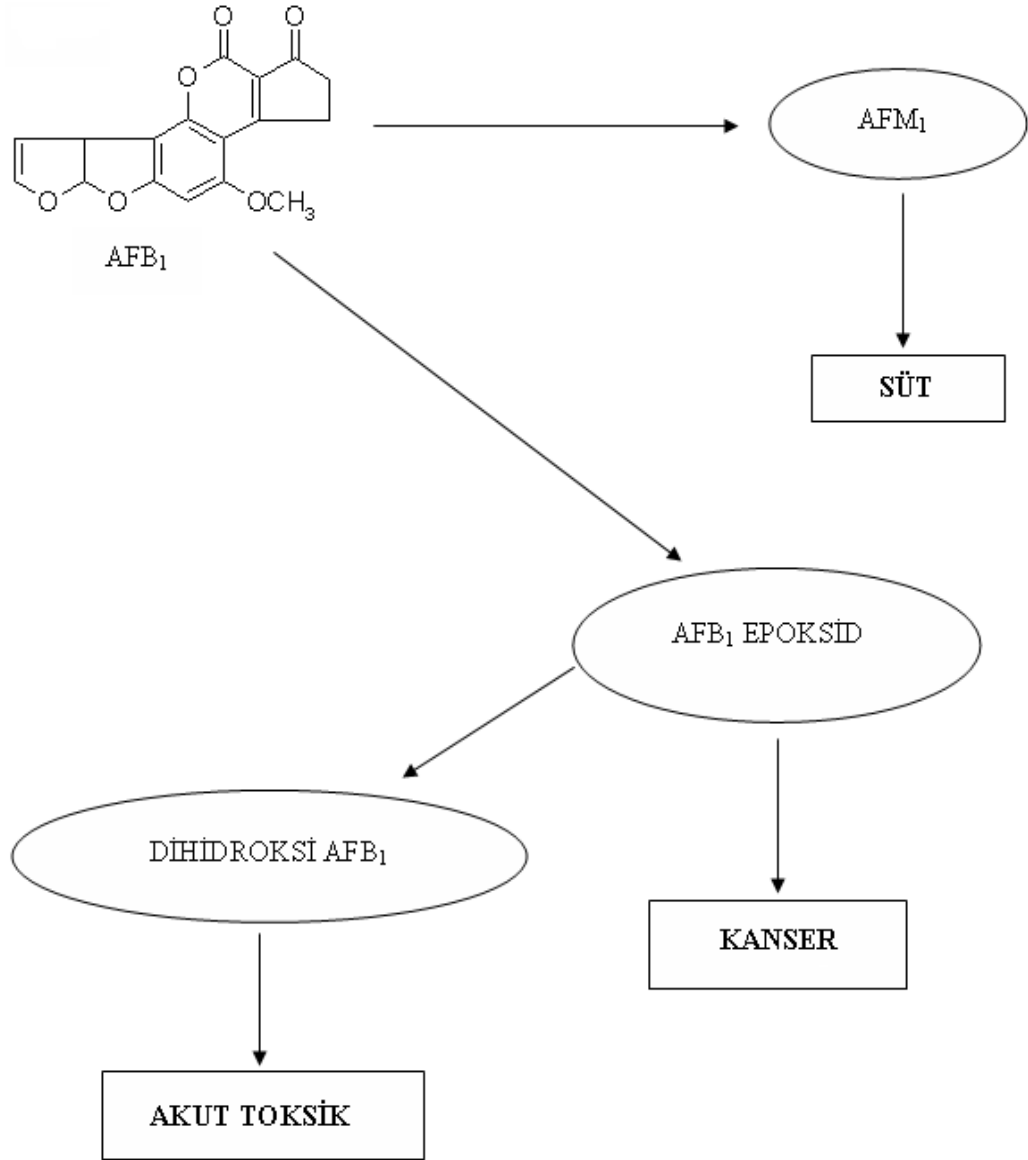
Aflatoksinlerin insanlara karşı gösterdiği en önemli kronik toksik aktivite karaciğer kanseri olarak gösterilmektedir. İnsanlarda karaciğer kanseri yoğun olarak orta Afrika ve Asya'nın güneydoğu bölgelerinde görülmektedir. Bu nedenle çeşitli Afrika ülkelerinde ve Tayland'da yapılan çalışmalardan karaciğer kanseri ile aflatoksin tüketimi arasında korelasyon görülmüştür (Doyle ve ark, 1997; Pitt, 2000). Diğer yandan, Afrika'da yüksek oranda karaciğer kanseri vakası görülmesinde hepatit B enfeksiyonunun da etkili olduğu, hepatit B ve aflatoksinin sinerjik etki gösterebildiği öne sürülmektedir (Pitt, 2000; Moss, 2002). Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) yapılan çalışmalarda ise karaciğer kanseri ile aflatoksin tüketimi arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir (Pitt, 2000).

Aflatoksinler difuranokumarin yapısında bileşikler olup doğada 18 farklı türevinin bulunduğu belirtilmektedir (Jay, 1992). Bunlar arasında doğada en sık rastlanılanları AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂'dir. "B" ve "G" harfleri metabolitlerin ince tabaka kromatografisi plakalarında UV ışığı altında verdikleri mavi (blue) ve

yeşil (green) floresans renklerini göstermektedir. AFB₁ ve AFB₂ ile kontamine olmuş yemlerin tüketimiyle süt veren hayvanlarda metabolizma faaliyeti sonucu hidroksillenmiş metabolitleri olan ve başlangıç metabolitine göre daha düşük toksisitesi olan “AFM₁” ve “AFM₂” oluşmaktadır (Pitt, 2000). Aflatoksinlerin toksik derecesi bakımından bir sıralama yapıldığında; toksisite AFB₁’den başlayarak AFM₁, AFG₁, AFB₂, AFM₂ ve AFG₂’ye doğru azalma göstermektedir (Jay, 1992; McLean ve Dutton, 1995).

2.2.1.1. Aflatoksin B₁

Aflatoksinler içerisinde AFB₁ (C₁₇H₁₂O₆) grubun en toksik ve kanserojenik potansiyele sahip olanıdır. Gıda maddesi yoluyla alınan AFB₁’in orijinal formda toksik aktivite göstermediği, muhtemelen karaciğere taşınım sonrasında çeşitli enzimler vasıtasıyla biyotransformasyona uğrayarak kanserojenik ve mutajenik bir özellik kazandığı belirtilmektedir (Moss, 2002). AFB₁’in karaciğerde mikrozomal-oksidadaz enzim sistemi ile metabolize edildiği, DNA ve proteinlere kovalent bağlarla bağlanarak aşırı reaktif 8-9 epoksid AFB₁ molekülü oluştuğu ileri sürülmektedir (Vidyasagar ve ark, 1997; Özkaya ve ark, 1999; Moss, 2002). Bu epoksid formun DNA ile birleşerek AFB₁-N₇-Guanine kompleksini oluşturduğu ve bu oluşumun karaciğer kanserine yakalanma riskini 2-3 kat artırdığı belirtilmektedir (Pitt, 2000). Diğer yandan, epoksid-AFB₁’in ileri aşamada aşırı reaktif dihidroksi AFB₁’e dönüştüğü ve bu metabolitin de akut toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2.AFB₁'in Metabolize Edilmesi Sonucu Akut Toksik ve Kanserojenik Aktivite Göstermesi (Moss, 2002).

2.2.1.2. Aflatoksin M₁

AFM₁, AFB₁'in hepatic mikrozomal sitokrom P450 tarafından biyotransformasyonu sonucu oluşan hidroksillenmiş metaboliti olup, süt toksini olarak da adlandırılmaktadır. Süt ve süt ürünlerine AFM₁ kontaminasyonu, hayvanların AFB₁ içeren yem tüketmeleri sonucu meydana gelmektedir (Rastogi ve

ark, 2003). AFB₁'in süt veren hayvanlarda metabolizma faaliyeti sonucu AFM₁'e dönüşme oranı ile ilgili olarak literatürde farklı bilgiler bulunmaktadır. Bu oran, hayvandan hayvana ve laktasyon periyoduna bağlı olarak değişmekle birlikte, tüketilen AFB₁'li yemin 12-24 saat içerisinde sütte %1-3 oranında AFM₁'e dönüştüğü belirtilmektedir. (Barbieri ve ark, 1994).

AFM₁'in toksik ve kanserojenik potansiyelinin AFB₁'e yakın olduğu vurgulanmaktadır (Barbieri ve ark, 1994; Moss, 2002). Bu konuda ördeklerde yapılan bir çalışmada AFB₁ ve AFM₁ için LD₅₀ değerleri sırasıyla 0.24 ve 0.32 mg kg⁻¹ olarak bulunmuştur (Galvano ve ark, 1996a).

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan süt ve süt ürünlerinin AFM₁ ile kontamine olması önemli bir sağlık riski oluşturmaktadır. Sütün yeni doğmuş ve gelişme çağındaki çocuklar gibi zayıf immunolojik sisteme sahip olan kişiler tarafından yoğun miktarda tüketildiği göz önüne alındığında tehlikenin boyutları büyümektedir (Neal ve ark, 1998, Pierides ve ark., 2000). Ayrıca, kabul edilebilir sınır değerler üzerinde AFM₁ ile kontamine olmuş sütün, peynir ve yoğurt gibi başka ürünlere işlenmesi de yasal açıdan yasak olduğundan önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Pierides ve ark, 2000).

AFM₁ riskini minimuma indirmek amacıyla pek çok ülkede süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek maksimum AFM₁ miktarı yasalarla belirlenmiştir. Bu yasal limitler, ülkelerin gelişmişlik düzeyine ve ekonomik durumlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Galvano ve ark, 1996a, Rastogi ve ark, 2003). Diğer yandan, pek çok az gelişmiş ülkede AFM₁ ile ilgili olarak yasal bir limitin bulunmadığı bilinmektedir (Rastogi ve ark, 2003). Avrupa Birliği çiğ süt ve teknolojik işlem uygulanmış süt ürünlerinde bulunabilecek maksimum AFM₁ limitini 0.05 µg kg⁻¹ olarak belirlemiştir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ise maksimum AFM₁ limitini 0.5 µg kg⁻¹ olarak bildirmiştir (Pierides ve ark, 2000). Bu kurumlar ayrıca, kontamine olmuş ürünle iyi kalitede ürünün karıştırılarak AFM₁ miktarının kabul edilebilir sınır değerlerin altına düşürülmesini de yasaklamıştır (Pierides ve ark, 2000). Ülkemizde süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek AFM₁ miktarını gösteren limitler ise Türk Gıda Kodeksi'nde belirlenmiştir. Buna göre, sütlerde bulunabilecek maksimum AFM₁ miktarı Avrupa Birliği limitleriyle paralellik gösterirken (0.05 µg

kg⁻¹), peynirlerde bulunabilecek maksimum AFM₁ miktarı 0.25 µg kg⁻¹, bebek mamalarında ise 0.02 µg kg⁻¹ olarak bildirilmiştir (Türk Gıda Kodeksi Tebliğ, 2002). Anne sütü ve bebek mamaları, yeni doğmuş ve gelişmekte olan bebeklerin temel ve tek besin kaynağıdır. Kanserojenik maddelerin biyotransformasyon mekanizması bebeklerde yetişkinlere göre yeterince gelişmediğinden, AFM₁'e karşı daha hassas olmalarına neden olmaktadır. Bu nedenle de bebek mamaları için belirlenen sınır değerler, süt için belirlenen değerlere göre daha düşük seviyede tutulmuştur.

Süt ve süt ürünlerinde AFM₁ varlığı ile ilgili olarak dünyada ve ülkemizde yapılmış çeşitli çalışma sonuçları, ürün baz alınarak Çizelge 2.2'de özetlenmiştir. Sütlerde bulunan AFM₁ varlığının ve miktarının sezona, coğrafi koşullara ve ülke koşullarına bağlı olarak farklılık gösterebildiği belirtilmektedir (Galvano ve ark, 1996a; Galvano ve ark, 1998). Genellikle yaz aylarında, hayvanların merada otlamadığı kış aylarına göre, sütlerde AFM₁ seviyesinin daha düşük olduğu bildirilmektedir (Galvano ve ark, 1996a). Buna karşın Özkaya ve ark. (2003), yaz ve kış aylarında toplanan süt örneklerinde AFM₁ miktarının istatistiksel açıdan farklılık göstermediğini belirtmiştir. Bölgesel farklılığın önemini ortaya koymak amacıyla İtalya'da yapılan bir çalışmada, ülkenin güneyinden toplanan süt örneklerinde, orta ve kuzey bölgelerden toplanan süt örneklerine göre daha düşük oranda AFM₁ tespit edilmiştir (Galvano ve ark, 1996a).

AFM₁'in stabilitesinin ısı işlemlerden etkilenip etkilenmediği ile ilgili olarak literatürde çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar AFM₁'in stabilitesinin, pastörizasyon ve sterilizasyon gibi endüstriyel uygulamalardan etkilendiğini bildirmişlerdir (Barbieri ve ark, 1994). Buna karşın, Bostan ve ark. (2003) 21 pastörize süt ve 46 sterilize süt (UHT tekniği) olmak üzere 67 içme sütü örneğinde AFM₁ varlığını araştırdıkları çalışmada, enzymlerle-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak analiz edilen örneklerin 16'sında (orsal olarak %23.9) AFM₁ miktarı 0.05 µg l⁻¹ değerinin üzerinde bulunmuştur. Araştırmacılar pastörize ve sterilize süt örneklerinde AFM₁ varlığı ve miktarı açısından önemli bir farklılık gözlememişlerdir. Benzer şekilde, Lopez ve ark. (2001) AFM₁'in ısı işleme karşı stabil bir yapı göstermesi nedeniyle, pastörizasyon işleminden etkilenmediğini vurgulamışlardır.

Çizelge 2.2.Süt ve Süt Ürünlerinde Saptanan AFM₁ Miktarları.

Örnek	Ülke	Örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı	Miktar (ng kg ⁻¹)	Yöntem	Kaynak
Süt	İtalya	161	125	<1-23.5	HPLC	Galvano ve ark. (1998)
Çiğ süt	Türkiye	90	79	1.2-123.6	TLC	Bakırcı (2001)
Çiğ süt	Yunanistan	107	71	5-> 50	HPLC	Roussi ve ark. (2002)
Çiğ süt	Türkiye	48	35	12-817	HPLC	Akdemir and Altıntaş (2003)
Çiğ süt	Arjantin	56	6	10-30	ELISA	Lopez ve ark. (2003)
Çiğ süt	Türkiye	543	203	10->250	HPLC	Ozkaya ve ark. (2003)
Çiğ süt	Türkiye	104	8	<10-<50	HPLC	Coksoyler ve ark. (2003)
Çiğ süt	Yunanistan	54	27	5-18.2	ELISA	Kaniou-Grigoriadou ve ark. (2004)
Çiğ süt	Portekiz	31	25	5->51	HPLC	Martins ve Martins (2004)
Çiğ süt	İran	111	85	15-280	TLC	Kamkar (2005)
Süt	Hindistan	12	4	28-164	ELISA	Rastogi ve ark. (2003)
Süt	Türkiye	27	16	<1-50.5	HPLC	Gürbay ve ark. (2006)
Süt	Brezilya	36	25	11-161	HPLC	Oliveira ve Ferraz (2007)
Pastörize süt	Yunanistan	136	113	5-50	HPLC	Roussi ve ark. (2002)
Pastörize süt	İran	624	624	< 45-80	ELISA	Alborzi ve ark. (2006)
UHT süt	İtalya	159	136	<1-108.5	HPLC	Galvano ve ark. (1998)
UHT süt	Yunanistan	17	14	5-50	HPLC	Roussi ve ark. (2002)
UHT süt	Portekiz	70	60	5->51	HPLC	Martins ve Martins (2004)
UHT süt	Türkiye	20	20	10-80	ELISA	Var ve Kabak (2005)
UHT süt	Türkiye	129	75	< 10-543	ELISA	Unusan (2006)
Süt tozu	İtalya	97	81	<1-101.3	HPLC	Galvano ve ark. (1998)
Yoğurt	İtalya	114	91	<1-496.5	HPLC	Galvano ve ark. (1998)
Yoğurt	İtalya	120	73	<1-32.1	HPLC	Galvano ve ark. (1998)
Yoğurt	Kore	60	50	3-172	ELISA	Kim ve ark. (2000)
Yoğurt	Portekiz	48	2	43-45	HPLC	Martins ve Martins (2004)
Peynir	İtalya	200	18	35-190	HPLC	Barbieri ve ark. (1994)
Peynir	Türkiye	400	327	<50->800	ELISA	Sarımehmetoğlu ve ark(2003)
Kaşar peyniri	Türkiye	53	47	1->250	ELISA	Ayçiçek ve ark. (2004)
Tereyağı	Türkiye	27	25	1-100	ELISA	Ayçiçek ve ark. (2004)

ND: Tespit edilemedi

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Bebek mamalarında da AFM₁ varlığı konusunda bazı araştırmalar yapılmıştır. Kim ve ark. (2000) Kore’de piyasadan topladıkları 26 bebek maması örneğinin 22’sinde 3-93 ng kg⁻¹ arasında değişen oranlarda AFM₁ bulmuşlardır. Benzer şekilde, Rastogi ve ark. (2003) tarafından Hindistan’da yapılan bir araştırmada 18 bebek maması örneğinin 17’sinde 143-770 ng kg⁻¹ arasında değişen oranlarda AFM₁ bulunmuştur. Diğer yandan Srivastava ve ark. (2001) Kuveyt’de inceledikleri 17 bebek maması örneğinin hiç birinde AFM₁’e rastlamamışlardır.

2.2.2. Okratoksin A

Aspergillus ve *Penicillium* cinsi küfler tarafından üretilen mikotoksinler içerisinde OTA, nefrotoksik ve kanserojenik aktiviteye sahip olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır (Pittet, 1998, FAO/WHO, 2001). OTA metaboliti ilk olarak Güney Afrika bölgesinde, *A. ochraceus* küfünden izole edilmiştir (Moss, 1992; Harris ve Mantle, 2001). Bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda *A. carbonarius* ve *P. verrucosum* küflerinin de OTA’yı sentezleme yeteneğinde olduğunu göstermiştir (Taniwaki ve ark, 2003).

OTA’nın Bulgaristan, Yunanistan ve Romanya gibi bazı Balkan ülkelerinde “Balkan Endemic Nephropathy” olarak adlandırılan öldürücü böbrek hastalıklarına ve üriner bölgede çeşitli tümörlere neden olduğu bildirilmektedir (FAO/WHO, 2001). Bunun yanı sıra OTA’nın teratojenik, bağışıklık sistemini baskılayıcı ve kanserojenik aktivite gösterdiği de belirlenmiş (Jornet ve ark, 2000; Mantle, 2002; Serra ve ark, 2003) ve Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından 1993 yılında “muhtemel kanserojenik madde (2B grubu)” grubunda sınıflandırılmıştır (IARC, 1993).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) Gıda Katkıları Uzman Komitesi ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), tolere edilebilir OTA miktarını 0.1 µg kg⁻¹ vücut ağırlığı/hafta ve 14 ng vücut ağırlığı/gün olarak belirlemişlerdir (FAO/WHO, 2001). Avrupa Birliği Gıda Bilimsel Komitesi (The Scientific Committee on Food of the European Union) ise, maksimum günlük kabul edilebilir OTA miktarını 5 ng kg⁻¹ vücut ağırlığı olarak

bildirmişlerdir (EC Report, 1998). Diğer yandan OTA'nın kanserojenite mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmadığı için OTA'nın kabul edilebilir limitleri hala tartışılmaktadır (Zepnik ve ark, 2003). Avrupa'da şaraplarda bulunabilecek maksimum OTA miktarı 2 ng ml⁻¹ olarak belirlenmiştir (Commission Regulation, 2006). Ülkemizde ise şarap ve bezeri içeceklerde OTA varlığı ile ilgili olarak yasal limit bulunmamaktadır (Var ve Kabak, 2007).

Tropikal ve sıcak bölgelerde OTA özellikle *Aspergillus* türleri tarafından üretilirken (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*) (Codex Alimentarius Commission, 2002), ılıman ve soğuk bölgelerde ise daha çok *Penicillium* türleri, özellikle de *P. viridicatum* ve *P. verrucosum* sorun yaratmaktadır (Lund ve Frisvad, 2003). Diğer mikotoksijenik küflerde olduğu gibi okratoksijenik küf gelişimi ve OTA oluşumu, ürünün gelişimi, hasat, kurutma ve depolama aşamalarındaki nem ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Soufleros ve ark, 2003).

Arpa, buğday, mısır ve yulaf gibi tahıl ürünleri, kahve, kakao çekirdekleri ve baharatlar OTA açısından riskli gıda maddeleri olarak görülmektedir (Lund ve Frisvad, 2003). Diğer yandan, üzüm, kuru üzüm ve şaraplarda OTA varlığı ülkemizin de içinde bulunduğu üzüm yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ülkelerde önemli bir sorun haline gelmiştir (Eltem ve ark., 2003). Üzümler, hasat öncesi, hasat sırasında veya üzümlerin işlenmesi aşamasında çeşitli küf türleri tarafından kontamine olabilmektedir. Üzümlerin özellikle *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Uncinula* ve *Plasmopara* cinsi küfler tarafından saldırıya uğradığı belirtilmektedir (Magnoli ve ark, 2003). Üzümlerin fungal kökenli bozulmalarında daha çok *Botrytis cinerea* rol oynamasına karşın, *A. carbonarius*, üzümlerde ve dolayısıyla şaraplarda OTA oluşumuna neden olan en önemli küf türüdür (Cabanès ve ark, 2002; Delage ve ark, 2003; Magnoli ve ark, 2003). Şarap üretiminde küflenmiş üzümlerin kullanılması, küf ile kontamine olmuş ekipmanların şarapla temas etmesi veya iyi üretim tekniklerine uyulmaması sonucu şaraplarda OTA kontaminasyonu söz konusu olabilmektedir (Zimmerli ve Dick, 1996). OTA'nın alkol fermantasyonundan önce meydana geldiği, şarap yapımı ve depolama aşamalarından etkilenmediği belirtilmektedir (Markaki ve ark, 2001; Delage ve ark, 2003).

Şaraplarda OTA varlığı ilk olarak Zimmerli ve Dick (1996) tarafından yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur. OTA'nın üzümlerde ve şaraplarda bulunması ile ilgili olarak elde edilen veriler genelde Almanya, Fransa, İskandinav ve Balkan Ülkeleri kaynaklıdır (Magnoli ve ark, 2003). Kodeks Alimentarius Komisyonu, şarabın tahıllardan sonra OTA açısından en riskli gıda kaynağı olduğunu ve gıda yoluyla alınan OTA'nın %15'inin şarap tüketiminden kaynaklandığını bildirmiştir (Magnoli ve ark., 2003; Lo Curto ve ark, 2004). Çizelge 2.3'de çeşitli ülkelerde şaraplarda HPLC yöntemiyle saptanan OTA miktarları özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Ülkemizde ve Çeşitli Ülkelerde Şaraplarda Saptanan OTA Miktarları.

Örnek sayısı	OTA bulunan örnek sayısı	Miktar ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Ülke	Kaynak
118	82	< 0.003–0.388	İsviçre	Zimmerli ve Dick (1996)
144	60	< 0.01–7.00	Almanya	Majerus ve Otteneder (1996)
55	48	0.01-7.63	İtalya	Visconti ve ark. (1999)
420	48	< 0.01–3.31	Dünya	Otteneder ve Majerus (2000)
30	30	0.028–3.24	Fas	Filali ve ark. (2001)
111	20	< 0.001–3.856	İtalya	Pietri ve ark. (2001)
31	31	< 0.002–3.40	Akdeniz Ülkeleri	Markaki ve ark. (2001).
40	20	0.056–0.316	İspanya	Lopez de Cerain ve ark (2002)
268	100	< 0.05–1.75	Yunanistan	Stefanaki ve ark. (2003)
35	22	< 0.02–3.20	Yunanistan	Soufleros ve ark. (2003)
116	45	< 0.01–0.76	İspanya	Blesa ve ark. (2004)
240	43	0.05–3.19	İspanya	Belli ve ark. (2004)
340	69	< 0.5–2.1	Portekiz	Ratola ve ark. (2004)
25	6	0.028–0.042	Brezilya	Rosa ve ark. (2004)
42	10	0.028–0.070	Güney Amerika	Rosa ve ark. (2004)
79	15	< 4–393	Kanada	Ng ve ark. (2004)
87	0	ND	Macaristan	Berente ve ark. (2005)
59	0	ND	Macaristan	Brera ve ark. (2005)
208	175	0.01–4 .0	İtalya	Brera ve ark. (2005)
47	47	0.03-1.92	Türkiye	Anlı ve ark. (2005)
95	82	0.004-0.815	Türkiye	Var ve Kabak (2007)

ND : Tespit edilemedi

Şaraplarda OTA ile ilgili yapılan tarama çalışmalarında, OTA'nın kırmızı şaraplarda daha fazla sıklıkla ve daha yüksek konsantrasyonda bulunduğu, bunu sırasıyla pembe ve beyaz şarapların izlediği belirtilmektedir (Battilani ve Pietri, 2002; Delage ve ark, 2003; Soufleros ve ark, 2003; Lo Curto ve ark, 2004). Zimmerli ve Dick (1996) yaptıkları çalışma sonucunda, beyaz şaraplarda ortalama 0.011 ng ml^{-1} , kırmızı şaraplarda ise ortalama 0.079 ng ml^{-1} miktarında OTA tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Lo Curto ve ark. (2004), İtalya'da 23 beyaz ve kırmızı şarap örneğini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile analiz etmeleri sonucunda, OTA'nın kırmızı şaraplarda beyaz şaraplara oranla daha yüksek konsantrasyonda ve daha fazla sıklıkla bulunduğunu belirlemişlerdir. Son olarak Var ve Kabak (2007), 34 beyaz, 9 pembe ve 51 kırmızı şarap örneklerinde OTA varlığı ve miktarlarını HPLC yöntemiyle inceledikleri çalışmada, beyaz, pembe ve kırmızı şaraplarda sırasıyla ortalama 0.108 , 0.052 ve 0.110 ng ml^{-1} OTA tespit etmişlerdir.

Üzümlerde ve dolayısıyla şaraplarda OTA varlığı ve miktarı sıcaklık, yağmur ve nispi nem gibi iklim faktörlerine (Battilani ve Pietri, 2002; Delage ve ark, 2003), üzümün olgunluğuna ve kalitesine, üzüm tırtıllarının varlığına, şarabın üretildiği bölgeye, şarabın rengine, şarap yapım tekniği ve depolama koşullarına göre değişiklik göstermektedir (Battilani ve Pietri, 2002; Leitner ve ark, 2002; Lo Curto ve ark, 2004). Avrupa'nın güneyinde ve kuzey Afrika'da üretilen üzüm suyu ve şaraplarda sıklıkla ve nispeten yüksek konsantrasyonlarda OTA'nın tespit edildiği bildirilmiştir (Leitner ve ark, 2002). Ülkemizde ise, Marmara ve Ege Bölgesi üzümlerinden üretilen şarapların Orta Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi menşeli üzümlerden yapılan şaraplara oranla daha fazla sıklıkla ve daha yüksek konsantrasyonda OTA içerdikleri bildirilmiştir (Var ve Kabak, 2007).

2.3. Mikotoksin Kontrol Stratejileri

Mikotoksinlerin toksik ve kanserojenik etki göstermeleri nedeniyle, mikotoksin içeren gıda ve yem maddelerinin tüketimi sonucu insan ve hayvanlarda önemli sağlık sorunları görülürken, ekonomik kayıplara da neden olduğu bildirilmektedir.

Mikotoksinlerin gerek sağlık, gerekse ekonomik yönden yarattığı sorunlar araştırmacıları mikotoksin oluşumunun engellenmesi ve/veya mikotoksinlerin ortamdan uzaklaştırılmasına yönelik kontrol stratejilerine yöneltmiştir (Rustom, 1997; Dorner ve ark., 1999; Yılmaz ve Özay, 2001). Gıda ve yem maddelerinde, mikotoksin oluşumunun ve sağlık üzerine olumsuz etkisinin önlenmesi için 3 yöntem üzerinde durulmaktadır (Bata ve Lasztity, 1999):

1. Mikotoksin oluşumunun engellenmesi
2. Gıda ve yem maddelerinde mikotoksinlerin detoksifikasyonu
3. Sindirim sisteminde mikotoksin absorpsiyonunun engellenmesi.

2.3.1. Mikotoksin Oluşumunun Engellenmesi

Mikotoksin kontaminasyonu hasat öncesi, hasat sırasında veya depolama-işleme aşamasında meydana geldiğinden dolayı mikotoksin oluşumunu engellemeye yönelik stratejiler; “hasat öncesi uygulamalar”, “hasat sırasındaki uygulamalar” ve “hasat sonrası uygulamalar” olmak üzere 3 başlık altında toplanmaktadır (Moss, 1992).

Hasat öncesi uygulamalar: Mikotoksin oluşumunu engellemeye yönelik olarak uygulanacak hasat öncesi uygulamalar ürünün cinsine göre spesifiklik taşımaktadır. Bu kontrol stratejileri arasında; ekimin zamanında yapılması, dayanıklı varyetelerin seçimi, ürün rotasyonu, toprağın sürülmesi, sulama ve gübrelemeyi içeren iyi tarım tekniklerinin kullanılması ve biyolojik ve kimyasal ajanların kullanımı yer almaktadır (Mishra ve Das, 2003).

Hasat sırasındaki uygulamalar: Hasadın optimum olgunlukta ve zamanında yapılması ve hasat sırasında ürüne zarar verilmemesi mikotoksin oluşumunu engellemede önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır (Moss, 1992).

Hasat sonrası uygulamalar: Ürünün hızlıca kurutulması, depolama koşullarının iyileştirilmesi (farklı nem içeriklerine sahip olan ürünlerin bir arada depolanmaması, depo içerisinde modifiye atmosfer kullanımı vb.), doğal ve kimyasal ajanların kullanımı ve bazı ürünlerde ışınlama, mikotoksin kontaminasyonunu engellemek

amacıyla hasat sonrası uygulanabilecek yöntemler arasında yer almaktadır (Moss, 1992).

2.3.2. Mikotoksinlerin Detoksifikasyonu

Mikotoksin oluşumunun engellenmesine yönelik olarak çeşitli stratejiler bulunmasına karşın, çoğu zaman gıda maddesinin mikotoksinlerle kontaminasyonu hasat öncesinde, hasat sırasında veya hasat sonrası depolama aşamasında engellenememektedir (Bata ve Lasztity, 1999). Bu nedenle mikotoksinlerin toksik ve kanserojenik etkisinden kurtulmak amacıyla çeşitli detoksifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir (Samarajeewa ve ark, 1990). Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) mikotoksinlerin gıda ve yem maddelerinden uzaklaştırılması amacıyla kullanılacak yöntemin bazı kriterlere sahip olması gerektiğini bildirmiştir. Bunlar;

- I. Toksin oluşumunu engelleyebilmeli, toksine zarar verebilmeli ya da inaktive edebilmeli veya ortamdan uzaklaştırabilmeli,
- II. Son üründe toksik ve/veya kanserojenik/mutajenik bir kalıntı bırakmamalı,
- III. Gıda ve yem maddesinin teknolojik ve/veya besinsel özelliklerinde önemli bir değişikliğe neden olmamalı,
- IV. Küf sporlarını ve miselyum gelişimini engelleyebilmeli,
- V. Teknolojik ve ekonomik yönden uygulanabilir olmalıdır (Piva ve ark., 1995).

Mikotoksinlerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla uygulanacak yöntemler arasında; sınıflandırma, yıkama, boyut küçültme vb. fiziksel ayırım metotları ve solventlerle ekstraksiyon yer almaktadır. Hasat sırasında veya depolama aşamasında hasar gören tanelerin ayırımı, yabancı maddelerin uzaklaştırılması, şekil ve renk farklılığı olan ve belirgin küf üremesi görülen tanelerin ortamdan uzaklaştırılmasının mikotoksin kontaminasyonu riskini düşüreceği bildirilmektedir (Yılmaz ve Özay, 2001). Bu yöntemlerin başarısı ürünün özelliğine göre değişim gösterebilmektedir (Rustom, 1997).

Yer fıstığı, mısır, pamuk tohumu, incir gibi bazı ürünlerde *A. flavus* grubu küflerin gelişmesi sonucu ürettiği metabolit nedeniyle, UV ışığı altında üründe parlak yeşil-sarı bir floresans meydana gelmektedir (Scott, 1998; Doyle ve ark, 1997). Bu floresansla, ürünün aflatoksin içeriği arasında sıkı bir ilişki bulunmuş ve floresanslı tanelerin ayırımı ile aflatoksinlerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ülkemizde bu yöntem kuru incir ihracatındaki dar boğazın aşılmasında etkili olmuştur (Çoksöyler, 1994; Özkaya ve ark, 1999). Diğer yandan, UV ışığı altında aflatoksinlerin yanı sıra *A. flavus* grubu küflerin oluşturduğu kojik asidin de parlak yeşilimsi bir floresansa neden olduğu bildirilmiştir (Scott, 1998).

Mikotoksinlerin detoksifikasyonu amacıyla uygulanan yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olmak üzere 3 grup altında toplanabilmektedir.

Fiziksel yöntemler: Mikotoksinlerin detoksifikasyonu amacıyla önerilen fiziksel yöntemler ısı işlem uygulaması, ışınlama ve adsorpsiyondur (Samarajeewa ve ark., 1990).

Kimyasal yöntemler: Asit ve baz kullanımı, hidrojen peroksit ve ozon gibi okside edici ajan kullanımı, indirgeyici ve klorlaştırıcı ajan kullanımı, tuz kullanımı ve formaldehit uygulaması mikotoksin detoksifikasyonu amacıyla üzerinde çalışılan alternatif yöntemlerdendir. Diğer yandan, gıda maddelerinin kimyasal maddelerle detoksifikasyonuna Avrupa Birliği'nde yasal olarak izin verilmemektedir (Piva ve ark., 1995).

Biyolojik yöntemler: Bu amaçla çeşitli bakteri (*Flavobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, laktik asit bakterileri), maya (*Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*) ve küf suşlarının (*Trichoderma* spp., *Phoma* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus fumigatus* ve nontoksijenik *A. flavus*) direkt olarak kullanılabilirliği ve fermantasyon uygulamaları önerilmektedir (Dorner ve ark., 1999; Karlovsky, 1999). Son yıllarda literatürde özellikle *F. aurantiacum*'un AFB₁'i sıvı ortamdaki ve süt, yer fıstığı ve mısır gibi çeşitli gıda maddelerinden uzaklaştırma yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir (Line ve ark, 1994; Line ve Brackett, 1995; D'Souza ve Brackett, 1998; D'Souza ve Brackett, 2001). Benzer şekilde Özkaya (2001) *F. aurantiacum* NRRL-B 184 suşunun AFB₁'i 48 saat içinde fosfat tamponundan %79.9-98.9, yer fıstığından %92.6-99.8 ve kırmızı biberden %88.7-100 arasında değişen oranlarda

uzaklaştırdığını bildirmiştir. Diğer yandan, söz konusu mikroorganizmanın ürünün rengini kırmızılaştırması nedeniyle kullanımını sınırlandırmıştır.

Mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yem maddelerinden toksini uzaklaştırmaya veya etkisiz hale getirmeye yönelik geliştirilen fiziksel ve kimyasal yöntemlerin gıda kalitesine ve insan sağlığına olumsuz etkide bulunabilmeleri etkin bir yöntem olarak kullanımlarını sınırlandırmıştır (Piva ve ark, 1995; Bata ve Lasztity, 1999). Önerilen çeşitli biyolojik yöntemlerin de henüz araştırma aşamasında olması ve güvenlik sorunu taşıması alternatif yöntemlere yönelme ihtiyacını doğurmuştur.

2.3.3. Sindirim Sisteminde Mikotoksin Absorbsiyonunun Engellenmesi

Mikotoksinlerin toksik etkisinden korunmak amacıyla geliştirilen stratejilerden biri de diyetlere mikotoksin bağlayıcı ajanların ilavesidir. Bu nedenle mikotoksinlerin gastrointestinal bölgede absorpsiyonlarının azaltılarak vücut dışına atılması ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır (Galvano ve ark, 1996b; Ramos ve Hernandez, 1997; Diaz ve ark, 2002; Tomasevic-Canovic ve ark., 2003). Bu amaçla kullanılan ajanlar arasında; aktif karbon, bentonit, zeolit ve susuz sodyum kalsiyum alüminyum silikat (HSCAS) gibi adsorban maddelerin yer aldığı bilinmektedir (Ramos ve Hernandez, 1996). Mikotoksinlerin adsorban maddelere tutunmasında kullanılan adsorban maddenin toplam yükü, yük dağılımı, yüzeyde bulunan gözeneklerin büyüklüğü, yüzey alanı gibi fiziksel özellikleri önemli bir rol oynamaktadır. Diğer yandan adsorbe edilecek mikotoksinin polaritesi, çözünübilirliği, şekli, büyüklüğü ve ortamda iyonize bileşiklerin varlığı da bağlanmada etkili olan faktörler arasında yer almaktadır (Huwig ve ark, 2001).

Adsorban maddelerin mikotoksinlere karşı etkisi çeşitli *in vitro* sindirim modelleri kullanılarak belirlenmiştir. Avantaggiato ve ark. (2003) %2 oranında aktif karbon kullanımının bağırsak koşullarında ZEA absorpsiyonunu %32'den %5'e indirdiğini belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada Avantaggiato ve ark (2004) farklı oranlarda aktif karbon kullanımının deoksinivalenolün bağırsak koşullarında

absorbsiyonunu %29-45 oranında, nivalenol'ün ise %23-41 arasında değişen oranlarda azalttığını rapor etmişlerdir.

Aktif karbonun *in vivo* ortamda mikotoksinleri etkili bir şekilde bağladığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu konuda yapılan bir araştırmada AFB₁ ile kontamine olmuş (11.28 µg kg⁻¹) yem tüketen hayvanların diyetlerine, haftada 3 defa aktif karbon ilave edilmesi durumunda hayvanların sütüne geçen AFM₁ miktarının kontrole göre %50 oranında azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Nageswaro Rao ve Chapiro (2001), 100 µg kg⁻¹ AFB₁ ile kontamine olmuş yemle beslenen hayvanların diyetlerine 14 gün süresince %1 oranında aktif karbon ilave edilmesi durumunda hayvanların sütüne geçen AFM₁ miktarında %75-99 arasında azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde, Ellis ve ark. (2000) 20 µg kg⁻¹ AFB₁ ile kontamine edilmiş yemle beslenen balıkların diyetlerine %2 oranında bentonit ilavesinin kontrole göre karaciğer ve böbrekte AFB₁ birikmesini önemli ölçüde azalttığını ve dışkıya salgılanan AFB₁ miktarında artışa neden olduğunu gözlemişlerdir. Nageswaro Rao ve Chopra (2001) 100 µg kg⁻¹ AFB₁ içeren yemle beslenen hayvanların diyetlerine 14 gün süresince %1 oranında bentonit ilave edilmesi durumunda hayvanların sütüne geçen AFM₁ miktarında kontrole göre %66.5 oranında azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Abdel-Wahhab ve ark. (2002) bentonitin gastrointestinal bölgede aflatoksine (2.5 mg kg⁻¹) karşı etkili bir şekilde bağlandığını ve gastrointestinal bölgede aflatoksinin kanserojenik aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğünü göstermişlerdir.

Dakovic ve ark. (2003), hayvan yemlerine zeolit ilavesinin gastrointestinal sistemde OTA'nın toksik aktivitesini engellediğini bildirmişlerdir. Galvano ve ark. (1996b), süt veren hayvanlarda yaptıkları çalışmada AFB₁ ile kontamine olmuş (11.2 µg kg⁻¹) yemle beslenen hayvanların diyetlerine %2 oranında HSCAS ilave edilmesi durumunda kontrole göre hayvanların sütüne geçen AFM₁ düzeyinde %36 oranında azalmanın meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada 200 µg kg⁻¹ aflatoksin ile kontamine olmuş yemle beslenen süt veren hayvanların diyetlerine 8 gün süresince %4 HSCAS ilave edilmesi sonucu, hayvanların sütüne geçen AFM₁ miktarında kontrole göre %86.9 oranında azalmanın olduğu

görülmüştür (Ramos ve Hernandez, 1997). HSCAS'ın tavuk yemlerine ilave edilmesi aflatoksinlerin toksik aktivitesini engellerken, OTA'nın toksisitesini engelleyemediği ileri sürülmektedir (Ellis ve ark, 2000).

Adsorban maddelerin vitamin ve mineral maddeleri yüksek oranda bağlama yeteneği göstermesi kullanımını sınırlandıran faktörlerden birini oluşturmaktadır. Diğer yandan, bu adsorban maddelerin çeşitli mikotoksin türlerini bağlama yeteneği göstermesine rağmen bu maddelerin yalnızca hayvan yemlerine belli oranlarda ilave edilmesi söz konusu olabilmektedir. Adsorban maddelerin gıda maddelerine ilavesi ve bu şekilde gastrointestinal bölgede mikotoksin absorpsiyonunun engellenmesi söz konusu olmadığından alternatif mikotoksin bağlayıcı ajanların araştırılması ve bu ajanların gıda yoluyla tüketim olanaklarının bulunması son derece önem arz etmektedir. Son yıllarda insanların bağırsak mikroflorasında doğal olarak bulunan bazı probiyotik laktik asit bakterilerinin bu amaçla kullanımı gündeme gelmiştir.

2.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) süt ürünleri ve bazı içeceklerin üretiminde uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, özellikle son yıllarda çok çeşitli fermente ürünlerin üretiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalar olarak bilinmektedir (Batish ve ark., 1997). Laktik asit bakterileri içinde biyokimyasal ve ekolojik özellikleriyle birlikte filogenetik olarak birbirine yakın olan “*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*” cinsleri yer almaktadır. *Bifidobacterium* cinsi bakteriler filogenetik olarak diğer laktik asit bakterilerine benzememesine rağmen, biyokimyasal, fizyolojik ve ekolojik özellikleri bakımından benzer olduğundan genellikle laktik asit bakterileri terimi içinde yer almaktadır (Adams, 1999).

Probiyotik kelimesi Yunanca'dan gelmekte olup “yaşam için” anlamında kullanılmaktadır. Probiyotik kelimesini ilk defa 1960'lı yıllarda Lilley ve Stilwell, bir protozoa tarafından salgılanıp diğer bir protozoanın gelişimini teşvik eden metaboliti tanımlamak amacıyla kullanmıştır (Naidu ve ark, 1999; Shortt, 1999;

Holzapfel ve Schillinger, 2002). Günümüzde probiyotik genel anlamı ile “düzenli olarak yeterli miktarda tüketildiklerinde bağırsak mikroflorasına yerleşerek, kullanan kişiye normal beslenmenin ötesinde çeşitli faydalar sağlayan mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik ürün ise, probiyotik bakteriler ile üretilmiş vücuda belli bir fayda sağlaması için tüketilen fonksiyonel bir gıdadır (Hekmat ve McMahon, 1992; Naidu ve ark, 1999; Mattila-Sandholm ve ark, 2002).

Dünyada probiyotik ürünlerin üretiminde kullanılan ve probiyotik bakteriler olarak tanımlanan laktik asit bakterilerinden bazıları, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salvarius*, *Lb. crispatus* ve *Bifidobacterium* spp.’dir (Holzapfel ve ark., 1998; Shortt, 1999; Oh ve ark, 2000; Charalampopoulos ve ark, 2002; Holzapfel ve Schillinger, 2002).

Gıda üretiminde kullanılan probiyotik bakterilerde bazı özellikler aranmaktadır. Bu özellikler; insan orijinli olması, patojenik olmaması, antibiyotiklere karşı dirençli olması, asit ve tuzu tolere edebilmesi, oksijensiz ortamda yaşayabilmesi, sağlık için yararlı etkilerde bulunabilmesi, sindirim süresince canlılığını sürdürebilmesi, bağırsak çeperine tutunabilmesi, bağırsaklarda canlı kalabilme ve çoğalabilme özelliğine sahip olmasıdır (Shah, 2000; Thamaraj ve Shah, 2003).

Lb. acidophilus, *Lb. rhamnosus* ve *Bifidobacterium* spp. gibi probiyotik bakterilerin diyetle bulunması, serum kolesterol seviyesini düşürücü, kanseri önleyici, bağırsak mikrobiyel florasını düzenleyici, kalsiyum absorpsiyonunu ve laktoz intolerans kişilerde laktoz kullanımını geliştirici gibi etkilerde bulunabilmektedir (Tamime ve Marshal, 1997; Shah ve Lankaputhra, 1997; Naidu ve ark, 1999; Marx ve ark, 2000). Bağırsak epiteline tutunarak patojen mikroorganizmaların koloni oluşturmasını engelleyen probiyotiklerin ayrıca, antagonistik etki yaptığı, besin elementleri için rekabetçi bir ortam oluşturduğu ve bağışıklık sistemini teşvik ettiği de belirtilmektedir (German ve ark, 1999).

2.4.1. *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus türleri gram (+), çubuk şeklinde, anaerob veya fakültatif anaerob, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz (-) özellik göstermektedir. Optimum gelişme

sıcaklıkları 35-38 °C'dir. (Kırdar, 2000; Curry ve Crow, 2003). Laktik asit bakterilerinin en büyük grubu olan *Lactobacillus* cinsi, 80'nin üzerinde tür ve alt türlerden oluşmaktadır (Limsowtin ve ark., 2003). Laktobasiller karbonhidratları fermente etme yollarına göre "homofermantatif", "fakültatif heterofermantatif" ve "zounlu heterofermantatif" olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadırlar (Curry ve Crow, 2003). Homofermantatif laktobasiller de kendi aralarında "*Lb. acidophilus*", "*Lb. salivarius*" ve "*Lb. casei*" olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Holzapfel ve Schillinger, 2002). *Lb. acidophilus*, laktozu homofermantatif yönden fermente etmekte ve DL laktik asit oluşturmasının yanısıra az miktarda da asetik asit, asetaldehit ve etanol oluşturmaktadır (Jay, 1992; Tamime ve Marshall, 1997). *Lb. casei* grubunda yer alan *Lb. rhamnosus* her ne kadar homofermantatif grupta yer alsada, fakültatif heterofermantatif olarak heksozları fermente ederek L (+) laktik asit, asetik asit, etanol ve formik asit oluşturmaktadır (Curry ve Crow, 2003).

Tüketilen üründe *Lb. acidophilus* ve *Lb. rhamnosus* gibi canlı probiyotik bakterilerin varlığı, kanser oluşumunu engelleme, serum kolesterol seviyesini düşürme, bağırsak mikrobiyal florasına hakim olma ve laktoz tolerans kişilerde laktoz kullanımını geliştirme gibi çeşitli terapötik yararlar sağlamanın yanı sıra, ürünün duyusal özelliklerini de etkilemektedir (Vinderola ve ark, 2000). Bu nedenle son yıllarda yoğurt ve diğer fermente süt ürünlerinde ve eczacılık (pharmaceutical) ürünlerinde kullanımı yaygınlaşmıştır (Oh ve ark., 2000).

Lb. acidophilus, asidik koşullara ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olması, çeşitli antagonistik maddeler üretmesi bağırsaktaki epitel hücrelere başarılı bir şekilde kolonize olmasını sağlamaktadır. Böylelikle gastrointestinal bölgede patojen mikroorganizmalarla rekabet etmektedir. *Lb. acidophilus* pH 3 ve daha aşağı değerlerde gelişebilmekte ve bazı suşları gastrointestinal bölgenin mide kısmından geçerken canlılığını sürdürmektedir (Oh ve ark., 2000).

2.4.2. *Bifidobacterium* spp.

Bifidobakterler, bifid şeklinde, gram (+), anaerop, morfolojik ve fizyolojik özellikleri bakımından bazı farklılıklar gösterse de, hareketsiz, spor oluşturmayan,

katalaz (-) bakterilerdir (Chung ve ark., 1999; Kaptan, 2000). Glikozu kendilerine has bir yolla asetat ve laktata fermente etmeleri açısından heterofermantattiftirler. Bu özel mekanizmanın enzimi olan fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz, rutin olarak bifidobakterlerin diğer mikroorganizmalardan ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Bifidobakterler için optimum gelişme sıcaklığı 37-43°C ve pH değerleri 6.5-7.0 arasındadır (Kaptan, 2000).

Bifidobakterler sağlıklı insanların bağırsak florasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. *Bifidobacterium* türlerinin bağırsak bölgesinde laktobasillere göre 3-4 log daha yüksek miktarda bulunduğu bildirilmektedir (Oatley ve ark., 2000). Bifidobakterlerin terapötik özelliğinden yararlanılması ilk olarak 1906 yılında Tissier tarafından sindirim bozukluklarına karşı kullanılmasıyla olmuştur (Chung ve ark., 1999).

İnsanların bağırsak florasının düzenlenmesinde *Bifidobacterium* türlerinin önemli ve yararlı bir rol oynadığı bildirilmektedir (Chung ve ark., 1999). *Bifidobacterium*'lar bağırsaklardaki epitel dokulara kolonize olmakta ve çeşitli asitler üretmektedir. Bu şekilde kolon pH'sını düşürmekte, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmekte ve patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemektedirler (İbrahim ve Bezkorovainy, 1993; Samona ve ark., 1996). *Bifidobacterium* türlerinin ayrıca ince bağırsakta laktaz (β -galaktozidaz) aktivitesi düşük olan insanlarda, β -galaktozidaz enzimi üreterek laktozun parçalanmasını sağladığı ve dolayısıyla mide ağrılarını engellediği de bildirilmektedir (Samona ve ark., 1996).

Bifidobakterlerin *Lb. acidophilus*'a göre asidik koşullara karşı daha hassas olduğu belirtilmektedir (Shah ve Lankaputhra, 1997). Bunun yanı sıra *Bifidobacterium* spp. içeren ürünlerin, daha az asitli, hafif tad, fizyolojik L(+) laktik asit içermesi ve terapötik fayda sağlaması besinsel ve teknolojik avantajlarını oluşturmaktadır (Samona ve ark., 1996).

2.5. Probiyotik Bakterilerin Mikotoksinleri Bağlama Yeteneği

Diyetle alınan mikotoksinlerin mide yoluyla ince bağırsaklara taşındığı ve özellikle duodenum (oniki parmak bağırsağı) bölgesinde absorbe edildiği ileri sürülmektedir. Hidrofobik karakterdeki mutajenik ve kanserojenik maddelerin probiyotik özellik gösteren spesifik bazı laktik asit bakterilerinin hücre duvarındaki hidrofobik kısımlara kovalent olmayan bağlarla bağlanarak, bu maddelerin incebağırsakta birikmesinin engellendiği ve vücut dışına salgılandığı ileri sürülmektedir (Bolognani ve ark, 1997; Yabe ve ark, 1999; Haskard ve ark, 2000; Oatley ve ark, 2000).

Bazı probiyotik laktik asit bakterilerinin mikotoksinleri bağlama yeteneği çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Bu araştırmalar özellikle AFB₁ üzerine yoğunlaşmış olup, AFM₁ ve OTA ile ilgili olarak ise sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksinleri bağlama yeteneği Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksinleri Bağlama Yeteneği.

Bakteri	Bakteri yoğunluğu (kob ml ⁻¹)	AF konst. (µg ml ⁻¹)	% AF bağlama	Kaynak
<i>Lb. acidophilus</i> E-94507	10 ¹⁰	5 AFB ₁	18.2	Peltonen ve ark. (2001)
<i>Lb. acidophilus</i> CSCC 5361	10 ¹⁰	5 AFB ₁	20.7	Peltonen ve ark. (2001)
<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356	10 ¹⁰	5 AFB ₁	48.4	El-Nezami ve ark. (1998a)
<i>Lb. acidophilus</i> LA1	10 ⁹	0.15 AFM ₁	18.3	Pierides ve ark. (2000)
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	10 ⁸	0.1 AFM ₁	30.5	Kabak ve Var (2004)
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	10 ⁸	0.1 AFM ₁	28.0	Kabak ve Var (2004)
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	10 ⁸	0.1 AFM ₁	25.7	Kabak ve Var (2004)
<i>Lb. rhamnosus</i> E-97800	10 ¹⁰	5 AFB ₁	22.7	Peltonen ve ark. (2001)
<i>Lb. rhamnosus</i> CSCC 2420	10 ¹⁰	5 AFB ₁	33.1	Peltonen ve ark. (2001)
<i>Lb. rhamnosus</i> LBG	10 ¹⁰	5 AFB ₁	75.3	El-Nezami ve ark. (1998a)
<i>Lb. rhamnosus</i> LC705	10 ¹⁰	5 AFB ₁	76.1	El-Nezami ve ark. (1998a)
<i>Lb. rhamnosus</i> LBG	10 ¹⁰	5 AFB ₁	78.5	Kankaanpaa ve ark. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	10 ⁸	0.15 AFM ₁	50.7	Pierides ve ark. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> LC705	10 ⁸	0.15 AFM ₁	46.3	Pierides ve ark. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> 1/3	10 ⁸	0.15 AFM ₁	18.1	Pierides ve ark. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰	5 AFB ₁	76	Haskard ve ark. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> LC705	10 ¹⁰	5 AFB ₁	77	Haskard ve ark. (2000)
<i>Lb. plantarum</i> E-79098	10 ¹⁰	5 AFB ₁	28.4	Peltonen ve ark. (2001)
<i>Lb. paracasei</i> F19	10 ¹⁰	5 AFB ₁	28	Peltonen ve ark. (2000)
<i>Lb. crispatus</i> M247	10 ¹⁰	5 AFB ₁	6	Peltonen ve ark. (2000)
<i>Lb. crispatus</i> MU5	10 ¹⁰	5 AFB ₁	20	Peltonen ve ark. (2000)
<i>Lb. fermentum</i> CSCC 5362	10 ¹⁰	5 AFB ₁	22.6	Peltonen ve ark. (2001)
<i>Lb. johnsonii</i> CSCC 5142	10 ¹⁰	5 AFB ₁	30.1	Peltonen ve ark. (2001)
<i>Lb. johnsonii</i> LJ-1	10 ¹⁰	5 AFB ₁	31	Peltonen ve ark. (2000)
<i>B. lactis</i> CSCC 5094	10 ¹⁰	5 AFB ₁	34.7	Peltonen ve ark. (2001)
<i>B. lactis</i> Bb-12	10 ¹⁰	5 AFB ₁	17	Peltonen ve ark. (2000)
<i>B. longum</i> CSCC 5304	10 ¹⁰	5 AFB ₁	37.5	Peltonen ve ark. (2001)
<i>B. longum</i> B1 24	10 ⁸	0.1 AFM ₁	26.7	Kabak ve Var (2004)
<i>B. bifidum</i> Bb13	10 ⁸	0.1 AFM ₁	32.5	Kabak ve Var (2004)
<i>P. freu. ssp. shermani</i> JS	10 ¹⁰	5 AFB ₁	34.1	El-Nezami ve ark. (1998a)
<i>P. freu. ssp. shermani</i> JS	10 ¹⁰	5 AFB ₁	22	Haskard ve ark. (2000)

El-Nezami ve ark. (1996) *Lb. rhamnosus* ATCC 53103'ün fosfat tamponu ortamında AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂'yi bağlama yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmacılar söz konusu probiyotik laktik asit bakterilerinin AFB₁'i etkili bir şekilde (%95) bağlarken, AFB₂ ve AFG₂'yi düşük oranda bağladığını saptamışlardır.

El-Nezami ve ark. (1998a) *Lb. rhamnosus* LBGG ve LC705 suşlarının AFB₁'i yaklaşık %80 oranında ortamdaki uzaklaştırdığını saptamışlardır. Araştırmacılar, toksinin ortamdaki uzaklaştırılmasında, inkübasyon sıcaklığının ve bakteri konsantrasyonunun da etkili olduğunu belirlemişlerdir. Optimum bağlanmanın 37°C'de gerçekleştiğini ve bakterinin ortamda minimum 2×10^9 kob ml⁻¹ yoğunlukta bulunması gerektiğini belirtmişlerdir.

El-Nezami ve ark. (1998b) *in vitro* ortamda yaptıkları çalışmada, *Lb. rhamnosus* LBGG ve *Lb. rhamnosus* LC705 suşlarının AFB₁'i bağlamalarında bakterinin canlı olup olmamasının önemli olmadığını saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, sıcaklık uygulamasının bakterilerin AFB₁'i bağlama yeteneğini arttırdığını belirtmişlerdir. *Lb. rhamnosus* LBGG ve *Lb. rhamnosus* LC705 37°C'de 4 saat inkübasyon sonucunda AFB₁'i %51.5 ve %53.9 oranında bağlama yeteneği gösterirken, ısı işlem uygulaması sonucu (100°C, pH 7) AFB₁'i sırasıyla %79.4 ve %82.5 oranında bağladığı belirlenmiştir. Var ve Kabak (2004) tarafından bazı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları ile yapılan diğer bir çalışmada, canlı bakterilerin fosfat tamponu ve rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %22.9-45.3 ve %19.3-38.3 arasında bulunurken, ısı işlem muamelesi sonrası test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinin fosfat tamponunda %31.3-61.9'a, rekonstitüe sütte ise %24.6-51.5 değerlerine yükseldiği saptanmıştır.

6 probiyotik laktik asit bakterisinin AFB₁'e bağlanma ve toksini ortamdaki uzaklaştırma yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmada, kullanılan bakteri kültürlerinin AFB₁'i bağlayarak ortamdaki uzaklaştırma oranı %20-50 arasında bulunmuştur. Çalışılan probiyotik kültürler arasında, *B. infantis* 1912'nin AFB₁'e bağlanma yeteneğinin en yüksek, *B. pseudolongum* 2099'un ise en düşük olduğu açıklanmıştır (Shah ve Wu, 1999).

Peltonen ve ark. (2000), probiyotik ürünlerin üretiminde kullanılan 6 farklı bakteri kültürünün AFB₁'i bağlama yeteneğini %5.8-31.3 arasında bulmuşlar ve

bağlanma yeteneğinin kullanılan bakteri kültürünün türüne bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışılan kültürler arasında en yüksek bağlanma aktivitesini, *Lb. johnsonii* LJ-1 ve *Lb. paracasei* F19'un gösterdiğini belirtmişlerdir.

Kankaanpaa ve ark (2000), bağırsaktaki epitel dokulara tutunma özelliğinde olan *Lb. rhamnosus* GG suşunun 4 saat inkübasyon sonucunda AFB₁'i bağlayarak %78.5 oranında ortamdan uzaklaştırdığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda bakteri yüzeyine tutunan aflatoksinin bu bakterinin bağırsaktaki epitel dokulara tutunma yeteneğini engellediği de saptanmıştır.

Oatley ve ark (2000), son yıllarda fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanımı yaygınlaşan *Bifidobacterium* türlerinin AFB₁'i bağlama yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmada, çalışılan bakteriler arasında *B. bifidum* BGN4 suşunun %46 oranında AFB₁'i bağlayarak en yüksek aktiviteyi gösterdiğini, *Bifidobacterium* spp. JO3'ün %41, *B. longum* JR20 ve *Bifidobacterium* spp. CH4'ün %37, *B. adolescentis* 14'ün %31, *Bifidobacterium* spp. Bf6'nın ise %25 oranında bağladığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda, AFB₁'i en yüksek bağlama yeteneği gösteren *B. bifidum* BGN4 suşunun hücre duvarının diğer suşlara göre, daha hidrofobik bir karaktere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar buradan yola çıkarak hücre duvarının hidrofobik karakterde olması ile bağlanma mekanizması arasında pozitif bir ilişkinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Pierides ve ark (2000), *Lb. rhamnosus* LBGG ve LC-705 suşlarının 15-16 saat içerisinde AFM₁'i fosfat tamponunda sırasıyla %50 ve %45 oranında bağlayarak ortamdan uzaklaştırdığını, *Lb. acidophilus* LA1 ve *Lb. rhamnosus* 1/3 suşlarının ise AFM₁'i %18 oranında bağladığını saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, bakterilerin canlı olup olmasının, bağlama mekanizması için bir ön şart olmadığını vurgulamışlardır. *Lb. acidophilus* LA1'in sıcaklık uygulaması sonucu öldürülmesiyle, fosfat tamponu ortamında AFM₁'i ortamdan uzaklaştırma yeteneğini %18.8'den %25.5'e yükseldiğini bildirmişlerdir. *Lb. gasseri* ATCC 33323 ve *Lb. rhamnosus* 1/3'ün AFM₁'i ortamdan uzaklaştırma yeteneğinin ise hücrelerin sıcaklık uygulaması sonucu iki katına çıktığını saptamışlardır.

El Nezami ve ark. (2000) *in vitro* olarak yaptıkları çalışmalarının yanı sıra, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. rhamnosus* LC 705 ve *Propionibacterium freudenreichii* ssp.

shermanii JS bakterileriyle *in vivo* olarak da çalışmışlar ve bu çalışmada tavuk bağırsaklarına enjekte ettikleri test bakterilerinin AFB₁'in bağırsak dokusundaki absorpsiyonlarının süreye bağlı olarak (1 ve 60 dakika) değişimlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. rhamnosus* LC 705 ve *P. freudenreichii* ssp. *shermani* JS varlığında 1 dakika içinde AFB₁'in bağırsak dokularında kontrole göre sırasıyla %70, %37 ve %63 oranında azaldığını (0.27 µg g⁻¹ doku) bildirmişlerdir. *Lb. rhamnosus* GG bakterisi ile 1 haftalık civcivlerde yaptıkları çalışmada 10¹⁰ kob g⁻¹ konsantrasyonunda bakteri hücresi 1.5 µg g⁻¹ AFB₁'i 1 dakikalık süre içerisinde %51 oranında bağlarken, sürenin 60 dakikaya çıkarılması durumunda ise bu oranın %92'ye çıktığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, test edilen bakterilerin *in vivo* ortamda AFB₁'i bağlama yeteneklerinde inkübasyon süresinin önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Haskard ve ark. (2000) *Lb. rhamnosus* GG ile yaptıkları çalışma sonucunda, bakterinin aflatoksine bağlanmasında canlı olması ile cansız olması (ısıl işlem ve asitle inaktivasyon) arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır. Isıl işlem ve asit uygulamasının, proteinlerin denatürasyonu sonucunda daha hidrofobik yüzeylerin açığa çıkmasına neden olduğu bildirilmektedir.

Peltonen ve ark. (2001) gıda sanayinde kullanılan laktik asit bakterilerinin ve bifidobakterlerin fosfat tamponunda AFB₁'i bağlama yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmacılar test edilen bakterilerin AFB₁'i %5.6–59.7 arasında değişen oranlarda bağlanma yeteneği gösterdiğini saptamışlardır.

Kabak ve Var (2004), *Lb. acidophilus* ve *B. bifidum* suşlarının PBS ve yağsız süt örneklerinde AFM₁'i bağlama yeteneklerini araştırmışlardır. Araştırmacılar test ettikleri bakteri suşlarının AFM₁'i bağlama yeteneklerini fosfat tamponunda %25.7-32.5 arasında, yağsız süt ortamında ise %21.2-29.3 arasında bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Aflatoksin M₁ Standardı

AFM₁ standart çözeltisi Hollanda Halk Sağlığı ve Çevre Araştırma Enstitüsü (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, Hollanda)'nden 10 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda, 2.5 ml kloroformda çözülmüş olarak cam ampul içinde temin edilmiştir.

3.1.2. Okratoksin A Standardı

Araştırmada *Aspergillus ochraceus* tarafından ticari olarak üretilen (Sigma-Aldrich, USA) OTA standardı kullanılmıştır. OTA, 1 mg olarak kristal formda temin edilmiş olup, analize alınıncaya kadar buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.1.3. AFM₁ Immunoaffinity Kolonu

Test bakterilerinin rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i bağlama yeteneğinin belirlenmesinde AFM₁'e karşı spesifik antikorları içeren AFM₁TM immunoaffinity kolonu (G1007, Vicam MA, USA) kullanılmıştır.

3.1.4. OTA immunoaffinity kolonu

Test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinde, gıda materyali olarak kullanılan beyaz şarabın OTA içerip içermediğinin belirlenmesinde OCHRAPREP (P14B, İskoçya) immunoaffinity kolonu kullanılmıştır.

3.1.5. Test Bakterileri

OTA ve AFM₁'i bağlama yeteneğinin belirlenmesinde Nestle-İsviçre'den temin edilen, *Lactobacillus acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68, *Bifidobacterium bifidum* Bb13, *B. bifidum* NCC 381 ve Ezal-Fransa firmasından satın alınan *Lb. rhamnosus* bakterileri kullanılmıştır.

3.1.6. Besiyeri ve Kimyasal Maddeler

Test bakterilerinin gelişiminin sağlanmasında kullanılan MRS sıvı besiyeri (De Man, Rogosa and Sharpe) ve fosfat tamponu (PBS) hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

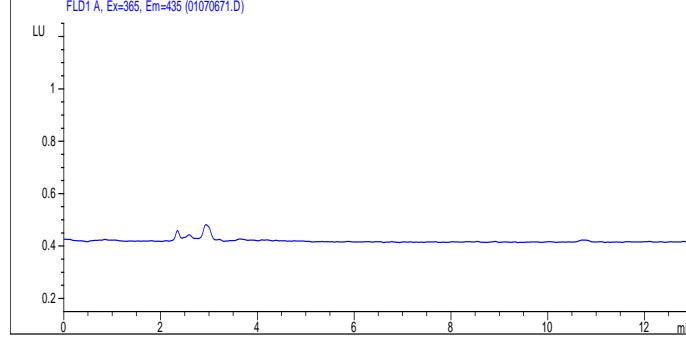
Test bakterilerinin OTA ve AFM₁'i bağlama yeteneklerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle belirlenmesinde kullanılan tüm kimyasallar HPLC saflığında olup, Merck (Darmstadt, Almanya) marka kullanılmıştır. Araştırmanın tüm analitik aşamalarında Millipore Synergy 18S (Millipore, Fransa) cihazı tarafından üretilen ultra saf su kullanılmıştır. Örneklerin HPLC cihazına enjeksiyonundan önce, 0.45 µm gözenek çapına sahip steril membran filtreler (Schleicher & Schuell (Dassel, Almanya) firmasına ait) kullanılmıştır.

Araştırmada anaerobik ortamı sağlamak amacıyla Merck firmasına ait Anaerocoult A (Darmstadt, Almanya) ticari kiti kullanılmış olup, kavanozda anaerop ortamın yaratılıp yaratılmadığının kontrolü Anaerotest kiti (Merck, Darmstadt, Almanya) ile sağlanmıştır.

3.1.7. Süt Tozu

Test bakterilerinin rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i bağlama yeteneğinin belirlenmesinde Pınar Süt Mamulleri San. A. Ş.'den sağlanan TS 1329 süt tozu standardına uygun olarak yağsız inek sütünün kurutulmasıyla üretilmiş A sınıfı süt

tozu kullanılmıştır. Süt tozu örneğine ait HPLC kromatogramı Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Süt Tozu Örneğine Ait HPLC Kromatogramı

3.1.8. Beyaz Şarap

Test bakterilerinin OTA’yı gıda modeli içinde bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde piyasadan temin edilen ve analizi yapılarak OTA içermediği belirlenen beyaz şarap kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Liyofilize Bakteri Kültürlerinin Aktivasyonu

Lb. acidophilus, *Lb. rhamnosus* ve *B. bifidum* liyofilize kültürlerini içeren cam ampuller etil alkol ile dezenfeksiyon sonrasında aseptik koşullarda kırılma noktalarından kırılmışlardır. Liyofilize kültürleri içeren cam ampuller içerisine, kültürleri çözündürmek amacıyla 1 ml De Man Rogosa and Sharpe (MRS)+Sistein (%0.05) ilave edilmiş ve bir iki dakika çözünmesi beklenmiştir. Bakteri kültürleri çözüldükten sonra, 10 ml MRS+Sistein içeren tüpe aktarılmıştır. Bu tüpten 1’er ml alınarak 10 ml’lik MRS+Sistein içeren tüplere inokülasyon yapılarak anaerobik koşullarda 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültürlerini aktive etmek amacıyla bu işlem bir defa daha tekrarlanmıştır.

3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Araştırmada çalışılacak bakteri konsantrasyonunu hazırlamak amacıyla, 8 ml MRS sıvı besiyeri içerisine aktive edilmiş bakteri kültürlerinden 1 ml inoküle edilmiş ve anaerobik koşullarda 37°C'de 2 gece inkübasyona bırakılmıştır. Çalışılacak canlı bakteri konsantrasyonu 10^8 kob ml⁻¹ ve 10^7 kob ml⁻¹ olacak şekilde ön denemelerle ayarlanmıştır.

3.2.3. Test Bakterilerinin Hücre Yüzeyinin Hidrofobik Karakterinin Belirlenmesi

Test bakterilerinin hücre yüzeyinin hidrofobik yapısının belirlenmesinde çeşitli metotlarla ön denemeler yapılmış ve sonuçta Vinderola ve Reinheimer (2003) tarafından önerilen analiz yöntemi kullanılmıştır. Bakterilerin hücre yüzeyinin hidrofobik yapısının belirlenmesinde uygulanan işlem aşamaları aşağıda özetlenmiştir.

- a) Test bakterileri 8 ml MRS broth içerisinde 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kültürleri santrifüj edilmiştir (3000xg, 15 dk).
- b) Santrifüj işleminden sonra supernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- c) Bakteri hücreleri 2 defa 8 ml 50 mM K₂HPO₄ (pH 6.5) tampon çözeltisi ile yıkanarak ortamda bulunabilecek çeşitli girişim faktörlerinin ortamdaki ayrılması sağlanmıştır.
- d) Tampon çözeltisiyle yıkama işleminden sonra hücreler tekrar 8 ml, 50 mM K₂HPO₄ tampon çözeltisi ile çözüldürülmüştür.
- e) Hücre süspansiyonu, tüp karıştırıcı ile homojenize edildikten sonra Shimadzu marka UV Visible spektrofotometrede tampon çözeltisi kullanılarak 560 nm dalga boyunda yaklaşık 1.0 absorbans değerine ayarlanmıştır.
- f) Spektrofotometrede 560 nm'deki absorbans değerlerinin okunmasından sonra (n-hexadecan muamelesi öncesi) 3 ml bakteri süspansiyonu için 0.6 ml n-hexadecan

(apolar n-alkan) çözeltisi kullanılarak tüp karıştırıcı yardımıyla 120 saniye karıştırılmıştır.

- g) Bundan sonraki aşamada iki fazın ayrılmasını sağlamak amacıyla test bakterileri 37°C’de 1 saat inkübatörde bekletilmiştir.
- h) Süre sonunda üst fazda bulunan hidrofobik özellikteki n-hexadecan ortamdan uzaklaştırılırken, 560 nm dalga boyunda hidrofilik özellikteki alt fazın absorbans değeri okunmuştur. Hücre süspansiyonunun n-hexadecan ile ekstraksiyonu sonucu absorbans değerindeki düşüş test bakterilerinin hücre yüzeyinin hidrofobik yapısını göstermektedir. Test bakterilerinin hücre yüzeyinin hidrofobik yapısının belirlenmesi, hidrofobik özellikteki n-hexadecan’ın hidrofilik özellikteki fosfat tamponundan ayrılırken hidrofobik karakterdeki bakterilerin n-hexadecan’a tutunarak birlikte taşınması prensibine dayanmaktadır. Böylece hücrelerin n-hexadecan’a bağlanma yüzdeleri bakterilerin hücre duvarının hidrofobik yapısını göstermektedir. Araştırmada kullanılan bakterilerinin hücre yüzeyinin hidrofobik karakteri aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\% \text{hidrofobik} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

A₀: n-hexadecan ile ekstraksiyon öncesinde 560 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri

A: n-hexadecan ile ekstraksiyon sonunda 560 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri

3.2.4. Test Bakterilerinin AFM₁’i Bağlama Yeteneği

3.2.4.1. AFM₁ Standart Çözeltisinin Hazırlanması

10 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda 2.5 ml kloroform ile çözündürülmüş stok AFM₁ standart çözeltisinden 1 µg ml⁻¹ AFM₁ çalışma çözeltisi hazırlamak amacıyla 500 µl alınarak 5 ml’lik amber renkli balon jöjeye konulmuş ve üzerine 4500 µl kloroform

ilave edilmiştir. AFM₁ çalışma standardı -18°C’de muhafaza edilmiş ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

3.2.4.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin AFM₁ ile Kontamine Edilmesi

3 farklı konsantrasyonda (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) hazırlanan AFM₁ standart çözeltisinden kloroform 40°C’de, N₂ gazı altında uzaklaştırıldıktan sonra, AFM₁ 5 ml PBS çözeltisi (%0.8 NaCl, %0.12 K₂HPO₄, %0.03 KH₂PO₄) ile çözündürülmüştür.

3.2.4.3. Rekonstitüe Sütün AFM₁ ile Kontamine Edilmesi

Test bakterilerinin AFM₁’i bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde gıda modeli olarak rekonstitüe süt kullanılmıştır. Bu amaçla yağsız inek sütünün kurutulmasıyla üretilmiş olan süt tozu saf su ile sulandırılmıştır (0.2 g ml⁻¹). Bundan sonraki aşamada 3 farklı konsantrasyonda (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) hazırlanan AFM₁ standart çözeltisinden kloroform 40 °C’de N₂ gazı kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı 5 ml rekonstitüe süt ile çözündürülmüştür.

3.2.4.4. Test Bakterilerinin AFM₁’i Bağlama Yeteneklerinin Belirlenmesi

MRS sıvı besiyeri içerisinde 37°C’de anaerobik koşullarda 48 saat gelişen test bakterilerinin konsantrasyon ayarlamaları yapıldıktan sonra (10⁸ ve 10⁷ kob ml⁻¹) 15 dakika santrifüj edilmiştir (3000xg). Santrifüj işleminden sonra supernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakteri hücreleri 5 ml saf su ile yıkanarak santrifüj edilmiş ve ortamda bulunabilecek çeşitli metabolitlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra bakteri hücreleri 3 farklı konsantrasyonda AFM₁ içeren (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) 5 ml PBS veya 5 ml rekonstitüe süt ile çözündürülmüş ve 37°C’de değişik sürelerde (başlangıç, 4 ve 24 saat) inkübasyona bırakılmıştır. “Başlangıç” terimi örneklerin analize hazırlanması sürecini kapsamaktadır ve bu en fazla 10 dakika olarak belirlenmiştir. İnkübasyon işleminden sonra bakteri süspansiyonu tekrar

3000xg'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bundan sonraki aşamada PBS ortamındaki supernatant (bağlanmamış AFM₁) enjektör yardımıyla toplanarak, bakteriye bağlanmamış AFM₁ miktarı floresans detektörlü HPLC cihazı ile belirlenmiştir. Örnekler HPLC cihazına enjeksiyondan önce 0.45 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilerek 2 ml kapasiteli HPLC viallerine alınmıştır. Diğer yandan bakterilerin rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i bağlama yeteneğini belirlemek amacıyla toplanan supernatant HPLC cihazına verilmeden önce immunoaffinity kolon kullanılarak ekstrakt temizleme işlemine tabi tutulmuştur.

Araştırmada kullanılan test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneğinin hesaplanması ve yöntem performansının belirlenmesi amacıyla geri alma çalışması yapılmıştır. Bu amaçla test bakterilerinin yokluğunda 5 ml fosfat çözeltisine veya 5 ml rekonstitüe süte 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonunda AFM₁ kontamine edilmiş ve belirtilen inkübasyon süreleri sonunda AFM₁'i fosfat tamponundan ve rekonstitüe süttten geri alma oranları ayrı ayrı belirlenmiştir.

3.2.4.5. Bakteri-AFM₁ Stabilesinin Belirlenmesi

Bakteri (10⁸ kob ml⁻¹)-AFM₁ (5 ng ml⁻¹) inkübasyonundan (4 saat) sonra santrifüjleme işlemi sonucunda toplanan supernatant ortamdaki bakteriyel pelleti üzerine AFM₁ içermeyen 5 ml PBS veya 5 ml rekonstitüe süt ilave edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda (3000xg, 15 dak.) toplanan supernatant HPLC ile analiz edilmiştir. Bu şekilde bakteri-AFM₁ kompleksinin stabilesi belirlenerek, bakteriyel peletine tutunan AFM₁'in tekrar PBS veya rekonstitüe süte geçme eğilimi ayrı ayrı tespit edilmiştir.

3.2.4.6. Test Bakterilerinin Canlılığının AFM₁'i Bağlama Yeteneği Üzerine Etkisi

Test bakterilerinin canlı olup olmasının AFM₁'i bağlama yeteneği üzerine etkisini tespit etmek amacıyla 10⁸ kob ml⁻¹ canlı bakteri kültürleri 90°C'de 15 dakika

kaynayan su banyosunda ısıtılma maruz bırakılmıştır. Isıtılma işlemi uygulanarak inaktive edilmiş bakteri hücrelerine 3.2.4.4'de belirtilen işlemler uygulanmış ve bağlanmamış AFM₁ miktarı HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.4.7. AFM₁ Ekstraksiyonu

Test bakterilerinin rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i bağlama deneyi gerçekleştirildikten sonra toplanan supernatant (4 ml) ultra saf su kullanılarak 20 ml'ye seyreltilmiştir. Bundan sonraki aşamada AFM₁ immunoaffinity kolonları vakum manifolda yerleştirilmiş ve seyreltilen 20 ml supernatant immunoaffinity kolondan dakikada 3 ml olacak şekilde geçirilmiştir. Immunoaffinity kolon 20 (2x10) ml ultra saf su ile yıkanmış ve kolonlar kurutulmuştur. Son olarak spesifik antikora bağlı halde bulunan AFM₁ kolondan 4 ml asetonyril geçirilerek toplanmıştır. Şiddetli olmayan azot gazı akımı altında toplanan eluat kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Son olarak, eluat 1 ml hareketli faz (su/asetonyril, 75/25, vol/vol) içinde yeniden çözündürülmüştür. Örnekler HPLC cihazı ile analiz edilinceye kadar 4-8°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.8. AFM₁ Analizi

Probiyotik bakterilerin AFM₁'i bağlama yeteneği izokratik koşullarda floresans detektörlü HPLC cihazı (Agilent 1100) ile belirlenmiştir. Bu sistemde CSI-6150 online vakum degaser (Cambridge, İngiltere), izokratik pompa (G 1310 A9, Agilent) ve manuel enjeksiyon sistemi (Rheodyne 7725i, Agilent, USA) yer almaktadır. AFM₁ analizinde uygulanan metot literatür araştırmaları sonucunda aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

Kolon: C18 (250x4.6 mm, 5 µm, Advanced Chromatography Technologies, İskoçya)

Hareketli faz: Su /asetonyril (75/25, vol/vol)

Hareketli faz akış hızı: 1 ml dak⁻¹

Basınç: Minimum 0 bar, maksimum 200 bar

Analiz süresi: 13 dakika

Alıkonma zamanı: 10.2-10.9 dakika

Enjeksiyon miktarı: 20 µl

Excitation (tahrik dalga boyu): 365 nm

Emission (yayım dalga boyu): 435 nm

Diğer yandan metot oluşumu tamamlandıktan sonra kalibrasyon ayarlarını oluşturmak amacıyla değişik konsantrasyonlarda hazırlanan AFM₁ standart çözeltileri HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Kalibrasyonda 2.5, 5, 10 ve 15 ng ml⁻¹ olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda AFM₁ standart çözeltisi kullanılmıştır. AFM₁'in alıkonma zamanı 10.2-10.9 dakika arasında belirlenmiştir. Çizelge 3.1'de farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AFM₁ standart çözeltilerine ait pik alanları verilmiştir.

Çizelge 3.1.Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulmasında Kullanılan AFM₁ Konsantrasyonu ve Pik Alanları.

AFM ₁ standardı (ng ml ⁻¹)	Alan
2.5	1.968
5	3.723
10	7.357
15	11.017

HPLC cihazına enjekte edilen standartlarına karşılık gelen pik alanlarına göre paket programı kullanılarak 4 farklı noktadan kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ($r^2=0.99995$). Test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde kalibrasyon eğrisi kullanılarak Chemstation software (Agilent) paket programı ile belirlenmiştir. Test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yetenekleri aşağıdaki formüle göre tespit edilmiştir.

$$\% \text{ bağlama} = (1 - \text{örnekteki AFM}_1 \text{ pikinin alanı} / \text{AFM}_1 \text{ kontrol pikinin alanı}) \times 100$$

Birimimiz mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan ve AFM₁ ve OTA analizlerinde kullanılan Agilent 1100 model HPLC, Resim 3.1'de gösterilmiştir.



Resim 3.1. AFM₁ ve OTA Analizlerinde Kullanılan HPLC Cihazı (Agilent 1100).

3.2.5. Test Bakterilerinin OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Belirlenmesi

3.2.5.1. OTA Standart Çözeltinin Hazırlanması

Kristal formda 1 mg olarak satın alınan OTA çözeltisi (amber renkli şişe içerisinde) 2 ml benzen/asetik asit (99:1, vol:vol) ile çözündürülmüştür. Çözelti bir gece oda koşullarında bekletilerek kristal formun tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Bu şekilde 500 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda OTA stok standart çözeltisi hazırlanmış ve -18°C'de muhafaza edilmiştir. OTA çalışma çözeltisinin hazırlanması amacıyla stok çözeltilerden 50 µl alınarak 25 ml'lik amber renkli balon jöjeye aktarılmış ve 1 µg ml⁻¹ elde etmek amacıyla benzen/asetik asit (99:1, vol:vol) ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. OTA çalışma standardı -18°C'de muhafaza edilmiş ve maksimum 3 ay içinde kullanılmıştır. OTA çalışma standart çözeltisi kullanılmadan önce, sıcaklığının oda koşullarına gelmesi beklenmiştir.

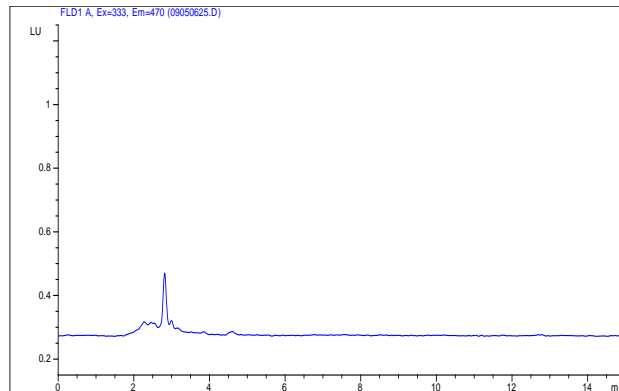
3.2.5.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin OTA ile Kontamine Edilmesi

5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonunda olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan OTA çözeltisinden benzen/asetik asit karışımı 40°C'de azot (N₂) gazı

altında kuruluğa kadar uzaklaştırıldıktan sonra, kalıntı 5 ml PBS çözeltisi (%0.8 NaCl, %0.12 K₂HPO₄, %0.03 KH₂PO₄) ile çözündürülmüştür.

3.2.5.3. Beyaz Şarapta OTA Varlığının Araştırılması

Test bakterilerinin OTA'yı gıda materyali olarak kullanılan beyaz şarap içinde bağlama yetenekleri belirlenmeden önce, kullanılan şarabın OTA içerip/içermediği araştırılmıştır. Bu amaçla; 25 ml beyaz şarap örneği 25 ml fosfat tamponu kullanılarak seyreltilmiş ve 10 M NaOH kullanılarak pH 7 değerine ayarlanmıştır. İkinci aşamada karışımdan 25 ml alınarak OTA'ya karşı spesifik antikorlar içeren immunoaffinity kolondan dakikada 2-3 ml olacak şekilde geçirilmiştir. Daha sonra immunoaffinity kolon 15-20 ml ultra saf su kullanılarak yıkanmış ve kolon kurutulmuştur. Spesifik antikorlara bağlı halde bulunan OTA kolondan 1600 µl (2x800) metanol/asetik asit (99/1) kullanılarak HPLC viallerine alınmıştır. Bundan sonraki aşamada vialler 40°C'de N₂ gazı altında metanol/asetik asit ortamdan uzaklaştırılmış ve kalıntı 400 µl hareketli faz (asetonitril/su/asetik asit, 47/51/2) ile çözündürülmüştür. Son olarak 20 µl örnek floresans detektörlü HPLC cihazına enjekte edilerek, gıda materyali olarak kullanılan şarapta OTA varlığı ve/veya miktarı tespit edilmiştir. Materyal olarak kullanılan beyaz şarap örneğine ait HPLC kromatogramı Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Test Bakterilerinin OTA'yı Gıda Modeli İçinde Bağlama Yeteneklerini Belirlemede Kullanılan Beyaz Şaraba Ait HPLC Kromatogramı.

3.2.5.4. Beyaz Şarabın OTA ile Kontamine Edilmesi

Test bakterilerinin gıda modeli içinde OTA'yı bağlama yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla 3 farklı konsantrasyondaki (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) OTA'dan benzen/asetik asit karışımı 40°C'de N₂ gazı kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı PBS yerine 5 ml beyaz şarap ile çözündürülmüştür.

3.2.5.5. Test Bakterilerinin OTA'yı Bağlama Yeteneğinin Belirlenmesi

Test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde 2 farklı konsantrasyonda bakteri kültürü kullanılmıştır. 10⁸ kob ml⁻¹ ve 10⁷ kob ml⁻¹ konsantrasyonda canlı test bakterilerini içeren tüpler 3000xg, 15 dakika santrifüj (Heraeus, Labofuge 200, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra supernatant ortamdan uzaklaştırılmış ve besiyerinden kaynaklanan yabancı maddeleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla hücreleri içeren pelet, 5 ml steril saf su ile yıkanmış ve tekrar santrifüj (3000xg, 15 dak.) edilmiştir. Süre sonunda supernatant ortamdan uzaklaştırılmış ve pelet 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda OTA içeren 5 ml PBS veya 5 ml beyaz şarap ile çözündürülmüştür. Karışım tüp karıştırıcı kullanılarak 10-15 saniye süre ile homojenize edildikten sonra 37°C'de başlangıç, 4 ve 24 saat inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda tüpler tekrar santrifüj edilerek test bakterilerine bağlanmamış OTA içeren supernatant temiz bir tüpe alınmıştır. Bağlanmamış OTA miktarı floresans detektörlü HPLC cihazı ile belirlenmiştir. Test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde aynı işlemler pozitif kontrol olarak test bakterilerinin bulunmadığı ortamda ve negatif kontrol olarak PBS (OTA içermeyen) ile de tekrarlanmıştır. Bu şekilde analiz yönteminden kaynaklanabilecek yalancı pozitif sonuçlar engellenmeye çalışılmıştır. Tüpler OTA analizine alınincaya kadar 5±1°C'de karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir. Örnekler HPLC cihazına enjeksiyondan önce 0.45 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilerek 2 ml kapasiteli HPLC viallerine alınmıştır.

3.2.5.6. Bakteri-OTA Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi

Bakteri (10^8 kob ml^{-1})-OTA (5 ng ml^{-1}) inkübasyonundan sonra (4 saat) santrifüjleme işlemi sonucunda toplanan supernatant ortamdan alındıktan sonra, bakteri peleti üzerine OTA içermeyen 5 ml PBS veya 5 ml beyaz şarap ilave edilmiş ve tekrar santrifüj işlemi sonunda toplanan supernatant HPLC ile analiz edilmiştir. Bu şekilde bakteri-OTA kompleksinin stabilitesi belirlenerek, bakteri hücrelerine tutunan OTA'nın tekrar PBS veya beyaz şaraba geçme eğilimi ayrı ayrı tespit edilmiştir.

3.2.5.7. Test Bakterilerinin Canlılığının OTA'yı Bağlama Yeteneği Üzerine Etkisi

Test bakterilerinin canlı olup olmasının PBS ve beyaz şarap içindeki OTA'yı bağlama yeteneği üzerine etkisini tespit etmek amacıyla 10^8 kob ml^{-1} canlı bakteri kültürleri kaynayan su banyosunda $90^\circ C$ 'de 15 dakika ısıtılma maruz bırakılmıştır. Isıtılma işlemi uygulanarak ölmüş bakteri hücrelerine 3.2.5.5'de belirtilen işlemler uygulanmış ve bağlanmamış OTA miktarı HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.5.8. OTA Analizi

Test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde bölümümüz Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan floresans detektörlü Agilent 1100 model (USA) HPLC cihazı kullanılmıştır. OTA analizi için uygulanacak metot gerekli literatür araştırmalarından sonra aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

Kolon: C18 (250x4.6 mm, 5 μm , Advanced Chromatography Technologies, İskoçya)

Hareketli faz: Asetonitril/su/ asetik asit (47/51/2, vol/vol/vol)

Hareketli faz akış hızı: 1 ml dak^{-1}

Basınç: Minimum 0 bar, maksimum 200 bar

Analiz süresi: 15 dakika

Alıkonma zamanı: 12.4-13.2 dakika

Enjeksiyon miktarı: 20 µl

Excitation (tahrik dalga boyu): 333 nm

Emission (yayım dalga boyu): 470 nm

Diğer yandan metot oluşumu tamamlandıktan sonra kalibrasyon ayarlarını oluşturmak amacıyla değişik konsantrasyonlarda hazırlanan OTA standart çözeltileri HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Kalibrasyonda 2.5, 10, 20 ve 25 ng ml⁻¹ olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda OTA standart çözeltisi kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan standart çözelti konsantrasyonlarının seçimi, araştırmada kullanılan konsantrasyon değerleri (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) baz alınarak yapılmıştır. Çizelge 3.2’de farklı konsantrasyonlarda hazırlanan OTA standart çözeltilerine ait pik alanları verilmiştir.

Çizelge 3.2.Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulmasında Kullanılan OTA Konsantrasyonu ve Pik Alanları.

OTA standardı (ng ml ⁻¹)	Alan
2.5	2.292
10	6.699
20	12.232
25	14.538

HPLC cihazına enjekte edilen standartlarına karşılık gelen pik alanlarına göre paket programı kullanılarak 4 farklı noktadan kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ($r^2=0.99850$). Test bakterilerinin OTA’yı bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde kalibrasyon eğrisi kullanılarak Chemstation software (Agilent) paket programı ile belirlenmiştir.

Test bakterilerinin OTA’yı bağlama yetenekleri aşağıdaki formüle göre tespit edilmiştir.

$$\% \text{ bağlama} = (1 - \text{örnekteki OTA pikinin alanı} / \text{OTA kontrol pikinin alanı}) \times 100$$

3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

3 tekerrürlü olarak yürütölen araştırma bulguları SPSS 10.0 istatistik yazılım programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Faktörlerin (bakteri suşu, inkübasyon süresi ve bakteriye uygulanan işlemler) etkisini belirlemek amacıyla varyans analizi uygulanmış ve önemli çıkan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 önem düzeyinde belirlenmiştir. Ayrıca, ikili karşılaştırmalarda Student-t-testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Test Bakterilerinin AFM₁'i Bağlama Yeteneği

Canlı ve ısıtılma işleme maruz bırakılan test bakterilerinin 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i başlangıç, 4 ve 24 saat içinde bağlama yetenekleri fosfat tamponu ve rekonstitüe ortamında belirlenmiştir.

4.1.1. Test Bakterilerinin Fosfat Tamponunda AFM₁'i Bağlama Yeteneği

4.1.1.1. Canlı Test Bakterilerinin Fosfat Tampounda AFM₁'i Bağlama Yeteneği

Araştırmada kullanılan 10⁸ ve 10⁷ kob ml⁻¹ yoğunluğundaki *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* Bb 13, *B. bifidum* NCC 381 ve *Lb. rhamnosus*'un fosfat çözeltisi ortamında 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Canlı Test Bakterilerinin (10^8 ve 10^7 kob ml^{-1}) PBS Ortamında AFM₁'i Bağlama Yetenekleri.

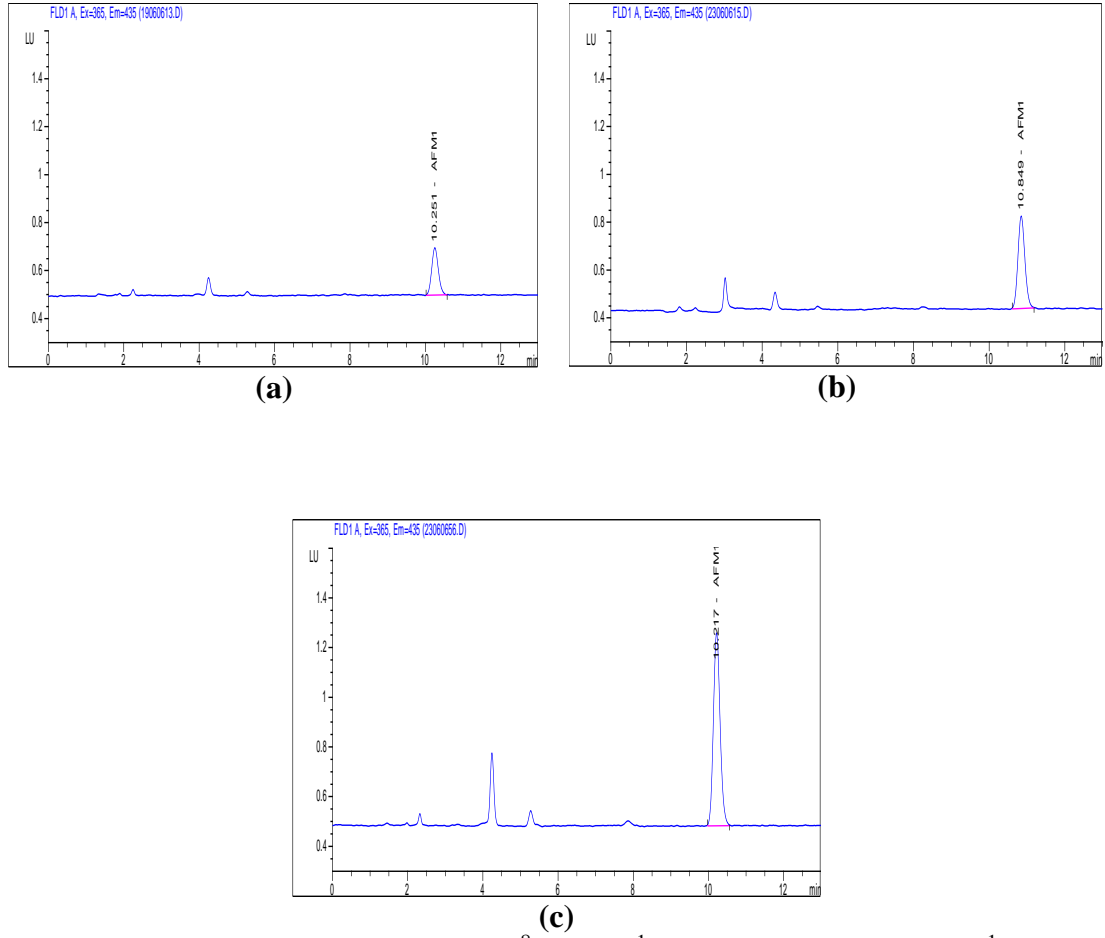
Bakteri	Yoğunluk (kob ml^{-1})	% bağlanan AFM ₁ (ortalama±sD, n=3)											
		5 ng $m l^{-1}$ AFM ₁				10 ng ml^{-1} AFM ₁				20 ng ml^{-1} AFM ₁			
		Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat
<i>Lb. acidophilus</i> NCC12	10^8	16.05±3.51	17.47±5.61	19.70±1.33	20.20±4.19	16.26±4.91	16.85±1.66	17.84±3.22	14.89±1.15	16.45±3.69			
	10^7	4.25±2.14	2.95±2.57	4.19±3.15	4.66±2.31	3.58±2.18	1.69±0.81	4.21±3.09	5.02±2.82	2.92±2.46			
<i>Lb. acidophilus</i> NCC36	10^8	22.23±10.76	23.47±2.59	22.24±4.67	22.73±6.81	20.37±4.16	25.32±4.15	24.78±1.39	22.99±3.74	23.10±5.19			
	10^7	3.44±3.04	3.74±3.57	4.95±1.88	2.34±1.44	4.69±0.84	2.85±1.94	1.80±1.20	1.20±1.16	1.75±1.51			
<i>Lb. acidophilus</i> NCC68	10^8	14.22±3.20	16.29±6.56	10.22±1.86	14.12±2.50	12.55±4.38	13.50±3.62	15.99±3.57	14.02±3.10	15.28±3.60			
	10^7	0.89±1.27	ND	1.30±1.70	1.13±1.96	ND	1.82±1.62	1.56±1.56	0.48±0.84	1.92±0.66			
<i>B. bifidum</i> Bb13	10^8	23.48±6.12	25.02±5.55	26.65±2.60	26.62±4.51	24.16±4.64	24.35±4.36	24.77±4.35	24.02±3.03	26.33±1.82			
	10^7	2.55±1.59	1.15±1.99	2.59±2.29	1.54±0.80	ND	ND	1.89±1.44	1.93±1.71	4.39±0.47			
<i>B. bifidum</i> NCC 381	10^8	18.11±2.57	16.62±3.63	18.92±2.84	21.08±6.05	18.24±2.97	19.08±6.07	19.79±7.74	22.09±6.12	18.70±3.69			
	10^7	ND	2.25±1.46	0.41±0.72	3.59±0.79	2.76±0.63	2.24±2.20	2.15±2.35	3.40±1.31	2.60±0.64			
<i>Lb. rhammosus</i>	10^8	20.21±6.16	22.19±2.97	22.16±7.14	22.70±2.39	20.53±2.96	23.96±2.16	22.88±7.11	20.68±4.29	21.64±1.66			
	10^7	3.44±0.99	2.90±2.77	3.17±1.01	3.88±0.70	2.59±2.33	2.42±0.42	4.19±1.49	3.73±1.49	3.68±0.97			
Geri Alma (%)		89.23±5.73	87.18±8.45	86.42±3.89	84.78±7.84	85.53±8.98	84.27±7.31	82.24±8.17	85.68±2.95	83.71±4.26			

ND: Tespit edilemedi (% 0)

10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin toksin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak AFM₁'i fosfat tamponu ortamında %10.22-26.65 arasında değişen oranlarda bağladığı belirlenmiştir. Genel olarak *B. bifidum* Bb 13 suşunun (10^8 kob ml^{-1}) diğer test bakterilerine oranla daha yüksek oranda AFM₁'i bağlama yeteneği gösterdiği belirlenirken, *Lb. acidophilus* NCC 68'in nispeten düşük bağlama yeteneğinde olduğu saptanmıştır. Test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponunda bulunan 5 ng ml^{-1} konsantrasyonundaki AFM₁'i bağlama yetenekleri başlangıçta %14.22-23.48 arasında değişiklik göstermekte olup, test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yetenekleri arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0.05$) olduğu belirlenmiştir. Test bakterilerinin fosfat tamponunda bulunan 5 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri 4. saatte %16.29-25.02, 24. saatte ise %10.22-26.65 arasında değişiklik göstermiştir. Test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 5 ng ml^{-1} AFM₁'i 4 saat inkübasyon içerisinde bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizken ($p>0.05$), 24 saat inkübasyon sonucu bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. *Lb. acidophilus* NCC 68'in 5 ng ml^{-1} AFM₁'i fosfat tamponunda 24 saat içinde bağlama yeteneği tüm test bakterileri içinde istatistiksel olarak en düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Araştırmada kullanılan bakterilerin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponunda bulunan 10 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri başlangıçta %14.12-26.62, 4. saatte %12.55-24.16 ve 24. saatte %13.50-25.32 arasında değişmiştir. Test bakterilerinin 10 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri arasındaki farklılık başlangıç ve 4 saat inkübasyon süresi içinde istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) iken, 24. saatte önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Diğer yandan, test bakterilerinin (10^8 kob g^{-1}) 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri başlangıçta %15.99-24.78 arasında olup, farklılık istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunurken, 4. saatte %14.02-24.02 arasında ($p<0.05$) ve 24. saatte %15.28-26.33 ($p<0.05$) arasında değişiklik göstermiştir.

Canlı *B. bifidum* Bb 13'ün (10^8 kob ml^{-1}) PBS ortamında 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i %25.02, %24.16 ve %24.02 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Canlı *B. bifidum* Bb 13'ün (10^8 kob ml^{-1}) PBS'de 4 Saatte 5 ng ml^{-1} AFM₁'i %25.02 (a), 10 ng ml^{-1} AFM₁'i %24.16 (b) ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i %24.02 (c) Oranlarında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

Araştırma kapsamında kullanılan canlı bakterilerin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında AFM₁'i başlangıç, 4 ve 24 saat içinde bağlama yeteneklerinde kullanılan toksin miktarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Örneğin; *B. bifidum* Bb 13 fosfat tamponu ortamında 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i başlangıçta sırasıyla %23.48, %26.62 ve %24.77 oranlarında bağlama yeteneği göstermiştir. Benzer şekilde, bakteri-AFM₁ inkübasyon süresinin de canlı test bakterilerinin fosfat tamponunda 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Örneğin, *Lb. acidophilus* NCC 36 fosfat tamponunda bulunan 5 ng ml^{-1} AFM₁'i başlangıç, 4 ve 24

saat içinde sırasıyla %22.23, %23.47 ve %22.24 oranlarında bağlama yeteneği göstermiştir.

Test bakterilerinin 10^7 kob ml^{-1} yoğunluğunda kullanılması durumunda fosfat tamponunda AFM_1 'i çok düşük oranlarda bağlama yeteneği gösterdiği (Çizelge 4.1) belirlenmiştir ($p < 0.05$). Laktik asit bakterilerinin (10^7 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında AFM_1 'i bağlama yetenekleri toksin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak %0-5.02 arasında bulunmuştur.

Test bakterilerinin (10^7 kob ml^{-1}) PBS ortamında 5 ng ml^{-1} AFM_1 'i bağlama yetenekleri başlangıçta %0-4.25, 4. saatte %0-3.74 ve 24. saatte %0.41-4.95 arasında değişiklik göstermekte olup, test bakterileri arasındaki fark her üç inkübasyon periyodunda da önemsiz ($p < 0.05$) çıkmıştır.

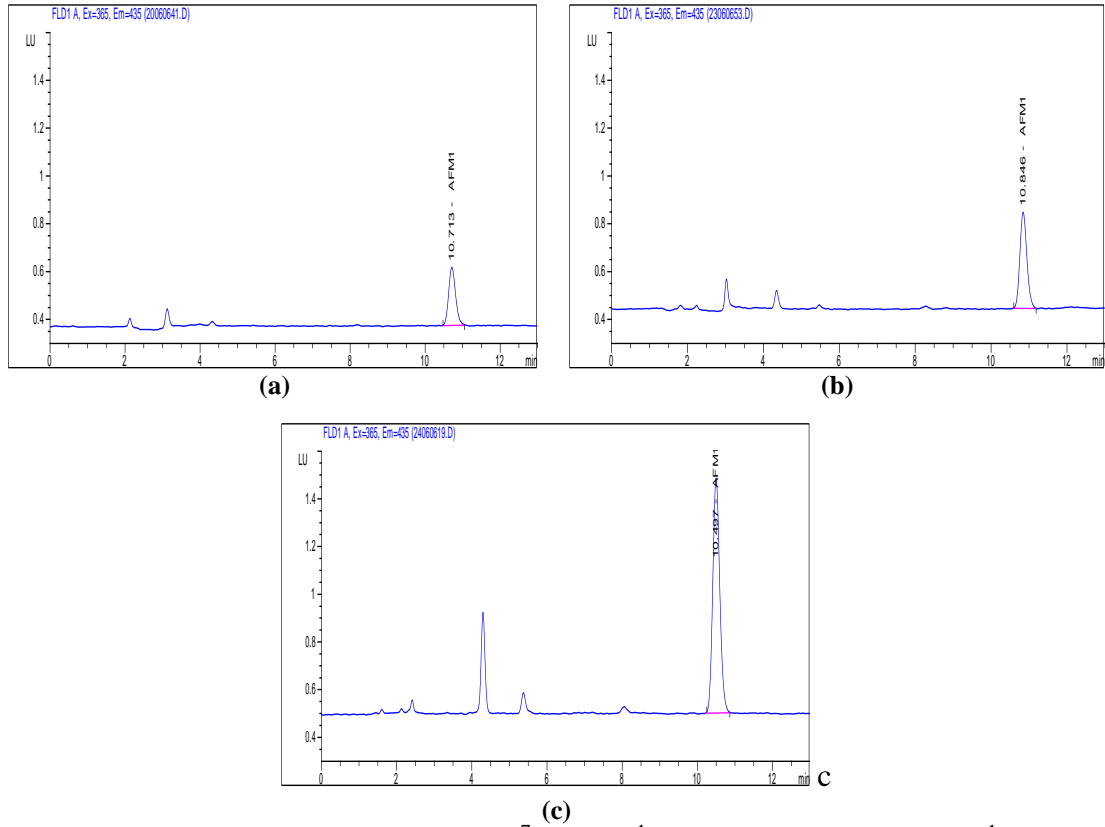
Test bakterilerinin fosfat tamponunda 10 ng ml^{-1} AFM_1 'i bağlama yetenekleri başlangıçta % 1.13-4.66 ($p > 0.05$), 24 saatte % 0-4.69 ($p > 0.05$) arasında iken, 4. saatte % 0-2.85 ($p < 0.05$) arasında olduğu saptanmıştır.

Benzer şekilde, bakterilerin (10^7 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında 20 ng ml^{-1} AFM_1 'i bağlama yetenekleri başlangıçta %1.56-4.21, 24. saatte ise %1.75-4.39 arasında olup, her iki inkübasyon periyodunda da test bakterileri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Diğer yandan test bakterileri (10^7 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında 4 saat içinde 20 ng ml^{-1} AFM_1 'i % 0.48-5.02 arasında değişen oranlarda bağlama yeteneği göstermiştir ($p < 0.05$).

Canlı *B. bifidum* Bb 13'ün (10^7 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} AFM_1 'i %1.15, %0 ve %1.93 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

10^7 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin fosfat tamponu ortamında başlangıç ve 4 saat içinde AFM_1 'i bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Diğer yandan, test bakterileri arasında yalnızca *B. bifidum* Bb 13'ün 24 saat içinde AFM_1 'i bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisinin istatistiksel açıdan önemli olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür.

Bakteri-AFM₁ inkübasyon süresinin test bakterilerinin (10^7 kob ml⁻¹) fosfat tamponu ortamında 5 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine etkisinin istatistiksel açıdan önemli olmadığı bulunurken, *B. bifidum* Bb 13 fosfat tamponunda 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i başlangıçta %1.54 oranında bağlarken, inkübasyonun 4. ve 24. saatlerinde bağlayamamıştır (p<0.05).



Şekil 4.2. Canlı *B. bifidum* Bb 13'ün (10^7 kob ml⁻¹) PBS'de 4 Saatte 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i %1.15 (a), 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i %0 (b) ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i %1.93 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

Test bakterilerinin AFM₁'i bağlamasında bakteri yoğunluğunun önemli bir etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. 10^7 kob ml⁻¹ yoğunluğunda kullanılan bakterilerin fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama oranları önemli oranda düşüş göstermiştir. Örneğin AFM₁'i nispeten yüksek oranda bağlama yeteneği gösteren 10^8 kob ml⁻¹ yoğunluğundaki *B. bifidum* Bb 13 suşu 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i başlangıçta %23.48, %26.62 ve %24.77 oranında bağlarken, bakteri yoğunluğunun 10^7 kob g⁻¹ olması durumunda AFM₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %2.55, %1.54 ve %1.89

değerlerine düşmüştür. Araştırmada kullanılan tüm test bakterilerinin 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i fosfat tamponu ortamında başlangıç, 4 saat ve 24 saat inkübasyon süresi içinde bağlama yeteneklerinde bakteri yoğunluğunun etkisi istatistiksel olarak önemli (p<0.05) bulunmuştur.

Laktik asit bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneği ile ilgili olarak literatürde sınırlı sayıda kaynak bulunmaktadır. Pierides ve ark. (2000) süt endüstrisinde kullanılan laktik asit bakterilerinin fosfat tamponu ve rekonstitüe sütte AFM₁'i bağlama yeteneklerini HPLC yöntemiyle araştırmışlardır. Araştırmacılar test ettikleri canlı bakterilerin fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama yeteneklerini %18.1-50.7 arasında bulmuşlardır.

Var ve Kabak (2004), bu araştırmada da kullanılan test bakterileri *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68, *Lb. rhamnosus*, *B. bifidum* Bb 13, *B. bifidum* NCC 381, *B. longum* Bl 24 ve *B. longum* NCC 135 suşlarının 100 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki AFM₁'i bağlama yeteneklerini PBS ve rekonstitüe süt ortamında farklı bir yöntemle (enzyme-linked immunosorbent assay) belirlemişlerdir. Araştırmada kullanılan 10⁸ kob ml⁻¹ konsantrasyondaki test bakterilerinin fosfat tamponu ortamında AFM₁'i 24 saat içinde bağlama yetenekleri %22.9-45.3 arasında bulunmuştur. Test bakterileri arasında en yüksek bağlama yeteneğini *B. bifidum* Bb 13, en düşük bağlama yeteneğini ise *B. longum* NCC 135 suşunun gösterdiği ve test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yetenekleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir.

Elde edilen verilerin Var ve Kabak (2004)'ın bildirdiği araştırma sonuçları ile kıyaslandığında her iki çalışmada da *B. bifidum* Bb 13 suşunun AFM₁'e karşı en yüksek bağlama yeteneği gösteren suş olduğu görülmektedir. Diğer yandan test bakterilerinin AFM₁'i bağlama değerleri arasında bazı farklılıkların olduğu göze çarpmaktadır. Örneğin; *B. bifidum* Bb 13 suşunun 24 saat içinde fosfat tamponunda bağladığı AFM₁ oranının (%24.35-26.33), Var ve Kabak (2004)'ın bildirdiği değerden (%45.3) daha düşük olduğu görülmektedir. Aynı bakteri ile çalışılmasına karşın farklı bağlama değerlerinin bulunmasının her iki çalışmada da farklı AFM₁ konsantrasyonlarının kullanılması ve uygulanan analiz yönteminin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Var ve Kabak (2004), test bakterilerinin

AFM₁'i bağlamalarında 100 ng ml⁻¹ gibi oldukça yüksek miktarda AFM₁ kullanmış olup, sütlerde bu seviyede doğal kontaminasyonun görülmesi çoğu zaman mümkün görünmemektedir. Araştırmacılar analiz yöntemi olarak da ELISA yöntemini kullanmış olup, analiz öncesi örneklerin 1/2000 oranında seyreltilmiş olmasının, bağlama sonuçlarında seyreltme işleminden kaynaklanan hatalara neden olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmacılar ayrıca, canlı test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerini ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemiyle de tespit etmişlerdir. Test bakterilerinin fosfat tamponunda 100 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneklerini İTK ile %17.8-32.5 arasında bulmuşlardır. Genel olarak bakıldığında test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılan analiz yönteminin önemli bir değişken olduğu görülmüştür. Test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinde İTK ile elde edilen sonuçların ELISA yöntemine göre daha düşük oranda olduğu görülmüştür. Örneğin; *Lb. rhamnosus*'un fosfat tamponu ortamında 100 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneği İTK ve ELISA yöntemiyle sırasıyla %30.8 ve % 37.8 oranında bulunmuştur. Araştırmacılar *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68 ve *B. longum* NCC 135 suşları için iki yöntem arasında analiz sonuçları bakımından istatistiksel olarak farklılık görülmediği ($P > 0.05$), *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. rhamnosus*, *B. bifidum* Bb 13 ve *B. bifidum* NCC 381 suşları için ise İTK ve ELISA yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel açıdan farklılık ($P < 0.05$) bulunduğu saptanmıştır (Var ve Kabak, 2004).

Bu konuda yapılan benzer bir çalışmada Sarımehtemtoğlu ve Küplülü (2004) yoğurt bakterilerinin (*Streptococcus thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) fosfat tamponu, rekonstitüe süt ve yoğurtta 4 saat içinde AFM₁'i bağlama yeteneklerini ELISA yöntemiyle belirlemişlerdir. Araştırmacılar fosfat tamponunda *Str. thermophilus* ST-36 ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH-2 suşlarının AFM₁'i (10 ng ml⁻¹) bağlama yeteneklerini sırasıyla %29.42 ve %18.70 oranında bulurken, süt ortamında bağlama yeteneklerini sırasıyla %39.16 ve %27.56 olarak belirlemişlerdir. Bu iki bakterinin bir arada kullanılarak üretilen yoğurtta ise bakterilerin AFM₁'i bağlama yeteneği %14.82 olarak gerçekleşmiştir.

4.1.1.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Fosfat Tamponunda AFM₁'i Bağlama Yetenekleri

Bakterilerin fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine canlı olup olmamalarının etkisini belirlemek amacıyla 10⁸ kob ml⁻¹ bakteri içeren kültürler 90°C'de 15 dakika kaynayan su banyosunda ısıl işleme maruz bırakılmıştır. Isıl işlem kullanarak öldürülen bakterilerin fosfat tamponu ortamında farklı inkübasyon sürelerinde (başlangıç, 4 ve 24 saat) 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Isıl işleme maruz bırakılan bakteri hücrelerinin fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama yeteneklerinin toksin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak %14.04-28.97 arasında olduğu saptanmıştır.

Isıl işlem kullanılarak öldürülen bakterilerin fosfat tamponunda 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri başlangıçta %19.46-27.74 arasında olup, test bakterilerinin bağlama yetenekleri arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli (p<0.05) olduğu bulunmuştur. Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri 4. saatte %16.98-26.81, 24. saatte ise %17.57-25.29 arasında olup, test bakterileri arasındaki farklılık her iki inkübasyon periyodunda da istatistiksel açıdan önemsizdir (p>0.05).

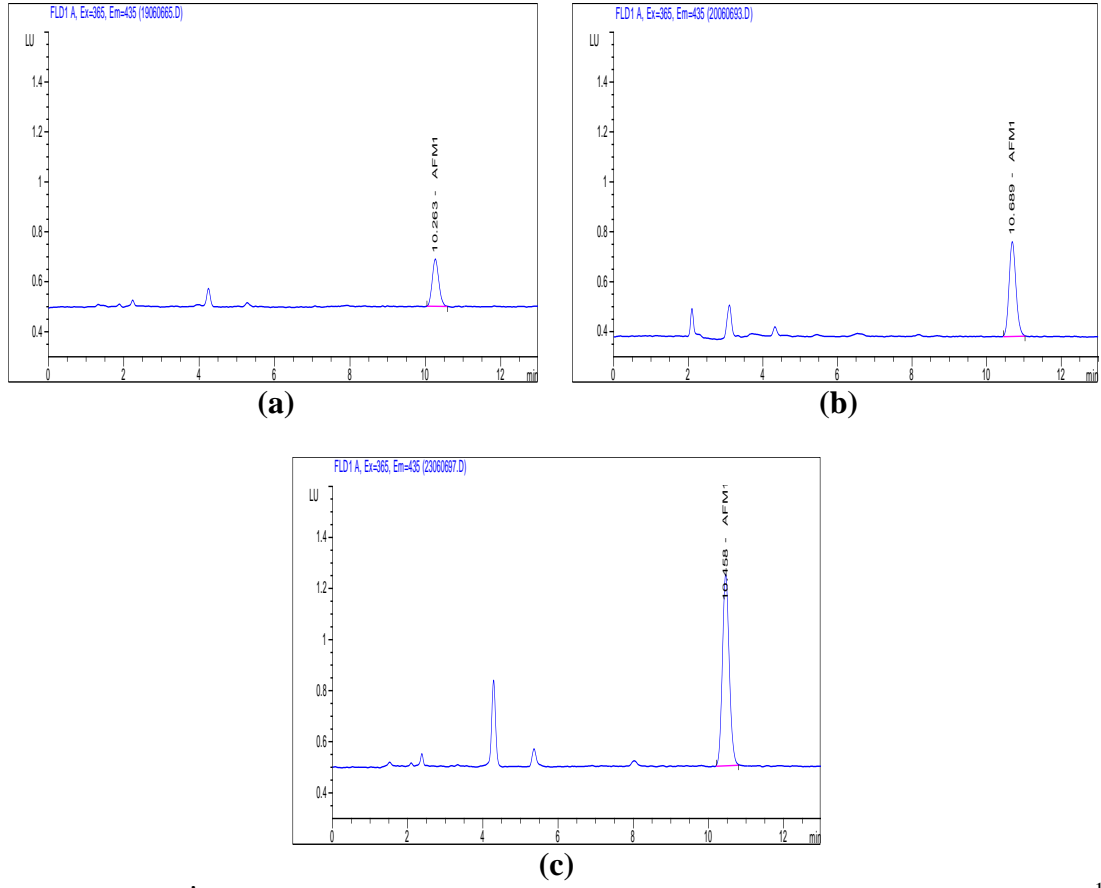
Isıl işleme maruz bırakılan *B. bifidum* Bb 13'ün PBS ortamında 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i sırasıyla %26.42, %27.36 ve %27.68 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları Şekil 4.3'de verilmiştir.

Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i fosfat tamponu ortamında bağlama yetenekleri başlangıçta %15.31-26.33 (p<0.05), 4. saatte %19.29-27.36 (p>0.05) ve 24. saatte %14.04-25.70 (p<0.05) arasında bulunurken en yüksek bağlama yeteneğini *B. bifidum* Bb 13 suşu göstermiştir.

Benzer şekilde ısıl işleme maruz bırakılan bakterilerin 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i fosfat tamponu ortamında bağlama yeteneklerinin başlangıçta %20.95-28.97, 4. saatte %21.59-27.68 ve 24. saatte %17.03-26.69 arasında olduğu saptanmıştır. Uygulanan tüm inkübasyon sürelerinde (başlangıç, 4 ve 24 saat) bakterilerin AFM₁'i bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin PBS Ortamında AFM₁'i Bağlama yetenekleri.

Bakteri	% bağlanan AFM ₁ (ort ± sD, n=3)											
	5 ng ml ⁻¹ AFM ₁				10 ng ml ⁻¹ AFM ₁				20 ng ml ⁻¹ AFM ₁			
	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat
<i>Lb. acidophilus</i> NCC12	24.08±1.58	22.98±4.92	24.95±4.50	20.68±3.06	19.85±3.94	20.21±5.89	24.75±4.23	21.59±5.47	17.03±2.20			
<i>Lb. acidophilus</i> NCC36	26.38±4.99	26.81±1.99	25.29±5.03	22.07±2.23	24.14±3.00	25.28±3.65	26.22±4.93	24.92±3.92	24.50±4.40			
<i>Lb. acidophilus</i> NCC68	16.82±2.37	16.98±4.65	17.57±5.92	15.31±2.92	19.29±2.20	14.04±2.16	20.95±0.51	21.85±4.73	17.72±6.00			
<i>B. bifidum</i> Bb13	27.74±2.97	26.42±6.96	25.12±5.33	25.97±5.73	27.36±2.40	25.70±5.21	28.97±3.49	27.68±3.53	24.32±6.99			
<i>B. bifidum</i> NCC 381	19.46±3.35	22.08±1.41	20.13±6.21	17.39±2.81	22.60±2.97	21.78±2.93	21.19±5.03	23.55±6.11	19.25±5.60			
<i>Lb. rhamnosus</i>	23.37±4.81	24.59±2.63	24.16±3.33	26.33±2.41	23.87±2.99	24.98±2.06	27.78±7.50	26.94±2.14	26.69±5.48			



Şekil 4.3. Isıl İşleme Maruz Bırakılan *B. bifidum* Bb 13'ün PBS'de 4 Saatte 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i %26.42 (a), 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i %27.36 (b) ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i %27.68 (c) Oranlarında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

Araştırmada kullanılan AFM₁ konsantrasyonunun (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) ısıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin fosfat tamponu ortamında AFM₁'i başlangıç, 4 ve 24 saat içinde bağlama yetenekleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p>0.05$). Örneğin ısıl işleme maruz bırakılan *Lb. acidophilus* NCC 36 fosfat tamponunda 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i başlangıçta sırasıyla %26.38, %22.07 ve %24.92 oranlarında bağlamıştır.

Benzer şekilde; AFM₁-bakteri inkübasyon süresinin de (başlangıç, 4 ve 24 saat) test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine etkisinin bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Isıl işleme maruz bırakılan *B. bifidum* Bb 13 fosfat

tamponunda 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i başlangıç, 4 ve 24 saat içinde sırasıyla %28.97, %27.68 ve %24.32 oranlarında bağlamıştır (p>0.05).

Isıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin fosfat tamponu ortamında AFM₁'i bağlama yetenekleri, canlı bakterilere göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Canlı *Lb. acidophilus* NCC 12 fosfat tamponunda 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i başlangıçta %16.05 oranında bağlarken, ısıl işleme maruz bırakıldıktan sonra bağlama yeteneği %24.08'e çıkmıştır. *Lb. acidophilus* NCC 12'nin ısıl işlem muamelesi sonucu başlangıçta 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneğindeki artış istatistiksel olarak önemli (p<0.05) bulunmuştur. Diğer bakterilerin canlı veya ölü olmasının fosfat tamponu ortamında 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine etkisinin istatistiksel açıdan önemsiz (p>0.05) olduğu bulunmuştur. Örneğin, AFM₁'i nispeten yüksek oranda bağlama yeteneği gösteren *B. bifidum* Bb 13 fosfat tamponunda 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i 4 saat içinde %24.02, ısıl işleme maruz bırakıldıktan sonra ise %27.68 oranında bağlayabilmiştir.

Bu konuda Pierides ve ark. (2000) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, test bakterilerinin (*Lb. lactis* ssp. *cremoris* ARH74 hariç) ısıl işleme maruz bırakılmaları durumunda AFM₁'i bağlama yeteneklerinde artış görülmüştür. Canlı *Lb. rhamnosus* GG fosfat tamponunda AFM₁'in %50.7'sini bağlarken, ısıl işlem kullanılarak öldürülmesi sonucu bağlama yeteneğinin %57.8'e çıktığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde; canlı ve ısıl işleme maruz bırakılan *Lb. acidophilus* LA1 suşunun fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %18.3 ve %25.5 oranında bulunmuştur. Buna karşın test edilen bakterilerden yalnızca *Lb. lactis* ssp. *cremoris* ARH74 suşunun (%40.4) ısıl işlem ile öldürülmesi sonucu AFM₁'i bağlama yeteneğinde az miktarda düşme görüldüğünü saptamışlardır. Araştırmacılar bu nedenle AFM₁'in laktik asit bakterileri tarafından bağlanmasında bakterilerin canlı olup olmasının ön şart olmadığını ve AFM₁'in ortamdan uzaklaştırılmasının metabolik bir yıkımdan çok, hücre duvarı ile ilgili fiziksel bir oluşum olduğunu öne sürmüşlerdir.

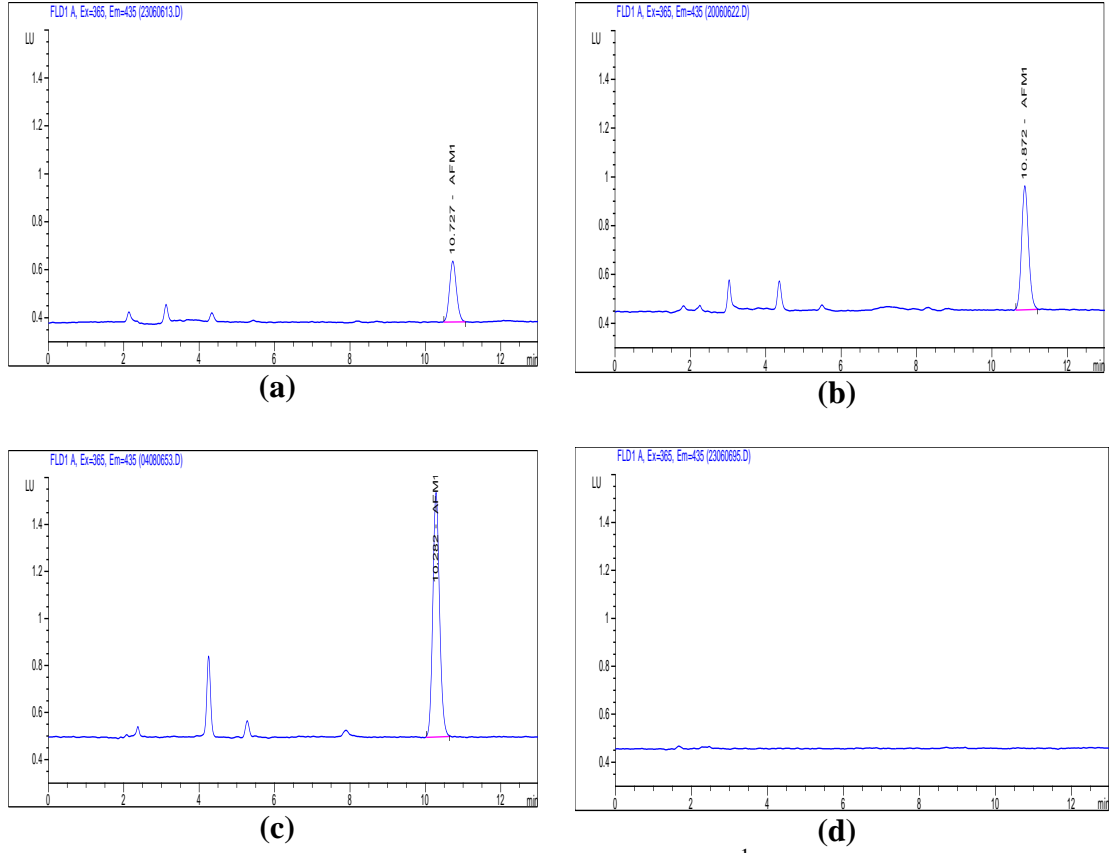
Var ve Kabak (2004), analiz ettikleri 8 laktik asit bakterisinin ısıl işleme maruz bırakılması durumunda fosfat tamponu ve rekonstitüe sütte AFM₁'i bağlama yeteneklerinin önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Isıl işleme maruz bırakılan

test bakterilerinin 100 ng ml^{-1} AFM₁'i 24 saat içinde fosfat tamponunda bağlama yeteneklerini %31.3-61.9 oranında bulmuşlardır. Test bakterilerine ısıtma işlemi muamelesi yapılması durumunda fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama yeteneklerinde canlı bakterilere oranla %2.3-16.6 oranında artış görülmüştür.

El-Nezami ve ark. (1998b) *Lb. rhamnosus* GG ve *Lb. rhamnosus* LC 705'in ısıtma işlemine maruz bırakılmaları durumunda fosfat tamponunda AFB₁'i bağlama yeteneklerinde artış görüldüğünü vurgulamışlardır. Araştırmacılar, canlı ve ısıtma işlemine maruz bırakılan *Lb. rhamnosus* GG'nin fosfat tamponu ortamında AFB₁'i bağlama yeteneklerini sırasıyla %51.5 ve %69.5 oranında bulmuşlardır. Benzer şekilde, Thyagaraja ve Hosono (1994) *Lb. casei*'nin otoklav edilmesi sonucunda fosfat tamponunda AFB₁'i ortamdan uzaklaştırma yeteneğinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Haskard ve ark. (2001) laktik asit bakterilerinin mutajenik maddeleri bağlamada hücre duvarı polisakaritleri ve peptidoglikanın en önemli 2 faktör olduğu ve ısıtma işleminin bu komponentleri önemli ölçüde etkilediğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar ısıtma işlemi uygulamasının analiz ettikleri bakterilerin fosfat tamponunda AFB₁'i bağlama yeteneğini büyük oranda artırdığını saptamışlardır. Örneğin; yakult bakterisi olarak da bilinen *Lb. casei* Shirota fosfat tamponunda AFB₁'in %21.8'ini bağlarken, bakterinin ısıtma işlemine maruz bırakılması sonucu AFB₁'i bağlama yeteneği hemen hemen 2 katına (%41.5) çıkmıştır. Benzer şekilde canlı ve ısıtma işlemine maruz bırakılan *Propionibacteria freudenreichii* subsp. *shermanii* JS fosfat tamponunda AFB₁'i sırasıyla %22.3 ve %67.3 oranlarında bağlamıştır. Diğer yandan, araştırmacıların analiz ettikleri 12 laktik asit bakterisinden yalnızca *Lb. lactis* subsp. *lactis*'in ısıtma işlemi ile inaktive edilmesi sonucu AFB₁'i bağlama yeteneğinde (%58.1) canlı kullanılmasına (%59) oranla az miktarda da olsa düşme görülmüştür.

Araştırmada analiz yönteminin hassasiyeti de belirlenmiş olup bu amaçla her denemede AFM₁'i fosfat çözeltisinden geri alma çalışması yapılmıştır. 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} konsantrasyonundaki AFM₁'in farklı inkübasyon sürelerinde fosfat tamponundan geri alma oranları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu şekilde test bakterilerinin bağlama yetenekleri ve analiz yönteminden kaynaklanan AFM₁ kayıpları belirlenmiştir. Fosfat tamponu çözeltisinde yapılan geri alma çalışmaları

sonucunda, inkübasyon süresine ve toksin konsantrasyonuna bağlı olarak AFM₁'in %82.24-89.23 oranında geri alındığı saptanmıştır. Şekil 4.4'de araştırmada kullanılan 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonlarındaki AFM₁'in fosfat tamponunda 4 saat içinde sırasıyla 4.36 (%87.18), 8.55 (%85.53) ve 17.14 (%85.68) ng ml⁻¹'sinin geri alınmasıyla ilgili pozitif kontrol kromatogramları ve AFM₁ negatif kontrol kromatogramı verilmiştir. Araştırmada kullanılan inkübasyon süresinin AFM₁'i fosfat tamponundan geri alma oranları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) olduğu bulunmuştur. Örneğin; 5 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki AFM₁'in başlangıç, 4 ve 24 saat inkübasyon sonucunda sırasıyla %89.23, %87.18 ve %86.42'sinin geri alındığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, AFM₁'in fosfat tamponundan geri alınma değeri üzerine uygulanan toksin konsantrasyonunun da bir etkisinin olmadığı (p>0.05) saptanmıştır. Bakterilerinin bulunmadığı ortamda 24 saat inkübasyon sonunda 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki AFM₁'in fosfat tamponu çözeltisinden geri alma oranları sırasıyla %86.42, %84.27 ve %83.71 olarak bulunmuştur. Fosfat tamponu ve rekonstitüe süt ortamında AFM₁'in geri alınma değerlerinin İTK ve ELISA yöntemleri ile belirlendiği araştırmalar da bulunmaktadır. Kabak ve Var (2004), İTK kullanarak yaptıkları çalışmada fosfat tamponunda 100 ng ml⁻¹ AFM₁'in geri alma değerlerini (pozitif kontrol) %90 oranında bulmuşlardır. Benzer şekilde Var ve Kabak (2004) test bakterilerinin 100 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneklerini ELISA yöntemi ile araştırdıkları çalışmada, fosfat tamponunda geri alma oranını %98.8 oranında bulmuşlardır.



Şekil 4.4. PBS Tamponunda 5 (a), 10 (b), 20 (c) ng ml⁻¹ AFM₁'in Geri Alınmasına Ait Pozitif Kontrol ve AFM₁ Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.

4.1.1.3. Fosfat Tamponu Ortamında Bakteri-AFM₁ Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi

Test bakterilerinin (10^8 kob ml⁻¹) fosfat tamponu ortamında AFM₁'i geri dönüşümlü olarak bağlayıp bağlamadığını tespit etmek amacıyla, AFM₁'in (5 ngml⁻¹) test bakterileri tarafından 4 saat inkübasyon süresince bağlandıktan sonra, serbest kalarak tekrar fosfat tamponuna geçme eğilimleri belirlenmiştir. Bakterilerin fosfat tamponu ortamında 5 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki AFM₁'i bağlama yetenekleri ve bakterilerin fosfat tamponu ile yıkanması sonucu serbest kalarak sıvı çözeltiliye geçme oranları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

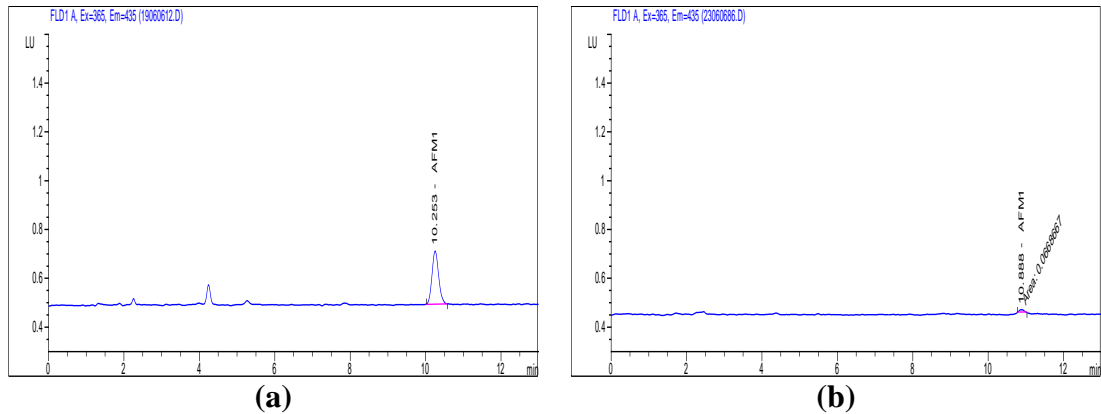
Çizelge 4.3. Fosfat Tamponu Ortamında Canlı Test Bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 4 Saat İçinde Bağladığı AFM₁'in (5 ng ml^{-1}) Tekrar Fosfat Tamponuna Geçme Oranları.

Bakteri	% bağlanan AFM ₁ (ort±sD, n=3) ^a	PBS'ye geçen % AFM ₁ (ort±sD, n=3) ^b
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	17.47±5.61	8.18±3.53
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	23.47±2.59	6.71±2.73
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	16.29±6.59	5.73±1.14
<i>B. bifidum</i> Bb13	25.02±5.55	5.62±2.93
<i>B. bifidum</i> NCC 381	16.62±3.63	7.81±2.05
<i>Lb. rhamnosus</i>	22.19±2.97	8.54±1.68

^a 10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml^{-1} AFM₁ ile 24 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları % AFM₁ oranı.

^b 10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml^{-1} AFM₁ ile 24 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları AFM₁'in 5 ml PBS (AFM₁ içermeyen) ile yıkanması sonucu serbest kalarak fosfat tamponuna geçen % AFM₁ oranı.

Canlı *Lb. acidophilus* NCC 12'nin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponunda 4 saat içinde 5 ng ml^{-1} AFM₁'i %17.47 oranında bağlama yeteneğine ait ve bakterilerin 5 ml fosfat tamponu çözeltisi ile (AFM₁ içermeyen) yıkanması sonucu serbest kalarak tekrar sıvı çözeltiye geçen (%8.18) AFM₁'e ait HPLC kromatogramları Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Canlı *Lb. acidophilus* NCC 12'nin (10^8 kob ml^{-1}) PBS'de 4 Saatte 5 ng ml^{-1} AFM₁'i %17.47 Oranında Bağlama Yeteneğine (a) ve Hücrelerin 5 ml PBS İle Yıkanması Sonucu Serbest Kalan AFM₁ Oranına (%8.18) Ait (b) HPLC Kromatogramları.

Çizelge 4.3'ün incelenmesiyle de görülebileceği gibi fosfat tamponu ortamında bağlanan AFM₁'in, suştan suşa farklılık göstermekle birlikte belirli oranlarda tekrar

fosfat tamponuna geçtiği belirlenmiştir. 5 ng ml⁻¹ AFM₁ içeren fosfat tamponunda 4 saat içerisinde test bakterileri tarafından farklı oranlarda (%16.29-25.02) bağlanan AFM₁'in stabilitesini koruyamayarak %5.62-8.54 arasında değişen oranlarda fosfat tamponuna geçtiği saptanmıştır. 5 ng ml⁻¹ konsantrasyonunda AFM₁ içeren fosfat tamponu ortamında 24 saat içerisinde *B. bifidum* Bb 13 tarafından %25.02 oranında bağlanan AFM₁'in %5.62'sinin tekrar fosfat tamponuna geçtiği belirlenmiştir. Test bakterileri tarafından bağlanan AFM₁'in fosfat tamponuna geçme oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Literatürde fosfat tamponunda laktik asit bakterilerinin AFM₁'i bağlamalarının geri dönüşümlü olup olmadığını belirlemeye yönelik herhangi bir veri bulunmamaktadır. Diğer yandan, bu konuda AFB₁ ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar bulunmaktadır. Peltonen ve ark. (2001), test bakterilerinin 5 µg ml⁻¹ AFB₁'i fosfat tamponunda bağlama yeteneğini belirledikten sonra, bakterileri 5 defa AFB₁ içermeyen fosfat tamponu ile yıkayarak, bağlanmanın geri dönüşümlü olup olmadığını araştırmışlardır. *Lactobacillus*-AFB₁ kompleksinin (*Lb. amylovorus* CSCC 5160, *Lb. amylovorus* CSCC 5197 ve *Lb. rhamnosus* Lc 1/3) değişik oranlarda (sırasıyla %94.4, %74.2 ve %27.8) serbest kalarak fosfat tamponuna geçtiği görülmüştür. Araştırmacılar, kompleksden ayrılarak fosfat tamponuna geçen AFB₁'in, en yüksek oranda 1. yıkamada görüldüğünü, *Lb. amylovorus* CSCC 5160, *Lb. amylovorus* CSCC 5197 ve *Lb. rhamnosus* LC 1/3 suşlarının bağladığı AFB₁'in sırasıyla %48.6, %30.7 ve %26.5'inin sıvı çözeltiliye geçtiğini tespit etmişlerdir. Diğer yandan, AFB₁-bakteri, kompleksinin 5 defa fosfat tamponu ile yıkanması sonucunda *Lb. amylovorus* CSCC 5160, *Lb. amylovorus* CSCC 5197 ve *Lb. rhamnosus* Lc 1/3 suşlarının bağladığı AFB₁'in sırasıyla %94.4, %74.2 ve %27.8'inin serbest kaldığını saptamışlardır. Benzer şekilde Haskard ve ark. (2001) test ettikleri 12 canlı laktik asit bakterisinin AFB₁ (5 µg ml⁻¹) ile oluşturdukları kompleksin 5 defa 1.5 ml fosfat tamponu ile yıkanması sonucunda bağladıkları AFB₁'in %11.5-38.6 oranında serbest kaldığını göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, ısıtılma maruz bırakılan test bakterilerinin bağladığı AFB₁'in de (%35.5-84.1) 5 defa fosfat tamponu ile yıkama sonucunda hücreden ayrılarak serbest forma geçme oranlarını %17.3-39.9 arasında

bulmuşlardır. Bu verilerden de görülebileceği gibi toksinin kompleksden ayrılarak serbest forma geçmesinde kullanılan bakteri suşu da önemli bir rol oynamaktadır.

4.1.2. Test Bakterilerinin Rekonstitüe Sütte AFM₁'i Bağlama Yeteneği

Test bakterilerinin fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama yeteneklerinde inkübasyon süresinin önemli bir etkisinin bulunmaması nedeniyle canlı ve ısıtma işlemine maruz bırakılan bakterilerin rekonstitüe süt (pH 6.5) ortamında 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneklerinde inkübasyon süresi olarak, sindirim süresi göz önüne alınarak yalnızca 4 saat kullanılmıştır.

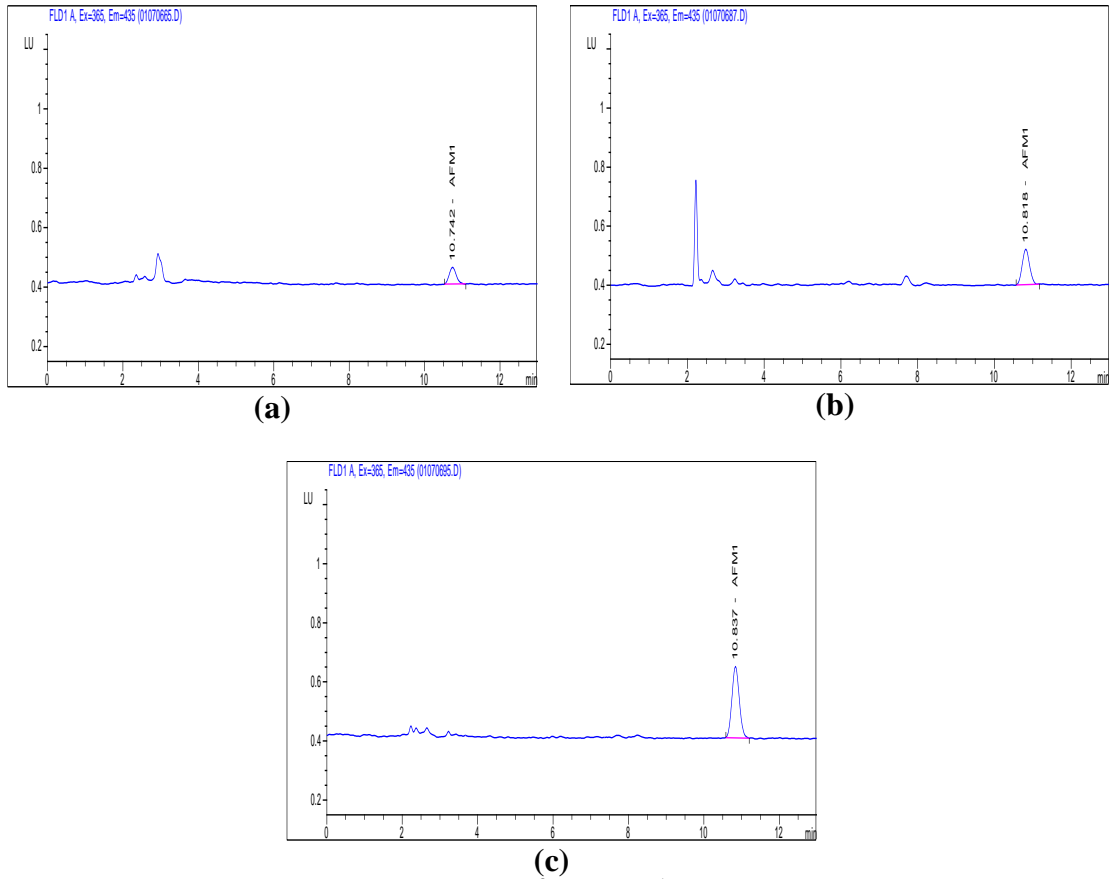
4.1.2.1. Canlı Test Bakterilerinin Rekonstitüe Sütte AFM₁'i Bağlama Yeteneği

Araştırma kapsamında kullanılan laktik asit bakterilerinin AFM₁'i fosfat tamponu yanı sıra gıda maddesi içinde de bağlama yeteneğini tespit etmek amacıyla gıda materyali olarak rekonstitüe süt kullanılmıştır. Araştırma kapsamında kullanılan bakterilerin (10⁸ kob ml⁻¹) 4 saat inkübasyon süresi içinde gıda modeli olarak kullanılan rekonstitüe sütte 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Test Bakterilerinin Rekonstitüe Süt Ortamında 4 Saat İnkübasyon Süresi İçinde AFM₁'i Bağlama Yetenekleri.

Bakteri	% bağlanan AFM ₁ (ortalama ± sD, n=3)		
	5 ng ml ⁻¹	10 ng ml ⁻¹	20 ng ml ⁻¹
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	15.44±4.66	14.84±5.12	14.37±1.34
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	22.70±3.36	21.76±7.19	22.47±1.82
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	9.55±3.60	7.85±1.59	10.51±2.63
<i>B. bifidum</i> Bb 13	25.94±6.48	23.97±5.13	24.59±6.00
<i>B. bifidum</i> NCC 381	15.95±3.17	15.49±3.45	18.63±5.46
<i>Lb. rhamnosus</i>	21.74±3.56	22.14±4.95	20.41±1.38
Geri alma (%)	82.08±3.27	81.24±1.93	80.97±3.17

Test bakterilerinin rekonstitüe sütte AFM₁'i bağlama yeteneği kullanılan suş ve toksin konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık göstermiştir. Test bakterilerinin 4 saat içinde rekonstitüe sütte 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneği %9.55-25.94 arasında değişiklik göstermiştir. Test bakterilerinin 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli (p<0.05) bulunmuştur. Test bakterileri içinde rekonstitüe sütte AFM₁'i en yüksek bağlama yeteneğini *B. bifidum* Bb13 gösterirken, *Lb. acidophilus* NCC 68 AFM₁'in yalnızca %9.55'ini bağlayarak en düşük aktivite gösteren suş olarak saptanmıştır. Bakterilerin 4 saat içinde rekonstitüe sütte 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri ise sırasıyla %7.85-23.97 (p<0.05) ve %10.51-24.59 (p<0.05) arasında değişiklik göstermiştir.

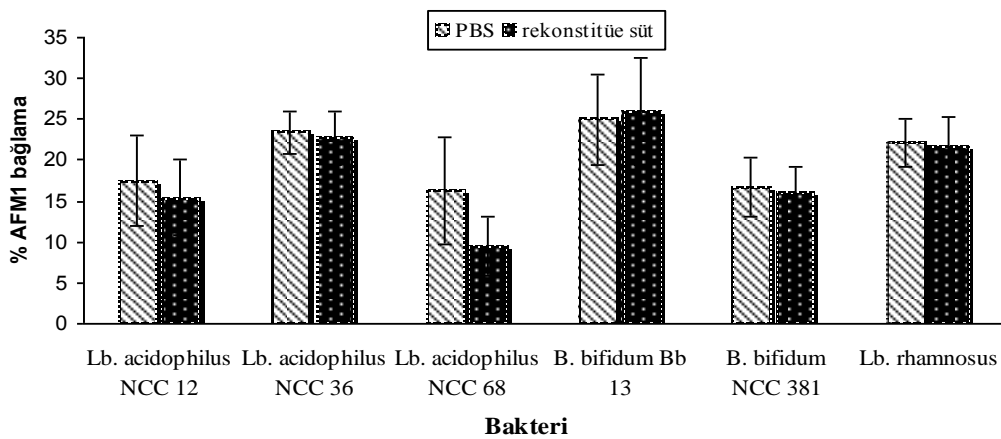


Şekil 4.6. Canlı *B. bifidum* Bb 13'ün (10⁸ kob ml⁻¹) Rekonstitüe Sütte 4 Saatte 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i %25.94 (a), 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i %23.97 (b) ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i %24.59 (c) Oranlarında Bağlamasına Ait HPLC Kromatogramları.

B. bifidum Bb 13'ün rekonstitüe süt ortamında 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i sırasıyla %25.94, %23.97 ve %25.49 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları Şekil 4.6'da verilmiştir.

Diğer yandan, rekonstitüe sütte bakterilerin AFM₁'i bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Örneğin, AFM₁'i nispeten yüksek oranda bağlama yeteneği gösteren *B. bifidum* Bb 13'ün rekonstitüe sütte 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %25.94, %23.97 ve %24.59 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, *Lb. rhamnosus*'un rekonstitüe sütte 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %21.74, %22.14 ve %20.41 olarak gerçekleşmiştir.

Canlı test bakterilerinin 4 saat inkübasyon süresi içinde fosfat tamponu ve rekonstitüe süt içinde 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda, suştan suşa bazı farklılıklar görülmesine karşın, test bakterilerinin (*B. bifidum* Bb 13 hariç) rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i daha düşük oranda bağlama yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. Örneğin; *Lb. acidophilus* NCC 36, 4 saat içinde PBS ortamında 5 ng ml⁻¹ AFM₁'in %23.47'sini bağlarken, rekonstitüe sütte %15.44'ünü bağlayabilmiştir. Diğer yandan, *B. bifidum* Bb 13, 4 saat içinde 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i PBS ve rekonstitüe süt ortamında bağlama yetenekleri sırasıyla %25.02 ve %25.94 oranında bulunmuştur (Şekil 4.7).

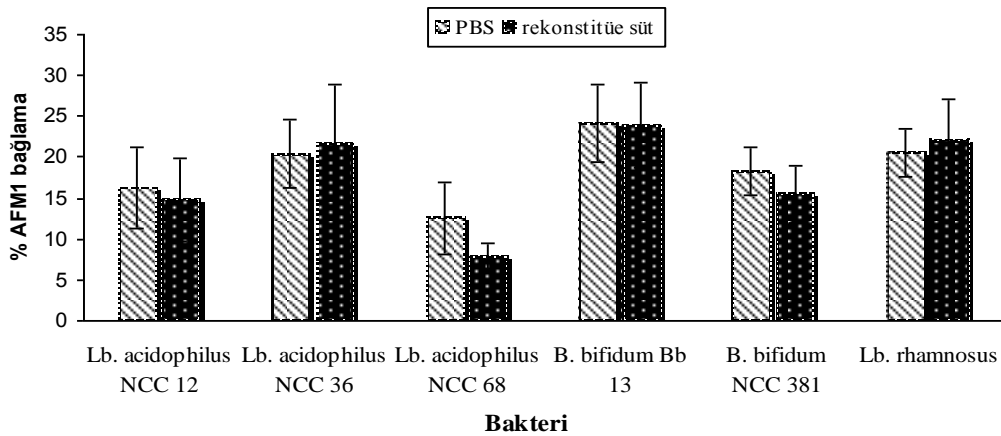


Şekil 4.7. Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

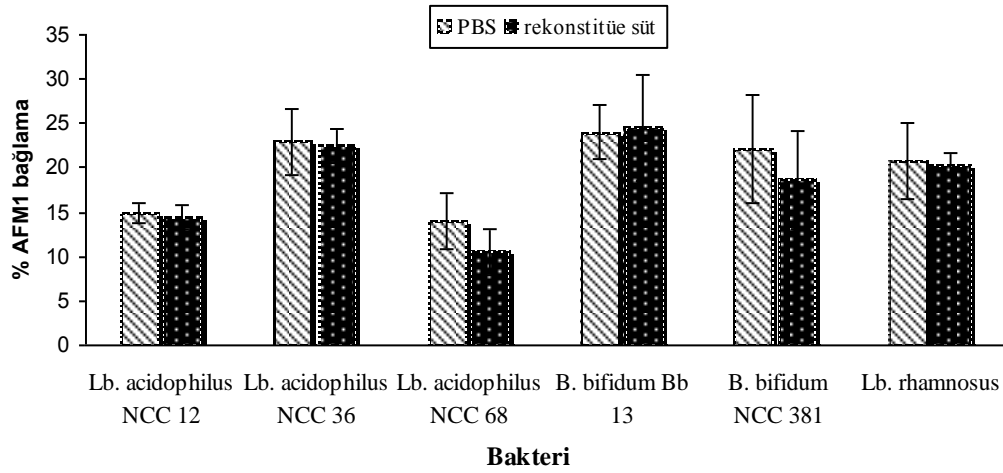
Test edilen bakteriler arasında yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus*'un 10 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri rekonstitüe süt ortamında PBS ortamına göre daha yüksek bulunmuştur. *B. bifidum* Bb 13, 4 saat inkübasyon süresi içinde PBS ve rekonstitüe sütte 10 ng ml^{-1} AFM₁'in sırasıyla %24.16 ve %23.97'sini bağlayabilmiştir. Benzer şekilde; 4 saat inkübasyon süresi içinde AFM₁'e her iki ortamda da en düşük bağlanma yeteneği gösteren *Lb. acidophilus* NCC 68, PBS ortamında 10 ng ml^{-1} AFM₁'in %12.55'ini bağlarken, rekonstitüe süt ortamında %7.85'ini bağlayabilmiştir. Buna karşın, *Lb. rhamnosus* PBS ortamda 10 ng ml^{-1} AFM₁'in %20.53'ünü, rekonstitüe süt ortamında ise %22.14'ünü bağladığı tespit edilmiştir.

Canlı test bakterilerinin 4 saat içinde 20 ng ml^{-1} AFM₁'i fosfat tamponu ve rekonstitüe süt ortamında bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda ise; analiz edilen bakteriler arasında yalnızca *B. bifidum* Bb 13'ün 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yeteneği gıda modeli olarak kullanılan rekonstitüe sütte (24.59) PBS ortamına oranla (%24.02) daha yüksek bulunmuştur.

Canlı test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinde kullanılan üç farklı toksin konsantrasyonunda da ortam farklılığının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Test bakterilerinin PBS ve rekonstitüe süt ortamında sırasıyla 10 ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırmalı gösterimi Şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8. Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 10 ng ml^{-1} AFM₁'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.



Şekil 4.9. Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 20 ng ml^{-1} AFM₁'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

Bu konuda yapılan bir çalışmada, Pierides ve ark. (2000) canlı *Lb. rhamnosus* GG suşunun AFM₁'i bağlama yeteneğinin sütte önemli ölçüde düştüğünü saptamışlardır. Araştırmacılar *Lb. rhamnosus* GG'nin fosfat tamponunda 15-16 saat içinde AFM₁'in %50.7'sini bağladığını, buna karşın yağı azaltılmış sütte bağlama yeteneğinin %18.8'e düştüğünü saptamışlardır. Diğer yandan, *Lb. rhamnosus* LC-705 suşunun fosfat tamponunda 150 ng ml^{-1} AFM₁'i %46.3 oranında bağlarken, yağı azaltılmış sütte (37 g protein/100 g) bağlama yeteneğinin %69.6 değerlerine yükseldiğini bulmuşlardır. Bununla birlikte canlı *Lb. rhamnosus* GG ve *Lb. rhamnosus* LC-705 suşlarının sütte (25 g protein/100 g) 15-16 saat içinde AFM₁'i bağlama yeteneklerini sırasıyla %26 ve %63.6 oranlarında bulunduğunu tespit etmişlerdir. Laktik asit bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinde fosfat tamponu ve süt ortamında farklı bağlama değerlerinin görülmesinin sütte girişim faktörlerinin fazlalığından olduğu ileri sürülmektedir. Araştırmacılar, AFM₁'in test bakterileri tarafından bağlanmasında yağı azaltılmış sütte bağlanmada meydana gelen %10 oranında azalmanın çalışmada kullanılan süt örneklerinin farklı protein içeriklerine sahip olmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir. AFM₁'in sütte özellikle süt proteinlerine bağlandığını bildirmişlerdir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, süte proteolitik enzim ilave edilmesi sonucu AFM₁ miktarında, proteolitik enzim ilave

edilmemiş sütlere oranla %30.7 oranında azalma görülmüştür (Brackett ve Marth, 1982).

Bu konuda yapılan diğer bir çalışmada ise yoğurt bakterilerinin rekonstitüe sütte 10 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri fosfat tamponuna oranla artış görülmüştür. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un AFM₁'i bağlama yeteneği fosfat tamponunda %18.7 iken rekonstitüe sütte %27.56'ya yükselmiştir. Benzer şekilde *Streptococcus thermophilus* ST-36 suşunun AFM₁'i bağlama yeteneği rekonstitüe sütte %9.74 oranında artmıştır. Araştırmadan elde edilen veriler *Streptococcus thermophilus* ST-36 suşunun AFM₁'e karşı daha yüksek ilgi duyduğunu göstermiştir (Sarımehmetoğlu ve Küplülü, 2004).

8 laktik asit bakterisinin rekonstitüe sütte AFM₁'i bağlama yeteneklerinin ELISA yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada, test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinin %19.3-38.3 arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacılar analiz edilen bakterilerin AFM₁'i bağlama yeteneklerinin, rekonstitüe sütte fosfat tamponuna göre düşme eğilimi görülmesine karşın, test edilen 8 laktik asit bakterisinden yalnızca *B. longum* B1 24 suşunun AFM₁'i bağlama yeteneği rekonstitüe sütte istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). *B. bifidum* B1 24 fosfat tamponunda 100 ng ml^{-1} AFM₁'in %34.3'ünü bağlarken, rekonstitüe sütte %26.8'ini bağlayabilmiştir (Var ve Kabak, 2004).

4.1.2.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Rekonstitüe Sütte AFM₁'i Bağlama Yeteneği

Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin rekonstitüe süt ortamında 4 saat inkübasyon süresi içinde 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin Rekonstitüe Süt Ortamında 4 Saat İnkübasyon Süresi İçinde AFM₁'i Bağlama Yetenekleri.

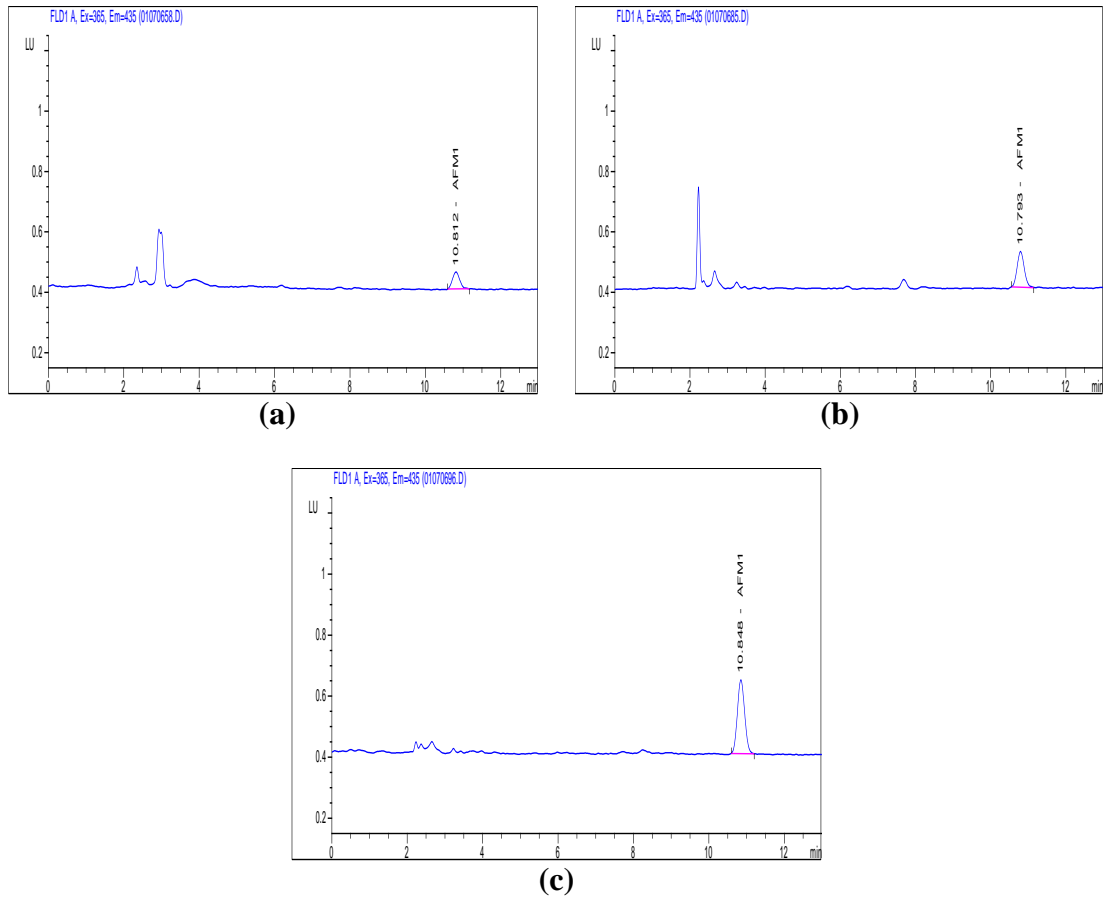
Bakteri	% bağlanan AFM ₁ (ortalama ± sD, n=3)		
	5 ng ml ⁻¹	10 ng ml ⁻¹	20 ng ml ⁻¹
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	19.02±0.77	16.60±3.42	18.96±1.35
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	23.73±2.52	24.13±4.67	25.07±7.96
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	15.36±4.28	12.85±3.09	15.92±5.51
<i>B. bifidum</i> Bb 13	25.41±4.60	25.64±3.18	27.31±1.82
<i>B. bifidum</i> NCC 381	21.36±1.91	17.12±2.64	22.24±7.77
<i>Lb. rhamnosus</i>	25.13±6.19	22.86±9.33	26.27±1.92

Çizelge 4.5'den de görülebileceği gibi ısı işleme maruz bırakılarak öldürülen test bakterilerinin 4 saat inkübasyon süresi içinde rekonstitüe sütte 5, 10 ve 20 ngml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %15.36-25.41, %12.85-25.64 ve %15.92-27.31 arasında değişiklik göstermiştir.

Öldürülen bakterilerin 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli (p<0.05) bulunmuştur. Kullanılan bakteriler arasında *B. bifidum* Bb13, 5 ng ml⁻¹ AFM₁'in %25.41'ini bağlarken, *Lb. acidophilus* NCC 68 yalnızca %15.36'sını bağlayabilmiştir. Benzer şekilde 10 ng ml⁻¹ AFM₁'in test bakterileri tarafından bağlanma değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli (p<0.05) olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, 20 ng ml⁻¹ AFM₁'in ısı işleme maruz bırakılan test bakterileri tarafından benzer oranlarda bağlandığı, bağlama değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı (p>0.05) saptanmıştır.

Öldürülen test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine toksin konsantrasyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Örneğin ısı işleme maruz bırakılan *Lb. rhamnosus* rekonstitüe süt ortamında 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i sırasıyla %25.13, %22.86 ve %26.27 oranlarında bağlama yeteneği göstermiştir.

Isıl işleme maruz bırakılan *B. bifidum* Bb 13'ün rekonstitüe sütte 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i sırasıyla %25.41, %25.64 ve %27.31 oranlarında bağlama yeteneklerini gösteren HPLC kromatogramları Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Isıl İşleme Maruz Bırakılan *B. bifidum* Bb 13'ün Rekonstitüe Sütte 4 Saat İçinde 5 ng ml^{-1} AFM₁'i %25.41 (a), 10 ng ml^{-1} AFM₁'i %25.64 (b) ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i %27.31 (c) Oranlarında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

Rekonstitüe süt ortamında 5 ve 10 ng ml^{-1} AFM₁'in test bakterileri tarafından bağlanmasında kullanılan bakterilerin canlı olup olmasının istatistiksel açıdan önemsiz olduğu ($p > 0.05$) saptanmıştır. Benzer şekilde *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* Bb13 ve *B. bifidum* NCC 381'in canlı veya ölü olmasının rekonstitüe süt ortamında 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yeteneği arasındaki fark da istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Örneğin, canlı *Lb. acidophilus* NCC 36 rekonstitüe sütte 4 saat içinde 20 ng ml^{-1} AFM₁'in %22.47'sini bağlarken, ısıl işlem kullanılarak öldürülmesi sonucu %25.07'sini bağlamıştır. Buna karşın, *Lb. acidophilus* NCC 12 ve *Lb. rhamnosus*'un rekonstitüe süt ortamında 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yeteneği, ısıl işlem ile öldürülmesi sonucu istatistiksel

olarak artış ($p < 0.05$) göstermiştir. Canlı *Lb. acidophilus* NCC 12, ortamda bulunan AFM₁'in %14.37'sini bağlarken ısıtma işlemi ile öldürülmesi sonucu %18.96'sını bağlamıştır. Benzer şekilde, canlı ve ısıtma işlemine maruz bırakılan *Lb. rhamnosus* rekonstitüe süt ortamında 20 ng ml⁻¹ AFM₁'in sırasıyla %20.41 ve %26.27'sini bağlama yeteneği göstermiştir.

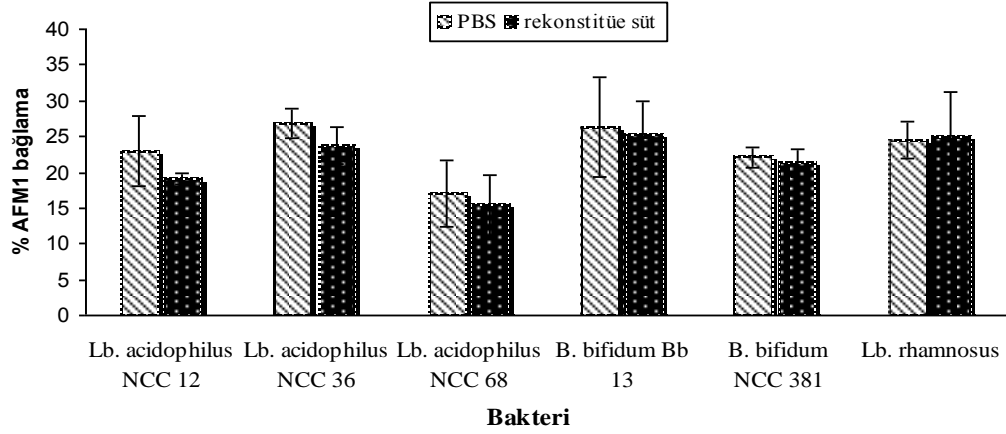
Var ve Kabak (2004), ısıtma işlemine maruz bırakılan 8 laktik asit bakterisinin rekonstitüe sütle AFM₁'i bağlama yeteneklerini ELISA yöntemiyle araştırdıkları çalışmada, test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinin %24.6-51.5 arasında değiştiğini saptamışlardır. Isıtma işlemine maruz bırakılan test bakterilerinin rekonstitüe sütle bağlama yeteneklerinde, fosfat tamponuna (%31.3-61.9) göre %3.5-10.4 arasında değişen oranlarda azalma gözlemlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca ısıtma işlem uygulamasının test bakterilerinin rekonstitüe sütle AFM₁'i bağlama yeteneklerini canlı bakterilere oranla %0.5-10 arasında değişen oranlarda artırdığını belirlemişlerdir.

Isıtma işlemine maruz bırakılarak öldürülen test bakterilerinin 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i PBS ve rekonstitüe sütle bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Test bakterileri arasında nispeten yüksek oranda bağlama yeteneği gösteren *B. bifidum* Bb 13'ün 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i 4 saat içinde, PBS ortamında %26.42, rekonstitüe süt ortamında ise %25.41 oranında bağladığı görülmüştür. Isıtma işlemine maruz bırakılan bakteriler arasında yalnızca *Lb. rhamnosus*'un 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneği rekonstitüe sütle (%25.13) PBS ortamına oranla (%24.59) daha yüksek bulunurken, farklılık istatistiksel açıdan önemsizdir ($p > 0.05$).

Isıtma işlemine maruz bırakılan test bakterilerinin 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i PBS ve rekonstitüe sütle bağlama yeteneklerinin karşılaştırmalı gösterimi Şekil 4.11'de verilmiştir.

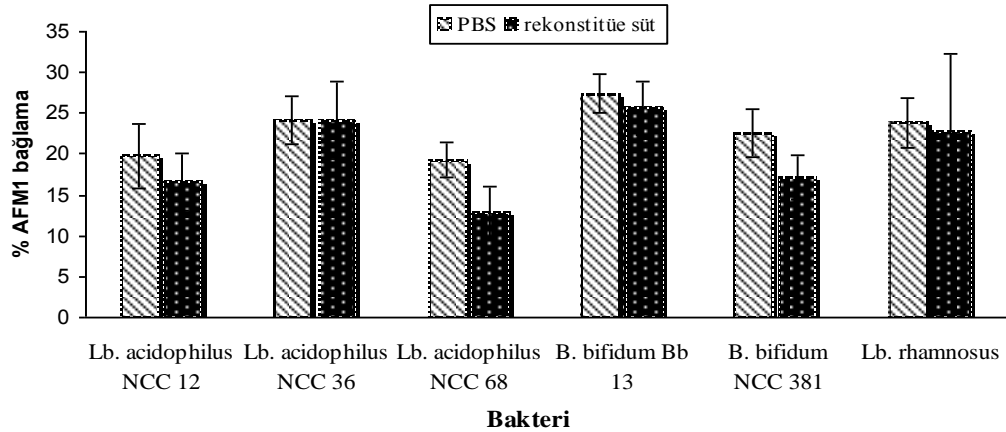
Öldürülen bakteriler arasında *Lb. acidophilus* NCC 68 hariç diğer tüm bakterilerin 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i PBS ve rekonstitüe sütle bağlama yetenekleri istatistiksel olarak farklı ($p > 0.05$) bulunmamıştır. *Lb. acidophilus* NCC 68, 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i PBS ortamında %19.29 oranında bağlarken, rekonstitüe sütle %12.85'ini bağlayabilmiştir ($p < 0.05$). 20 ng ml⁻¹ AFM₁'in öldürülen test bakterileri tarafından

bağlanmasında ortam farklılığının etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

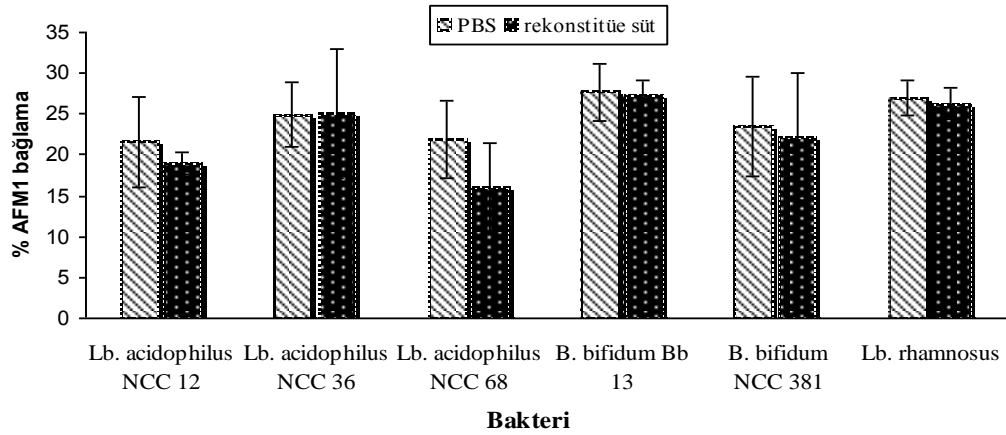


Şekil 4.11. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 5 ng ml^{-1} AFM₁'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

Isıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin 4 saat içinde PBS ve rekonstitüe sütte sırasıyla 10 ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırmalı gösterimi Şekil 4.12 ve 4.13'de yer almaktadır.



Şekil 4.12. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 10 ng ml^{-1} AFM₁'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

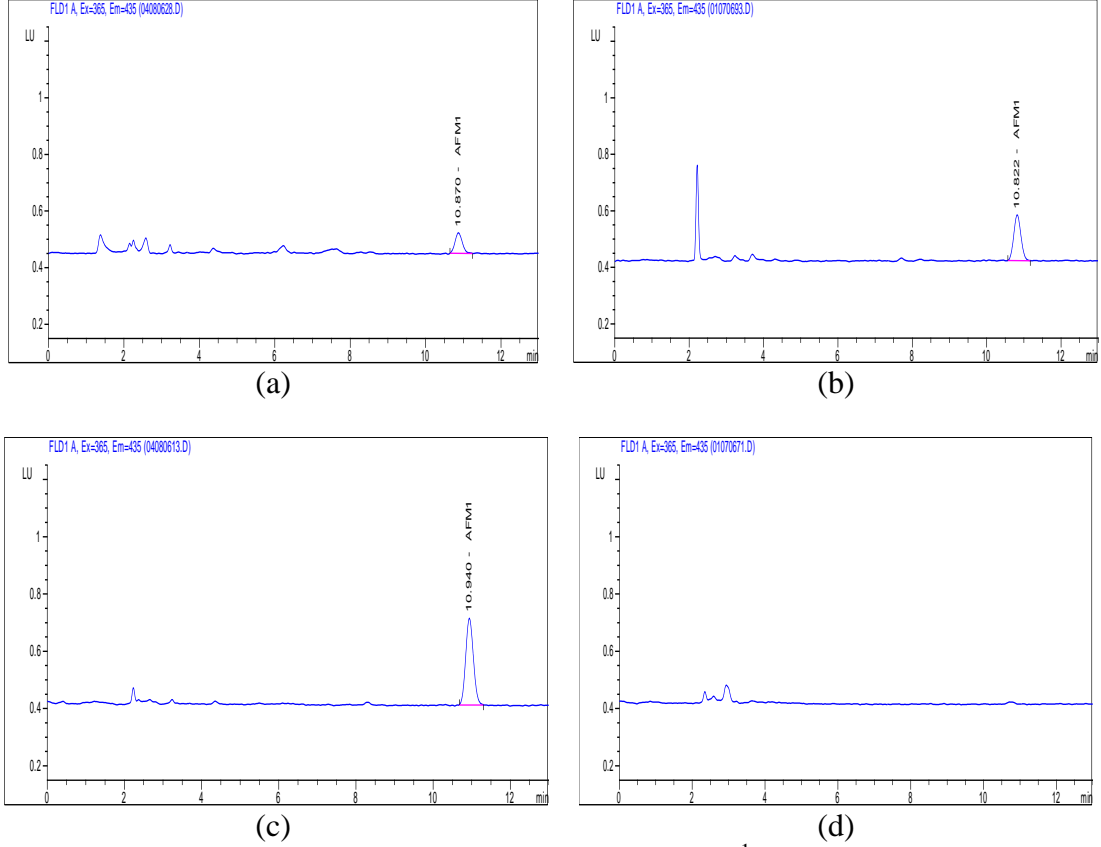


Şekil 4.13. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Rekonstitüe Sütte 20 ng ml^{-1} AFM₁'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

Test bakterilerinin rekonstitüe süt ortamında farklı konsantrasyonlardaki AFM₁'i bağlama yeteneğini bulmak ve yöntem performansını tespit etmek amacıyla AFM₁'i rekonstitüe süt ortamından geri alma oranları (pozitif kontrol) belirlenmiştir. Çizelge 4.6'dan da görülebileceği gibi $5, 10$ ve 20 ng ml^{-1} konsantrasyondaki AFM₁'in 4 saat inkübasyon süresi içinde rekonstitüe süttten sırasıyla 4.10 (%82.08), 8.12 (%81.24) ve 16.19 (%80.97)'unun geri alındığı görülmüştür. 5 ng ml^{-1} AFM₁'in geri alma oranı kullanılan diğer toksin konsantrasyonlarına göre (10 ve 20 ng ml^{-1}) daha yüksek bulunmasına karşın, AFM₁'in rekonstitüe süttten geri alınmasında toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur.

Araştırmada kullanılan $5, 10$ ve 20 ng ml^{-1} AFM₁'in rekonstitüe süttten sırasıyla %82.08, %81.24 ve %80.97 oranlarında geri alınmasıyla ilgili pozitif kontrol ve AFM₁ negatif kontrol kromatogramı Şekil 4.14'de verilmiştir.

AFM₁'in 4 saat içinde fosfat tamponu ve rekonstitüe süttten geri alma oranları karşılaştırıldığında AFM₁'in fosfat tamponundan daha yüksek oranda geri alındığı belirlenmiştir. Buna karşın, AFM₁'in geri alınmasında çalışılan tüm toksin konsantrasyonlarında ortam farklılığının etkisi istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Örneğin; fosfat tamponu ortamında 4 saat inkübasyon süresi içinde 5 ng ml^{-1} AFM₁'in geri alınma oranı %87.18, rekonstitüe sütte ise %82.08 olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.14. Rekonstitüe Sütte 5 (a), 10 (b), 20 (c) ng ml⁻¹ AFM₁'in Geri Alınmasına Ait Pozitif Kontrol ve AFM₁ Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.

Kabak ve Var (2004) *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının 100 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneklerini TLC yöntemi ile araştırdıkları çalışmada AFM₁'in geri alınma oranını %75 civarında bulmuşlardır. Araştırmacılar ayrıca, AFM₁'in geri alınmasında ortam farklılığının önemli bir etkisi olduğunu, geri alma değerlerinde rekonstitüe sütte fosfat tamponuna göre azalma meydana geldiğini ve bunun da AFM₁'in süt proteinlerine bağlanmış olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Var ve Kabak (2004), ELISA yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, AFM₁'in rekonstitüe süttten geri alma oranını %92 olarak bulmuşlardır. Kaniou-Grigoriadou ve ark. (2004), 10 ng l⁻¹ AFM₁'i süttten geri alma oranını ELISA yöntemiyle %93 olarak bulmuşlardır.

Martins ve Martins (2000), 0.05-0.20 $\mu\text{g l}^{-1}$ AFM₁ ile kontamine edilen sütlerden AFM₁'in geri alma oranını HPLC yöntemiyle ortalama %97 olarak bulmuşlardır. Srivastava ve ark. (2001), immunoaffinity kolon ve HPLC cihazı kullandıkları çalışmada 0.1 ng ml⁻¹ AFM₁'i süt ortamından geri alma oranlarını %79.42-93.67 arasında bulmuşlardır. Roussi ve ark. (2002), Yunanistanda marketlerde satılan sütlerde AFM₁ kontaminasyon seviyesini HPLC yöntemiyle belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 50 ng l⁻¹ AFM₁'in sütlerden geri alma oranını %91 olarak bulmuşlardır.

4.1.2.3. Rekonstitüe Sütte Bakteri-AFM₁ Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi

Rekonstitüe süt ortamında bakteri-AFM₁ kompleksi stabilitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan ön denemelerde toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin önemli bir etkisinin görülmemesi nedeniyle, bakteri-AFM₁ stabilitesinin araştırılmasında toksin konsantrasyonu olarak 5 ng ml⁻¹ ve inkübasyon süresi olarak 4 saat kullanılmıştır.

Test bakterilerinin (10^8 kob ml⁻¹) rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i geri dönüşümlü olarak bağlayıp bağlamadığını tespit etmek amacıyla, AFM₁'in (5 ngml⁻¹) test bakterileri tarafından 4 saat inkübasyon süresince bağlandıktan sonra, serbest kalarak tekrar rekonstitüe süte geçme eğilimleri belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin rekonstitüe süt ortamında 5 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki AFM₁'i bağlama yetenekleri ve bakterilerin rekonstitüe süt ile yıkanması sonucu serbest kalan AFM₁ oranları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Canlı *Lb. acidophilus* NCC 36 (10^8 kob ml⁻¹)'nin rekonstitüe süt ortamında 4 saat içinde 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i %22.70 oranında bağlama yeteneğine ve bakterilerin 5 ml rekonstitüe süt çözeltisi ile (AFM₁) içermeyen yıkanması sonucu serbest kalarak tekrar rekonstitüe süte geçen (tespit edilemedi) AFM₁'e ait HPLC kromatogramları Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

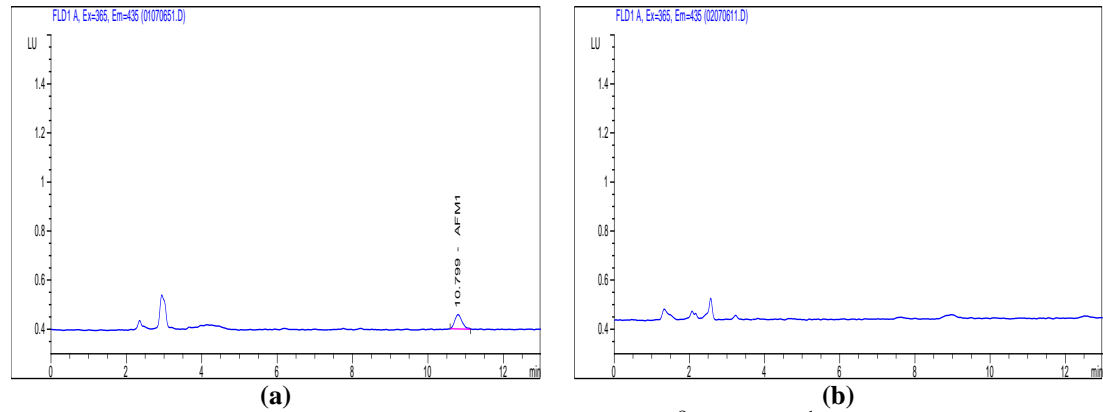
Çizelge 4.6. Rekonstitüe Süt Ortamında Canlı Test Bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 4 Saat İçinde Bağladığı AFM₁'in (5 ng ml^{-1}) Tekrar Rekonstitüe Süte Geçme Oranları.

Bakteri	% bağlanan AFM ₁ (ortalama±sD, n=3) ^a	Rekonstitüe süte geçen % AFM ₁ (ortalama±sD, n=3) ^b
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	15.44±4.66	<LOD ^c
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	22.70±3.36	<LOD
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	9.55±3.60	<LOD
<i>B. bifidum</i> Bb13	25.94±6.48	<LOD
<i>B. bifidum</i> NCC 381	15.95±3.17	<LOD
<i>Lb. rhamnosus</i>	21.74±3.56	<LOD

^a 10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml^{-1} AFM₁ ile 24 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları % AFM₁ oranı.

^b 10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml^{-1} AFM₁ ile 24 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları AFM₁'in 5 ml PBS (AFM₁ içermeyen) ile yıkanması sonucu serbest kalarak fosfat tamponuna geçen % AFM₁ oranı.

^cLOD : Tespit limiti, 0.01 ng ml^{-1}



Şekil 4.15.Canlı *Lb. acidophilus* NCC 36'nın (10^8 kob ml^{-1}) Rekonstitüe Sütte 4 Saatte 5 ng ml^{-1} AFM₁'i %22.70 Oranında Bağlama Yeteneğine (a) ve Hücrelerin 5 ml Rekonstitüe Süt İle Yıkanması Sonucu (b) Serbest Kalan AFM₁ Oranına (tespit edilemedi) Ait HPLC Kromatogramları.

Çizelge 4.8'in incelenmesiyle de görülebileceği gibi rekonstitüe süt ortamında test bakterilerinin AFM₁'i geri dönüşümsüz olarak bağladığı belirlenmiştir. Test bakterileri tarafından bağlanan AFM₁'in geri dönüşüm oranları üzerine ortam farklılığının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Test bakterileri fosfat tamponunda bağladıkları AFM₁'in %5.62-8.54'ünü kaybederken, rekonstitüe süt ortamında geri dönüşümsüz olarak bağladığı belirlenmiştir. Bununla birlikte,

literatürde de (Pierides ve ark., 2000) belirtildiği üzere bir kısım AFM₁'in süt proteinlerine bağlanmış olabileceği de düşünülmektedir.

4.2. Test Bakterilerinin OTA'yı Bağlama Yetenekleri

Araştırma kapsamında, AFM₁ gibi muhtemel kanserojen bir mikotoksin olan OTA'nın canlı ve ısıl işleme maruz bırakılan test bakterileri tarafından bağlanma yetenekleri fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında belirlenmiştir.

4.2.1. Test Bakterilerinin Fosfat Tamponunda OTA'yı Bağlama Yeteneği

4.2.1.1. Canlı Test Bakterilerinin Fosfat Tamponunda OTA'yı Bağlama Yeteneği

Araştırmada kullanılan 10⁸ ve 10⁷ kob ml⁻¹ yoğunluğundaki *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* Bb 13, *B. bifidum* NCC 381 ve *Lb. rhamnosus*'un fosfat tamponu ortamında 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelge 4.7'nin incelenmesiyle de görülebileceği gibi test bakterilerinin (10⁸ kob ml⁻¹) toksin konsantrasyonuna, kullanılan suşa ve inkübasyon süresine bağlı olarak belirli oranda OTA'yı bağlama yeteneği gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Canlı Test bakterilerinin (10^8 ve 10^7 kob ml^{-1}) PBS Ortamında OTA'yı Bağlama Yetenekleri.

Bakteri	Yoğunluk (kob ml^{-1})	% bağlanan OTA (ortalama±sD, n=3)											
		5 ng ml^{-1} OTA				10 ng ml^{-1} OTA				20 ng ml^{-1} OTA			
		Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat
<i>Lb. acidophilus</i> NCC12	10^8	17.90±4.03	15.90±3.14	16.46±1.15	13.70±2.45	11.60±1.04	12.43±4.22	18.06±4.67	13.70±3.18	17.34±1.50	13.70±3.18	17.34±1.50	
	10^7	2.50±2.23	0.40±0.69	3.30±2.88	2.34±0.75	ND	ND	3.64±1.29	ND	2.03±0.60	ND	2.03±0.60	
<i>Lb. acidophilus</i> NCC36	10^8	18.20±3.20	15.97±3.09	12.53±3.52	11.97±4.02	11.77±3.59	13.94±2.83	13.17±6.22	10.88±3.20	9.50±3.48	10.88±3.20	9.50±3.48	
	10^7	1.04±1.79	0.70±1.21	ND	1.80±1.57	2.13±2.15	ND	3.57±1.59	ND	ND	ND	ND	
<i>Lb. acidophilus</i> NCC68	10^8	8.66±3.72	10.34±3.62	10.10±2.00	11.64±5.36	9.60±2.98	9.70±0.40	13.27±3.31	14.00±3.38	16.44±1.47	14.00±3.38	16.44±1.47	
	10^7	1.20±1.66	ND	1.14±1.05	1.77±1.63	1.07±1.85	0.40±0.69	0.70±1.21	ND	ND	ND	ND	
<i>B. bifidum</i> Bb13	10^8	8.40±3.57	6.60±2.74	7.06±0.75	6.10±2.69	5.86±3.47	5.84±2.81	8.11±5.07	4.43±3.86	6.00±1.57	4.43±3.86	6.00±1.57	
	10^7	ND	1.17±1.15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
<i>B. bifidum</i> NCC 381	10^8	14.33±4.41	12.80±1.97	12.60±3.37	11.17±2.98	11.06±1.12	13.30±4.27	13.53±3.20	12.44±2.67	11.91±3.44	12.44±2.67	11.91±3.44	
	10^7	ND	ND	0.70±1.21	ND	0.70±1.21	1.13±1.10	ND	ND	2.13±2.15	ND	2.13±2.15	
<i>Lb. rhamnosus</i>	10^8	20.71±2.69	16.67±2.99	18.26±5.74	16.53±3.39	12.43±1.79	14.20±3.14	16.37±4.97	16.27±3.12	13.67±2.63	16.27±3.12	13.67±2.63	
	10^7	3.93±2.15	3.47±1.71	1.40±2.43	2.16±2.70	0.77±0.75	2.14±2.15	ND	3.90±1.44	ND	3.90±1.44	ND	
Geri Alma (%)		88.72±1.24	88.81±2.87	89.91±2.09	88.34±2.27	88.28±0.35	88.13±0.72	89.85±1.98	89.87±0.86	89.13±4.98	89.87±0.86	89.13±4.98	

ND: Tespit edilemedi (%0)

10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin fosfat tamponu ortamında toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak OTA'yı %4.43 ile %20.71 arasında değişen oranlarda bağlama yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. *Lb. rhamnosus*'un (10^8 kob ml^{-1}) diğer test bakterilerine oranla daha yüksek oranda OTA bağlama yeteneği gösterdiği, *B. bifidum* Bb 13'ün ise nispeten düşük bağlama yeteneğinde olduğu saptanmıştır.

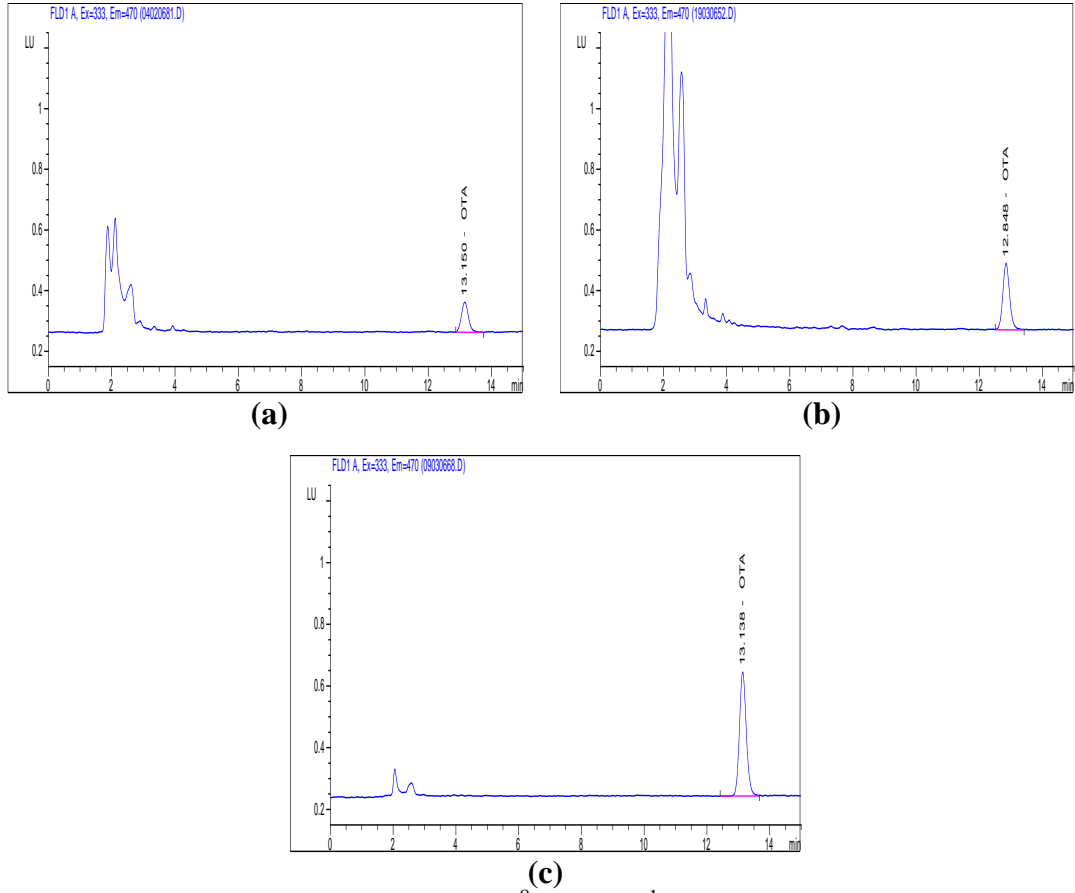
Test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponunda bulunan 5 ng ml^{-1} konsantrasyonundaki OTA'yı bağlama yetenekleri başlangıçta %8.40-20.71 arasında değişiklik göstermiştir. Test edilen bakteriler arasında *Lb. acidophilus* NCC 68 ve *B. bifidum* Bb 13, fosfat tamponunda diğer test bakterilerine oranla istatistiksel olarak daha düşük oranda OTA bağlama yeteneği göstermiştir ($p < 0.05$). 4 saat inkübasyon süresi içinde test bakterilerinin (10^8 kob g^{-1}) fosfat tamponu çözeltisinde 5 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yetenekleri %6.60-16.67 ($p < 0.05$), 24. saatte ise %7.06-18.26 ($p < 0.05$) arasında bulunmuştur.

Araştırmada kullanılan bakterilerin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponunda, 10 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yetenekleri başlangıçta %6.10-16.53, 4. saatte %5.86-12.43 ve 24. saatte %5.84-14.20 arasında değişiklik göstermiştir. Test bakterilerinin 10 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yetenekleri arasındaki farklılık her üç inkübasyon periyodunda da (başlangıç, 4 ve 24 saat) istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur.

Diğer yandan, test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yetenekleri başlangıçta %8.11-18.06 arasında olup, farklılık istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunurken, 4. saatte %4.43-16.27 arasında ($p < 0.05$), 24. saatte ise %6.00-17.34 ($p < 0.05$) arasında değişiklik göstermiştir.

Şekil 4.16'da canlı *Lb. rhamnosus* (10^8 kob ml^{-1})'un 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} OTA'yı başlangıçta sırasıyla %20.71, %16.53 ve %16.37 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları gösterilmiştir.

Elde edilen verilerden de görülebileceği gibi test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında OTA'yı başlangıç ve 4 saat içinde bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur.



Şekil 4.16. Canlı *Lb. rhamnosus*'un (10^8 kob ml^{-1}) PBS'de Başlangıçta 5 ng ml^{-1} OTA'yı %20.71 (a), 10 ng ml^{-1} OTA'yı %16.53 (b) ve 20 ng ml^{-1} OTA'yı %16.37 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

Benzer şekilde, *Lb. acidophilus* NCC 68 hariç diğer bakterilerin OTA'yı 24 saat içinde bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisinin istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) olduğu görülmüştür. *Lb. acidophilus* NCC 68 fosfat tamponu ortamında 24 saat içinde 20 ng ml^{-1} OTA'yı (%16.44), 5 ve 10 ng ml^{-1} OTA'ya göre (sırasıyla %10.10 ve %9.70) istatistiksel olarak daha yüksek oranda bağlamıştır ($p<0.05$). Diğer yandan, inkübasyon süresinin test bakterilerinin OTA'yı ($5, 10$ ve 20 ng ml^{-1}) bağlama yetenekleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

Canlı test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında OTA ve AFM_1 'i bağlama yetenekleri arasında inkübasyon süresi ve toksin konsantrasyonuna

bağlı olarak farklılıklar bulunmuştur. Bununla birlikte genelde test bakterilerinin AFM₁'i daha yüksek oranda bağlama yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. Test bakterileri arasında *B. bifidum* Bb 13, fosfat tamponu ortamında başlangıçta 5 ng ml⁻¹ OTA'yı %8.40 oranında bağlarken, aynı konsantrasyondaki AFM₁'i %23.48 oranında bağlama yeteneği göstermiştir. Fosfat tamponu ortamında toksin (5 ngml⁻¹) bakteri inkübasyon süresinin 4 saat uygulanması durumunda kullanılan tüm bakterilerin AFM₁'i OTA'ya oranla daha yüksek oranda bağlamasına karşın, yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *B. bifidum* Bb 13'ün söz konusu iki toksini bağlama yetenekleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu (p<0.05) bulunmuştur. Benzer şekilde, fosfat tamponunda 24 saat içinde *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *B. bifidum* Bb 13'ün 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i OTA'ya göre daha yüksek oranda bağladığı istatistiksel olarak da saptanmıştır (p<0.05).

Toksin konsantrasyonunun 10 ng ml⁻¹ olarak kullanılması durumunda başlangıçta *B. bifidum* Bb 13'ün AFM₁'i (%26.62) OTA'ya (%6.10) göre istatistiksel olarak daha yüksek oranda bağladığı görülürken diğer bakterilerin AFM₁ ve OTA'yı başlangıçta bağlama yeteneklerinin istatistiksel olarak farklı olmadığı (p>0.05) tespit edilmiştir. Toksin-bakteri inkübasyon süresinin 4 saat olması durumunda ise test bakterileri arasında *B. bifidum* Bb 13, *B. bifidum* NCC 381 ve *Lb. rhamnosus*'un fosfat tamponunda AFM₁'i OTA'ya göre istatistiksel olarak daha yüksek oranda bağladığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, test edilen tüm canlı bakterilerin 24 saat içinde AFM₁'i OTA'ya göre daha yüksek oranda bağlamasına karşın yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 36, *B. bifidum* Bb 13 ve *Lb. rhamnosus*'un iki toksini bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak farklı (p<0.05) bulunmuştur.

Test bakterileri arasında *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *B. bifidum* Bb 13'ün başlangıçta ve 4 saat içinde fosfat tamponunda bulunan 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonlarındaki AFM₁ ve OTA'yı bağlama yetenekleri istatistiksel olarak farklı (p<0.05) bulunmuştur. *Lb. acidophilus* NCC 36 fosfat tamponunda başlangıçta OTA ve AFM₁'i sırasıyla %13.17 ve %24.78 oranında bağlamıştır. Benzer şekilde, *Lb. acidophilus* NCC 36'un, 4 saat içinde fosfat tamponunda bulunan 20 ng ml⁻¹ OTA'nın %10.88'ini, AFM₁'in ise %22.99'unu bağlama yeteneği gösterdiği saptanmıştır. Fosfat tamponunda 24 saat içinde *Lb. acidophilus* NCC 36, *B. bifidum*

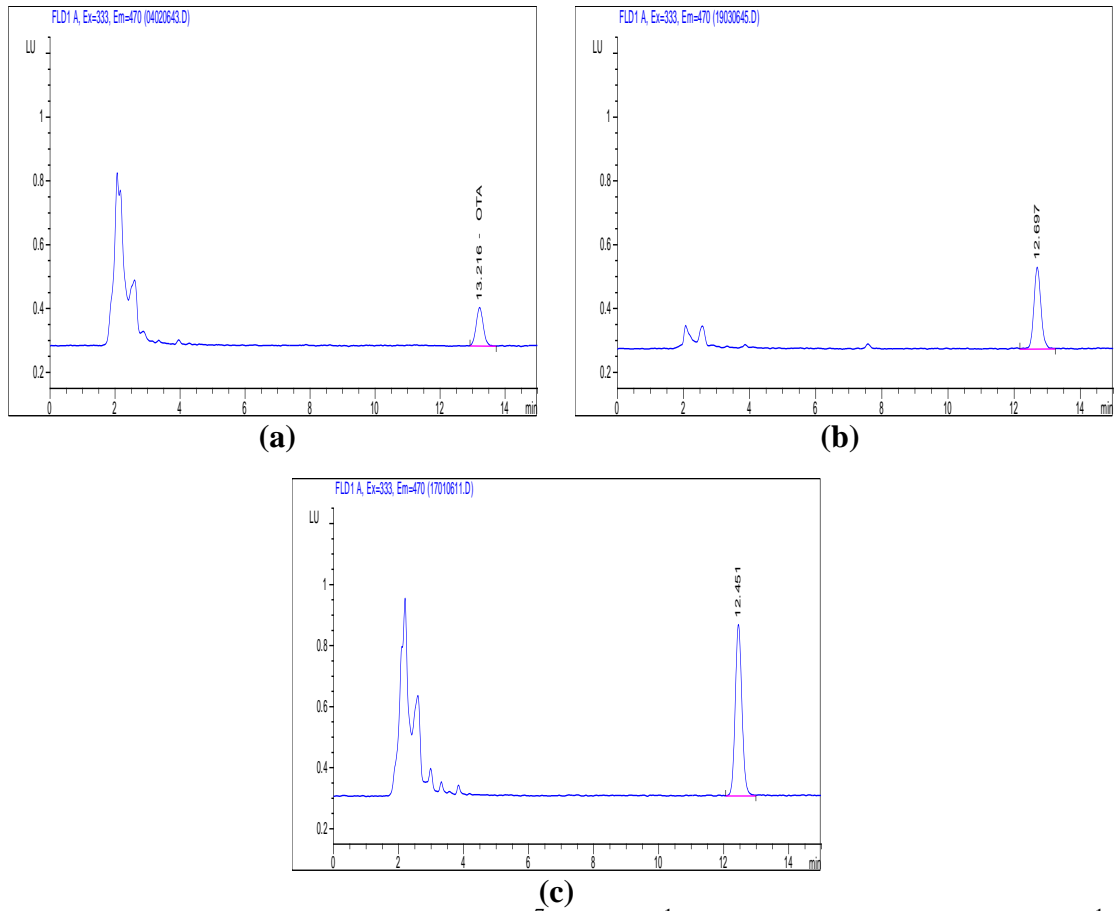
Bb 13, *Lb. rhamnosus*'un 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i OTA'ya göre istatistiksel olarak daha yüksek oranda bağladığı tespit edilmiştir.

Test bakterilerinin 10⁷ kob ml⁻¹ yoğunluğunda kullanılması durumunda fosfat tamponunda OTA'yı bağlama yetenekleri önemli miktarda düşme eğilimi göstermiştir (Çizelge 4.7). Bakterilerin (10⁷ kob ml⁻¹) fosfat tamponu ortamında OTA'yı bağlama yeteneklerinin, kullanılan suşa, toksin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak %0-3.93 arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır.

Bakterilerin (10⁷ kob ml⁻¹) PBS ortamında 5 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri başlangıçta %0-3.93 arasında, 4. saatte %0-3.47 ve 24. saatte %0-3.30 arasında değişiklik göstermiştir. Test bakterilerinin fosfat tamponunda 10 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri arasındaki farklılık uygulanan her üç inkübasyon süresinde de istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Diğer yandan, bakterilerin (10⁷ kob g⁻¹) 20 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri başlangıçta %0-3.64, 4. saatte %0-3.90 ve 24. saatte %0-2.13 arasında bulunmuştur.

Şekil 4.17'de canlı *Lb. rhamnosus* (10⁷ kob ml⁻¹)'un 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı başlangıçta sırasıyla %3.90, %2.16 ve %0 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları yer almaktadır.

Test bakterilerinin fosfat tamponu ortamında farklı konsantrasyonlardaki OTA'yı bağlama yeteneklerinde bakteri yoğunluğunun önemli bir etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. Kullanılan bakteri yoğunluğu 1 logaritma azalma gösterdiğinde, bağlanan OTA miktarının istatistiksel olarak önemli oranda düşüş gösterdiği (p<0.05) belirlenirken, bazı durumlarda 10⁷ kob ml⁻¹ bakterinin OTA'yı bağlayamadığı tespit edilmiştir. Fosfat tamponu ortamında OTA'yı nispeten yüksek oranda bağlama yeteneği gösteren *Lb. rhamnosus*'un 10⁸ kob g⁻¹ yoğunluğunda kullanılması durumunda 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı 4 saat inkübasyon süresi içinde sırasıyla %16.67, %12.43 ve %16.27 oranında bağlarken, kullanılan bakteri yoğunluğunun 10⁷ kob ml⁻¹ olması durumunda OTA'yı bağlama oranları sırasıyla %3.47, %0.77 ve %3.90 değerlerine düşmüştür.



Şekil 4.17. Canlı *Lb. rhamnosus*'un (10^7 kob ml^{-1}) PBS'de Başlangıçta 5 ng ml^{-1} OTA'yı %3.90 (a), 10 ng ml^{-1} OTA'yı %2.16 (b) ve 20 ng ml^{-1} OTA'yı %0.00 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

10^7 kob g^{-1} yoğunluğunda kullanılan test bakterilerinin başlangıç, 4 ve 24 saat içinde OTA'yı bağlamasında kullanılan OTA konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur.

Benzer şekilde, test bakterilerinin 5 ve 10 ng ml^{-1} OTA'yı bağlamasında inkübasyon süresinin etkisi de istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Diğer yandan, *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus*'un 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlamasında inkübasyon süresinin etkisi istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. Örneğin *Lb. acidophilus* NCC 36 fosfat tamponunda 5 ng ml^{-1} OTA'yı başlangıçta %3.57 oranında bağlarken, 4 ve 24 saat içinde bağlama yeteneği gösterememiştir ($p < 0.05$).

Bu araştırmadan ve literatürden elde edilen bilgilerden de görülebileceği gibi, laktik asit bakterilerinin AFM₁, OTA ve diğer toksinleri bağlama yeteneklerinde, kullanılan bakteri türü, toksin konsantrasyonu, bakteri yoğunluğu, bakteri-toksin inkübasyon süresi ve uygulanan analiz yönteminin önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir. Peltonen ve ark. (2001) bazı *Lactobacillus* suşlarının fosfat tamponunda AFB₁'i bağlama yeteneklerini araştırdıkları çalışmada, inkübasyon süresinin etkisini istatistiksel olarak önemli bulmuşlardır. *Lb. amylovorus* CSCC 5160 suşunun 0, 24, 48 ve 72 saat içinde AFB₁'i bağlama yeteneklerini sırasıyla %52.6, %59.7, %68.6 ve %73.2 oranında bulmuşlardır. Benzer şekilde *Lb. rhamnosus* LC 1/3'ün 0, 24, 48 ve 72 saat içinde AFB₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %76.9, %54.6, %57.9 ve %56.6 oranında bulunmuştur.

Bu araştırma ve bu konuda yapılan diğer çalışmalar laktik asit bakterilerinin mikotoksinleri bağlamasında kullanılan bakteri yoğunluğunun mikotoksin türü açısından önemli olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada canlı laktik asit bakterilerinin OTA ve AFM₁'i ve belirli oranda bağlama yeteneği gösterebilmesi için ortamda minimum olarak 10⁸ kob g⁻¹ veya ml⁻¹ ya da daha yüksek oranda bulunması gerektiği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Bu konuda El-Nezami ve ark. (1998a) tarafından yapılan bir çalışmada, AFB₁'in laktik asit bakterileri tarafından yüksek oranda bağlanabilmesi için ortamda minimum 2x10⁹ kob ml⁻¹ yoğunluğunda bulunması gerektiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, El-Nezami ve ark. (2002a) laktik asit bakterilerinin trikotesenleri bağlayabilmesi için bakteri yoğunluğunun ortamda minimum 10⁹ kob ml⁻¹ olması gerektiğini bildirmişlerdir.

4.2.1.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Fosfat Tamponunda OTA'yı Bağlama Yeteneği

Araştırmada kullanılan bakterilerin fosfat tamponunda OTA'yı bağlama yetenekleri üzerine canlı olup olmamalarının etkisini belirlemek amacıyla 10⁸ kob ml⁻¹ bakteri içeren kültürler 90°C'de 15 dakika su banyosunda ısıl işleme maruz bırakılmıştır. Isıl işleme maruz bırakılarak öldürülen bakterilerin fosfat tamponu ortamında farklı inkübasyon sürelerinde (başlangıç, 4 ve 24 saat) 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹

OTA'yı bağlama yetenekleri Çizelge 4.8'de özetlenmiştir. Isıl işlem ile öldürülen bakteri hücrelerinin fosfat tamponunda OTA'yı bağlama yetenekleri kullanılan suşa, toksin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak %9.60-25.17 arasında bulunmuştur.

Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin fosfat tamponunda 5 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri başlangıçta %10.40-23.67 arasında olup test bakterileri arasında *B. bifidum* Bb 13 nispeten düşük oranda (p<0.05) bağlama yeteneği göstermiştir. Isıl işlem ile öldürülen bakterilerin 5 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri 4. saatte %10.00-18.73, 24. saatte ise %9.94-20.97 arasında olup, her iki inkübasyon periyodunda da (4 ve 24 saat) test bakterileri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Şekil 4.18 (a)'de ısıl işleme maruz bırakılan *Lb. rhamnosus*'un fosfat tamponunda 5 ng ml⁻¹ OTA'yı başlangıçta %23.67 oranında bağlama yeteneğine ait HPLC kromatogramı gösterilmiştir.

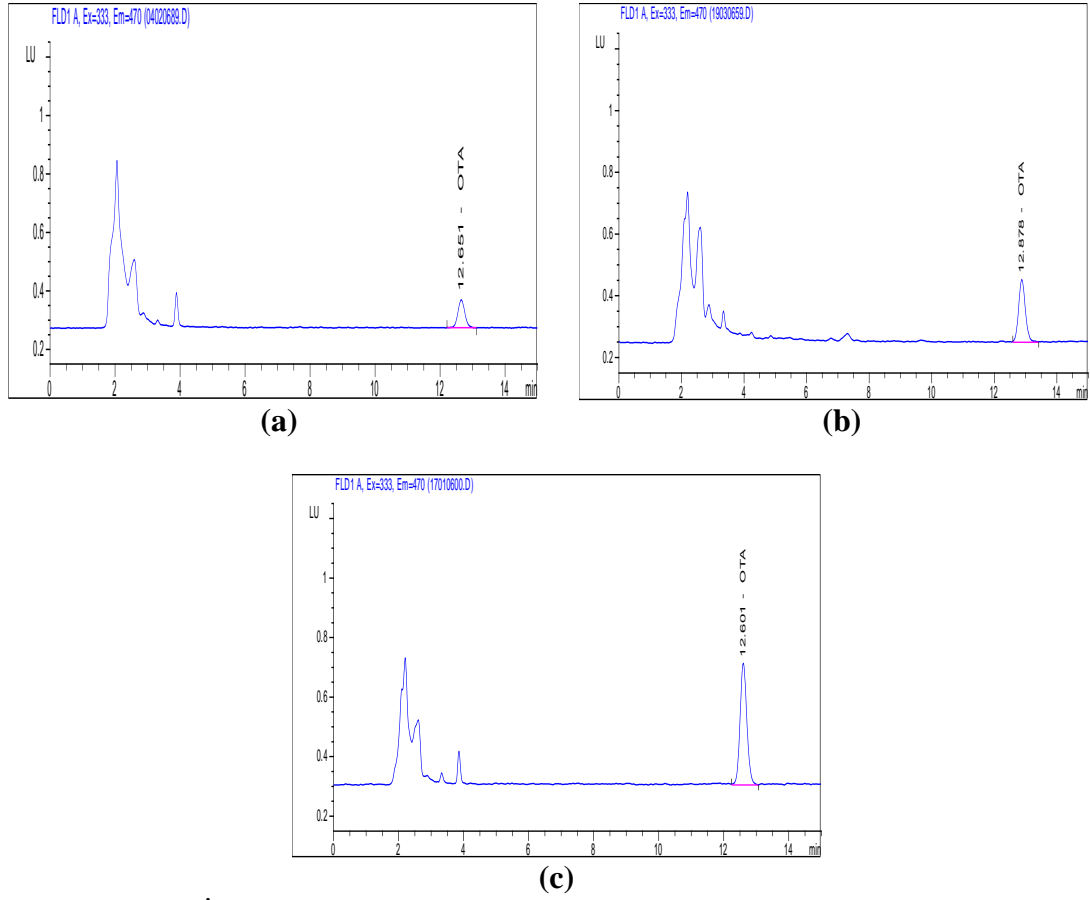
Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin 10 ng ml⁻¹ OTA'yı fosfat tamponu ortamında bağlama yetenekleri başlangıçta %10.50-24.43, 4. saatte %9.80-20.40 ve 24. saatte %10.20-24.24 arasında bulunmuştur. Uygulanan tüm inkübasyon sürelerinde (başlangıç, 4 ve 24 saat) test bakterilerinin fosfat tamponunda OTA'yı bağlama değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bulunurken, en yüksek bağlanma yeteneğini *Lb. rhamnosus* göstermiştir.

Benzer şekilde ısıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin 20 ng ml⁻¹ OTA'yı fosfat tamponu ortamında bağlama yetenekleri başlangıçta %10.84-25.17, 4. saatte %9.60-22.66 ve 24. saatte %11.27-24.10 arasında olduğu saptanmıştır. Isıl işlem ile öldürülen bakterilerin 20 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri arasındaki fark başlangıçta ve 4. saatte istatistiksel olarak önemliyken (p<0.05), 24. saatte önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Isıl işleme maruz bırakılan *Lb. rhamnosus*'un 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı başlangıçta sırasıyla %24.43 ve %25.17 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 4.18 (b) ve Şekil 4.18 (c)'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin PBS Ortamında OTA'yı Bağlama Yetenekleri.

Bakteri	% bağlanan OTA (ort ± sD, n=3)											
	5 ng ml ⁻¹ OTA				10 ng ml ⁻¹ OTA				20 ng ml ⁻¹ OTA			
	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat	Başlangıç	4 saat	24 saat
<i>Lb. acidophilus</i> NCC12	19.43±5.09	17.26±1.85	20.60±7.79	20.26±3.39	18.84±4.78	18.17±2.67	22.90±1.48	22.66±4.04	24.10±3.82			
<i>Lb. acidophilus</i> NCC36	18.60±1.65	16.57±3.42	20.97±7.55	13.17±5.77	9.80±1.67	13.66±3.65	18.44±2.49	21.44±1.33	16.83±4.26			
<i>Lb. acidophilus</i> NCC68	20.34±2.68	18.77±2.45	16.60±2.34	14.29±3.32	14.27±4.27	13.46±2.66	14.73±4.82	17.13±1.12	17.23±5.64			
<i>B. bifidum</i> Bb13	10.40±4.40	10.00±2.91	9.94±3.00	10.50±4.33	10.26±0.55	10.20±5.64	10.84±3.10	9.60±1.71	11.27±5.27			
<i>B. bifidum</i> NCC 381	17.80±3.73	17.00±4.56	20.57±3.91	15.33±3.93	14.97±6.13	18.83±2.89	21.30±1.56	16.84±4.37	18.74±2.93			
<i>Lb. rhamnosus</i>	23.67±4.18	18.73±4.94	20.53±4.39	24.43±4.10	20.40±4.78	24.24±4.00	25.17±5.09	20.63±4.18	20.48±6.73			



Şekil 4.18. Isıl İşleme Maruz Bırakılan *Lb. rhamnosus*'un PBS'de Başlangıçta 5 ng ml⁻¹ OTA'yı %23.67 (a), 10 ng ml⁻¹ OTA'yı %24.43 (b) ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı %25.17 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin başlangıç ve 24 saat içinde OTA'yı bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. 4 saat inkübasyon süresi içinde de *Lb. acidophilus* NCC 36 hariç ($p<0.05$) diğer ısı ile öldürülen bakterilerin OTA'yı bağlama yetenekleri üzerine toksin konsantrasyonunun etkisinin önemli olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır. Isıl işleme maruz bırakılan *Lb. acidophilus* NCC 36 fosfat tamponu ortamında 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı sırasıyla %16.57, %9.80 ve %21.44 oranlarında bağlamıştır ($p<0.05$).

Diğer yandan, ısıtılma maruz bırakılan tüm bakterilerin fosfat tamponu ortamında 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri üzerine inkübasyon süresinin etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Canlı ve ısıtılma maruz bırakılarak öldürülen test bakterilerinin OTA'yı fosfat tamponunda bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda genel olarak ısıtılma işlemi ile öldürülen test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinde artış görülmüştür. Canlı *Lb. acidophilus* 68 suşunun 5 ng ml⁻¹ OTA'yı başlangıçta, 4 ve 24 saat inkübasyon süresi içinde bağlama yeteneği sırasıyla %8.66, %10.34 ve %10.10 iken, ısıtılma işlemi ile öldürülen *Lb. acidophilus* NCC 68 OTA'yı sırasıyla %20.34, %18.77 ve %16.60 oranlarında bağlamıştır. Canlı ve ısıtılma maruz bırakılarak öldürülen *Lb. acidophilus* NCC 68'in 5 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri arasındaki farkın uygulanan tüm inkübasyon sürelerinde istatistiksel açıdan önemli olduğu (p<0.05) görülmüştür. Buna karşın diğer test bakterilerinin canlı veya ölü olmasının 5 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenekleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Benzer şekilde, test bakterilerinin başlangıçta ve 4 saat inkübasyon süresi içinde 10 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yeteneklerinde, canlı veya ölü olmasının istatistiksel olarak önemsiz olduğu (p>0.05) görülmüştür. Diğer yandan, canlı ve ölü *Lb. rhamnosus*'un fosfat tamponunda 10 ng ml⁻¹ OTA'yı 24 saat inkübasyon süresi içinde sırasıyla %14.20 ve %24.24 oranında bağladığı ve bağlama yetenekleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli (p<0.05) olduğu saptanmıştır.

Test bakterileri arasında *B. bifidum* NCC 381'in 20 ng ml⁻¹ OTA'yı başlangıçta bağlama yeteneklerinde, canlı veya ölü olmasının istatistiksel olarak önemli (p<0.05) olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, *Lb. acidophilus* NCC 12 ve *Lb. acidophilus* NCC 36'un ısıtılma işlemi kullanılarak öldürülmesi sonucu 20 ng ml⁻¹ OTA'yı 4 saat içinde bağlama yetenekleri istatistiksel olarak artış göstermiştir (p<0.05). *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* BB 13, *B. bifidum* NCC 381 ve *Lb. rhamnosus*'un ise 20 ng ml⁻¹ OTA'yı 4 saat içinde bağlama yeteneklerinde canlı veya ölü olmalarının istatistiksel olarak önemli olmadığı (p>0.05) saptanmıştır. Bakteri-OTA inkübasyon süresinin 24 saat olması durumunda ise test bakterileri arasında yalnızca

Lb. acidophilus NCC 12'nin ısıtma işlemi ile öldürülmesi sonucu 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yeteneği istatistiksel olarak artış göstermiştir ($p < 0.05$). Canlı ve ölü *Lb. acidophilus* NCC 12 fosfat tamponu ortamında 20 ng ml^{-1} OTA'yı 24 saat inkübasyon süresi içinde sırasıyla %17.34 ve %24.10 oranında bağlamıştır.

Isıtma işlemine maruz bırakılan bakteriler arasında *B. bifidum* Bb 13'ün fosfat tamponunda başlangıçta ve 24 saat içinde AFM_1 'i (5 ng ml^{-1}) bağlama yeteneği OTA'ya (5 ng ml^{-1}) göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Isıtma işlemine maruz bırakılan *B. bifidum* Bb 13 fosfat tamponunda başlangıçta 5 ng ml^{-1} OTA'nın %10.40'ını bağlarken, AFM_1 'in %27.74'ünü bağlama yeteneği göstermiştir. Isıtma işlemi ile inaktive edilmiş bakteriler arasında *Lb. acidophilus* NCC 68'in fosfat tamponunda 4 saat içinde 5 ng ml^{-1} OTA'yı (%18.77) bağlama yeteneği AFM_1 'e (%16.98) oranla daha yüksek bulunurken, diğer bakterilerin AFM_1 'i daha yüksek oranda bağladığı tespit edilmiştir. Isıtma işlemine maruz bırakılan bakteriler arasında *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *B. bifidum* Bb 13'ün fosfat tamponunda 4 saat içinde 5 ng ml^{-1} AFM_1 'i bağlama yetenekleri OTA'ya göre daha yüksek bulunmuştur. Isıtma işlemi ile öldürülen *Lb. acidophilus* NCC 36, 4 saat içinde fosfat tamponunda bulunan OTA'nın %16.57'sini, ortamda aynı konsantrasyonda AFM_1 bulunması durumunda ise %26.38'ini bağlamıştır.

Fosfat tamponunda toksin konsantrasyonunun 10 ng ml^{-1} bulunması durumunda ısıtma işlemine maruz bırakılan tüm bakterilerin başlangıç, 4 ve 24 saat içinde AFM_1 'e OTA'ya göre daha yüksek oranda bağlandığı görülmüştür. Isıtma işlemine maruz bırakılan *B. bifidum* Bb 13 başlangıçta fosfat tamponunda bulunan 10 ng ml^{-1} OTA ve AFM_1 'i sırasıyla %10.50 ve %25.97 oranında bağlamıştır ($p < 0.05$). Benzer şekilde, 4 ve 24 saat bakteri-toksin inkübasyonu süresince de ısıtma işlemine maruz bırakılan *Lb. acidophilus* ve *B. bifidum* Bb 13'ün, AFM_1 'i OTA'ya göre istatistiksel olarak daha yüksek oranda bağladığı tespit edilmiştir.

Isıtma işlemi kullanılarak öldürülen test bakterilerinin fosfat tamponunda başlangıç, 4 ve 24 saat içinde 20 ng ml^{-1} AFM_1 'i OTA'ya göre daha yüksek oranda bağladığı (*Lb. acidophilus* NCC 12 hariç) tespit edilmiştir. Bununla birlikte, ısıtma işlemine maruz bırakılan test bakterileri arasında yalnızca *B. bifidum* Bb 13'ün başlangıç, 4 ve 24 saat içinde 20 ng ml^{-1} AFM_1 'i OTA'ya göre istatistiksel olarak

daha yüksek oranda bağladığı belirlenmiştir. Isıl işleme maruz bırakılan *B. bifidum* Bb 13 başlangıçta 20 ng ml⁻¹ OTA'yı %10.80 oranında bağlarken, AFM₁'i %28.97 oranında bağlama yeteneği göstermiştir.

Mikotoksinlerin laktik asit bakterileri tarafından ortamdaki uzaklaştırılması konusunda yapılan çalışmalar genelde AFB₁ üzerine yoğunlaşmış olup, diğer mikotoksin türleri ile ilgili olarak ise sınırlı düzeyde bilgi bulunmaktadır. Bu konuda HPLC yöntemi ile yapılan çalışmalarda *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. rhamnosus* LC-705 ve *Propionibacterium freudenreichii*'nin bazı önemli *Fusarium* toksinlerini (deoksinivalenol, 3-acetyldeoksinivalenol, nivalenol, fusarenon-X, dioksinivalenol, T-2 ve HT-2) farklı oranlarda bağladığını bildirmişlerdir (El-Nezami ve ark, 2002a). Benzer şekilde, *Lb. rhamnosus* GG ve *Lb. rhamnosus* LC-705 suşlarının benzer toksin bağlama yüzeylerine sahip oldukları ve kombine olarak kullanıldıklarında zearalenon toksinini %55 oranında bağladıkları bulunmuştur (El-Nezami ve ark, 2002b). Diğer yandan, laktik asit bakterilerinin OTA'ya karşı gösterdikleri aktivite konusunda literatürde yalnızca Turbic ve ark. (2002)'nin HPLC yöntemi ile yaptığı çalışma bulunmaktadır. Araştırmacılar fosfat tamponu ortamında canlı *Lb. rhamnosus* GG ve *Lb. rhamnosus* LC-705 suşlarının bir saat içinde OTA'yı bağlama yeteneklerini sırasıyla %47.12 ve %36.43 oranında bulmuşlardır.

Araştırmacılar laktik asit bakterilerinin aflatoksin türlerini bağlamasında, toksinin polaritesinin de önemli bir etkisinin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Test bakterilerinin aflatoksin türlerini bağlama yeteneklerinin AFB₁>AFB₂>AFG₁>AFG₂ şeklinde olduğunu bildirmişlerdir (Haskard ve ark, 2000). Benzer şekilde Pierides ve ark. (2000) test ettikleri laktik asit bakterilerinin AFB₁'e, AFM₁'e oranla daha yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiğini ve bu durumun aflatoksinin kimyasal yapısıyla ilgili olduğunu bildirmişlerdir. AFM₁'in AFB₁'in hidroksillenmiş (-OH) bir formu olması sonucu polaritesinin arttığı ve daha hidrofilik bir karaktere dönüşmesi nedeniyle polar özellik gösteren sulu çözeltide (fosfat tamponu) alıkonma eğilimi gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Son yıllarda Turbic ve ark. (2002) laktik asit bakterilerinin çeşitli mikotoksin türlerini bağlama yeteneklerini araştırdıkları çalışmada *Lb. rhamnosus* GG ve *Lb. rhamnosus* LC-705 suşlarının mikotoksinleri bağlama sırasının AFB₁>AFM₁>OTA şeklinde gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

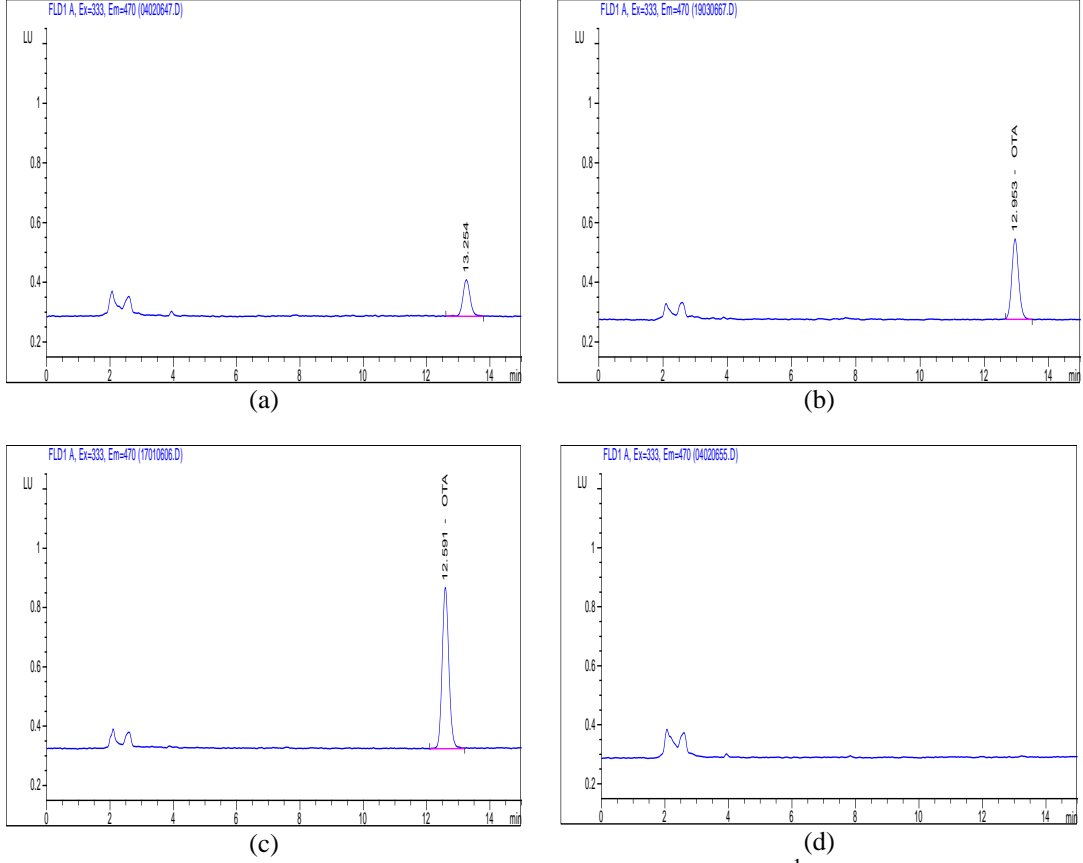
Örneğin *Lb. rhmanosus* LC-705 suşunun AFB₁, AFM₁ ve OTA'yı bağlama yetenekleri sırasıyla %77.23, %45.70 ve %36.43 oranında bulunmuştur. Benzer şekilde Var ve Kabak (2004) *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının AFB₁'i AFM₁'e oranla daha yüksek oranda bağladığını saptamışlardır. Bu araştırmada da test bakterilerinin AFM₁'i OTA'ya oranla daha yüksek oranda bağlaması literatürdeki bilgilerle paralellik göstermiştir.

Araştırmada analiz yönteminin hassasiyetini belirlemek amacıyla her denemede OTA'yı fosfat tamponu çözeltisinden geri alma çalışması (pozitif kontrol) yapılmıştır. 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki OTA'nın farklı inkübasyon sürelerinde fosfat tamponundan geri alma oranları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Bu şekilde test bakterilerinin bağlama yetenekleri ve analiz yönteminden kaynaklanan OTA kayıpları belirlenmiştir.

Fosfat tamponu çözeltisinde yapılan geri alma çalışmaları sonucunda, inkübasyon süresine ve toksin konsantrasyonuna bağlı olarak OTA'nın %88.13-89.81 oranında geri alındığı saptanmıştır. Araştırmada kullanılan inkübasyon süresinin OTA'yı fosfat tamponundan geri alma oranları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) olduğu bulunmuştur. Örneğin; 5 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki OTA'nın başlangıç, 4 ve 24 saat inkübasyon sonucunda sırasıyla %88.72, %88.81 ve %89.91'inin geri alındığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde, araştırmada kullanılan toksin konsantrasyonunun da OTA'yı fosfat tamponundan geri alınma değeri üzerine bir etkisinin olmadığı (p>0.05) saptanmıştır. Test bakterilerinin bulunmadığı ortamda 24 saat inkübasyon sonucunda 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonundaki OTA'nın fosfat tamponundan geri alma oranları sırasıyla %89.91, %88.13 ve %89.13 olarak bulunmuştur.

Şekil 4.19'da araştırmada kullanılan 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ konsantrasyonlarındaki OTA'nın fosfat tamponunda başlangıçta sırasıyla 4.44 (%88.72), 8.83 (%88.34) ve 17.99 (%89.95) ng ml⁻¹'sinin geri alınmasıyla ilgili pozitif kontrol kromatogramları ve fosfat tamponuna ait negatif kontrol HPLC kromatogramı yer almaktadır.



Şekil 4.19. Fosfat Tamponunda 5 (a), 10 (b) ve 20 (c) ng ml⁻¹ OTA Pozitif Kontrol ve OTA Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.

Fosfat tamponu çözeltisinde OTA ve AFM₁'in geri alma (pozitif kontrol) değerlerinin karşılaştırılması durumunda, genelde OTA'nın AFM₁'e oranla daha yüksek oranda geri alındığı belirlenmiştir. Diğer yandan, başlangıç, 4 ve 24 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA ve AFM₁'in fosfat tamponu ortamından geri alınma oranlarının istatistiksel açıdan farklı olmadığı (p>0.05) belirlenmiştir. Örneğin toksin konsantrasyonunun 10 ng ml⁻¹ olması durumunda başlangıç, 4 ve 24 saat içinde fosfat tamponunda sırasıyla %88.34, %88.28 ve %88.13'ü, beyaz şarap ortamında ise %84.78, %85.70 ve %84.27'si geri alınabilmiştir.

4.2.1.3.Fosfat Tamponu Ortamında Bakteri-OTA Kompleksi Stabilitesinin Belirlenmesi

Canlı test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponu ortamında OTA'yı etkili bir şekilde bağlayıp bağlamadığını (bağlamanın geri dönüşümlü olup olmadığını) tespit etmek amacıyla, OTA'nın (5 ng ml^{-1}) test bakterileri tarafından 4 saat içinde bağlandıktan sonra bakteri hücreleri OTA içermeyen fosfat tamponu çözeltisiyle yıkanarak, serbest kalan OTA oranı belirlenmiştir. Bakterilerin fosfat tamponu ortamında 4 saat içinde 5 ng ml^{-1} konsantrasyonundaki OTA'yı bağlama yetenekleri ve bakterilerin fosfat tamponu ile yıkanması sonucu serbest kalarak sıvı çözeltiliye geçen OTA oranları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9'un incelenmesiyle de görülebileceği gibi fosfat tamponu ortamında bağlanan OTA'nın suştan suşa farklılık göstermekle birlikte belirli oranlarda tekrar fosfat tamponuna geçtiği belirlenmiştir. 5 ng ml^{-1} OTA içeren fosfat tamponunda 4 saat içerisinde test bakterileri tarafından farklı oranlarda (%6.60-16.67) bağlanan OTA'nın stabilitesini koruyamayarak %1.98-6.77 arasında değişen oranlarda tekrar fosfat tamponuna geçtiği saptanmıştır. 5 ng ml^{-1} OTA içeren fosfat tamponu ortamında 4 saat içinde *Lb. rhamnosus* tarafından bağlanan %16.67 oranındaki OTA'nın, %1.98'inin tekrar fosfat tamponuna geçtiği belirlenmiştir. Diğer yandan *B. bifidum* Bb 13 tarafından bağlanan OTA'nın (%6.60) fosfat tamponu ile yıkanması sonucu (5 ml), %5.22'sinin hücreden ayrılarak tekrar fosfat tamponuna geçtiği saptanmıştır. Test bakterileri tarafından bağlanan OTA'nın fosfat tamponuna geçme oranları arasında bazı farklılıklar olmasına karşın, bu farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

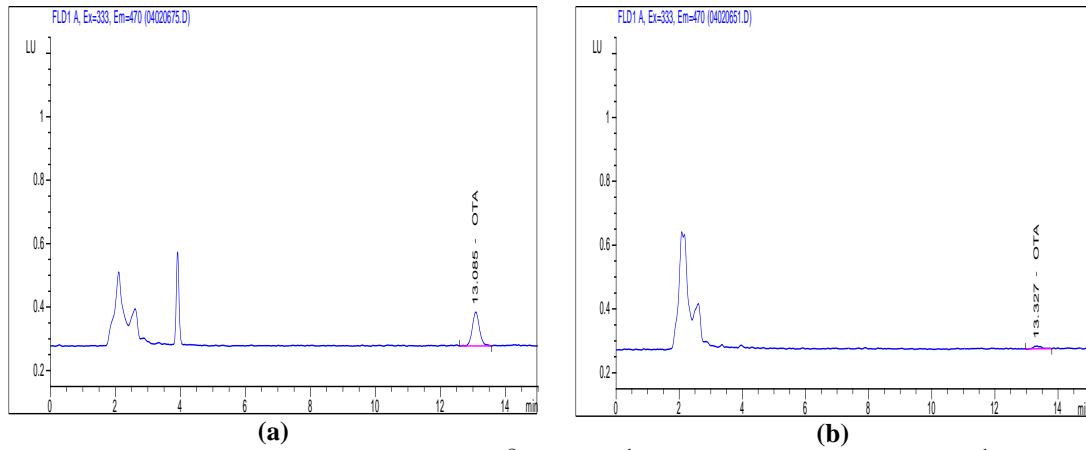
Canlı *Lb. rhamnosus*'un (10^8 kob ml^{-1}) 4 saat içinde 5 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama (%16.67) ve bakterinin 5 ml fosfat tamponu çözeltisi ile (OTA içermeyen) yıkanması sonucu serbest kalarak tekrar sıvı çözeltiliye geçen (%1.98) OTA'ya ait HPLC kromatogramı Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Fosfat Tamponu Ortamında Canlı Test Bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 4 Saat İçinde Bağladığı OTA'nın ($5 ng ml^{-1}$) Tekrar Fosfat Tamponuna Geçme Oranları.

Bakteri	% bağlanan OTA (ort ± sD, n=3) ^a	Serbest kalan % OTA (ort ± sD, n=3) ^b
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	15.90±3.14	6.23±2.47
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	15.97±3.09	2.39±0.93
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	10.34±3.62	6.77±1.46
<i>B. bifidum</i> Bb13	6.60±3.62	5.22±2.34
<i>B. bifidum</i> NCC 381	12.80±1.97	3.27±3.18
<i>Lb. rhamnosus</i>	16.67±2.99	1.98±1.00

^a 10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml^{-1} OTA ile 4 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları % OTA oranı

^b 10^8 kob ml^{-1} yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml^{-1} OTA ile 4 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları % OTA'nın, 5 ml PBS (OTA içermeyen) ile yıkanması sonucu serbest kalarak fosfat tamponuna geçen % OTA oranı



Şekil 4.20. Canlı *Lb. rhamnosus*'un (10^8 kob ml^{-1}) PBS'de 4 Saatte 5 ng ml^{-1} OTA'yı %16.67 Oranında Bağlama Yeteneğine (a) ve Hücrelerin PBS İle Yıkanması Sonucu Serbest Kalan %1.98 OTA Oranına (b) Ait HPLC Kromatogramları.

Test bakterileri tarafından fosfat tamponunda 4 saat içinde bağlanan toksinin ($5 ng ml^{-1}$) serbest kalarak tekrar fosfat tamponuna geçme değerleri üzerine toksin farklılığının etkisi değerlendirilmiştir. *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* Bb 13 ve *B. bifidum* NCC 381'den ayrılarak serbest kalan ve fosfat tamponuna geçen OTA ve AFM₁ oranları arasında istatistiksel açıdan farklılık ($p>0.05$) görülmemiştir. Buna karşın; *Lb. acidophilus* NCC 36'dan ayrılarak fosfat tamponuna geçen AFM₁ oranının (%6.71) OTA'ya göre (%2.39) istatistiksel olarak

daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde; *Lb. rhamnosus* tarafından bağlanan AFM₁'in stabilitesini koruyamıyarak %8.54'ünün tekrar fosfat tamponuna geçtiği buna karşın, OTA'nın %1.98'inin tekrar fosfat tamponuna geçtiği tespit edilmiştir (p<0.05).

4.2.2. Test Bakterilerinin Beyaz Şarap Ortamında OTA'yı Bağlama Yeteneği

Araştırmada kullanılan bakterilerin OTA'yı bağlama yeteneklerinde fosfat tamponundan çok gıda maddesi içinde göstereceği aktivite büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde gıda materyali olarak OTA açısından tahıllardan sonra ikinci önemli kontaminant kaynağı olan şarap kullanılmıştır. Canlı ve ısıtılma maruz bırakılan bakterilerin beyaz şarapta 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yeteneklerinde inkübasyon süresi olarak ise 4 saat kullanılmıştır.

4.2.2.1. Canlı Test Bakterilerinin Beyaz Şarap Ortamında OTA'yı Bağlama Yeteneği

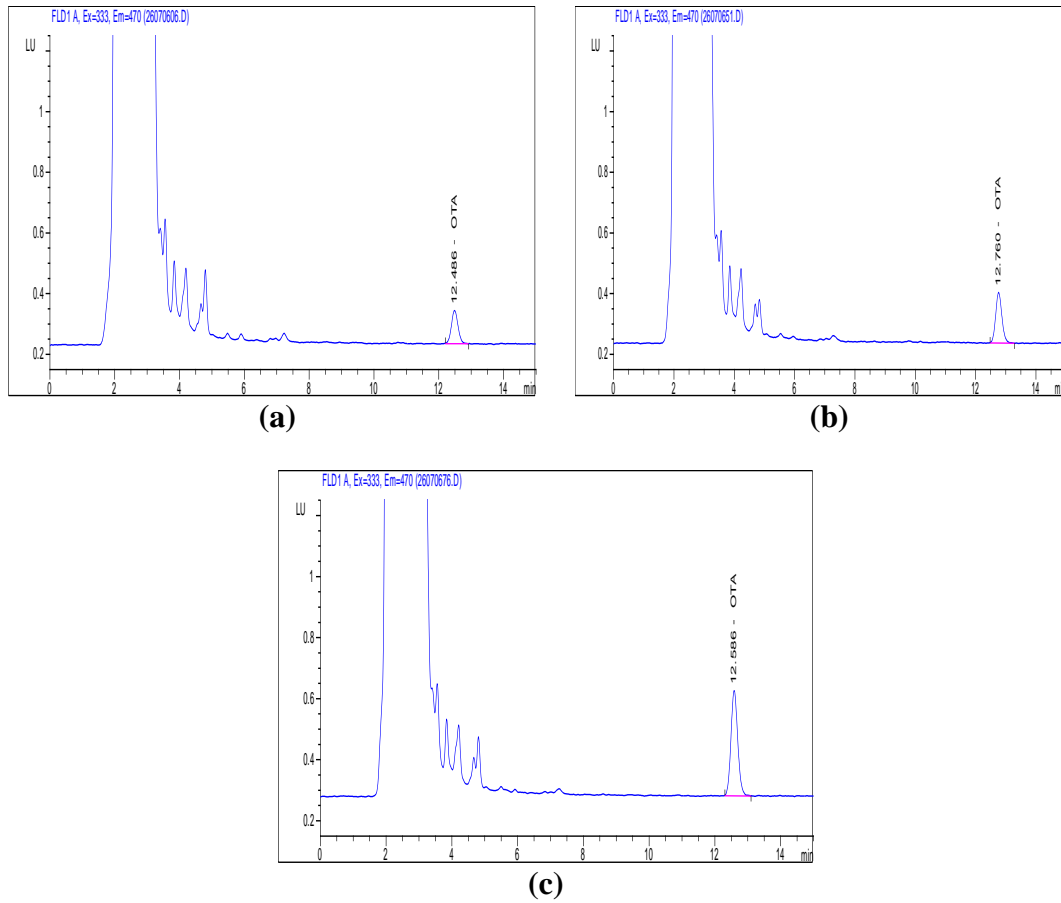
10⁸ kob ml⁻¹ yoğunluğundaki canlı test bakterilerinin 4 saat inkübasyon süresi içinde OTA'yı bağlama yetenekleri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Canlı Test Bakterilerinin Beyaz Şarap Ortamında 4 Saat İçinde OTA'yı Bağlama Yeteneği.

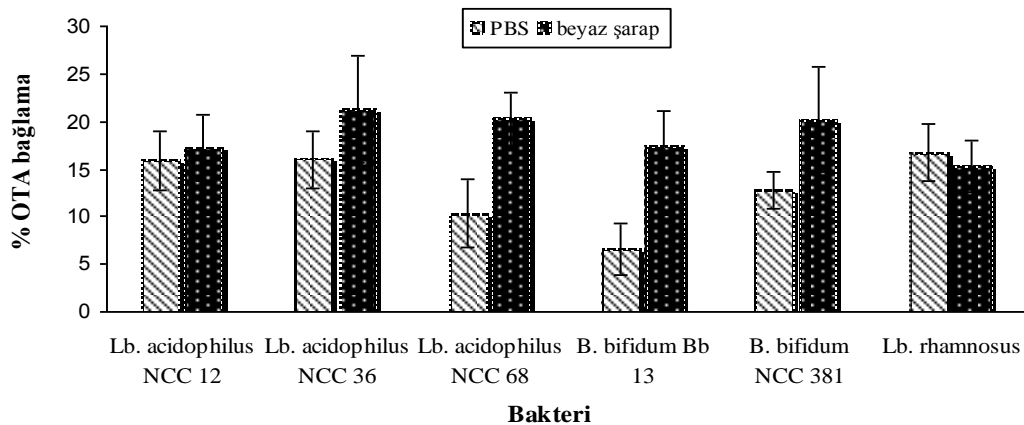
Bakteri	% bağlanan OTA (ortalama ± sD, n=3)		
	5 ng ml ⁻¹	10 ng ml ⁻¹	20 ng ml ⁻¹
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	17.18±3.47	16.20±1.40	17.34±4.28
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	21.27±5.63	23.40±7.38	19.11±1.46
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	20.23±2.76	20.19±4.53	16.54±4.78
<i>B. bifidum</i> Bb 13	17.38±3.69	22.60±3.64	15.08±4.68
<i>B. bifidum</i> NCC 381	20.17±5.51	15.57±4.07	15.40±4.64
<i>Lb. rhamnosus</i>	15.29±2.76	12.72±1.10	15.00±3.88
Geri alma (%)	86.05±1.42	84.86±2.99	84.70±1.07

Test bakterilerinin kullanılan suşa ve toksin konsantrasyonuna bağlı olarak beyaz şarap ortamında OTA'yı farklı oranlarda bağlama yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan canlı test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 4 saat inkübasyon süresi içinde beyaz şarap ortamında 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yetenekleri sırasıyla %15.29-21.27, %12.72-23.40 ve %15.00-19.11 arasında bulunmuştur. Beyaz şarap ortamında test bakterileri içinde OTA'yı en yüksek bağlama yeteneğini *Lb. acidophilus* NCC 36 gösterirken, *Lb. rhamnosus* nispeten düşük bağlama yeteneği göstermiştir. Diğer yandan 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} konsantrasyonundaki OTA'nın test bakterileri tarafından bağlanmasında kullanılan laktik asit bakterilerinin etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) çıkmıştır. Benzer şekilde test bakterilerinin OTA'yı bağlama yetenekleri üzerine toksin konsantrasyonunun etkisi de istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$). Şekil 4.21'de canlı *Lb. acidophilus* NCC 36'nın beyaz şarap ortamında 4 saat inkübasyon süresi içinde 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} OTA'yı %21.27, %23.40 ve %19.11 oranında bağlama yeteneğine ait HPLC kromatogramları verilmiştir.

Araştırmada kullanılan bakterilerin fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında OTA'yı bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda, *Lb. rhamnosus* hariç diğer bakterilerin OTA'yı (5 ng ml^{-1}) bağlama yeteneği beyaz şarap ortamında artış göstermiştir (Şekil 4.22). *Lb. rhamnosus* 4 saat inkübasyon içinde PBS ortamında 5 ng ml^{-1} OTA'nın %16.67'sini bağlarken, beyaz şarap ortamında %15.29'unu bağlayabilmiştir ($p>0.05$). Diğer yandan beyaz şarap ortamında en yüksek bağlama yeteneği gösteren *Lb. acidophilus* NCC 36 (%21.27), PBS ortamında 5 ng ml^{-1} OTA'nın %15.97'sini bağlamıştır. Test edilen bakteriler arasında *Lb. acidophilus* NCC 68 ve *B. bifidum* Bb 13'ün 5 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yeteneği beyaz şarap ortamında, PBS ortamına oranla istatistiksel olarak artış gösterirken ($p<0.05$), *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *B. bifidum* NCC 381 ve *Lb. rhamnosus*'un OTA (5 ng ml^{-1})'yı bağlama yeteneklerinin fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür.



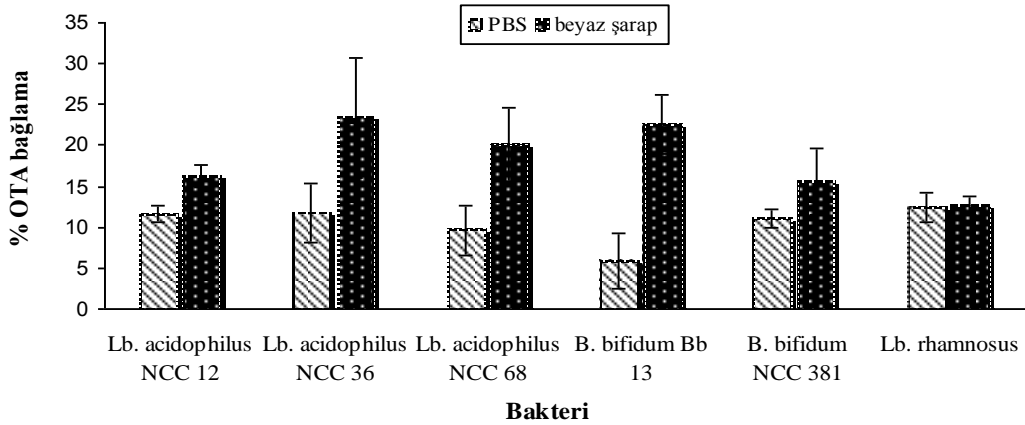
Şekil 4.21. Canlı *Lb. acidophilus* NCC 36'nın 4 Saat İçinde Beyaz Şarıpta 5 ng ml⁻¹ OTA'yı %21.27 (a), 10 ng ml⁻¹ OTA'yı %23.40 (b) ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı %19.11 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.



Şekil 4.22. Canlı Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarıpta 5 ng ml⁻¹ OTA Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

Test edilen tüm bakterilerin 10 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yeteneklerinin beyaz şarap ortamında PBS ortamına oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68 ve *B. bifidum* Bb13'ün 10 ng ml^{-1} konsantrasyondaki OTA'yı bağlama yetenekleri beyaz şarap ortamında fosfat tamponuna göre daha yüksek bağlama yeteneği gösterirken ($p < 0.05$), *B. bifidum* NCC 381 ve *Lb. rhamnosus*'un OTA'yı (10 ng ml^{-1}) bağlama yeteneklerinde ortam farklılığının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Örneğin *Lb. rhamnosus* 10 ng ml^{-1} OTA'yı 4 saat inkübasyon süresi içinde PBS ve beyaz şarap ortamında sırasıyla %12.43 ve %12.72 oranında bağlamıştır.

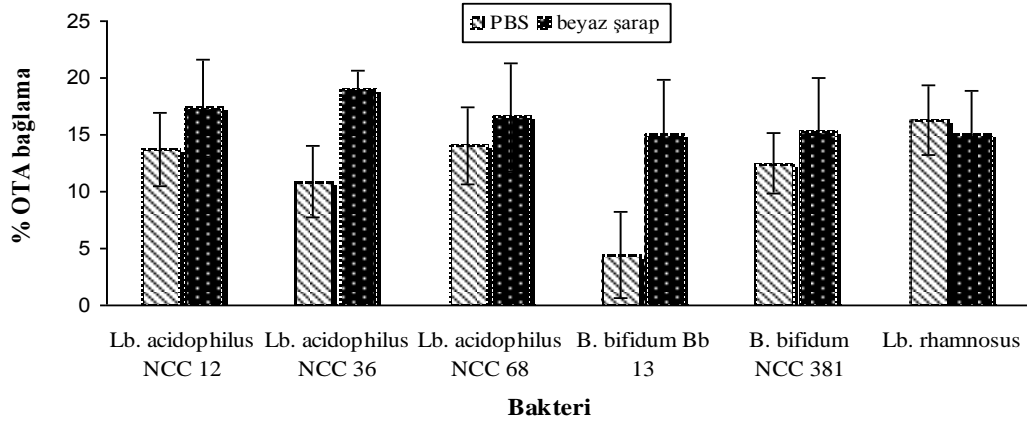
Fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamlarında 10 ng ml^{-1} OTA'nın 4 saat içinde test bakterileri tarafından bağlanma oranlarının karşılaştırmalı gösterimi Şekil 4.23'de yer almaktadır.



Şekil 4.23. Canlı Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarapta 10 ng ml^{-1} OTA Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

Analiz edilen bakteriler arasında yalnızca *B. bifidum* Bb 13'ün 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yetenekleri gıda modeli olarak kullanılan beyaz şarap ortamında fosfat tamponuna göre istatistiksel olarak artış gösterirken ($p < 0.05$), *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36, *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* NCC 381 ve *Lb. rhamnosus*'un 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yetenekleri her iki ortamda da istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$). *B. bifidum* Bb 13, 20 ng ml^{-1} OTA'yı 4 saat içinde PBS ve beyaz şarapta sırasıyla %4.43 ve %15.08 oranında

bağlama yeteneği göstermiştir. Şekil 4.24’de fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında 20 ng ml^{-1} OTA’nın 4 saat içinde test bakterileri tarafından bağlanma oranlarının karşılaştırmalı gösterimi verilmiştir.



Şekil 4.24.Canlı Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarapta 20 ng ml^{-1} OTA Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

4.2.2.2. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Bakterilerin Beyaz Şarap Ortamında OTA’yı Bağlama Yeteneği

Araştırmada kullanılan bakterilerin canlılığının gıda modeli olarak kullanılan beyaz şarap ortamında OTA’yı bağlama yeteneği üzerine etkisini belirlemek için, ısıl işlem kullanılarak öldürülmüş test bakterilerinin beyaz şarap içinde OTA’yı bağlama yetenekleri ayrıca belirlenmiştir. Çizelge 4.11’den de görülebileceği gibi test bakterilerinin $5, 10$ ve 20 ng ml^{-1} OTA’yı beyaz şarap içinde bağlama yetenekleri sırasıyla %17.88-24.64, %15.24-26.11 ve %16.44-24.32 arasında değişiklik göstermiştir.

Isıl işleme maruz bırakılan bakteriler arasında OTA’yı beyaz şarap ortamında en yüksek bağlama yeteneğini *Lb. acidophilus* NCC 36 gösterirken *Lb. rhamnosus* nispeten düşük bağlama yeteneği göstermiştir. Diğer yandan, ısıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin $5, 10$ ve 20 ng ml^{-1} konsantrasyonlarındaki OTA’yı bağlama yeteneklerinde, bakteri yoğunluğu ve toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Örneğin OTA’yı düşük bağlama

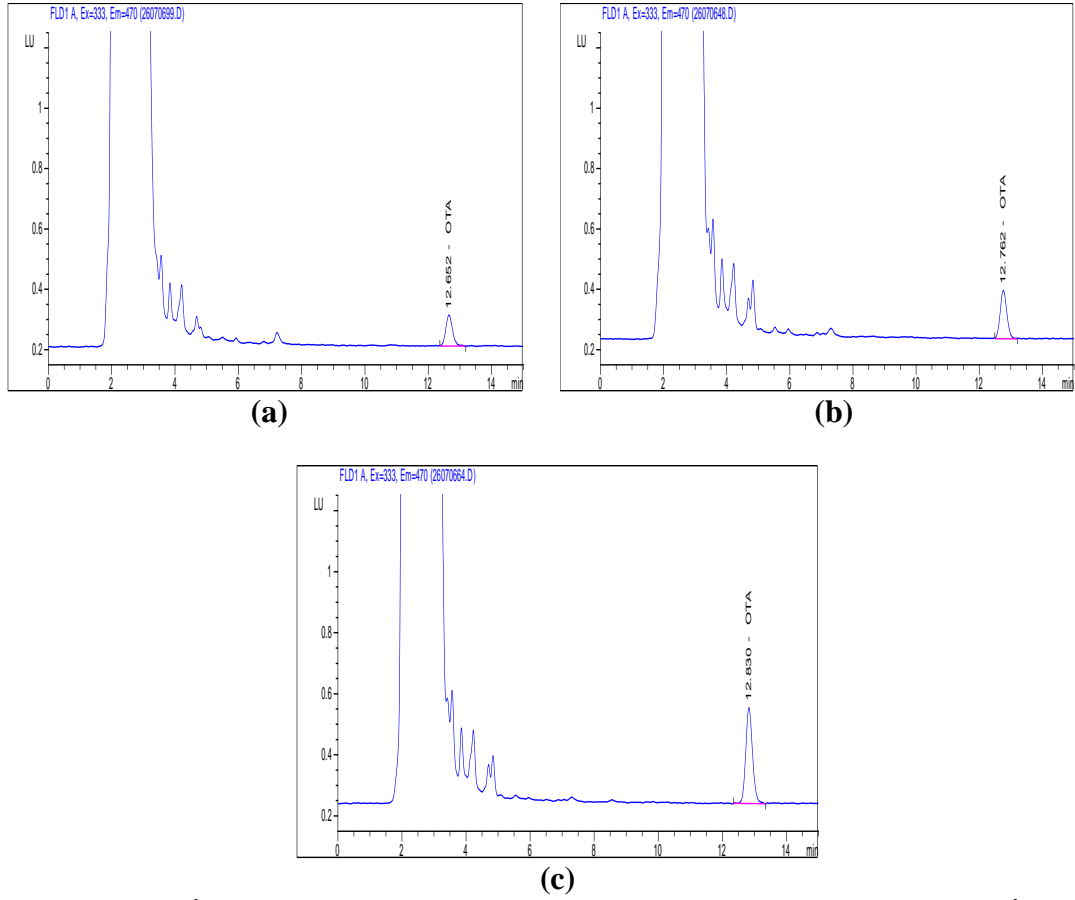
yeteneği gösteren *B. bifidum* Bb 13 beyaz şarap ortamında 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı sırasıyla %18.06, %16.32 ve %18.80 oranında bağlamıştır.

Çizelge 4.11. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin Beyaz Şarapta 4 Saat İçinde OTA'yı Bağlama Yeteneği.

Bakteri	% bağlanan OTA (ortalama ± sD, n=3)		
	5 ng ml ⁻¹	10 ng ml ⁻¹	20 ng ml ⁻¹
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	20.13±4.79	19.34±3.26	23.72±9.43
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	24.64±8.76	26.11±6.03	24.32±2.42
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	22.99±1.62	20.32±7.13	20.86±2.89
<i>B. bifidum</i> Bb 13	18.06±4.78	16.32±5.19	18.80±4.85
<i>B. bifidum</i> NCC 381	23.18±2.49	18.62±3.54	19.96±3.88
<i>Lb. rhamnosus</i>	17.88±3.78	15.24±4.99	16.44±8.31

Isıl işleme maruz bırakılan bakteriler arasında her iki ortamda da en yüksek bağlama yeteneği gösteren *Lb. acidophilus* NCC 36'nın beyaz şarap ortamında 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'yı %24.64, %26.11 ve %24.32 oranında bağlama yeteneklerine ait HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

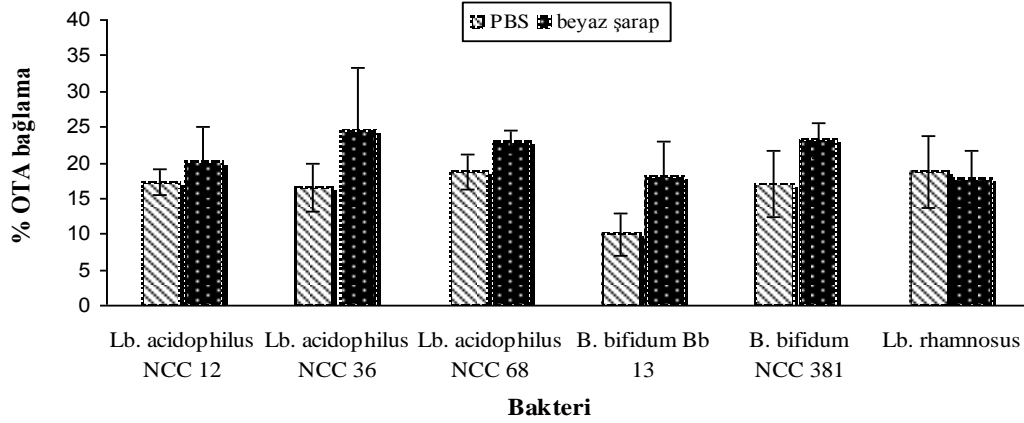
Test bakterilerinin ısıl işleme maruz bırakılması durumunda genelde beyaz şarap içinde OTA bağlama yeteneklerinde bir miktar artış görülmüştür. Bununla birlikte test bakterilerinin beyaz şarapta 4 saat içinde 5 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yeteneklerinde kullanılan bakterilerin canlı veya ısıl işlemle öldürülmelerinin etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Test bakterileri arasında *Lb. acidophilus* NCC 36'nın ısıl işlem ile inaktive edilmesi durumunda beyaz şarap içinde 10 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenğinde istatistiksel olarak artış görülmüştür. Canlı *Lb. acidophilus* NCC 36 beyaz şarap içinde 10 ng ml⁻¹ OTA'nın %9.80'ini bağlarken, ısıl işleme maruz bırakılması durumunda OTA'yı bağlama yeteneği %26.11'e çıkmıştır. Benzer şekilde, *B. bifidum* Bb 13'ün ısıl işleme maruz bırakılması durumunda beyaz şarapta 20 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yetenğinde istatistiksel olarak artış görülürken (p<0.05), diğer bakterilerin OTA'yı bağlamalarında canlı veya ısıl işlem ile öldürülmüş olmalarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.



Şekil 4.25. Isıl İşleme Maruz Bırakılan *Lb. acidophilus* NCC 36'nın 4 Saat İçinde Beyaz Şarapta 5 ng ml^{-1} OTA'yı %24.64 (a), 10 ng ml^{-1} OTA'yı %26.11 (b) ve 20 ng ml^{-1} OTA'yı %24.32 (c) Oranında Bağlama Yeteneklerine Ait HPLC Kromatogramları.

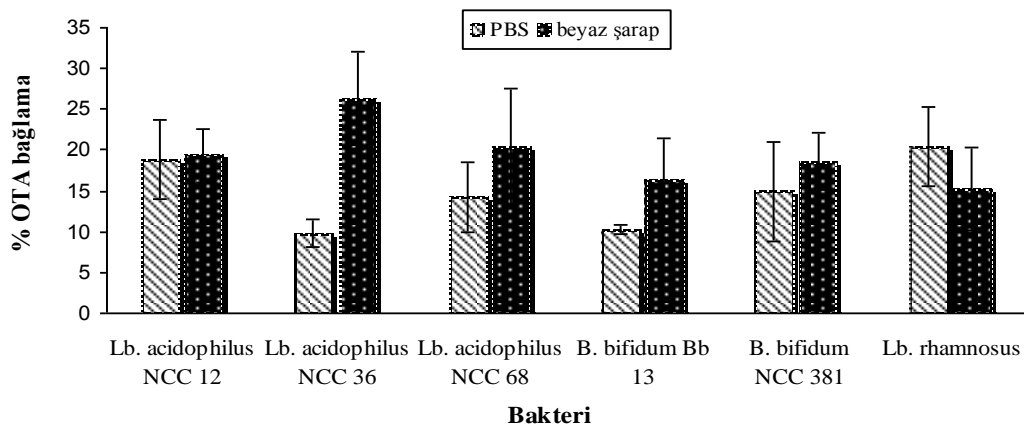
Isıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında 4 saat içinde 5 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda (Şekil 4.26); 5 ng ml^{-1} konsantrasyonundaki OTA'nın bakteriler tarafından bağlanmasında ortam farklılığının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Diğer yandan, *Lb. acidophilus* NCC 36'un 10 ng ml^{-1} OTA'yı beyaz şarapta 4 saat içinde (%26.11) fosfat tamponuna (%9.80) göre daha yüksek oranda bağladığı ($p<0.05$), test edilen diğer bakterilerin ise 10 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yeteneklerinin her iki ortamda da istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır. Benzer şekilde *B. bifidum* Bb 13'ün 4 saat inkübasyon süresi içinde 20 ng ml^{-1} OTA'yı beyaz şarap ortamında (%18.80) fosfat tamponuna (%9.60)

oranla daha yüksek oranda bağlarken ($p < 0.05$), diğer bakterilerin ise 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yeteneklerinde ortam farklılığının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur.

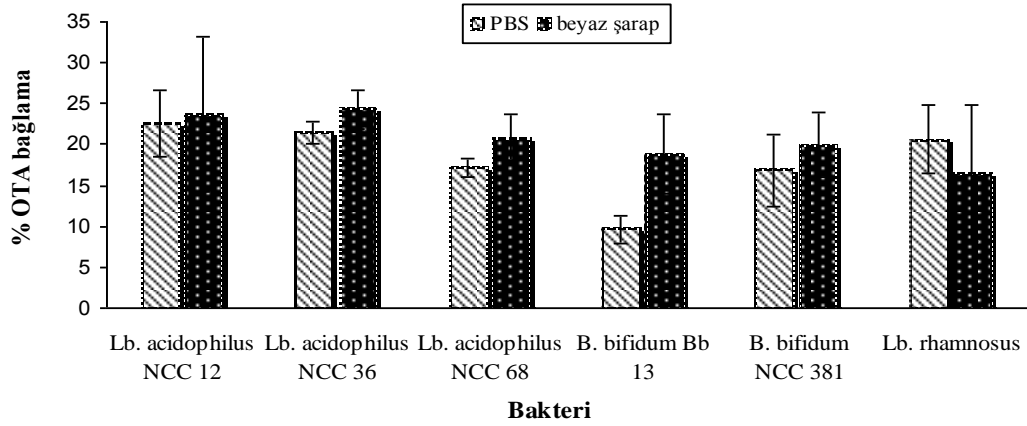


Şekil 4.26. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarap Ortamında 5 ng ml^{-1} OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

Fosfat tamponu ve beyaz şarap içinde 10 ng ml^{-1} OTA'nın test bakterileri tarafından karşılaştırmalı olarak gösterimi sırasıyla Şekil 4.27 ve 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarap Ortamında 10 ng ml^{-1} OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.



Şekil 4.28. Isıl İşleme Maruz Bırakılan Test Bakterilerinin 4 Saat İçinde PBS ve Beyaz Şarap Ortamında 20 ng ml^{-1} OTA'yı Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması.

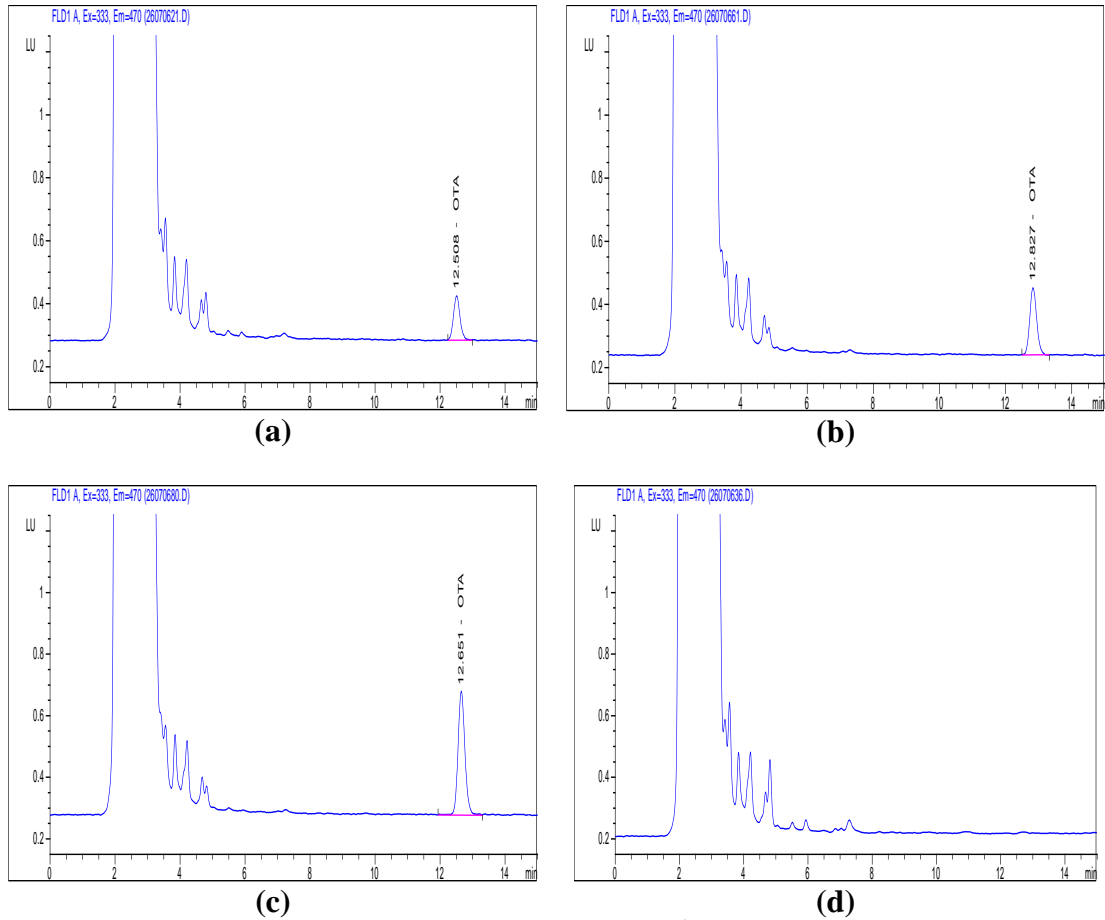
Laktik asit bakterilerinin OTA'yı üzüm suyu ve/veya şarapta bağlama yetenekleri ile ilgili olarak herhangi bir bilgi bulunmamasına karşın, literatürde mayalarla ilgili bazı çalışmalar yer almaktadır. %40 maya ve %60 oranında bira fermantasyonu artığının kombine olarak kullanımının *in vitro* koşullarda OTA'yı etkili bir şekilde bağladığı, bağlanmanın mayanın hücre duvarı üzerinden olduğu ve en yüksek oranda bağlamanın pH 3 değerinde gerçekleştiği bildirilmiştir (Shetty ve Jespersen, 2006). Benzer şekilde, *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından izole edilen β -D glukun'un aflatoksin ve OTA'yı önemli miktarda bağlama yeteneğinde olduğu belirlenmiştir (Raju ve Devegowda, 2000).

Son yıllarda Bejaouii ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Sacchromyces* mayasının yerel suşlarının OTA'yı sentetik ve doğal üzüm suyundan uzaklaştırılması amacıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar maya hücrelerinin canlı olması durumunda 5 dakika içinde OTA adsorpsiyonunun %35 oranında gerçekleştiğini, buna karşın mayaların ısıl işleme maruz bırakılması durumunda adsorpsiyonun %90'a çıktığını ve hücre yoğunluğunun adsorpsiyonunda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

Test bakterilerinin beyaz şarap ortamında farklı konsantrasyonlardaki OTA'yı bağlama yeteneğinin belirlenmesi amacıyla (pozitif kontrol), OTA'yı beyaz şarap ortamından geri alma oranları bulunmuştur (Çizelge 4.10). Çizelge 4.10'dan da görülebileceği gibi 5, 10 ve 20 ng ml^{-1} konsantrasyondaki OTA'nın 4 saat

inkübasyon süresi içinde beyaz şaraptan sırasıyla 4.30 (%86.05), 8.49 (%84.86) ve 16.94 (%84.70)'ünün geri alındığı görülmüştür. OTA'nın beyaz şarap ortamından geri alınma değerlerinde kullanılan toksin konsantrasyonlarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

Analizde kullanılan 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ OTA'nın beyaz şarap ortamından sırasıyla %86.05, %84.86 ve %84.70 oranlarında geri alınmasıyla ilgili pozitif kontrol ve OTA negatif kontrol kromatogramları Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Beyaz Şarapta 5 (a), 10 (b), 20 (c) ng ml⁻¹ OTA Pozitif Kontrol ve OTA Negatif Kontrol (d) Kromatogramları.

Pozitif kontrol amacıyla OTA'nın fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında geri alma oranlarının karşılaştırılması durumunda, OTA'nın fosfat tamponu ortamında beyaz şaraba göre nispeten yüksek oranda geri alındığı tespit edilmiştir. 5 ve 10 ng ml⁻¹ OTA'nın geri alınmasında PBS ve beyaz şarap ortamları arasındaki

fark istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında 5 ng ml^{-1} OTA'nın 4 saat inkübasyon süresi içinde sırasıyla %88.81 ve 86.05 oranında geri alındığı, benzer şekilde 10 ng ml^{-1} OTA'nın %88.28 ve %84.86'sinin geri alındığı tespit edilmiştir. Diğer yandan 20 ng ml^{-1} OTA'nın 4 saat içinde fosfat tamponunda geri alma oranı (%89.87) beyaz şaraba göre (%84.70) istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur.

Literatürde OTA'nın fosfat tamponundan geri alınması ile ilgili olarak herhangi bir veri bulunmamasına karşın, şarap örneklerinde OTA varlığını araştırmak amacıyla HPLC yöntemi kullanılarak yapılan tarama çalışmalarda OTA'nın şaraptan geri alınma oranları tespit edilmiştir. Test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneğinde pozitif kontrol amacıyla kullanılan OTA'nın geri alma sonuçları literatürde yer alan geri alma değerleri ile benzerlik göstermiştir. Pietri ve ark. (2001) şaraplara ilave edilen $71-4000 \text{ ng l}^{-1}$ OTA'nın geri alınma oranını %87-97 arasında bulmuşlardır. Markaki ve ark. (2001), Fransa'da şaraplarda OTA varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada OTA'nın geri alınma oranını ortalama %91.3 olarak bulmuşlardır. Lopez de Cerain ve ark. (2002), İspanyada şaraplarda OTA kontaminasyonu seviyesini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada $0.148-0.355 \text{ ng ml}^{-1}$ konsantrasyonunda OTA kontamine edilen şaraplardan OTA'nın geri alınma oranını %95.2-116 arasında bulmuşlardır. Bu konuda yapılan diğer bir çalışmada, Blesa ve ark. (2004) kırmızı şaraplarda 0.5 ng ml^{-1} OTA'nın geri alınma oranını ortalama %94 olarak saptamışlardır. Benzer şekilde, Dall'Asta ve ark. (2004) şaraplardan OTA'nın geri alınma oranını %93-96 arasında bulmuşlardır. Berente ve ark. (2005) Macaristan'da yaptıkları çalışmada 5 ng ml^{-1} OTA'nın şaraplardan geri alınma oranını %83.5 bulmuşlardır. Rosa ve ark. (2004) kırmızı ve beyaz şaraplardan OTA'nın ($5-50 \text{ ng l}^{-1}$) geri alınma oranlarını sırasıyla %91 ve %82 olarak bulmuşlardır. Brera ve ark. (2005) kırmızı şaraplardan 0.5 ng ml^{-1} OTA'nın geri alınma oranının %86 olduğunu bildirmişlerdir. Son olarak Var ve Kabak (2007), Türkiye'de şaraplarda OTA varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, OTA'nın ($0.1-1 \text{ ng ml}^{-1}$) geri alınma oranlarını %76.61-85.07 arasında bulmuşlardır.

4.2.2.3. Beyaz Şarap Ortamında Bakteri-OTA Kompleksi Stabilitésinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan canlı bakterilerin OTA'yı (5 ng ml⁻¹) kuvvetli bir şekilde bağlayıp bağlamadığını diğer bir deyişle bağlanmanın geri dönüşümlü olup olmadığını belirlemek amacıyla test bakterilerinin 4 saat inkübasyon süresi içinde OTA'yı bağlama denemesi gerçekleştirildikten sonra, hücreler tekrar OTA içermeyen 5 ml beyaz şarap ile muamele edilmiştir. Bu şekilde bakteri yüzeyine bağlanan OTA'nın serbest kalarak tekrar beyaz şarap ortamına geçme eğilimi tespit edilmiştir. Çizelge 4.12'de test bakterilerinin beyaz şarap ortamında 4 saat içinde bağladığı %OTA oranı ve serbest kalarak tekrar beyaz şaraba geçme oranları verilmiştir.

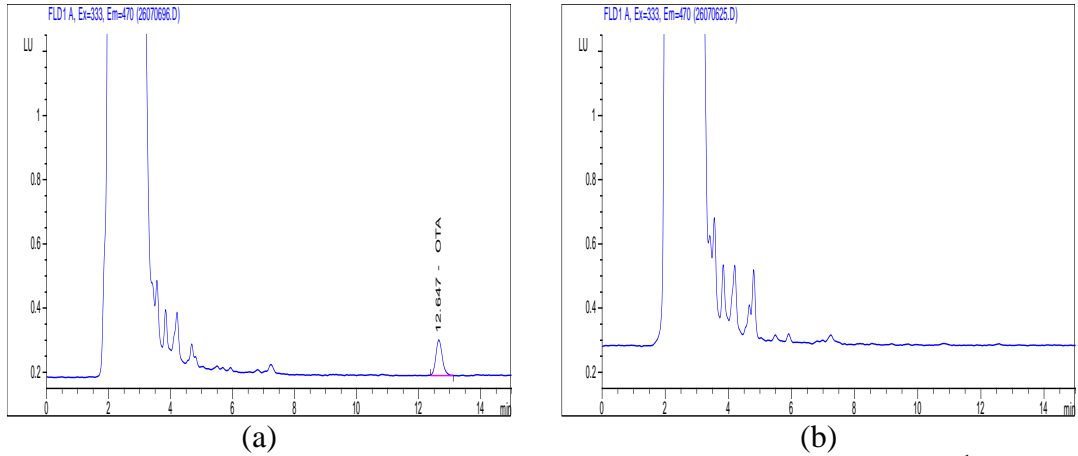
Çizelge 4.12. Beyaz Şarapta Canlı Test Bakterilerinin (10⁸ kob ml⁻¹) 4 Saatte Bağladığı OTA'nın (5 ng ml⁻¹) Tekrar Beyaz Şaraba Geçme Oranları.

Bakteri	% bağlanan OTA (ort ± sD, n=3) ^a	Serbest kalan % OTA (ort ± sD, n=3) ^b
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	20.13±4.79	<LOD ^c
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	24.64±8.76	<LOD
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	22.99±1.62	7.06±0.36
<i>B. bifidum</i> Bb13	18.06±4.78	3.70±3.21
<i>B. bifidum</i> NCC 381	23.18±2.49	1.91±3.31
<i>Lb. rhamnosus</i>	17.88±3.78	<LOD

^a10⁸ kob ml⁻¹ yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml⁻¹ OTA ile 4 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları % OTA oranı
^b10⁸ kob ml⁻¹ yoğunluğundaki test bakterilerinin 5 ng ml⁻¹ OTA ile 4 saat inkübasyon sonucunda bağladıkları % OTA'nın, 5 ml beyaz şarap (OTA içermeyen) ile yıkanması sonucu serbest kalarak tekrar beyaz şaraba geçen % OTA oranı
^cLOD: tespit limiti, 0.01 ng ml⁻¹.

Çizelge 4.12'nin incelenmesiyle de görülebileceği gibi gıda modeli olarak kullanılan beyaz şarap ortamında bağlanan OTA'nın, serbest kalarak tekrar beyaz şarap ortamına geçme değerleri suştan suşa farklılık göstermiştir (p<0.05). Test edilen bakteriler arasında *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus*'un OTA'yı kuvvetli bir şekilde bağladığı ve tekrar fosfat tamponuna geçen OTA'nın tespit edilebilir seviyenin altında olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan

canlı *Lb. acidophilus* NCC 68 tarafından bağlanan %22.99 oranında OTA'nın %7.06'sının serbest kalarak tekrar beyaz şaraba geçtiği saptanmıştır. Benzer şekilde, *B. bifidum* Bb 13 ve *B. bifidum* NCC 381'in bağladıkları OTA'nın sırasıyla %3.70 ve %1.91'inin tekrar beyaz şaraba geçtiği görülmüştür. Şekil 4.30'da canlı *Lb. acidophilus* NCC 36'nın (10^8 kob ml⁻¹) 4 saat içinde 5 ng ml⁻¹ OTA'yı %24.64 oranında bağlama yeteneğine ve bakterilerin 5 ml beyaz şarap (OTA içermeyen) ile yıkanması sonucu serbest kalan (tespit edilemedi) OTA'ya ait HPLC kromatogramları gösterilmiştir.



Şekil 4.30. *Lb. acidophilus* NCC 12'nin Beyaz Şarapta 4 Saatte 5 ng ml⁻¹ OTA'yı %20.13 Oranında Bağlama Yeteneğine ve Beyaz Şarapla (OTA içermeyen) Yıkanması Sonucu Serbest Kalan OTA'ya (tespit edilemedi) Ait HPLC kromatogramları.

Bakteri-OTA stabilitesi üzerine ortam farklılığının etkisinin karşılaştırılması durumunda, *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus*'un beyaz şarap ortamında OTA'yı geri dönüşümsüz olarak bağladığı ve ortam farklılığının (fosfat tamponu ve beyaz şarap) bakteri-OTA stabilitesi üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür. Diğer yandan, *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* Bb 13 ve *B. bifidum* NCC 381'in fosfat tamponu ve beyaz şarap ortamında belirli oranlarda geri dönüşümlü olarak bağlamakla birlikte ortam farklılığının etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu ($p > 0.05$) saptanmıştır.

4.3. Test Bakterilerinin Hücre Yüzeyinin Hidrofobik Yapısı

Bazı araştırmacılar hücre duvarının hidrofobik yapısı ile mikotoksinlere ve diğer küf metabolitlerine bağlanma yeteneği arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Aflatoksin gibi hidrofobik karakterdeki mutajenik ve kanserojenik maddelerin probiyotik özellik gösteren spesifik laktik asit bakterilerinin hücre duvarındaki hidrofobik kısımlara kovalent olmayan bağlarla bağlandığı, bu maddelerin incebağırsakta birikmesinin engellendiği ve metabolizma faaliyeti sonucu vücut dışına atıldığı ileri sürülmektedir (Bolognani ve ark, 1997; Yabe ve ark, 1999; Haskard ve ark, 2000; Oatley ve ark, 2000). Bu nedenle çalışma kapsamında kullanılan bakterilerin hücre yüzeylerinin hidrofobik karakteri de araştırılmıştır.

Fosfat tamponu ve gıda modelinde OTA ve AFM₁'i bağlama yeteneğinde kullanılan test bakterilerinin hücre yüzeyinin % hidrofobik özelliği Çizelge 4.13'de gösterilmiştir. Test bakterilerinin hidrofobik yapısı, hidrofobik özellikteki n-hexadecan'ın hidrofilik fosfat tamponundan ayrılırken bir kısım bakteriyi de taşıması sonucu alt fazda meydana gelen absorbans düşüşünün ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Test Bakterilerinin Hücre Yüzeylerinin Hidrofobik Karakteri (n=4, ortalama±sD).

Bakteri suşu	A ₀	A	% hidrofobik
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	1.11±0.08	0.94±0.08	15.82±1.83
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	1.09±0.09	1.06±0.10	4.31±1.91
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	1.10±0.06	0.99±0.04	10.14±1.78
<i>B. bifidum</i> Bb 13	1.06±0.17	0.90±0.15	18.89±2.94
<i>B. bifidum</i> NCC 381	1.05±0.13	0.94±0.12	10.90±2.39
<i>Lb. rhamnosus</i>	1.02±0.11	0.91±0.10	10.84±2.20

A₀: n-hexadecan ile ekstraksiyon öncesinde 560 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri.

A: n-hexadecan ile ekstraksiyon sonunda 560 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri.

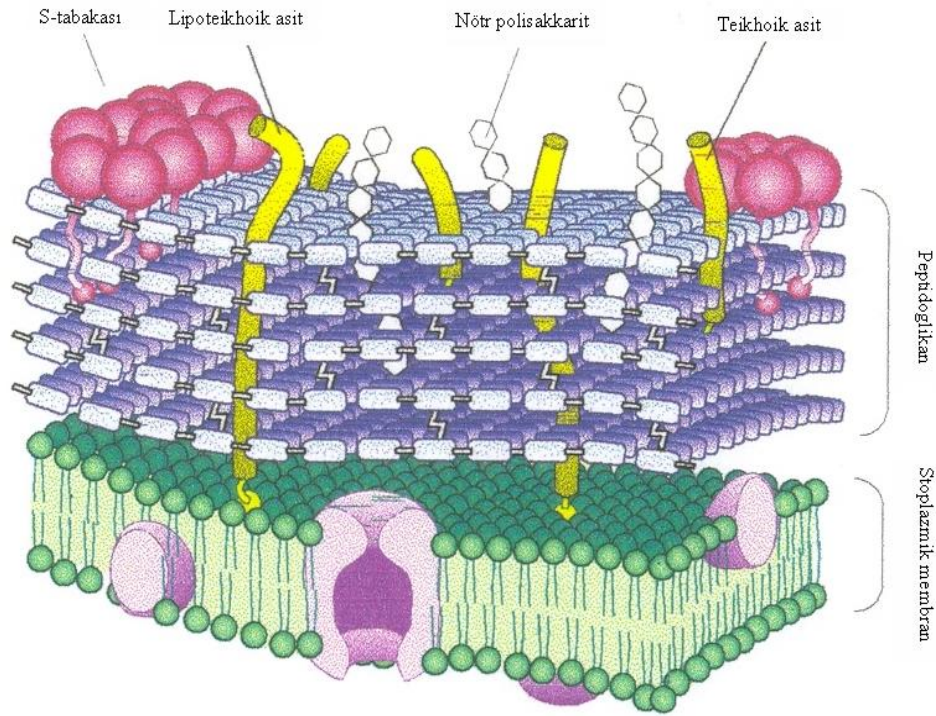
Çizelge 4.13'ün incelenmesiyle de görülebileceği gibi test edilen bakterilerin hücre yüzeyi çok düşük oranda hidrofobik özellik göstermiştir. Test bakterileri arasında en yüksek hidrofobik hücre yüzeyine sahip olan suşların sırasıyla %18.89 ile *B. bifidum* Bb13 ve %15.82 ile *Lb. acidophilus* NCC 12 olduğu, buna karşın *Lb. acidophilus* NCC 36 suşunun istatistiksel olarak daha düşük (p<0.05) hidrofobik

(%4.31) özellik gösteren hücre yüzeyine sahip olduğu belirlenmiştir. Çeşitli laktik asit bakterilerinin hücre yüzeyinin hidrofobik yapısı bazı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar Çizelge 4.14’de özetlenmiştir. Savage (1992) *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. reuteri*, *Lb. leichmannii* ve *Lb. murinus*’un çeşitli suşlarının hücre yüzeyinin hidrofobik karakterlerini, hücre duvarı yapısına bağlı olarak %0-81 arasında bulmuşlardır. De Ambrosini ve ark. (1998) bazı laktik asit bakterilerinin hücre duvarının morfolojisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, *Pediococcus pentosaceus*’un %0, *Lactococcus lactis*’in %6.7, *Propionibacterium acidipropionici*’nin %10, *Lb. casei*’nin %8.5 ve *Lb. acidophilus*’un hücre duvarının ise %4 oranında hidrofobik karakter taşıdığı belirlenmiştir. Ouwehand ve ark. (1999) test ettikleri probiyotik mikroorganizmaların hücre yüzeyinin hidrofobik yapısını %0-16 arasında bulmuşlardır. Vinderola ve Reinheimer (2003) bazı probiyotik laktik asit bakterilerinin hücre duvarının hidrofobik yapısını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, *Lb. acidophilus* suşlarının hidrofobik yapısını %38.1-67.8 arasında, bifidobakterlerin %13.6-64.7 arasında, *Lb. casei* ve *Lb. rhamnosus*’un ise %10.9 ile % 24.1 arasında değişen oranlarda hidrofobik yapıda olduğunu saptamışlardır. Çizelge 4.14’ün incelenmesiyle de görülebileceği gibi laktik asit bakterilerinin hücre yüzeyinin hidrofobik yapıları arasında önemli farklılıklar görülmektedir. Buradan yola çıkarak aynı türün suşları arasında farklılıkların olabileceği ve farklı hidrofobik karakter taşıyabilecekleri sonucu ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 4.14. Laktik Asit Bakterilerinin Hücre Yüzeylerinin Hidrofobik Yapısı.

Bakteri suşu	% hidrofobik	Kaynak
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	9	Ouwehand ve ark. (1999)
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	4	Ouwehand ve ark. (1999)
<i>Lb. rhamnosus</i> A15	10.9	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. rhamnosus</i> A16	19.9	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	16	Ouwehand ve ark. (1999)
<i>Lb. casei</i> shirota	8	Ouwehand ve ark. (1999)
<i>Lb. casei</i>	8.5	De Ambrosini ve ark. (1998)
<i>Lb. acidophilus</i>	4	De Ambrosini ve ark. (1998)
<i>Lb. acidophilus</i> 100-21	50	Savage (1992)
<i>Lb. acidophilus</i> 100-23	4	Savage (1992)
<i>Lb. acidophilus</i> 100-12	20	Savage (1992)
<i>Lb. acidophilus</i> A9	43.8	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. acidophilus</i> 08	38.1	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. acidophilus</i> 5	50.2	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. acidophilus</i> CSL	41	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. acidophilus</i> CNRZ 1881	50.3	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. acidophilus</i> CNRZ 1923	67.8	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>Lb. acidophilus</i>	4	De Ambrosini ve ark. (1998)
<i>Lb. acidophilus</i> 100-21	50	Savage (1992)
<i>Lb. acidophilus</i> 100-23	4	Savage (1992)
<i>Lb. acidophilus</i> 100-12	20	Savage (1992)
<i>Lb. acidophilus</i> 100-28	42	Savage (1992)
<i>Lb. fermentum</i> 1685	21	Savage (1992)
<i>Lb. reuteri</i> D111	72	Savage (1992)
<i>Lb. reuteri</i> D287	15	Savage (1992)
<i>Lb. fermentum</i> 1685	21	Savage (1992)
<i>B. bifidum</i> A12	46.7	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>B. bifidum</i> BBI	54.7	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>B. bifidum</i> Bb 12	51.8	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>B. bifidum</i> ATCFC 35914	64.7	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>B. longum</i> A1	22.5	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>B. longum</i> A7	27.1	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>B. longum</i> BL	28.9	Vinderola ve Reinheimer (2003)
<i>P. acidipropionici</i>	10	De Ambrosini ve ark. (1998)

Laktik asit bakterileri, heterojenik olarak pek çok bakteri grubunu bünyesinde barındırmasına rağmen, tipik gram-pozitif hücre duvarı yapısına sahip bulunmaktadır. Gram-pozitif bakterilerinin hücre duvarının şematik olarak görünümü Şekil 4.31’de gösterilmiştir (Delcour ve ark, 1999). Laktik asit bakterilerinin hücre duvarında temel yapı olarak peptidoglikan ve bu tabakaya gömülü halde bulunan teikhoik asit ve lipoteikhoik asit, protein yapısındaki S-tabakası ve nötr polisakkaritler bulunmaktadır. Bu yapılar, özellikle de teikhoik asit ve nötr polisakkaritlerin adhezyon ve makro moleküllerin bağlanması gibi pek çok aktivitede önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Delcour ve ark, 1999). Teikhoik asit, hücre duvarı kuru ağırlığının %50’sinden fazlasını oluşturmaktadır. Teikhoik asitin yapısı ve miktarı, tür ve suşa, kültürün yaş ve gelişim durumuna, ortamın pH’sına, karbon kaynağı ve fosfat varlığına bağlı olarak büyük farklılık göstermektedir. Teikhoik asitin peptidoglikan tabakasına kovalent bağla bağlı iken, lipoteikhoik asit ve lipoglikanların stoplazmik membrana bağlı olabildikleri, fakat bazı fraksiyonlarının hücre duvarında serbest halde olabildiği ve hatta ortamda serbest hale geçebildiği bildirilmektedir. Lipoteikhoik asit, laktik asit bakterileri grubu içinde *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leucunostoc* ve *Streptococcus* cinslerinde bulunmaktadır. Bazı *Bifidobacterium* türlerinde ise lipoteikhoik asit yerine farklı yapıda olan lipoglikan tabakası yer almaktadır. Lipoteikhoik asitin hücre duvarının hidrofobikliğini sağlayan temel bileşen olduğu belirtilmektedir (Delcour ve ark, 1999). Lipoteikhoik asit dışında diğer polisakkaritlerin genellikle hidrofilik karakterde olduğu ileri sürülmektedir. Aflatoksin ve diğer mutajenik maddelerin (heterosiklik aminler vb.) hücre duvarındaki nispeten hidrofobik karakterdeki karbonhidrat içeren bileşiklere bağlanma özelliği gösterdiği bildirilmektedir (Haskard ve ark., 2000). Bu hidrofobik kısmın suşlara göre farklılık gösterdiği ve hidrofobik kısmın artmasıyla bağlanmanın da doğru orantılı olarak arttığı ileri sürülmektedir (Oatley ve ark, 2000). Laktik asit bakterilerinin iç yüzeyinde ise stoplazmayı dış ortamdaki ayıran ve polar moleküllere karşı bir engel oluşturan stoplazmik membran tabakası bulunmaktadır (Kılıç, 2001).



Şekil 4.31. Gram-Pozitif Bakterilerin Hücre Duvarının Görünümü (Delcour ve ark, 1999).

Laktik asit bakterilerinin miktoksinleri ortamdan uzaklaştırmasının mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, etkinin fiziksel bağlama yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgularda da görülebileceği gibi, ısı işlem sonucu öldürülen bakterilerin de AFM₁ ve OTA'yı belirli oranda ortamdan uzaklaştırdığı, hatta canlı olarak kullanılmasına göre daha yüksek oranda etki göstermesi nedeniyle, bu olayın bakteri kaynaklı metabolik bir aktiviteyle açıklanamıyacağı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin hücre duvarında yer alan peptidoglikan ve polisakkaritlerin bağlanma mekanizmasında rol oynayan en önemli etken maddeler oldukları ileri sürülmektedir (Bolognani ve ark, 1997; El-Nezami ve ark, 1998b). Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda *Streptococcus cremoris* Z-25 suşundan izole edilen peptidoglikan ve polisakkaritlerin mutajenik maddeleri bağlama yeteneği gösterdiği bulunmuştur (Zhang ve Ohta, 1991). Benzer şekilde, Tanabe ve ark. (1991), mutajenik maddeleri bağlamanın hücre duvarında yer alan peptidoglikan vasıtasıyla

gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu amaçla *Streptococcus faecalis* ile yapılan bir çalışmada, bakterinin gösterdiği antimutajenik aktivitenin hücre duvarındaki protein yapısında olmayan karbonhidrat-karbonhidrat kompleksi veya lipit-karbonhidrat kompleksinden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Hosono ve ark., 1988). Bağlanma mekanizmasında hidrofobik etkileşimlerin önemli rol oynadığı, buna karşın elektrostatik etkileşimlerin ise sınırlı düzeyde etkisinin bulunduğu belirtilmektedir (Haskard ve ark, 2000). Bu konuda yapılan diğer bir çalışmada ise mutajenik maddelerin laktik asit bakterisine bağlanmasının katyonik bağlar yoluyla gerçekleştiği belirtilmektedir (Morotomi ve Mutai, 1986).

Haskard ve ark. (2000) aflatoksinlerin *Lb. rhamnosus* tarafından bağlanma mekanizmasını belirlemeye yönelik olarak yaptıkları çalışmada, bağlanmanın önemli bir kısmının hücre duvarında yer alan karbonhidratlara ve proteinlere olduğunu bulmuşlardır. Üre ilavesinin aflatoksin bağlamayı önemli ölçüde düşürmesi hidrofobik interaksiyonların önemli bir etkisinin olduğunu göstermiştir. NaCl₂ ve CaCl₂ ilavesinin bağlanma üzerine az miktarda etki göstermesi nedeniyle elektrostatik etkileşimlerin sınırlı düzeyde etki gösterdiği vurgulanmıştır.

El-Nezami ve ark. (2002a) canlı ve ısıl işleme maruz bırakılan *Lactobacillus* ve *Propionibacterium* suşlarıyla yaptıkları çalışmada, bakterilerin *Fusarium* küflerinin ürettiği deoksinivalenol, diasetoksirpenol ve fusarenon-X toksinlerini %18-93 arasında değişen oranlarda bağlama yeteneği gösterdiğini belirtmişlerdir. Isıl işlemin etkisiyle canlılığını yitiren hücrelerin de önemli oranda toksini sıvı çözültiden uzaklaştırması nedeniyle, bunun bakterilerin canlılığını yitirmiş olması nedeniyle metabolik yıkımla açıklanamıyacağı ve muhtemel etkinin fiziksel olarak bağlanma yoluyla gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar buradan yola çıkarak (metabolik aktivasyonun görülmemesi nedeniyle) aflatoksinlerin laktik asit bakterilerine bağlanmasının kovalent olmayan bağlarla gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir.

Son yıllarda Lahtinen ve ark. (2004) AFB₁'in *Lb. rhamnosus*'a bağlanma mekanizmasını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada bakterinin hücre duvarını parçalayarak, izole ettikleri komponentlerin (karbonhidrat ve protein) AFB₁'i bağlama yeteneğini belirlemeye çalışmışlardır. Araştırmacılar laktik asit

bakterilerinin hücre duvarında yer alan karbonhidratların ekzopolisakkarit, teikhoik asit veya lipoteikhoik asit ve peptidoglikan olmak üzere 3 temel formda bulunduğunu bildirmişlerdir. *Lb rhamnsous* GG hücre duvarından izole edilen peptidoglikan izolatinin (%81), canlı *Lb. rhamnosus* GG'nin (%84) bağladığı orana yakın AFB₁'i bağlayabildiği tespit edilmiştir. Diğer yandan, *Lb. rhamnosus* GG'nin hücre duvarından izole edilen ekzopolisakkaritin AFB₁'i bağlama yeteneği göstermediği görülmüştür. Diğer yandan araştırmacılar, hücre duvarında yer alan proteinlerin ve glikoproteinlerin etkisini belirlemek amacıyla spesifik proteolitik enzim ve kimyasal denatüre edici ajan (sodyum dodesil sülfat ve üre) kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda hücre duvarına kovalent olmayan bağlarla bağlı bulunan proteinlerin ve glikoproteinlerin AFB₁'i bağlamada önemli bir etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Buna karşın, bazı araştırmacılar, proteinlerin bağlanmada önemli bir etkisinin bulunduğunu da bildirmişlerdir (Haskard ve ark., 2000).

Bu çalışmada test bakterilerinin OTA'yı bağlama yetenekleri ile bakterilerin hücre duvarlarının % hidrofobik değerleri karşılaştırıldığında bir paralellik görülmemektedir. Örneğin; nispeten en yüksek hidrofobik yüzeye sahip (%18.89) *B. bifidum* Bb 13 suşunun, en düşük OTA bağlama yeteneği gösterdiği görülmüştür. Diğer yandan, ikinci en yüksek hidrofobik yüzeye sahip olan (%15.82) *Lb. acidophilus* NCC 12 suşunun *B. bifidum* Bb 13'e göre istatistiksel olarak daha yüksek oranda OTA'yı bağladığı belirlenmiştir.

Test bakterilerinin ısıtma maruz bırakılması sonucu AFM₁ ve OTA'yı bağlama yeteneklerinin artması, bu konuda özellikle AFB₁ ve diğer mikotoksin türleri ile yapılan çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Hücre duvarında yer alan polisakkarit ve peptidoglikanların ısıtma işleminden etkilendiği, ısıtma işlemiyle proteinlerin denatüre olabileceği ve polisakkarit ile peptid ve proteinler arasında Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşabileceği öne sürülmektedir. Peptidoglikan tabakası oldukça kalın olan laktik asit bakterilerinde ısıtma işleminin etkisiyle hücre duvarının kalınlığının azalabildiği ve üzerindeki gözenek çapının sıcaklık etkisiyle büyüdüğü belirlenmiştir (El-Nezami ve ark, 2002a). Bu şekilde bakterilerin bağlama yeteneğinde artış meydana gelmektedir.

El-Nezami ve ark. (2002a), *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. rhamnosus* LC-705 ve *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS suşlarının *Fusarium* toksinlerini (diasetoksirpenol, HT-2, T-2, deoksinivalenol, fusarenon-X, nivalenol ve 3-asetildeoksinivalenol) bağlama yeteneklerinde, canlı veya ısıl işleme maruz bırakılmış olmalarının suşa da bağlı olarak önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Örneğin; *Lb. rhamnosus* GG'nin HT-2, T-2, DON ve NIV toksinlerini bağlama yeteneği ısıl işlemin etkisiyle artış gösterirken, DAS ve F-X toksinlerinin bağlama yeteneğinde azalma gözlenmiő, 3AC-DON toksinini ise hem canlı hem de ısıl işleme maruz bırakılan hücrelerin bağlayamadığı belirlenmiştir. Bu konuda Turbic ve ark. (2002) tarafından yapılan diğer bir çalışmada *Lb. rhamnosus* GG'nin fosfat tamponunda 1 saat içinde OTA'yı bağlama yeteneği ısıl işlem etkisiyle %47.12'den %75.60'a yükselmiştir. Benzer şekilde *Lb. rhamnosus* LC-705 suşunun ısıl işleme maruz bırakılması durumunda fosfat tamponunda OTA'yı bağlama yeteneği %36.43'den %58.10'a yükselmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, sağlık üzerine olumsuz etkileri ve ekonomik açıdan yarattığı sorunlar nedeniyle önemli mikotoksin grupları içinde yer alan AFM₁ ve OTA'yı, fonksiyonel gıda ürünlerinin üretiminde kullanılan bazı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin fosfat tamponu ve gıda modelinde biyolojik olarak ortamdan uzaklaştırma yeteneği ayrı ayrı araştırılmıştır. Bu amaçtan hareketle gerçekleştirilen araştırmada, mikotoksinlerin bağlanmasında önemli bir faktör olarak görülen bakterilerin hücre duvarının % hidrofobik özellikleri, bakterilerin canlı veya ölü olmaları, bakteri-toksin inkübasyon süresi, bakteri yoğunluğu ve toksin konsantrasyonunun test bakterilerinin toksinleri bağlama yeteneği üzerine etkisi incelenmiştir. Araştırma kapsamında ayrıca, fosfat tamponu ve gıda modeli içinde bakterinin toksini bağlayarak oluşturduğu bakteri-toksin kompleksinin stabilitesi de belirlenerek, bağlanmanın geri dönüşümlü olup olmadığı araştırılmıştır.

Test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneği

Fosfat tamponu içinde canlı test bakterilerinin (10^8 kob ml⁻¹) AFM₁'i bağlama yetenekleri toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak %10.22-26.65 arasında bulunmuştur. Genel olarak test bakterileri içinde *B. bifidum* Bb 13, fosfat tamponunda AFM₁'i en yüksek oranda bağlama yeteneği gösterirken, *Lb. acidophilus* NCC 68'in en düşük bağlama yeteneği gösteren suş olduğu görülmüştür. Canlı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının (10^8 kob ml⁻¹) fosfat tamponunda AFM₁'i başlangıç, 4 ve 24 saat içinde bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Benzer şekilde fosfat tamponunda canlı test bakterilerinin 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine bakteri-toksin inkübasyon süresi etkisinin de önemsiz ($p>0.05$) olduğu saptanmıştır.

Araştırmada kullanılan bakteri yoğunluğunun AFM₁'i bağlamada önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. Bakterilerin 10^7 kob ml⁻¹ yoğunluğunda kullanılması durumunda AFM₁'i bağlama yetenekleri önemli oranda düşüş göstermiştir ($p<0.05$). Canlı test bakterilerinin (10^7 kob ml⁻¹) fosfat tamponunda toksin konsantrasyonu ve

inkübasyon süresine bağlı olarak AFM₁'i bağlama yeteneklerinin %0-5.02 arasında olduğu belirlenmiştir. 10⁷ kob ml⁻¹ yoğunluğundaki test bakterilerinin fosfat tamponunda başlangıç ve 4 saat içinde AFM₁'i bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsizken (p>0.05), test bakterileri arasında yalnızca *B. bifidum* Bb 13'ün fosfat tamponunda 24 saat içinde AFM₁'i bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli (p<0.05) bulunmuştur.

Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin fosfat tamponunda AFM₁'i bağlama yetenekleri toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak %14.04-28.97 arasında bulunmuştur. Isıl işleme maruz bırakılan bakteriler arasında uygulanan tüm inkübasyon süresi ve toksin konsantrasyonlarında AFM₁'e karşı en yüksek bağlama aktivitesini *B. bifidum* Bb 13 suşu göstermiştir. Araştırma kapsamında kullanılan toksin konsantrasyonunun (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) ısıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin fosfat tamponunda AFM₁'i başlangıç, 4 ve 24 saat içinde bağlama yetenekleri üzerine önemli (p>0.05) bir etkisinin bulunmadığı istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde AFM₁-bakteri inkübasyon süresinin de (başlangıç, 4 ve 24 saat) ısıl işleme maruz bırakılan bakterilerin AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Test bakterilerinin ısıl işleme maruz bırakılması sonucu literatürde de belirtildiği üzere hücre duvarındaki hidrofobik yüzeylerin daha çok açığa çıkması nedeniyle, genelde canlı olarak kullanılmalarına oranla AFM₁'i bağlama yeteneklerinde artış görülmüştür. Diğer yandan test bakterileri arasında yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 12'nin ısıl işleme maruz bırakılması sonucu fosfat tamponu ortamında başlangıçta 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yeteneği istatistiksel açıdan önemli (p<0.05) bulunurken, araştırma kapsamında kullanılan diğer bakterilerin canlı veya ölü olmasının 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) olduğu belirlenmiştir.

Canlı test bakterileri tarafından 4 saat içinde bağlanan toksinin (%16.29-25.02), AFM₁ içermeyen fosfat tamponu ile yıkanması sonucu belirli oranda stabilitesini koruyamıyarak, bağlanan toksinin kullanılan bakteri suşuna bağlı olarak %5.62-8.54 arasında değişen oranlarda geri fosfat tamponuna döndüğü belirlenmiştir.

Rekonstitüe sütte canlı test bakterilerinin 4 saat içinde 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri toksin konsantrasyonuna bağlı olarak %7.85-25.94 arasında bulunmuştur. Test bakterilerinin uygulanan 3 farklı toksin konsantrasyonunda da AFM₁'i bağlama değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli (p<0.05) olduğu görülmüştür. Rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i en yüksek bağlama yeteneğini *B. bifidum* Bb 13 gösterirken, en düşük bağlama yeteneğini *Lb. acidophilus* NCC 68 suşu göstermiştir. Diğer yandan, rekonstitüe süt ortamında bakterilerin AFM₁'i bağlamalarında uygulanan toksin konsantrasyonunun (5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Canlı test bakterilerinin 4 saat içinde fosfat tamponu ve rekonstitüe sütte AFM₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda, bakterilerin genelde fosfat tamponunda daha yüksek oranda AFM₁'i bağladığı belirlenirken, bazı istisnalar da bulunmaktadır. Örneğin; her iki ortamda da AFM₁'i en yüksek oranda bağlayan *B. bifidum* Bb 13 fosfat tamponunda 4 saat içinde 5 ng ml⁻¹ AFM₁'i %25.02 oranında bağlarken, rekonstitüe sütte %25.94 oranında bağlamıştır. Diğer yandan, canlı test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinde kullanılan 3 farklı toksin konsantrasyonunda da ortam farklılığının etkisi istatistiksel açıdan önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Isıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin 4 saat içinde rekonstitüe sütte 5, 10 ve 20 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlama yetenekleri sırasıyla %15.36-25.41, %12.85-25.64 ve %15.92-27.31 arasında değişiklik göstermiştir. Test bakterileri arasında rekonstitüe süt ortamında en yüksek bağlama yeteneğini *B. bifidum* Bb 13 gösterirken, *Lb. acidophilus* NCC 68 nispeten düşük bağlama yeteneği göstermiştir. Diğer yandan, ısıl işleme maruz bırakılan test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yetenekleri üzerine toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel açıdan önemsiz (P > 0.05) bulunmuştur.

Rekonstitüe süt ortamında canlı bakterilerin ısıl işleme maruz bırakılmaları sonucu AFM₁'i bağlama yeteneklerinde artış görülmüştür. Test bakterilerinin canlı veya ısıl işleme maruz bırakılmış olmalarının 5 ve 10 ng ml⁻¹ AFM₁'i bağlamalarında istatistiksel olarak farklılık görülmezken, *Lb. acidophilus* NCC 12 ve *Lb.*

rhamnosus'un ısıtma maruz bırakılmaları sonucu 20 ng ml^{-1} AFM₁'i bağlama yetenekleri istatistiksel olarak artış göstermiştir.

Isıtma maruz bırakılan test bakterilerinin AFM₁'i bağlama yeteneklerinin genelde fosfat tamponu ortamında daha yüksek olduğu görülmesine karşın, ortam farklılığının etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur (*Lb. acidophilus* NCC 68 hariç). Isıtma maruz bırakılan *Lb. acidophilus* NCC 68 suşu 10 ng ml^{-1} AFM₁'i PBS ortamında %19.29 oranında bağlarken, rekonstitüe sütte bağlama yeteneği %12.85'e düşmüştür.

Canlı test bakterilerinin rekonstitüe süt ortamında AFM₁'i geri dönüşsüz olarak bağladığı ve ortam farklılığının bakteri-AFM₁ kompleksinin stabilitesi üzerine önemli bir etkisinin bulunduğu belirlenmiştir.

Test bakterilerinin yokluğunda yapılan AFM₁'i geri alma çalışmalarında (pozitif kontrol) AFM₁'in fosfat tamponu ortamından geri alma oranları toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak %82.24-89.23 arasında gerçekleşmiştir. Araştırmada kullanılan inkübasyon süresi (başlangıç, 4 ve 24 saat) ve toksin konsantrasyonunun ($5, 10$ ve 20 ng ml^{-1}) etkisinin AFM₁'i geri alma değerleri üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). AFM₁'in rekonstitüe süt ortamından 4 saat içinde geri alma değerleri ise %80.97-82.08 arasında bulunmuştur. Benzer şekilde toksin konsantrasyonunun AFM₁'i rekonstitüe süttten geri alma oranları üzerine toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

AFM₁'in 4 saat içinde PBS ve rekonstitüe süttten geri alma değerlerinin karşılaştırılması durumunda; AFM₁'in fosfat tamponunda daha yüksek oranda geri alınmasına karşın, ortam farklılığının etkisi istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

Test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneği

Canlı test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) fosfat tamponu içinde OTA'yı bağlama yetenekleri, toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak %4.43-20.71 arasında bulunmuştur. Test bakterileri içinde en yüksek OTA bağlama yeteneğini *Lb. rhamnosus* göstermiştir. Canlı test bakterilerinin fosfat tamponu ortamında OTA'yı

(5, 10 ve 20 ng ml⁻¹) bağlama yeteneklerinde inkübasyon süresinin etkisi önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Benzer şekilde, bakterilerin başlangıç ve 4 saat içinde OTA'yı bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi önemsizken (p>0.05), 24 saat içinde yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 68'in 20 ng ml⁻¹ OTA'yı bağlama yeteneği diğer toksin konsantrasyonlarına göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (p<0.05).

Canlı bakterilerin (10⁸ kob ml⁻¹) fosfat tamponu ortamında genelde OTA'yı AFM₁'e göre daha yüksek oranda bağladığı görülmüştür. *B. bifidum* Bb 13 suşunun fosfat tamponu ortamında AFM₁'i en yüksek oranda bağlayan suş olmasına karşın, OTA'ya karşı test bakterileri içinde en düşük aktiviteyi göstermesi dikkat çekicidir. Bu sonuç, laktik asit bakterilerinin mikotoksinleri bağlamasında toksin türünün de önemli bir rol oynadığını ve bakterilerin değişik toksinlere karşı farklı ilgi duyabileceklerini göstermiştir.

Kullanılan canlı bakteri yoğunluğu 1 logaritma azalma gösterdiğinde (10⁷ kob ml⁻¹), bakterilerin OTA bağlama yetenekleri %0-3.93 arasında değişiklik göstermiştir. OTA'yı bağlamada bakteri yoğunluğunun etkisi istatistiksel açıdan önemli (p<0.05) bulunurken, OTA konsantrasyonunun önemli bir etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir (p>0.05).

Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin fosfat tamponu ortamında OTA'yı bağlama yetenekleri toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak %9.60-25.17 arasında bulunmuştur. Isıl işleme maruz bırakılan bakteriler arasında *Lb. rhamnosus* ve *Lb. acidophilus* NCC 12 nispeten yüksek bağlama yeteneği göstermişlerdir. Isıl işleme maruz bırakılan bakterilerin OTA'yı bağlama yeteneklerinde inkübasyon süresinin etkisi önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Benzer şekilde, başlangıç ve 24 saat içinde OTA'nın test bakterileri tarafından bağlanmasında toksin konsantrasyonu önemsiz bulunurken, 4 saat içinde yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 36'nın 10 ng ml⁻¹ OTA'yı diğer toksin konsantrasyonlarına göre daha düşük oranda bağladığı tespit edilmiştir (p<0.05).

Test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinin genelde ısıl işlem muamelesi sonrası artış gösterdiği görülmüştür. Örneğin *Lb. rhamnosus*'un fosfat

tamponunda 10 ng ml^{-1} OTA'yı 24 saat içinde bağlama yeteneği ısıtma işlemi muamelesi sonrası yaklaşık 1.7 kat artış göstermiştir.

Isıtma işlemi maruz bırakılan bakterilerin genelde AFM₁'e karşı OTA'ya kıyasla daha yüksek ilgi gösterdiği görülmüştür. Isıtma işlemi maruz bırakılan bakteriler içinde yalnızca *B. bifidum* Bb 13'ün fosfat tamponunda çalışılan tüm inkübasyon süresi ve toksin konsantrasyonlarında AFM₁'i OTA'ya kıyasla istatistiksel açıdan daha yüksek oranda bağladığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Bakteri-OTA kompleksi stabilitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, canlı test bakterileri tarafından 4 saat içinde bağlanan OTA'nın (%6.60-16.67), OTA içermeyen fosfat tamponu ile yıkanması sonucu, bağlanan toksinin stabilitesini koruyamıyarak bakteri süşuna bağlı olarak %1.98-6.67 arasında değişen oranlarda tekrar fosfat tamponuna geçtiği saptanmıştır.

Bakteri-toksin kompleksi stabilitesi üzerine toksin türünün etkisi incelendiğinde, canlı test bakterilerinden yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus*'un fosfat tamponu ile yıkanması sonucu sıvı çözeltiye geçen AFM₁ oranının OTA'ya göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Canlı test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) gıda modeli olarak kullanılan beyaz şarap ortamında 4 saat içinde OTA'yı bağlama yetenekleri toksin konsantrasyonuna bağlı olarak %15-23.40 arasında bulunmuştur. Test bakterileri içinde beyaz şarap ortamında en yüksek bağlama yeteneğini *Lb. acidophilus* NCC 36 gösterirken, *Lb. rhamnosus* nispeten düşük bağlama yeteneği göstermiştir. Canlı test bakterilerinin beyaz şarap içinde OTA'yı bağlama yeteneklerinde süş farklılığının ve toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur.

Canlı test bakterilerinin (10^8 kob ml^{-1}) 4 saat içinde fosfat tamponu ve beyaz şarap içinde OTA'yı bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda, çalışılan tüm toksin konsantrasyonlarında test bakterinin (*Lb. rhamnosus* hariç) OTA'yı beyaz şarap ortamında daha yüksek oranda bağladığı belirlenmiştir.

Isıtma işlemi maruz bırakılan test bakterilerinin 4 saat içinde beyaz şarap ortamında OTA bağlama yetenekleri %15.24-26.11 arasında değişiklik göstermiştir. Isıtma işlemi maruz bırakılan bakteriler arasında en yüksek bağlama yeteneğini *Lb. acidophilus* NCC 36 gösterirken, *Lb. rhamnosus* nispeten düşük bağlama yeteneği

göstermesine karşın, kullanılan bakteri suşunun etkisi istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Benzer şekilde, ısıtılma maruz bırakılan test bakterilerinin OTA'yı bağlama yeteneklerinde toksin konsantrasyonunun etkisi de istatistiksel açıdan önemsiz ($P > 0.05$) bulunmuştur.

Test bakterilerinin ısıtılma maruz bırakılmaları sonucunda beyaz şarap içinde OTA'yı bağlama yeteneklerinde bir miktar artış görülmüştür. Test bakterileri içinde yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 36'nın 10 ng ml^{-1} OTA'yı ve *B. bifidum* Bb 13'ün 20 ng ml^{-1} OTA'yı bağlama yeteneklerinde ısıtılma muamelesi sonrası görülen artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, ısıtılma maruz bırakılan test bakterilerinin fosfat tamponu ve beyaz şarap içinde OTA'yı bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması durumunda test bakterilerinin (*Lb. rhamnosus* hariç) çalışılan tüm toksin konsantrasyonlarında OTA'yı beyaz şarap içinde daha yüksek oranda bağladığı görülmüştür. Buna karşın, test bakterileri içinde yalnızca *Lb. acidophilus* NCC 36'nın 10 ng ml^{-1} OTA'yı ve *B. bifidum* Bb 13'ün 20 ng ml^{-1} OTA'yı beyaz şarap içinde bağlama yetenekleri fosfat tamponuna göre istatistiksel açıdan daha yüksek bulunmuştur.

Canlı test bakterilerinden *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus*'un beyaz şarapta 4 saat içinde OTA'yı geri dönüşümsüz olarak bağladığı buna karşın, *Lb. acidophilus* NCC 68, *B. bifidum* Bb 13 ve *B. bifidum* NCC 381'in bağladığı OTA'nın sırasıyla %7.06, %3.70 ve %1.91'inin tekrar sıvı çözeltiliye geçtiği tespit edilmiştir.

Bakteri-OTA kompleksi üzerine ortam farklılığının etkisinin karşılaştırılması durumunda, test bakterileri içinde *Lb. acidophilus* NCC 12, *Lb. acidophilus* NCC 36 ve *Lb. rhamnosus*'un OTA'yı geri dönüşümsüz olarak bağladığı ve ortam farklılığının etkisinin istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür.

Test bakterilerinin yokluğunda yapılan OTA'yı geri alma çalışmalarında (pozitif kontrol) OTA'yı PBS ortamından geri alma oranları toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak %88.13-89.81 arasında bulunmuştur. OTA'nın fosfat tamponundan geri alınmasında toksin konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin etkisi istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. OTA'nın beyaz şarap ortamından 4 saat içinde geri alma değerleri %84.70-86.05 arasında değişiklik

göstermiş olup, geri alma değerleri üzerine toksin konsantrasyonunun etkisi istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

OTA'nın fosfat tamponu ve beyaz şaraptan geri alma değerlerinin karşılaştırılması durumunda, OTA'nın fosfat tamponunda nispeten yüksek oranda geri alınabildiği tespit edilmiştir. 5 ve 10 ng ml⁻¹ OTA'nın geri alınmasında ortam farklılığının etkisi önemsiz ($p>0.05$) bulunurken, 20 ng ml⁻¹ OTA'nın fosfat tamponunda beyaz şaraba göre istatistiksel açıdan daha yüksek oranda geri alındığı belirlenmiştir.

Test bakterilerinin AFM₁ ve OTA'yı bağlama yetenekleri üzerine bakterilerin hücre yüzeylerinin hidrofobik özelliklerinin etkisi incelenmiştir. Araştırma kapsamında kullanılan 6 adet bakterinin hücre yüzeylerinin % hidrofobik değerleri, %4.3-18.89 arasında bulunmuştur. Test bakterileri içinde en yüksek hidrofobik yüzeye *B. bifidum* Bb 13 sahipken, *Lb. acidophilus* NCC 36'nın en düşük hidrofobik yüzey özelliği gösteren suş olduğu görülmüştür. Nispeten yüksek hidrofobik hücre yüzeyine sahip olan *B. bifidum* Bb 13'ün AFM₁'i en yüksek oranda bağlayan suş olmasına karşın, OTA'ya karşı en düşük aktiviteyi gösterdiği görülmüştür. Bu sonuç, laktik asit bakterilerinin mikotoksinleri bağlamasında toksin türünün de önemli olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak,

- a) test bakterilerinin düşük oranlarda (%30'un altında) AFM₁ ve OTA bağlama yeteneğine sahip olduğu,
- b) kullanılan bakterilerin farklı hidrofobik yüzeye sahip olması nedeniyle bağlama yeteneğinin suştan suşa farklılık gösterdiği,
- c) bakterilerin söz konusu toksinleri bağlamasında hücre yoğunluğunun önemli bir etkisinin olduğu ve ortamda minimum 10⁸ kob ml⁻¹ (probiyotik bakterilerin terapötik özellik gösterebilmesi için gerekli olan minimum yoğunluk) veya daha yüksek hücre yoğunluğunun olması gerektiği,
- d) bağlanmada bakterinin canlı olup olmasının önemli bir rol oynamadığı,
- e) bakteri-toksin inkübasyonu süresinin bağlanma üzerine etkisinin olmadığı,
- f) toksin türü ve bakteri suşu ilişkisinin bağlanmada önemli rol oynadığı,

- g) AFM₁ ve OTA'nın test bakterileri tarafından bağlanmasında ortam farklılığının (fosfat tamponu ve gıda modeli) önemli olmadığı,
- h) Bakteri-toksin kompleksinin suştan suşa farklılık göstermekle birlikte gıda modelinde fosfat tamponuna göre daha stabil bir yapı gösterdiği,
- i) HPLC kromatogramlarının incelenmesi sonucunda (kontrol örnekleriyle karşılaştırmalı olarak) toksinlere ait piklerin dışında yabancı piklerin görülmemesi, toksinlerin ortamdaki uzaklaştırılmasının metabolik yıkımla olmadığı, fiziksel bağlanma yoluyla olduğu görüşüne varılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan suşlarla gıdalarda bulunabilecek muhtemel toksinleri bağlamaya yönelik teknolojik bir çalışmanın yapılabilmesi, düşük oranlarda bağlama yeteneği göstermeleri nedeniyle mümkün görünmemektedir. Bundan sonraki aşamada, hayvansal ürünler başta olmak üzere laktik asit bakterilerince zengin ürünlerden izole edilen çeşitli laktik asit bakterilerinin kanserojenik AFB₁ ve muhtemel kanserojen AFM₁ ve OTA başta olmak üzere farklı mikotoksinleri bağlama yeteneklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca, bağlanma mekanizması üzerine etki eden faktörlerin araştırılması da büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, bakterilerin söz konusu toksinleri bağlayabilme yeteneklerinin *in vivo* koşullarda deney hayvanları ile ve/veya *in vitro* sindirim modeli kullanılarak araştırılması, mikotoksinlerin sindirim süresince absorpsiyon koşullarının belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu şekilde, mikotoksinlerin neden olabileceği toksik ve kanserojenik etkilerden korunmak amacıyla etkin bir stratejinin oluşturulması sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

- ABDEL-WAHHAB, M.A., NADA, S.A., KHALIL, F.A., 2002. Physiological and Toxicological Responses in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet With or Without Sorbent Materials. *Animal Feed Science and Technology*, 97: 209-219.
- ADAMS, M.R., 1999. Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68: 171-178.
- AKDEMİR, Ç., ALTINTAŞ A., 2003. Ankara’da içilen Sütlerde Aflatoksin M₁ Varlığının ve Düzeylerinin HPLC ile Araştırılması. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*, 18-19 Eylül 2003, İstanbul, s.87-92.
- ALBORZI, S., POURABBAS, B., RASHIDI, M., ASTANEH, B., 2006. Aflatoxin M₁ Contamination in Pasteurized Milk in Shiraz (South of Iran). *Food Control*, 17: 582-584.
- ANLI, E., ÇABUK, B., VURAL, N., BAŞPINAR, E., 2005. Ochratoxin A in Turkish Wines. *Journal of Food Biochemistry*, 29: 611-623.
- ARDA, M., 1997. Temel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, 498s.
- ATROSHI, F., RIZZO, A., WESTERMACK, T., ALI-VEHMAS, T., 2002. Antioxidant Nutrients and Mycotoxins. *Toxicology*, 180: 151-167.
- AVANTAGGIATO, G., HAVENAAR, R., VISCONTI, A., 2003. Assessing the Zearalenone-Binding Activity of Adsorbent Materials During Passage Through a Dynamic *In Vitro* Gastrointestinal Model. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1283-1290.
- AVANTAGGIATO, G., HAVENAAR, R., VISCONTI, A., 2004. Evaluation of the Intestinal Absorption of Deoxynivalenol and Nivalenol by an *In Vitro* Gastrointestinal Model, and the Binding Efficacy of Activated Carbon and other Adsorbent Materials. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 817-824.
- AYCICEK, H., AKSOY, A., SAYGI, S., 2004. Determination of Aflatoxin Levels in Some Dairy and Food Products which Consumed in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16: 263-266.

- BAKIRCI, I., 2001. A Study on the Occurrence of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products Produced in Van Province of Turkey. *Food Control*, 12: 47-51.
- BANKOLE, S. A., ADEBANJO, A., 2003. Mycotoxins in Food in West Africa: Current Situation and Possibilities of Controlling it. *African Journal of Biotechnology*, 2: 254-263.
- BANWART, G. J., 1989. *Basic Food Microbiology*. Second Edition, Chapman & Hall, New York, 773 p.
- BARBIERI, G., BEGAMINI, C., ORI, E., RESCA, P., 1994. Aflatoxin M₁ in Parmesan Cheese: HPLC Determination. *Journal of Food Science*, 59 (6): 1313-1314.
- BATA, A., LASZTITY, R., 1999. Detoxification of Mycotoxin-Contaminated Food and Feed by Microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 223-228.
- BATISH, V.K., ROY, U., GROVER, S., 1997. Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria-A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17 (3): 209-225.
- BATTILANI, P., PIETRI, A., 2002. Ochratoxin A in Grapes and Wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 639-643.
- BEJAOUII, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBRIHI, A., 2004. Ochratoxin A Removal in Synthetic and Natural Grape Juices by Selected Oenological *Saccharomyces* Strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1038-1044.
- BELLI, N., MARIN, S., DUAIGUES, A., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., 2004. Ochratoxin A in Wines, Musts and Grape Juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 591-594.
- BERENTE, B., MORICZ, A., H-OTTA, K., ZARAY, G., LEKO, L., RACZ, L., 2005. Determination of Ochratoxin A in Hungarian Wines. *Microchemical Journal*, 79: 103-107.
- BLESA, J., SORIANO, J.M., MOLTO, J.C., MANES, J., 2004. Concentration of Ochratoxin A in Wines from Supermarkets and Stores of Valencian Community. *Journal of Chromatography A*, 1054: 397-401.

- BOLOGNANI, F., RUMNEY, J.C., ROWLAND, I.R., 1997. Influence of Carcinogen Binding by Lactic Acid-Producing Bacteria on Tissue Distribution and *In Vivo* Mutagenity of Dietary Carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, 35 (6): 535-545.
- BOSTAN, K., ÇETİN, Ö., BÜYÜKÜNAL, S.K., ERGÜN, Ö., 2003. İstanbul'da Satışa Sunulan İçme Sütü Örneklerinde Aflatoksin M₁ Düzeyleri Üzerine Araştırma. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003, İstanbul, s.176.
- BRACKETT, R.E., MARTH, E.H., 1982. Association of Aflatoxin M₁ with Casein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 174: 439-441 (Alınmıştır: PIERIDES, M., EL-NEZAMI, H., PELTONEN, K., SALMINEN, S., AHOKAS, J., 2000. Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind Aflatoxin M₁ in a Food Model. *Journal of Food Protection*, 63: 645-650).
- BRERA, C., SORIANO, J.M., DEBEGNACH, F., MİRAGLIA, M., 2005. Exposure Assessment to Ochratoxin A from the Consumption of Italian and Hungarian Wines. *Microchemical Journal*, 79: 109-113.
- CABANES, F.J., ACCENSI, F., BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L., CASTELLÁ, G., MINGUEZ, S., PONS, A., 2002. What is the Source of Ochratoxin A in Wine. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 213-215.
- CHARALAMPOPOULUS, D., WANG, R., PANDIELLA, S.S., WEBB, C., 2002. Application of Cereals and Cereal Components in Functional Foods: A Review. *International Journal of Food and Microbiology*, 79: 131-141.
- CHUNG, H.S., KIM, Y.B., CHUN, S.L., JI, G.E., 1999. Screening and Selection of Acid and Bile Resistant Bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 25-32.
- CODEX ALIMENTARUS COMMISSION, 2002. Proposed Draft Code of Practice for the Prevention (Reduction) of Mycotoxin Contamination in Cereals, Including Annexes on Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonisin and Trichothecenes, CX/FAC 02/21, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rotterdam, The Netherlands.

- COMMISSION REGULATION, 2006. EC No 1881/2006 of 19 December 2006. Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364, 5-24.
- CURRY, B., CROW, V., 2003. *Lactobacillus* spp. Encyclopedia of Dairy Sciences (Eds: H. ROGINSKI, J.W. FUQUAY, P.F. FOX) Volume 3, Academic Press, 2095p.
- ÇOKSÖYLER, N., 1994. Türkiye’de Mikotoksin Problemi. II. Gıda Mühendisliği Kongresi, 21-23 Eylül, Gaziantep, s.234-239.
- ÇOKSÖYLER, N., GÜLTAKTI, Y., DEMİR, C., AŞKIN, O., KARADAŞ, F., ANDIÇ, S., 2003. Van Yöresinde Üretilen Sütlerde Aflatoksin Aranması. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003, İstanbul, s.99-104.
- DAKOVIĆ, A., TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, M., ROTTINGHAUS, G., DONDUR, V., AND MAŠIĆ, Z., 2003. Adsorption of Ochratoxin A on Octadecyldimethyl Benzyl Ammonium Exchanged-Clinoptilolite-Heulandite Tuff. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 30: 157-165.
- DALL’ASTA, C., GALAVERNA, G., DOSSENA, A., MARCHELLI, R., 2004. Reversed-Phase Liquid Chromatographic Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine. Journal of Chromatography A, 1024: 275-279.
- DEACON, J. W., 1997. Modern Mycology, Third Edition, Blackwell Science Ltd., 303 p.
- DE AMBROSINI, V.M., GONZALEZ, S., DE RUIZ HOLGADO, A.P., OLIVER, G., 1998. Study of the Morphology of the Cell Walls of Some Strains of Lactic Acid Bacteria and related species. Journal of Food Protection, 61: 557-562.
- DEBERGHES, P., BETBEDER, A.M., BOISARD, F., BLANC, R., DELABY, J.F., KRIVOBOK, S., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F., CREPPY, E.E., 1995. Detoxification of Ochratoxin A, A Food Contaminant: Prevention of Growth of *Aspergillus ochraceus* and its Production of Ochratoxin A. Mycotoxin Research, 11: 37-47.
- DELAGE, N., D’HARLINGUE, A., CECCALDI, B.C., BOMPEIX, G., 2003. Occurrence of Mycotoxins in Fruit Juices and Wine. Food Control, 14: 225-227.

- DELCOUR, J., FERAIN, T., DEGHOAIN, M., PALUMBO, E., HOLS, P., 1999. The Biosynthesis and Functionality of the Cell-Wall of Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 159-184.
- DENİZEL, T., JARVIS, B., ROLFE, E.J., 1976. A Field Survey of Pistachio (*Pistachia vera*) nut production and Storage in Turkey with Particular Reference to Aflatoxin Contamination. *Journal of Science of Agriculture*, 27: 1021-1026.
- DIAZ, D.E., HAGLER JR, W.M., HOPKINS, B.A., WHITLOW, L.W., 2002. Aflatoxin Binders I: *In Vitro* Binding Assay for Aflatoxin B₁ by Several Potential Sequestering Agents. *Mycopathologia*, 156: 223-226.
- DORNER, J.W., COLE, R.J., WICKLOW, D.T., 1999. Aflatoxin Reduction in Corn Through Field Application of Competitive Fungi. *Journal of Food Protection*, 62(6): 650-656.
- DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J., 1997. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington D.C. p768.
- D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166.
- D'SOUZA, D.H., BRACKETT, R.E., 1998. The Role of Trace Metal Ions in Aflatoxin B₁ Degradation by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, 61(12): 1666-1669.
- D'SOUZA D. H., BRACKETT, R.E., 2001. Aflatoxin B₁ Degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the Presence of Reducing Conditions and Seryl and Sulfhydryl Group Inhibitors. *Journal of Food Protection*, 64: 268-271.
- EC (EUROPEAN COMMISSION) REPORT, 1998. Opinion on Ochratoxin A, Expressed on 17 September 1998. Scientific Committee on Food.
- EC REPORT, 1999. Scientific Committee on Plants. Opinion on the Relationship Between the Use of Plant Protection Products on Food Plants and the Occurrence of Mycotoxins in Foods. SCP/RESI/063, 30 November, Brussel.
- EC REPORT, 2000. Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins. Part 3: Fumonisin B₁ (FB₁), Brussels.

- EFSA (European Food Safety Authority), 2004. Opinion on the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on Request from the Commission Related to Zearalenone as Undesirable Substance in Animal Feed. Question No EFSA-Q-2003-037, Adopted on 28 July 2004, The EFSA Journal, 89: 1-35.
- ELLIS, R. W., CLEMENTS, M., TIBBETTS, A., WINFREE, R., 2000. Reduction of the Bioavailability of 20 µg / kg Aflatoxin in Trout Feed Containing Clay. *Aquaculture*, 183: 179-188.
- EL-NEZAMI, H., SALMINEN, S.J., AHOKAS, S.J., 1996. Biological Control of Feed Carcinogens with use of *Lactobacillus*. *Nutrition-Today*, 31(6): 41,42.
- EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA., P., SALMINEN, S., AHOKAS, J., 1998a. Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind a Common Food Carcinogen, Aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 321-326.
- EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA, P., SALMINEN, S., AHOKAS, J., 1998b. Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Remove Aflatoxin from Contaminated Media. *Journal of Food Protection*, 61: 466-468.
- EL-NEZAMI, H., MYKKANEN, H., KANKAANPAA, P., SALMINEN, S., AHOKAS, J., 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* Strains to Remove Aflatoxin B₁ from the Chicken Duodenum. *Journal of Food Protection*, 63: 549-552.
- EL-NEZAMI, H. S., CHREVATIDIS, A., AURIOLA, S., SALMINEN, S., MYKKANEN, H., 2002a. Removal of Common *Fusarium* Toxins *In Vitro* by Strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants*, 19: 680-686.
- EL-NEZAMI, H.S., POLYCHRONAKI, N., SALMINEN, S., MYKKANEN, H., 2002b. Binding Rather than Metabolism may Explain the Interaction of Two Food-Grade *Lactobacillus* Strains with Zearalenone and its Derivative α -Zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3545-3549.
- ELTEM, R., AKSOY, U., ALTINDIŞLI, A., SARIGÜL, N., TAŞKIN, E., AŞKUN, T., ATEŞ, M., MEYVACI, B., ARASILER, Z., TURGUT, H., KARTAL, N.,

2003. Ege Bölgesinde Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde OTA Oluşumunun Belirlenmesi. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül, İstanbul.
- FAO/WHO (Food and Agricultural Organization/World Health Organization), 2001. Ochratoxin A, In "Safety Evaluations of Specific Mycotoxins". Prepared by the Fifty-Sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 6-15 February, Geneva.
- FILALI, A., OUAMMI, L., BETBEDER, A.M., BAUDRIMONT, I., SOULAYMANI, R., BENAYADA, A., CREPPY, E.E., 2001. Ochratoxin A in Beverages from Morocco: A Preliminary Survey. Food Additives and Contaminant, 18: 565-568.
- FROBISH, R.A., BRADLEY, B.D., WAGNER, D.D., LONG-BRADLEY, P.E., HAIRSTON, H., 1986. Aflatoxin Residues in Milk of Dairy Cows After Ingestion of Naturally Contaminated Grain. Journal of Food Protection, 49 (10): 781-785.
- GALVANO, F., GALOFARO, V., GALVANO, G., 1996a. Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. Journal of Food Protection, 59: 1079-1090.
- GALVANO, F., PIETRI, A., BERTUZZI, T., FUSCONI, G., GALVANO, M., PIVA, A., PIVA, G., 1996b. Reduction of Carryover of Aflatoxin from Cow Feed to Milk by Addition of Activated Carbons. Journal of Food Protection, 59: 551-554.
- GALVANO, F., GALOFARO, V., DE ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANO, M., GALVANO, G., 1998. Survey of the Occurrence of Aflatoxin M₁ in Dairy Products Marketed in Italy. Journal of Food Protection, 61: 738-741.
- GALVANO, F., PIVA, A., RITIENI, A., GALVANO, G., 2001. Dietary Strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins: A Review. Journal of Food Protection, 64: 120-131.
- GERMAN, B., SCHIFFRIN, E.J., RENIERO, R., MOLLET, B., PREIFER, A., NEESER, J., 1999. The Development of Functional Foods: Lessons from the Gut. Tibtech, 17, 492-499.

- GURBAY, A., AYDIN, S., GIRGIN, G., ENGIN, A.B., AND SAHIN, G., 2006. Assessment of Aflatoxin M₁ Levels in Milk in Ankara, Turkey. *Food Control*, 17(1): 1-4.
- HARRIS, J.P., MANTLE, P.G., 2001. Biosynthesis of Ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 58: 709-716.
- HASKARD, C., BINNION, C., AHOKAS, J., 2000. Factors Affecting the Sequestration of Aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, 128: 39-49.
- HASKARD, C.A., EL-NEZAMI, H.S., KANKAANPAA, P.E., SALMINEN, S., AHOKAS, J.T., 2001. Surface Binding of Aflatoxin B₁ by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3086-3091.
- HEATHCOTE, J.G., HIBBERT, J.R., 1978. Aflatoxin Chemical and Biological Aspects. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, 212p.
- HEKMAT S., MCMAHON D.J., 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food. *Journal of Food Science*, 75: 1415-1422.
- HOLZAPFEL, W.H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U., VELT, J.H.J.H., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41:85-101.
- HOLZAPFEL, W.H., SCHILLINGER, U., 2002. Introduction to Pre- and Probiotics. *Food Research International*, 35: 109-116.
- HOSONO, A., YOSHIMURA, A., OTANI, H., 1988. Desmutagenic Property of Cell Walls *Streptococcus faecalis* on the Mutagenicities Induced by Amino Acid Prolysates. *Milchwissenschaft*, 43: 168-170.
- HUSSEIN, H.S., BRASEL, J.M., 2001. Toxicity Metabolism and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
- HUWIG, A., FREIMUND, S., KAPPELI, O., DUTLER, H., 2001. Mycotoxin Detoxification of Animal Feed by Different Adsorbents. *Toxicology Letters*, 122: 179-188.

- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Some Naturally Occurring Substances, Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 56 World Health Organization, Lyon, France, p489.
- IBRAHİM, S.A., BEZKOROVAINY, A., 1993. Inhibition of *Escherichia coli* by Bifidobacteria. Journal of Food Protection, 56: 713-745.
- JAY, J.M., 1992. Modern Food Microbiology. Fourth Edition, Chapman & Hall, London, 701p.
- JORNET, D., BUSTO, O., GUASCH, J., 2000. Solid-Phase Extraction Applied to Determination of Ochratoxin A in Wines by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography A, 882: 29-35.
- KABAK, B., VAR, I., 2004. Binding of Aflatoxin B₁ by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Milchwissenschaft, 59: 301-303.
- KANİOU-GRİGORİADOU, I., ELEFTHERİADOU, A., MOURATİDOU, T., KATİKOU, P., 2004. Determination of Aflatoxin M₁ in Ewe's Milk Samples and the Produced Curd and Feta Cheese. Food Control, 16: 257-261.
- KANKAANPAA P., TUOMALA, E., EL-NEZAMI, H., AHOKAS, J., SALMINEN, S.J., 2000. Binding of Aflatoxin B₁ Alters the Adhesion Properties of *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG in a Caco-2 Model. Journal of Food Protection, 63: 412-414.
- KAMKAR, A.A., 2005. A Study on the Occurrence of Aflatoxin M₁ in Raw Milk Produced in Sarab City of Iran. Food Control, 16(7): 593-599.
- KAPTAN, H., 2000. Bifidobakteriler. Gıda, 25: 459-465.
- KARLOVSKY, P., 1999. Biological Detoxification of Fungal Toxins and Its Use in Plant Breeding, Feed and Food Production, Natural Toxins, 7: 1-23.
- KILIÇ, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, Bornova, İzmir, 451s.
- KIRDAR, S., 2000. Süt Teknolojisinde *Lactobacillus acidophilus* Yeri ve Önemi (Ed: M. DEMİRCİ) VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, 287-295.

- KIM, E.K., SHON, D.H., RYU, D., PARK, J.W., HWANG, H.J., KIM, Y. B., 2000. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined ELISA. *Food Additives and Contaminants*, 17:59-64.
- LAHTINEN, S.J., HASKARD, C.A., OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S.J., AHOKAS, J.T., 2004. Binding of Afltoxin B₁ to Cell Wall Components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, 21: 158-164.
- LEITNER, A., ZOLLNER, P., PAOLILLO, A., STROKA, J., PAPADOPOULOU, BOURAOU, A., JABOREK, S., ANKLAM, E., LINDNER, W., 2002. Comparison of Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine. *Analytica Chimica Acta*, 453: 33-41.
- LIMSOWTIN, G.K.Y., BROOME, M.C., POWELL, I.B., 2003. Lactic Acid Bacteria, Taxonomy. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Eds: H. ROGINSKI, J.W. FUQUAY, P.F. FOX) Volume 3, Academic Press, 2095p.
- LINE, J.E., BRACKETT, R.E., WILKINSON, R.E., 1994. Evidence for Degradation of Aflatoxin B₁ by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, 57: 788-791.
- LINE, J.E., BRACKETT, R.E., 1995. Factors Affecting Aflatoxin B₁ Removal by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, 58: 91-94.
- LO CURTO, R.L., PELLICANÒ, T., VILASI, F., MUNAFÒ, P., DUGO, G., 2004. Ochratoxin A Occurrence in Experimental Wines in Relationship with Different Pesticide Treatments on Grapes. *Food Chemistry*, 84: 71-75.
- LOPEZ, C., RAMOS, L., RAMADAN, S., BULACIO, L., PEREZ, J., 2001. Distribution of Aflatoxin M₁ in Cheese Obtained from Milk Artificially Contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 211-215.
- LOPEZ, C.E., RAMOS, L.L., RAMADAN, S.S., BULACIO, L.C., 2003. Presence of Aflatoxin M₁ in Milk for Human Consumption in Argentina. *Food Control*, 14: 31-34.
- LOPEZ DE CERAIN, A., GONZALEZ-PENAS, E., JIMENEZ, A.M., BELLO, J., 2002. Contribution to the Study of Ochratoxin A in Spanish Wines. *Food Additives and Contaminant*, 19: 1058-1064.

- LUND, F., FRISVAD, J.C., 2003. *Penicillium verrucosum* in Wheat and Barley Indicates Presence of Ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 1117-1123.
- MAGNOLI, C., VIOLANTE, M., COMBINA, M., PALACIO, G., DALCERO, A., 2003. Mycoflora and Ochratoxin-Producing Strains of *Aspergillus* Section Nigri in Wine Grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 179-184.
- MAJERUS, P., OTTENEDER, H., 1996. Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubensaft. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92: 388-390.
- MANTLE, P.G., 2002. Risk Assessment and the Importance of Ochratoxins. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50: 143-146.
- MARKAKI, P., DELPONT-BINET, C., GROSSO, F., DRAGACCI, S., 2001. Determination of Ochratoxin A in Red Wine and Vinegar by Immunoaffinity High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Food Protection*, 64: 533-537.
- MARTINS, M.L., MARTINS, H.M., 2000. Aflatoxin M₁ in Raw and Ultra High Temperature-Treated Milk Commercialized in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 17: 871-874.
- MARTINS, M.L., MARTINS, H.M., 2004. Aflatoxin M₁ in Yoghurts in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 315-317.
- MARX, S.P., WINKLER, S., HARTMEIER, W., 2000. Metabolization of β -(2,6)-Linked Fructose-Oligosaccharides by Different Bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 163-169.
- MATTILA-SANDHOLM, T., MYLLARINEN, P., CRITTENDEN, R., MOGENSEN, G., FONDEN, R., SAARELA, M., 2002. Technological Challenges for Future Probiotic Foods. *International Dairy Journal*, 12: 173-182.
- MCLEAN, M., DUTTON, M.F., 1995. Cellular Interactions and Metabolism of Aflatoxin: An Update. *Pharmac Ther*, 65: 163-192.

- MISHRA, H.N., DAS, C., 2003. A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 245-264.
- MOROTOMI, M., MUTAI, M., 1986. *In Vitro* Binding of Potent Mutagenic Pyrolyzates to Intestinal Bacteria. *J. Natl. Cancer Inst*, 77: 195-201. (Alınmıştır: El Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J., 1998b. Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Remove Aflatoxin From Contaminated Media. *Journal of Food Protection*, 61: 466-468).
- MOSS, M.O., 1992. Secondary Metabolism and Food Intoxication-Moulds. *Journal of Food Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 73: 80-88.
- MOSS, M.O., 2002. Mycotoxin Review-1. *Aspergillus and Penicillium*. *Mycologist*, 16: 116-119.
- NACHTMANN, C., GALLINA, S., RASTELLI, M., FERRO, G.L., DECASTELLI, L., 2007. Regional Monitoring plan Regarding the Presence of Aflatoxin M₁ in Pasteurized and UHT Milk in Italy. *Food Control*, 18: 623-629.
- NAGESWARA RAO, S.B., CHOPRA, R.C., 2001. Influence of Sodium Bentonite and Activated Charcoal on Aflatoxin M₁ Excretion in Milk of Goats. *Small Ruminant Research*, 41: 203-213.
- NAIDU, A.S., BIDLACK, W.R., CLEMENS, R.A., 1999. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (1): 13-126.
- NEAL, G.E., EATON, D.L., JUDAH, D.J., VERMA, A., 1998. Metabolism and Toxicity of Aflatoxins M₁ and B₁ in Human Derived *In Vitro* Systems. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151: 152-158.
- NG, W., MANKOTIA, M., PANTAZOPOULOS, P., NEIL, R.J., SCOTT, P.M., 2004. Ochratoxin A in Wine and Grape Juice Sold in Canada. *Food Additives and Contaminant*, 21: 971-981.
- OATLEY, J.T., RARICK, M. D., JI, G. E., LINZ, J.E., 2000. Binding of Aflatoxin B₁ to *Bifidobacteria In Vitro*. *Journal of Food Protection*, 63: 1133-1136.

- OH, S., KIM, S.H., WOROBO R.W., 2000. Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*, 83: 2747-2752.
- OLIVEIRA, C.A.F., FERRAZ, J.C.O., 2007. Occurrence of Aflatoxin M₁ in Pasteurised, UHT Milk, and Milk Powder from Goat Origin. *Food Control*, 18: 375-378.
- ONIONS, A.H.S., ALLSOPP, D., EGGINS, H.O.W., 1981. *Smiths's Introduction to Industrial Mycology*. Seventh Edition, Edward Arnold Publishers Ltd., Great Britain, 398p.
- OTTENEDER, H., MAJERUS, P., 2000. Occurrence of Ochratoxin A (OTA) in Wines: Influence of the Type of Wine and its Geographical Origin. *Food Additives and Contaminant*, 17: 793-798.
- OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, P.V., GRONLUND, M.-M., ISOLAURI, E., SALMINEN, S.J., 1999. Adhesion of Probiotic Micro-Organisms to Intestinal Mucus. *International Dairy Journal*, 9: 623-630.
- ÖZKAYA, Ş., TAYDAŞ, E.E., BAŞARAN, A., AVCI, B., HIZLI, S., 1999. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Aflatoksin Analiz Kurs Notları, 7-14 Ağustos, Ankara.
- ÖZKAYA, Ş., 2001. Ülkemizde Aflatoksin Sorunu Yaşanan Bazı Gıdalarda Aflatoksin B₁'in Azaltılması veya Giderilmesinde *Flavobacterium aurantiacum*'un Etkinliğinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- ÖZKAYA, Ş., BAŞARAN, A., TOPUZ, F., AKDEMİR, Ç., 2003. Türkiye'de Üretilen Sütlerde Aflatoksin M₁ Aranması. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003, İstanbul, s.93-98.
- PELTONEN, K., EL-NEZAMI, H., SALMINEN, S., AHOKAS, J., 2000. Binding of Aflatoxin B₁ by Probiotic Bacteria. *Journal of Food Science and Agriculture*, 80: 1942-1945.
- PELTONEN, K., EL-NEZAMI, H., HASKARD, C., AHOKAS, J., SALMINEN, S., 2001. Aflatoxin B₁ Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84: 2152-2156.

- PIERIDES, M., EL-NEZAMI, H., PELTONEN, K., SALMINEN, S., AHOKAS, J., 2000. Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind Aflatoxin M₁ in a Food Model. *Journal of Food Protection*, 63: 645-650.
- PIETRI, A., BERTUZZI, T., PALLARONI, L., PIVA, G., 2001. Occurrence of Ochratoxin A in Italian Wines. *Food Additives and Contaminant*, 18: 647-654.
- PITTET, A., 1998. Natural Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds-an Updated Review. *Revue Vet. Med*, 149(6): 479-492.
- PITT, J.I., 2000. Toxigenic fungi: Which are Important? *Medical Mycology*, 38: 17-22.
- PIVA, G., GALVANO, F., PIETRI, A., PIVA, A., 1995. Detoxification Methods of Aflatoxins. A Review. *Nutrition Research*, 15(5): 767-776.
- PLACINTA, C.M., D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C., 1999. A Review of Worldwide Contamination of Cereal Grains and Animal Feed with *Fusarium* Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 21-37.
- RAJU, M.V.L.N., DEVEGOWDA, G., 2000. Influence of Esterified-Glucomannan on Performance and Organ Morphology, Serum Biochemistry and Haematology in Broilers Exposed to Individual and Combined Mycotoxicosis (Aflatoxin, Ochratoxin, And T-2 Toxin). *British Poultry Science*, 41: 640-650.
- RAMOS, A.J., FINK-GREMMELES, J., HERNENDEZ, E., 1996. Prevention of Toxic Effects of Mycotoxins by Means of Nonnutritive Adsorbent Compounds. *Journal of Food Protection*, 59:631-641.
- RAMOS, A.J., HERNANDEZ, E., 1997. Prevention of Aflatoxicosis in Farm Animals by Means of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate Addition to Feddstuffs: A Review. *Animal Feed Science Technology*, 65: 197-206.
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), 2004. Weeks 52, 53. Available from: <http://www.europa.eu.int>.
- RASFF, 2005. Weeks 4, 5. Available from: <http://www.eu.int>.
- RASTOGI, S., DWIVEDI, P.D., KHANNA, S.K., DAS, M., 2003. Detection of Aflatoxin M₁ Contamination in Milk and Infant Milk Products from Indian Markets by ELISA. *Food Control*, 15 (4): 287-290.

- RATOLA, N., MARTINS, L., ALVES, A., 2004. Ochratoxin A in Wines-Assessing Global Uncertainty Associated with the Results. *Analytica Chimica Acta*, 513: 319-324.
- ROSA, C.A.R., MAGNOLI, C.E., FRAGA, M.E., DALCERO, A.M., SANTANA, D.M.N., 2004. Occurrence of Ochratoxin A in Wine and Grape Juice Marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminant*, 21: 358-364.
- ROUSSI, V., GOVARIS, A., VARAGOULI, A., BOTSOGLU, N.A., 2002. Occurrence of Aflatoxin M₁ in Raw and Market Milk Commercialized in Greece. *Food Additives and Contaminant*, 19: 863-868.
- RUSTOM, I.Y.S., 1997. Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, Legislation and Inactivation by Physical Methods. *Food Chemistry*, 59(1): 57-67.
- SAMARAJEEWA, U., SEN, A.C., COHEN, M.D., WEI, C.I., 1990. Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds by Physical and Chemical Methods. *Journal of Food Protection*, 53(6): 489-501.
- SAMONA, A., ROBINSON, R.K., MARAKIS, S., 1996. Acid Production by Bifidobacteria and Yoghurt Bacteria During Fermentation and Storage of Milk. *Food Microbiology*, 13: 275-280.
- SARIMEHMETOĞLU, B., KÜPLÜLÜ, Ö., ÇELİK, T.H., 2003. Detection of Aflatoxin M₁ in Cheese Samples by ELISA. *Food Control*, 1: 45-49.
- SARIMEHMETOĞLU, B., KÜPLÜLÜ, Ö., 2004. Binding Ability of Aflatoxin M₁ to Yoghurt Bacteria. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 51: 195-198.
- SAVAGE, D.C., 1992. Growth Phase, Cellular Hydrophobicity, and Adhesion *In Vitro* of *Lactobacilli* Colonizing the Keratinizing Gastric Epithelium in the Mouse. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1992-1995.
- SCOTT, P.M., 1998. Industrial and Farm Detoxification Processes for Mycotoxins. *Revue Med. Vet.*, 149(6): 543-548.
- SERRA, R., ABRUNHOSA, L., KOZAKIEWICZ, Z., VENÂNCIO, A., 2003. Black *Aspergillus* Species as Ochratoxin A Producers in Portuguese Wine Grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 2736: 1-6.

- SHAH, N.P., LANKAPUTHRA, W.E.V., 1997. Improving Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in Yoghurt. *International Dairy Journal*, 7: 349-356.
- SHAH, N., WU, X., 1999. Aflatoxin B₁ Binding Abilities of Probiotic Bacteria. *Bioscience and Microflora*, 18: 43-48.
- SHAH, N.P., 2000. Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907.
- SHETTY, P.H., JESPERSEN, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria as Potential Mycotoxin Decontaminating Agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 48-55.
- SHORTT, C., 1999. The Probiotic Century: Historical and Current Perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 411-417.
- SOUFLEROS, E.H., TRICARD, C., BOULOUMPASSI, E.C., 2003. Occurrence of Ochratoxin A in Greek Wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 173-179.
- SRIVASTAVA, V.P., BU-ABBAS, A., ALAA-BASUNY, A., AL-JOHAR, W., AL-MUFTI, S., SIDDIQUI, M.K.J., 2001. Aflatoxin M₁ contamination in commercial samples of milk and dairy products in Kuwait. *Food Additives and Contaminants*, 18: 993-997.
- STEFANAKI, I., FOUFA, E., TSATSAU-DRITSA, A., DAIS, P., 2003. Ochratoxin A Concentrations in Greek Domestic Wines and Dried Wine Fruits. *Food Additives and Contaminants*, 20: 74-83.
- SWEENEY, M.J., DOBSON, A.D.W., 1999. Molecular Biology of Mycotoxin Biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- TAMIME, A.Y., MARSHALL, V.M.E., 1997. Microbiology and Technology of Fermented Milk (Ed: B.A. Law). *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Blackie Academic & Professional Publ., London, s.153-192.
- TANABE, T., OTANI, H., OSONO, A., 1991. Binding of Mutagens with Cell Wall Peptidoglycan of *Lueconoctoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* T 180. *Milchwissenschaft*, 46: 622-625.

- TANIWAKI, M.H., PITT, J.I., TEIXEIRA, A.A., IAMANAKA, B.T., 2003. The Source of Ochratoxin A in Brazilian Coffee and its Formation in Relation to Processing Methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 173-179.
- THAMARAJ, N., SHAH, N.P., 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science*, 86: 2288-2296.
- THUVANDER, A., MÖLLER, T., BARBIERI, H.E., JANSSON, A., SALOMONSSON, A.-C., OLSEN, M., 2001. Dietary Intake of Some Important Mycotoxins by the Swedish Population. *Food Additives and Contaminant*, 18: 696-706.
- THYGARAJA, N., HOSONO, A., 1994. Binding Properties of Lactic Acid Bacteria from 'Idly' Towards Food-Borne Mutagens. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 805-809.
- TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, M., DAKOVIĆ, A., ROTTINGHAUS, G., MATIJAŠEVIĆ, S., DURIČIĆ, M., 2003. Surfactant Modified Zeolites-New Efficient Adsorbents for Mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials*, 61: 173-180.
- TOPAL, Ş., ARAN, N., PEMBEÇİ, C., 1999. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Mikotoksin Profilleri. *Gıda*, 24: 129-137.
- TURBIC, A., AHOKAS, J.T., HASKARD, C.A., 2002. Selective *In Vitro* Binding of Dietary Mutagens, Individually or in Combination, by Lactic Acid Bacteria. *Food Additives and Contaminants*, 19: 144-152.
- TÜRK GIDA KODEKSİ TEBLİĞİ, 2002. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Bulunması Hakkında Tebliğ, Resmi Gazete, 25 Eylül 2002, sayı 24885, Ankara, Başbakanlık Basımevi.
- UNUSAN, N., 2006. Occurrence of Aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1897-1900.
- VAN EGMOND H.P., 2004. Natural Toxins: Risks, Regulations and the Analytical Situation in Europe. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378: 1152-1160.

- VAR, I., KABAK, B., 2004. Removal of Aflatoxins by Viable and Heat-Killed Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 55: 106-109.
- VAR, I., KABAK, B., 2005. Occurrence of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products Consumed in Adana, Turkey. 27. Mycotoxin Workshop, 13-15 June, Dortmund, Germany.
- VAR, I., KABAK, B., 2007. Occurrence of Ochratoxin A in Turkish Wines. *Microchemical Journal*, 86: 241-247.
- VIDYASAGAR, T., VYJAYANTHI, V., SUJATHA, N., RAO, S., 1997. Quantification of Aflatoxin B₁-N⁷-Guanine Adduct in Urine by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Coupled with Immunoaffinity Chromatography. *Journal of AOAC International*, 80 (5): 1013-1022.
- VINDEROLA, C.G., BAILO, N., REINHEIMER, J.A., 2000. Survival of Probiotic Microflora in Argentinian Yoghurts During Refrigerated Storage. *Food Research International*, 33: 97-102.
- VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A., 2003. Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria: A Comparative “*In Vitro*” Study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance. *Food Research International*, 36: 895-904.
- VISCONTI, A., PASCALE, M., CENTONZE, G., 1999. Determination of Ochratoxin A in Wine by Means of Immunoaffinity Column Clean-Up and HPLC. *Journal of Chromatography A*, 864: 89-101.
- WANG, J., GROOPMAN, J.D., 1999. DNA Damage by Mycotoxins. *Mutation Research*, 424: 167-181.
- YABE, K., NAKAMURA, M., HAMASAKI, T., 1999. Enzymatic Formation of G-Group Aflatoxins and Biosynthetic Relationship Between G and B Group Aflatoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9): 3867-3872.
- YILMAZ, A., ÖZAY, G., 2001. Gıda ve Yemlerde Mikotoksinlerin Detoksifikasyonu. *Gıda Dergisi*, 7: 80-84.
- ZEPNIK, H., VOLKEL, W., DEKANT, W., 2003. Toxicokinetics of the Mycotoxin Ochratoxin A in F344 Rats After Oral Administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192: 36-44.

- ZHANG, X.B., OHTA, Y., 1991. Binding of Mutagens by Fractions of Lactic Acid Bacteria on Mutagens the Cell Wall Skelaton. *Journal of Dairy Science*, 74: 1477-1481.
- ZIMMERLI, B., DICK, R., 1996. Ochratoxin A in Table Wine and Grape Juice: Occurrence and Risk Assessment. *Food Additives and Contaminant*, 13: 655-668.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Çorum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Çorum'da tamamladıktan sonra 1993 yılında Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandı. 1998 yılında bu bölümden mezun olduktan sonra, aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 1999 yılı Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2002 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak aynı enstitüde doktora eğitimine başladı. Halen aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmakta olup, evli ve bir çocuk babasıdır.