

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
2019 YL-016

**AFLATOKSİN M1'İN (AFM1) LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ TARAFINDAN BAĞLANMASI**

Mustafa YÜCEL

Tez Danışmanı:
Dr. Öğr. Üyesi Çisem BULUT ALBAYRAK

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Mustafa Yücel tarafından hazırlanan “Aflatoksin M1’in (AFM1) Laktik Asit Bakterileri Tarafından Bağlanması” başlıklı tez, 11.01.2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Dr. Öğr. Üyesi Çisem BULUT ALBAYRAK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Ziba GÜLEY	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (tezin türü) tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. GönülAYDIN

Enstitü Müdürü



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

11/01/2019

Mustafa YÜCEL

ÖZET

AFLATOKSİN M1'İN (AFM1) LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN BAĞLANMASI

Mustafa YÜCEL

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Çisem BULUT ALBAYRAK

2019, 57 Sayfa

Aflatoksinler *Aspergillus* türleri tarafından ikincil metabolit olarak üretilen insan ve hayvan sağlığına zararlı olan toksinlerdir. Aflatoksin M1 (AFM1) süt ve süt ürünlerinde bulunabilen oldukça toksik bir maddedir. Bu çalışmanın amacı çeşitli Laktik asit bakterilerinin fosfat tamponlu tuzlu su solüsyonunda AFM1 toksinini bağlama özelliğini araştırmaktır. Farklı parametreler (AFM1 konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı, etkileşim süresi, pH, mikroorganizma konsantrasyonu, ölü veya canlı hücre olma) bağlanma mekanizmasının açıklanması için test edilmiştir. Sonuç olarak, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 (%17,05±0,91), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NRRL B-4560 (%17±0,64), *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14170 (%18,12±1,33), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* NRRL B-441 (%15,67±0,74), *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 (%17,05±0,92) ve *Lactobacillus helveticus* NRRL B-734 (%17,04±1,48) yüksek bağlanma gösteren mikroorganizmalar olarak bulunmuştur. Parametrik çalışmalar yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile yapılmıştır. Bağlanmanın kısa süre içerisinde gerçekleştiği (30 dak) gözlenmiştir. Inkübasyon sıcaklığının artması bağlanma oranını olumsuz etkilemiştir. Ölü hücreler de canlı hücrelere yakın toksin bağlama özelliği göstermiştir. AFM1-mikroorganizma kompleksinin tekrar eden yıkamalarla kararlılığı kontrol edilmiş ve sınırlı düzeyde geri kazanım gözlenmiştir. Bu deneyler, bağlanmanın fiziksel adsorpsiyon olduğunu göstermiştir. Adsorpsiyon denge verileri en iyi Sip's adsorpsiyon denge izoterm modeli ile uyumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : Aflatoksin M1, laktik asit bakterileri, fiziksel adsorpsiyon, adsorpsiyon izotermi, bağlanma mekanizması.

ABSTRACT

THE BINDING OF AFLATOXIN M1 (AFM1) BY LACTIC ACID BACTERIA

Mustafa YÜCEL

MSc Thesis, Food Engineering Department

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Çisem BULUT ALBAYRAK

2019, 57 Pages

Aflatoxins are the toxins produced by *Aspergillus* species as secondary metabolites that are harmful to human and animal health. Aflatoxin M1 (AFM1) is a highly toxic substance that can be found in milk and dairy products. The aim of this study was to investigate the ability of Lactic acid bacteria of various *Lactobacillus* species to bind AFM1 toxin in phosphate buffered saline solution. Different parameters (AFM1 concentration, incubation temperature, time of interaction, pH, concentration of microorganisms, dead or live cells) were tested to explain the binding mechanism. In the result, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 (%17,05±0,91), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NRRL B-4560 (%17±0,64), *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14170 (%18,12±1,33), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* NRRL B-441 (%15,67±0,74), *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 (%17,05±0,92) and *Lactobacillus helveticus* NRRL B-734 (%17,04±1,48) were found to be high binding microorganisms. Parametric studies were performed with *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 which showed high binding properties. It was observed that binding took place in a short time (30 min). The increase in incubation temperature adversely affected the binding rate. Dead cells also showed toxin binding properties close to living cells. The AFM1-microorganism complex was controlled by repeated washing and limited reversibility was observed. These experiments have shown that binding is physical adsorption. Adsorption equilibrium data were found to be best compatible with Sip's adsorption equilibrium isotherm model.

Key Words: Aflatoxin M1, lactic acid bacteria, physical adsorption, adsorption isotherm, binding mechanism.

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım süresince ve çalışmamın her aşamasında desteğini hiçbir zaman üzerimden eksik etmeyen, çalışmalarım ve analizlerim boyunca her zaman yanımda olan, değerli bilgilerini benimle paylaşan, gelecekteki meslek hayatımda da desteklerini eksik etmeyeceğine inandığım saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Çisem BULUT ALBAYRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmama yön veren Uzman Mustafa DURAN'a çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim yaşantım ve hayatım boyunca, başarımla beraber, her türlü zor zamanıma da ortak olan canım aileme, her konuda desteklerini ve güvenlerini benden esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu zorlu tez sürecinde manevi desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Özlem YÜCEL'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yanımda olan sevgili arkadaşım Rana AĞALDAY'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda büyük bir özveriyle yer alan, yardımını ve desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım Aslıhan KAMBER'e çok teşekkür ederim.

Manevi destekleri ile yüksek lisansım süresince yanımda olan yüksek lisans sınıf arkadaşlarıma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa YÜCEL

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1 . GİRİŞ	1
2 . Kaynak özetleri	4
2.1 . Mikotoksinler	4
2.1.1 . Aflatoksin M1 (AFM1)	7
2.2 . Laktik Asit Bakterileri.....	8
2.2.1 . <i>Lactobacillus</i>	8
2.3 . Bağlanma Çalışmaları	8
2.4 . Bağlanma Mekanizması	13
2.4.1 . Adsorpsiyon	14
2.4.1.1 . Fiziksel Adsorpsiyon.....	14
2.4.1.2 . Kimyasal Adsorpsiyon	15
2.4.1.3 . Değişim Adsorpsiyonu (İyonik Adsorpsiyon)	15
2.5 . Adsorpsiyon İzotermi.....	15
2.5.1 . Freundlich İzotermi.....	15
2.5.2 . Langmuir İzotermi.....	16
3 . MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 . Materyal	17

3.1.1 . Aflatoksin M1 Standardı	17
3.1.2 . Test Bakterileri	17
3.1.3 . Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	18
3.1.4 . BIOSAN DEN-1 Hücre Densitometre Cihazı	19
3.2 . Yöntem	19
3.2.1 . Mikroorganizma Stoklarının Hazırlanması	19
3.2.2 . PBS Çözeltilisinin Hazırlanması	19
3.2.3 . Aflatoksin M1 Standartının Hazırlanması	19
3.2.4 . Stok Mikroorganizmaların Canlandırılması	19
3.2.5 . Bağlanma Denemeleri	19
3.2.6 . Bağlanmış AFM1 Miktarının Belirlenmesi (HPLC Tekniği İle)	20
3.2.6.1 . Kromatografik Analizler İçin Ön Çalışmalar	20
3.2.6.2 . AFM1 Miktarının Belirlenmesi ve Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	22
3.2.6.3 . Tespit Limiti (LOQ)'nin Belirlenmesi	22
3.2.6.4 . Mikroorganizma Tarama İşlemi	23
3.2.7 . Mikroorganizma Yoğunluğunun Belirlenmesi	24
3.2.7.1 . BIOSAN DEN-1 Hücre Densitometre Cihazı Kullanımı	24
3.2.7.2 . Mikroorganizma Sayımı	24
3.2.7.3 . İnkübasyon Süresi	25
3.2.7.4 . İnkübasyon Sıcaklığı	25
3.2.7.5 . Aflatoksin Konsantrasyonu	26
3.2.7.6 . Mikroorganizma Konsantrasyonu	26
3.2.7.7 . Canlılığın Etkisi	26
3.2.7.8 . Bağlanma Stabilitesi	26
3.2.7.9 . pH	27

3.2.8 . Adsorpsiyon İzoterm Eğrisinin Oluşturulması ve İzoterm Modellerinin Uygulanması.....	27
4. BULGULAR.....	29
4.1. Kromatografik Analizler İçin Ön Çalışmalar.....	29
4.2. Mikroorganizma Tarama İşlemi.....	31
4.3. Mikroorganizma Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	35
4.4. İnkübasyon Süresi.....	36
4.5. İnkübasyon Sıcaklığı.....	38
4.6. AFM1 Konsantrasyonu.....	40
4.7. Canlılığın Etkisi.....	41
4.8. Bağlanma Stabilitesi.....	42
4.8. pH.....	43
4.9. Adsorpsiyon İzotermi.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFB1	: Aflatoksin B1
AFM1	: Aflatoksin M1
AFB2	: Aflatoksin B2
AFM2	: Aflatoksin M2
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (International Agency for Research on Cancer)
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
CO ₂	: Karbondioksit
LAB	: Laktik Asit Bakterisi
AFG1	: Aflatoksin G1
AFG2	: Aflatoksin G2
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
UHT	: Ultra Yüksek Isı (Ultra-High Temperature)
Kob	: Koloni Oluşturan Birim
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
°C	: Santigrat Derece
L	: Litre
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ppb	: Milyarda Bir (parts per billion)
ppm	: Milyonda Bir (parts per million)
NRRL	: Kuzey Bölgesel Araştırma Laboratuvarı (Northern Regional Research Laboratory)
İYTE	: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Üniversitesi

xviii

ADÜ	: Adnan Menderes Üniversitesi
mm	: Milimetre
λ nm	: Dalga Boyu
nm	: Nanometre
McF	: MacFarland
V	: Hacim
dak	: Dakika
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
g	: Gram
μ l	: Mikrolitre
Subsp	: Tür
Rf	: Alıkonma Zamanı
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Tayin limiti
ss	: Standart sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.2 “n” değerlerine göre eğri modelleri.....	16
Şekil 3.1 HPLC cihazı.....	21
Şekil 3.2 BIOSAN DEN-1 hücre densitometre cihazı 0,5 McF.....	24
Şekil 3.3 Petride mikroorganizma sayımı	25
Şekil 4.1 Mobil faz bileşimi hacimce (su:asetonitril:metanol) (50:30:20) (v:v:v)..	29
Şekil 4.2 Mobil faz bileşimi hacimce (su:asetonitril) (75:75) (v:v)	30
Şekil 4.3 HPLC kalibrasyon grafiği	31
Şekil 4.4 Düşük konsantrasyondaki (0,01 ppb) AFM1 kromatogram görüntüsü....	32
Şekil 4.5 5 ppb AFM1’in kromatogram görüntüsü	32
Şekil 4.6 Mikroorganizmaların AFM1’i bağlama oranları	35
Şekil 4.7 10 ⁸ kob/ml mikroorganizma yoğunluğunda kromatogram görüntüsü.	36
Şekil 4.8 10 ¹⁰ kob/ml mikroorganizma yoğunluğunda kromatogram görüntüsü. ...	36
Şekil 4.9 İnkübasyon süresinin bağlanmaya etkisi.....	38
Şekil 4.10 İnkübasyon süresinin bağlanma miktarına etkisi.	38
Şekil 4.11 İnkübasyon sıcaklığının bağlanmaya etkisi.	39
Şekil 4.12 İnkübasyon sıcaklığının bağlanma miktarına etkisi.	39
Şekil 4.13 AFM1 konsantrasyonunun bağlanma miktarına etkisi.....	40
Şekil 4.14 AFM1 konsantrasyonunun bağlanmaya etkisi.	41
Şekil 4.15 Yıkama sayısına bağlı bağlanma stabilitesi grafiği.....	43
Şekil 4.16 pH değerinin bağlanmaya etkisi.....	44
Şekil 4.17 pH değerinin bağlanma miktarına etkisi.	44
Şekil 4.18 Langmuir izoterm grafiği	49
Şekil 4.19 Freundlich izoterm grafiği.	49
Şekil 4.20 Adsorpsiyon verilerinin Sip’s izoterm modeli ile uyumu	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Aflatoksinlerin mikroorganizmalar tarafından bağlanma çalışmaları..	11
Çizelge 2.2 Adsorpsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması.	14
Çizelge 3.1 Kullanılan mikroorganizma suşları.	17
Çizelge 3.2. HPLC tekniği koşulları	22
Çizelge 3.3 Pik alanları ve LOD/LOQ değerleri	23
Çizelge 3.4 LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması.....	23
Çizelge 3.5 İzoterm modelleri ve çözümlenmeleri.	27
Çizelge 4.1 Kalibrasyon grafiği verileri.....	30
Çizelge 4.2 Mikroorganizmaların AFM1'i bağlama oranları.....	34
Çizelge 4.3 İnkübasyon süresinin bağlanmaya etkisi.....	37
Çizelge 4.4 İnkübasyon sıcaklığının bağlanmaya etkisi.	39
Çizelge 4.5 AFM1 konsantrasyonunun bağlanmaya etkisi	41
Çizelge 4.6 İzoterm modellerinin sıcaklığa bağlı verileri	45
Çizelge 4.7 Langmuir izoterm modeli verileri	45
Çizelge 4.8 Freunlich izoterm modeli verileri.....	46

1. GİRİŞ

Küfler hasat öncesi ve hasat sonrası dönemlerde tarımsal ürünlerde mikotoksin adı verilen çeşitli toksik maddeler üretebilirler. Mikotoksinlerin varlığı çeşitli ekonomik kayıplara sebep olmakla birlikte insan ve hayvan sağlığını da önemli ölçüde tehdit etmektedir. Bu toksinlerin en tehlikeli ve yaygın olanlarından bir tanesi aflatoksin B1 (AFB1)'dir (Sabuncuoğlu vd., 2008). AFB1, toksik madde içeren yemlerle beslenen hayvanların karaciğerinde aflatoksin M1'e (AFM1) dönüşerek hayvanın sütüne kontamine olmaktadır (Sabuncuoğlu vd., 2008).

Süt içerdiği protein, yağ, makro ve mikro elementler gibi temel besin maddeleri nedeniyle insan beslenmesinde önemli bir yere sahip besin ürünlerinden biridir. Özellikle yeni doğan ve ileri yaşlardaki kişilerin bağışıklık sisteminin daha hassas olması nedeni ile süte bulunabilecek toksik maddelerden daha büyük zararlar görebilirler. Bu nedenle, sütte AFM1 varlığının önlenmesi, kontrol edilmesi ve uzaklaştırılması önemli bir konudur (Corassin vd.,2013).

Mikotoksinlerin zararlı etkilerini en aza indirmek için; fiziksel uygulamalar (ısı uygulaması, radyasyon uygulaması), doğal kimyasal madde uygulamaları (vitamin kombinasyonları, melatonin, likopen, propolis, bal, yeşil çay, sarımsak, kahve, su yosunu türleri, kil mineralleri), sentetik kimyasal madde uygulamaları (Bütillenmiş Hidroksi Toluen, Bütillenmiş Hidroksi Anisol ve Propil Paraben) ve biyolojik degradasyon teknikleri kullanılmaktadır (Sabuncuoğlu vd., 2008). Mikotoksinlerin zararlı etkilerini en aza indirmek için pek çok uygulama yapılmasına rağmen gıdalardaki varlığı halen devam etmektedir. Aflatoksinleri uzaklaştırmak için birçok çalışma yapılmaktadır (Shah ve Wu, 1999; Oatley vd., 2000; Peltonen vd., 2000; Lahtinen vd., 2004; Pizzolitto vd., 2011; Ismail vd., 2016; Bueno vd., 2007). Bu çalışmaların bir kısmı aflatoksinleri degrades etme üzerine, bir kısmı ise aflatoksinleri bağlayarak uzaklaştırma üzerinedir (Zhao vd., 2010; Sarimehmetoğlu ve Küplülü 2004; Pizzolitto vd., 2011). Aflatoksinleri bağlayarak uzaklaştırmada kullanılan materyaller; bazı inorganik bileşenler ve mikroorganizmalardır. Kullanılan bazı inorganik bileşenler; aktif karbonlar, killer, alüminosilikatlardır. Bu bileşenlerin gıdalarda kullanımının uygun olup olmadığını belirlemek için daha fazla araştırma gereklidir (Masimango vd., 1979).Biyolojik yöntemler içerisinde mikroorganizmaların kullanımı , mikroorganizmanın aflatoksini degrades etmesi ya da yüzeyine bağlaması şeklinde olabilir.

Uzaklaştırma amacı ile kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri, *Bifidobacterium* suşları, *Saccharomyces cerevisiae*, *Flavobacterium aurantiacum*'dur (Hao ve Brackett, 1988; Kabak ve Var, 2008; Bueno vd., 2007). Laktik asit bakterileri Gram (+), spor oluşturmeyen ve solunum yapmayan mikroorganizmalardır (Klein vd., 1998).

AFM1'in sütteki varlığı süt ürünlerini tüketicileri için sağlığı tehdit eder potansiyelindedir. Süt özellikle büyüme çağındaki çocuklar için önemli besin kaynaklarından ve büyüme çağındaki çocuklar toksik maddeler için yetişkinlere göre daha hassastırlar. Çeşitli ülkelerde, süt ve ürünlerinde AFM1 için yasal limitler mevcuttur ve Avrupa Birliği komisyonu ve Tür Gıda Kodeksinde belirtilen yasal limitler çiğ süt için 0,05 mg/kg'dır (Anonim, 2006; Anonim, 2011; Codex, 2015). Bu limtleri geçmiş olduğu tespit edilen sütler üretim ve tüketimden uzaklaştırıldığı için ekonomik olarak da kayıplara neden olmaktadır.

AFB1'in hayvan yemlerinde varlığının kontrolü ve azaltılmasına yönelik çabalara karşın, AFM1 bulundurmeyen süt üretimi her zaman gerçekleşmeyebilir. Bu nedenle, AFM1 ile kontamine sütlerde detoksifikasyon için pratik, büyük ölçek uygulamaya uygun ve maliyet açısından verimli metotlar gereklidir.

Literatürde çeşitli laktik asit bakterisi tür ve suşlarının AFM1 uzaklaştırma özellikleri ile ilgili çoğunlukla PBS ortamında ve kısıtlı sayıda süt ortamında çalışmalar mevcuttur (Pierides vd., 2000; Kabak ve Var, 2008; İsmail vd., 2017). Bu çalışmalarda değişen oranlarda (5-100%) bağlanma tespit edilmiştir. Bu özelliğinin tür ve suşa göre değişiklik göstermesi ve başlangıç AFM konsantrasyonu, sıcaklık, vb. gibi çeşitli parametreler ile farklı bir boyutta yapılan çalışmalar, süt ortamında daha etkin ve verimli detoksifikasyon uygulamalarını mümkün kılabilir.

Gıdaların fermentasyonu çok eski zamanlardan bu yana koruma metodu olarak kullanılmıştır ve laktik asit bakterilerinin küf gelişimini engellediği ve aflatoksin olumunu azalttığı bildirilmektedir (Elsanhoty vd., 2016). Güvenli olarak da bilien ve çeşitli sağlığa faydalı etkileri ile de dikkat çeken bu bakterilerin AFM1 detoksifikasyonunda kullanılabilme potansiyeli önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli mikroorganizma tür ve suşlarının AFM1'i bağlama özelliklerini ve mekanizmasını araştırmaktır. Çalışmada insan sağlığına zararsız

olarak bilinen Gram (+) hücre yapısına sahip laktik asit bakterileri ve Gram (-) hücre yapısına sahip *Escherichia coli* kullanılmıştır. Yüksek bağlanma gösteren mikroorganizmaların belirlenmesi ve farklı parametrelerin bağlanmaya olan etkilerinin belirlenmesi bağlanma mekanizmasını açıklamak için önemlidir. Bu alanda pek çok çalışma yapılmış olmasına karşın, bazı parametreler (sıcaklık ve PH) ile ilgili verilere rastlanamamış olması niteliği ve adsorpsiyon koşullarının dizaynında faydalı olacak adsorpsiyon denge verilerinin modellenmesi literatüre katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada , kullanılan PBS ortamı model biyolojik ortam olarak düşünülmüş ve elde edilen sonuçlar süttten AFM1 uzaklaştırılmasında kullanılacaktır.

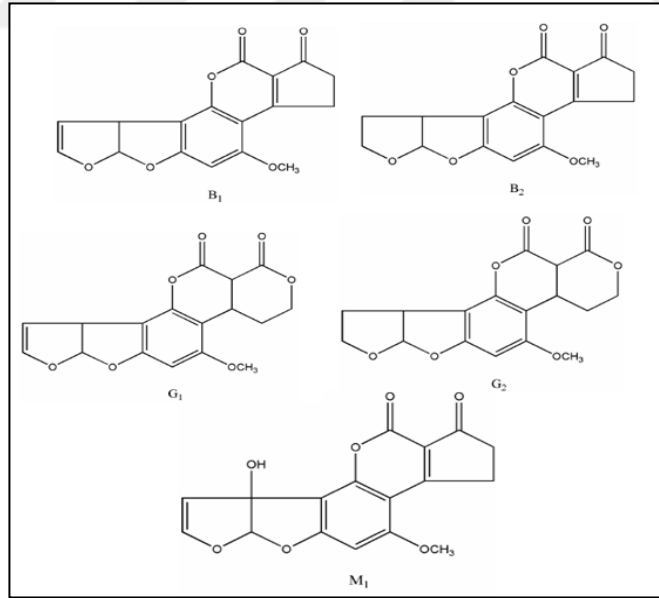
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler bazı küfler tarafından üretilen toksik metabolizma ürünleridir. Mikotoksin üreten küfler arasında *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* yer almaktadır. Mikotoksinler; küflerin gelişimi sırasında küflerin normal metabolizması için önemli bir role sahip değildir ancak insan ve hayvanlarda kanserojen, mutajen, teratojen ve östrojenik etkiler gibi akut ve kronik hastalıklara sebep olurlar (Sabuncuoğlu vd., 2008). Mikotoksinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde çoğunun aromatik yapıda olduğu bir kısmının ise alifatik bileşiklerden oluştuğu görülmüştür. Mikotoksinler bakteri toksinlerinin aksine çok çeşitli kimyasal yapıya ve biyolojik aktiviteye sahiptir (Adams ve Moss, 2000). Küçük molekülü bileşikler oldukları için immünojenik yöntemlerle belirlenmesinde poliklonal antikorlar (antiserumlar) kullanmak yeterli olur. Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğu ise miselden substrata doğru salgılanır ve difüze olur. Bu nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırıldığında ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmaz (Tunail, 2000). Genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler (sadece 240 °C'nin üstünde deşere olabilirler) ve sentezlenen diğer toksinlerden olumsuz etkilenmezler. 400 civarında mikotoksin türü bilinmektedir. Bunlardan toksisitesi ve gıdalarda bulunuşları bakımından en önemlileri aflatoksinler, fumonisinler, okratoksinler, patulin, sitrinin ve zearolenlerdir (Sabuncuoğlu vd., 2008). 400 civarında mikotoksin türü bilinmektedir. Bunlardan toksisitesi ve gıdalarda bulunuşları bakımından en önemlileri aflatoksinler, fumonisinler, okratoksinler, patulin, sitrinin ve zearolenlerdir (Sabuncuoğlu vd., 2008).

Aflatoksinler insan sağlığı açısından en tehlikeli mikotoksin grubudur (Adams ve Moss, 2000). Aflatoksinler; 1960 yılında keşfedilmiş ve 1962 yılında da güçlü bir "hepatotoksik" ve "hepatokarsinojen" etkisi olduğu anlaşılmıştır (Sabuncuoğlu vd., 2008). Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar toksinin kanserojen olduğunu göstermiştir. At, sığır, domuz, koyun, keçi, köpek, maymun, fare, hindi, tavuk, ördek gibi hayvanlar aflatoksine duyarlıdır. İçlerinde en duyarlı hayvan ördek yavruları olduğundan aflatoksinin etkilerinin belirlenmesinde genellikle bu hayvanlar kullanılır (Sabuncuoğlu vd., 2008).

Aflatoksinler yapısal olarak benzer çoklu kumarin grubudur ve genellikle 3 küf çeşidi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* subsp. *parasiticus*, *Aspergillus nomius*) tarafından üretilmektedir. Aflatoksinlerin kimyasal olarak bifuran halkası ve lakton bağı içeren kumarin türevleri oldukları saptanmıştır. Kimyasal yapıları Şekil 2.1’de görülmektedir (Ergun vd., 2006). Aflatoksinler B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 olmak üzere başlıca altı ana gruba ayrılmaktadır. Bu gruplara ek olarak, küflü kültürlerden ve hayvan vücudundan elde edilmiş metabolitleri ile (örneğin aflatoksin B2a, G2a, P1, Q1 ve aflatoksikol vb.) sayıları 18’i bulmaktadır. Aflatoksinlerin isimlendirilmesinde kullanılan B ve G harfleri ultraviyole ışık altında mavi (Blue) ve yeşil (Green) floresans verme özelliklerinden kaynaklanmaktadır. AFM1 ve AFM2, AFB1 ve AFB2’nin süt veren hayvanların bünyesinde metabolize olarak, OH içeren türevlere dönüşmesi ve süte salgılanması ile “süt kaynaklı toksin” olduklarını belirtmek amacıyla M ile simgelenmiştir (Ergun vd., 2006).



Şekil 2.1 Aflatoksinlerin kimyasal yapıları

Aflatoksinler içinde insan ve hayvanlar için en toksik olanı, en fazla karsinojenik etkiye sahip olanı, gıdalarda ve yemlerde en sık bulunanı AFB1’dir. AFB1 bilinen en güçlü karaciğer karsinojenidir. Bu sebeple Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi (IARC) tarafından aflatoksinler birinci dereceden kanserojen maddeler grubunda yer almaktadır. Aflatoksinler, insan ve hayvanlardaki toksik etkileri

dikkate alındığında $B1 > M1 > G1 > B2 > M2 > G2$ şeklinde sıralanabilmektedirler (Gacem ve El Hady-Khelil, 2016; Bullerman, 1979).

Aflatoksinler bazı gıdalar ve yemlerde bulunmaktadır. Bulaşma, işleme ve depolama sırasında olabilmektedir. Aflatoksinle kontamine olmuş yemler hayvan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Aflatoksinle kontamine olmuş yemleri tüketen hayvanların et, yumurta ve sütlerinin tüketimi ise insan sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır (Gowda vd., 2004). Aflatoksinler kontaminasyon oranına göre akut ölümlere ve kronik hastalıklara sebep olabilirler (Móricz vd., 2007). Aflatoksinlerin neden olabildiği hastalıklar; siroz, hepatit, kronik gastrit, reye sendromu ve böbrek hastalıklarıdır (Koirala vd., 2005).

Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri, birçok gıda ve yeme kontamine olabilmeleri aflatoksinlerin insan sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmasına sebep olmakta ve ekonomik yönden kayıplara yol açmaktadır. Bütün aflatoksinler ısıl işlemlere oldukça dayanıklıdır (sadece 240 °C'nin üstünde deşrede olabilirler) ve hafif asidik karaktere sahiptirler. Bu nedenle gıdaların üretim ve depolama süreçlerinde stabil kalabilmektedirler (Koirala vd., 2005).

Aflatoksin sentezi küf gelişimine uygun ortam koşullarına sahip her gıdada olabilir. Küf gelişimi üzerine substrat konsantrasyonu, nem, bağıl nem, sıcaklık ve diğere rekabetçi mikroorganizmaların bulunması gibi faktörler etkilidir (Koirala vd., 2005).

Aflatoksinlerin başlıca analiz yöntemleri; ince tabaka kromatografisi (kalitatif ince tabaka kromatografisi ve kantitatif ince tabaka kromatografisi) yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'dır. İnce tabaka kromatografisi kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Örnekleme, ekstraksiyon, yoğunlaştırma, kromatografik ayırım, tayin ve doğrulama basamakları uygulanmaktadır. Kalitatif ince tabaka kromatografisinde floresans ışık altındaki renk ayırımına ve Rf değerine göre aflatoksin varlığı tespit edilir, kantitatif ince tabaka kromatografisinde ise floresans konsantrasyonları karşılaştırılır ve UV lamba kullanılarak miktar tayini yapılır. Analiz süresi uzun olmakta ve fazla solvent kullanımı gerektirmektedir. HPLC yönteminde örnek içerisindeki bileşenler mobil faz ile kolona taşınır, kolonda bileşenler ayrılır ve detektöre ulaşan bileşenlerin oluşturduğu pikler analiz edilir. Piklerin alıkonma süreleri ve alanları hesaplanarak aflatoksin miktarı tespit edilir.

ELISA yönteminde ise spesifik antikorlar kullanılarak aflatoksin miktarı tespit edilir (Var vd., 2004).

Mikotoksin analizleri pahalı olduğu için yeni yöntemler de geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri kapiler elektroforez yöntemidir. Hazırlanan örnekler ince ve dayanıklı kapilerlerden elektirik akımı ile geçirilmektedir. Bu yöntem ile bileşiklerin elektirik yüklerine göre ayrılması sağlanmaktadır (Molina ve Giannuzzi, 2002).

Aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığını tehdit eden etkilerini azaltmak için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler önerilmiştir. Aflatoksin ile mücadelede kullanılan yöntemler; aflatoksin varlığının önlenmesi veya azaltılması olarak gruplandırılır. Tarım ürünlerinin yetiştirilmesi aşamasında, hasat öncesi ve hasat sonrası aflatoksin ve küf varlığını önleyici çeşitli uygulamalar söz konusu olabilmektedir (Sabuncuoğlu vd., 2008; Guan vd., 2011; Tunail vd., 2000; Yentür ve Er, 2011).

Aflatoksinleri uzaklaştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar mineral adsorbantların ve özellikle kil minerallerin aflatoksinleri etkin bir şekilde uzaklaştırdığını göstermiştir (Tunail vd., 2000; Masimango vd., 1979). Mikrobiyal adsorbantlar için özellikle de laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar hala sürdürülmektedir (Pierides vd., 2000; El-Nezami vd., 1998; El-Nezami vd., 2000; Di Natale vd., 2009; Shah ve Wu, 1999; Gratz vd., 2005; El Khoury vd., 2011).

2.1.1. Aflatoksin M1 (AFM1)

Aflatoksinin ana gruplarından biri olan AFM1, AFB1 içeren yemlerle beslenen hayvanların karaciğerinde aflatoksin M1'e (AFM1) dönüşerek hayvanın sütüne kontamine olmaktadır. Hayvanın tükettiği yemlerdeki AFB1 miktarı ile sütündeki AFM1 miktarı arasında doğrusal bir oran olduğu bildirilmiştir (Madalı ve Ayaz, 2017). AFM1 genellikle süt, süt tozu, peynir, yoğurt, tereyağ ve bebek mamalarında görülmektedir. Avrupa Birliği çiğ sütte, ısıtılmış sütte ve süt ürünlerinde maksimum 0,05 ppb AFM1 bulunmasına izin vermektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) AFM1'i 1. grup kanserojenler olarak değerlendirmektedir (Elsanhoty vd., 2014). Bu tez çalışmasında da AFM1'i bağlamak amacıyla mikrobiyal adsorbant olarak laktik asit bakterilerinin potansiyelleri değerlendirilmiştir.

2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri Gram (+), spor oluşturmeyen ve solunum yapmayan mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterilerinin en önemlileri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* ve *Bifidobacterium*'dur (Papadimitriou vd., 2016). Çeşitli gıdaların laktik asit bakterileri kullanılarak muhafazası en eski gıda muhafaza yöntemlerinden birisi olarak kabul edilir. Laktik asit bakterileri, bağırsak sisteminin doğal florası olmalarının yanında fermente gıdalara tekstür ve aroma vererek insanlar için önemli faydalar sağlayan bakteri grubu olarak bilinirler. Fermente et, süt, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında kullanılırlar. Laktik asit bakterileri karbohidratları parçalayarak laktik asit üretirler, kompleks oligosakkaritleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler (Garrido vd., 2013). Laktik asit bakterileri homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Homofermentatif laktik asit bakterileri metabolik faaliyetleri sonucunda sadece laktik asit üretirken, heterofermentatif laktik asit bakterileri CO₂, etanol ve laktik asit üretirler. Ayrıca fakültatif grupları da bulunmaktadır. (McDonald vd., 1987). Laktik asit bakterileri ürettikleri metabolitler ile diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki ve antagonistik aktivite gösterirler. Oluşturdukları laktik asit, asetik asit, H₂O₂, bakteriyosinler, diasetil, alkol ve CO₂ birçok mikroorganizmayı inhibi eder (Ceylan ve Aliç, 2012).

2.2.1. *Lactobacillus*

Laktik asit bakterilerinin önemli bir grubunu oluşturan *Lactobacillus*'lar metabolik faaliyetleri sonucunda laktik asit üretirler ve pH'ı düşürürler. Birçok fermente gıdada aroma maddeleri üretmeleri ve pH'ı etkin bir şekilde düşürmeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar (Sömer vd., 2012). Ayrıca *Lactobacillus* 'lar probiyotik özellik gösterirler, bağırsak patojenlerine karşı laktik asit, H₂O₂ ve çeşitli bakteriyosinler üreterek insan sağlığını olumlu yönde etkilerler (Sezen, 2013).

2.3. Bağlanma Çalışmaları

Literatürde gıdalardaki aflatoksin oranlarını belirleme ve mikroorganizmaların aflatoksinleri bağlama özellikleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada yöresel süt ürünlerinde AFM1 düzeyleri belirlenmiş ve süt örneklerinin %40,62'sinde, yoğurt örneklerinin %32,81'inde AFM1'e rastlanmıştır.

Kontaminasyon düzeylerinin bir kısmının Avrupa Birliği limitlerinin altında, bir kısmının ise üzerinde olduğu görülmüştür (Elsonhoty vd., 2014). *In vitro* koşullarda süt ve PBS sıvısında yapılan AFM1'in *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* tarafından bağlanma deneyleri 2 saat ve 14 saat'te gerçekleştirilmiş ve *L. bulgaricus*'un *S. thermophilus*'a göre yüzdesel olarak daha yüksek bağlama gösterdiği (14 saat sonra *L. bulgaricus* için %87,6 ve *S. thermophilus* için %70) tespit edilmiştir (Pizzolitto vd., 2011).

Sekiz farklı *Lactobacillus casei* suşunun PBS sıvısında AFB1'i bağlama özellikleri belirlenmiştir. Bu 8 suş farklı ekolojik kaynaklardan elde edilmiştir (peynir, mısır silajı, insan dışkısı, fermente içecek). Bu suşlar farklı derecede toksin bağlama özelliği göstermişlerdir. En yüksek AFB1 bağlama özelliği gösteren suş *Lactobacillus casei* L30'dur ve toksin bağlama oranı %49,2 olarak tespit edilmiştir. Aflatoksin mikroorganizma kompleksinin stabilitesi tekrar eden yıkamalar ile test edilmiş ve stabilite özelliğinin de suşlar arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Oatley vd., 2000).

UHT yağsız sütte laktik asit bakterilerinin ve *Saccharomyces cerevisiae*'nın AFM1'i bağlama etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada 3 farklı laktik asit bakterisi tek başına ve farklı kombinasyonlar halinde kullanılmıştır. Bütün mikroorganizmalar ısıtıl işlem (100 °C, 1 saat) ile öldürülmüş ve etkileşim süresinin etkisi 37°C'de yapılan deneyler ile belirlenmiştir. Laktik asit bakterisi karışımları ile *S. cerevisiae* hücreleri karşılaştırıldığında, *S. cerevisiae* hücrelerinin daha yüksek bağlama özelliği (30 dakikada %90,3±0,3) gösterdiği, etkileşim sürelerinin ise bağlanmayı önemli düzeyde etkilemediği gözlenmiştir. Bu çalışma *S. cerevisiae*'nın tek başına ya da laktik asit bakterileri karışımları ile sütte AFM1'i düşürecek potansiyel uygulamalarını göstermiştir (Serrano-Niño vd., 2013).

5 ppm AFB1 içeren PBS sıvısında 10¹⁰ kob/ml *L. rhamnosus* GG ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 15-16 saat, 37°C'de inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranı %75,3 olarak gözlenmiştir. 5 ppm AFB1 içeren PBS sıvısında 10¹⁰ kob/ml *L. rhamnosus* LC 705 ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 20 saat, 37°C'de inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranı %76,3 olarak gözlenmiştir (El-Nezami vd., 1998).

0,15 ppm AFM1 içeren PBS sıvısında *L. rhamnosus* GG ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 15-16 saat, 37°C'de inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranı

%50,7±2,1 olarak gözlenmiş, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* ile aynı koşullarda çalışma yapıldığında ise bağlanma oranı %40,4±2,7 olarak gözlenmiştir. Yağsız süt ortamında aynı koşullarda *L. rhamnosus* GG ile bağlanma oranı %18,8±1,9 olarak gözlenmiştir. 50 ppm AFM1 içeren PBS sıvısında 10^6 kob/50 ml *Lactobacillus bulgaricus* ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 14 saat, 37°C'de inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranı %87,6 olarak gözlenmiştir. 10^6 kob/ml *Streptococcus thermophilus* ile aynı koşullarda yapılan çalışmada ise bağlanma oranı %70 olarak gözlenmiştir (Shah ve Wu, 1999).

10 ppm AFB1 içeren PBS sıvısında 10^{11} kob/0,5 ml probiyotik mikroorganizma karışımı (*L. rhamnosus* LC 705, *Probiobacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS) ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 24 saat, 37°C'de inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranı %57,8 olarak gözlenmiştir (Peltonen vd., 2000).

0,05 ppb AFM1 içeren PBS sıvısında 10^6 kob/ml *Lactobacillus* suşları ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 14 saat, 37°C'de inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranının %76-100 arasında olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada 0,1 ppb AFM1 içeren PBS sıvısında ise bağlanma oranının %73-92 arasında olduğu gözlenmiştir (Lahtinen vd., 2004).

0,5 ppm AFB1 içeren sıvıda 2×10^8 kob/ml *Lactococcus lactis* ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 30 dakika inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranı %54,85 olarak gözlenirken, *Streptococcus thermophilus* ile aynı koşullarda yapılan çalışmada ise bağlanma oranı %81 olarak gözlenmiştir (Elsanhoty vd., 2014).

4,6 ppb AFB1 içeren PBS sıvısında 2×10^8 kob/ml *L. casei* ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 4 saat, 37°C'de inkübasyon uygulanmış ve bağlanma oranının %14-49 arasında olduğu gözlenmiştir (İsmail vd., 2016).

Yapılan çalışmalar ile ilgili başlıca koşullar ve sonuçlar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Aflatoksinlerin mikroorganizmalar tarafından bağlanma çalışmaları

Aflatoksin	Konsantrasyonu	Mikroorganizma Tipi	İnkübasyon Koşulları	%Bağlanma	Kaynak
AFB1	5 µg/ml	<i>L. rhamnosus</i> GG	15-16 saat 37°C PBS sıvısında, 10 ¹⁰ kob/ml	75,3	(El-Nezami vd., 1998)
AFB1	5 µg/ml	<i>L. rhamnosus</i> LC 705	20 saat 37°C PBS sıvısında, 10 ¹⁰ kob/ml	76,3	(El-Nezami vd., 1998)
AFM1	0,15 µg/ml	<i>L. rhamnosus</i> GG	15-16 saat 37°C yağsız süt ortamında	18,8±1,9	(Shah ve Wu, 1999)
AFM1	0,15 µg/ml	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	15-16 saat 37°C PBS sıvısında	40,4±2,7	(Shah ve Wu, 1999)
AFM1	0,15 µg/ml	<i>L. rhamnosus</i> GG	15-16 saat 37°C PBS sıvısında	50,7±2,1	(Shah ve Wu, 1999)
AFM1	50 µg/ml	<i>Streptococcus thermophilus</i>	14saat 37°C PBS sıvısında, 10 ⁶ kob/ml	70	(Shah ve Wu, 1999)
AFM1	50 µg/ml	<i>L. bulgaricus</i>	14saat 37°C PBS sıvısında, 10 ⁶ kob/50ml	87,6	(Shah ve Wu, 1999)
AFB1	-	<i>L. casei</i> L 30	PBS sıvısında	49,2	(Oatley vd., 2000)
AFB1	10 µg/ml	Probiyotik karışım (<i>L. Rhamnosus</i> LC 705, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> JS)	24 saat 37°C PBS sıvısında, 10 ¹¹ kob/0,5ml	57,8	(Peltonen vd., 2000)
AFM1	0,05 µg/l	<i>Lactobacillus</i> suşları	14saat37°C PBS sıvısında, 10 ⁶ kob/ml	76-100	(Lahtinen vd., 2004)
AFM1	0,1 µg/l	<i>Lactobacillus</i> suşları	14 saat 37°C PBS sıvısında, 10 ⁶ kob/ml	73-92	(Lahtinen vd., 2004)
AFM1	-	<i>L. bulgaricus</i>	14 saat PBS sıvısında	87,6	(Pizzolitto vd., 2011)

Çizelge 2.1 Aflatoksinlerin mikroorganizmalar tarafından bağlanma çalışmaları (devamı)

AFM1	-	<i>Streptococcus thermophilus</i>	14 saat PBS sıvısında	70	(Pizzolitto vd., 2011)
AFM1	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 dakika 37°C UHT Yağsız Süt Ortamında	90,3±0,3	(Serrano-Niño vd., 2013)
AFB1	0,05 µg/ml	<i>Lactococcus lactis</i>	30 dakika 2x10 ⁸ kob/ml	54,85	(Elsanhoty vd., 2014)
AFB1	0,5 µg/ml	<i>Streptococcus thermophilus</i>	30 dakika 2x10 ⁸ kob/ml	81	(Elsanhoty vd., 2014)
AFB1	4,6 µg/l	<i>Lactobacillus casei</i>	4 saat 37°C PBS sıvısında, 2x10 ⁸ kob/ml	14-49	(Ismail vd., 2016)

2.4. Bağlanma Mekanizması

Mikroorganizmaların aflatoksinleri uzaklaştırmalarının degradasyon ya da fiziksel bağlanma (adsorpsiyon) ile mümkün olabildiği görülmüştür. Aflatoksinlerin, mikroorganizmaların yüzeylerine bağlanması konusunda laktik asit bakterileri ve *Saccharomyces cerevisiae* ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Gerbaldo vd., 2012, Kabak ve Özbey, 2012a, Kabak ve Özbey, 2012b, Serrano-Niño vd., 2013). Yapılan bir literatür çalışmasında yoğurttaki probiyotik bakterilerin AFM1'i detoksifiye etme özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada AFM1 düzeylerindeki azalma en fazla %50 yoğurt kültürü (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*) ve %50 *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiş yoğurta gözlenmiş ve AFM1 düzeylerindeki azalma, bağlanma veya degradasyon olarak ifade edilmiştir. AFM1 düzeyleri 5 °C de, 7 gün boyunca süren çalışma sonucunda belirlenmiştir (Sarimehmetoğlu ve Küplülü, 2004).

Bağlanma mekanizmasının açıklanmasına ilişkin yapılan çalışmalar ve deneyler göstermiştir ki toksinin uzaklaşması mikrobiyal degradasyon ve kovalent bağlanmadan ziyade, organizmanın hücre duvarı komponentlerine toksinin tutunması şeklindedir (Gerbaldo vd., 2012; İsmail vd., 2016). Ölü hücrelerde de bağlanmanın görülmüş olması bu durumu desteklemektedir.

Probiyotik LAB'nin hücre duvarındaki peptidoglukan ve polisakkaritlerin, bağlanma mekanizmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (İsmail vd., 2016). Gram (+) suşların, aflatoksin B1 (AFB1)'e gram (-) olan *Escherichia coli*'den daha yüksek bağlanma yeteneği gösterdiği ve bakterinin hücre duvarı yapısının bağlanmada önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (El-Nezami vd., 1998). Benzer şekilde, *Streptococcus faecalis* ile yapılan başka bir çalışmada antimutajenik aktivitenin, hücre duvarındaki protein yapısında olmayan, karbonhidrat kompleksi veya lipit-karbonhidrat kompleksinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Haskard vd., 2000). Probiyotik laktik asit bakterisinin toksini bağlama kapasitesinin hücre yüzeyinin hidrofobik karakteri ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Oatley vd., 2000). Diğer yandan bakterinin mikotoksini bağlama yeteneğinin toksinin özelliklerine göre de farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Probiyotik LAB'nin aflatoksini bağlama yeteneğinin toksinin polaritesi ile yakından ilişkili olduğunu ve bağlama yeteneğinin sırasıyla AFB1 > AFB2 > AFG1 > AFG2'ye doğru azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Haskard vd., 2000).

2.4.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon; bir maddenin diğ er bir madde yüzeyinde konsantrasyonunun artması veya başka bir ifadeyle moleküllerin temas ettikleri yüzeydeki çekme kuvvetlerine bağı lı olarak, o yüzeyle birleşmesidir. Adsorban yüzeye tutunan madde, adsorbent ise tutulunan maddeyi ifade etmektedir. Ü ç çeş it adsorpsiyon yöntemi vardır. Bunlar fiziksel adsorpsiyon, kimyasal adsorpsiyon ve değı ş im adsorpsiyonu (iyonik adsorpsiyon)'dur (Hamutoğ lu vd., 2012). Adsorpsiyon yöntemlerindeki çekim kuvvetleri ve gösterdikleri özellikler Ç izelge 2.2'de karşı laşt ırılmalı olarak gösterilmektedir.

Ç izelge 2.2 Adsorpsiyon yöntemlerinin karşı laşt ırılması

Fiziksel Adsorpsiyon	Kimyasal Adsorpsiyon	Değı ş im Adsorpsiyonu (İyonik Adsorpsiyon)
Spesifik değı ldir.	Spesifiktir.	Spesifik değı ldir.
Van der Waals kuvvetleri etkilidir.	Elektron alış veriş i veya ortak elektron kullanımı etkilidir.	Elektrostatik çekim kuvvetleri etkilidir.
Tekli veya çoklu bağı lar oluşabilir.	Tekli bağı oluşur.	Tekli veya çoklu bağı lar oluşabilir.
Hızlı bağlanma görülür ve geri dönüşümlüdür.	Yavaş bağlanma görülür ve geri dönüşümü zordur.	Hızlı bağlanma görülür ve geri dönüşümlüdür.
Düşük sıcaklıklarda daha yüksek adsorpsiyon görülür.	Yüksek sıcaklıklarda daha yüksek adsorpsiyon görülür.	Elektrik yükü fazla olan iyonlar ile küçük çaplı iyonlarda daha yüksek adsorpsiyon görülür.

2.4.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyonda zayıf van der Waals bağı ları oluşur. Bu bağı lar tekli veya çoklu olabilir. Spesifik bir adsorban ve adsorbent yoktur, bağı lar birçok farklı bileş en ile oluşabilmektedir. Bağlanma hızlı ve bağı ların çekim kuvvetleri zayıf olduğı için geri dönüşümlü olabilir. Düşük sıcaklıklarda daha yüksek fiziksel bağlanma görülmektedir (Hamutoğ lu vd., 2012).

2.4.1.2. Kimyasal Adsorpsiyon

Kimyasal adsorpsiyonda elektron alışverişi veya ortak elektron kullanımından kaynaklanan kuvvetler etkilidir. Bağlar spesifikdir ve sadece belirli özellikteki bileşenler arasında oluşmaktadır. Her bileşen tekli bağ oluşturmaktadır. Bağlanma hızı düşüktür ve kimyasal etkileşim olduğu için geri dönüşümü zordur. Kimyasal reaksiyonların oluşması için gerekli olan eşik enerjilerinin daha kolay sağlanmasından dolayı yüksek sıcaklıklarda kimyasal bağlanma daha çok görülmektedir (Hamutoğlu vd., 2012).

2.4.1.3. Değişim Adsorpsiyonu (İyonik Adsorpsiyon)

Değişim adsorpsiyonunda elektrostatik çekim kuvvetleri etkilidir. Tekli veya çoklu bağlar oluşabilir. Spesifik bir adsorban ve adsorbent yoktur, bağlar birçok farklı bileşen ile oluşabilmektedir. Bağlanma hızlı ve geri dönüşümlü olabilir. Elektrik yükü fazla olan iyonlar ile küçük çaplı iyonlarda daha yüksek değişim (iyonik) adsorpsiyonu görülmektedir (Hamutoğlu vd., 2012).

2.5. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorbent yüzeyinde adsorplanmış adsorbatın sistem denge halindeyken bulunan miktarı ile çözültideki adsorbatın konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi sabit sıcaklıkta gösteren eğrilere adsorpsiyon izotermi denir. Farklı izoterm modelleri geliştirilmiştir. Bunlar Freundlich, Langmuir ve bu izotermilerin karışımı ile elde edilen Langmuir-Freundlich (Sip's) izoterm modelleridir (Doğan vd., 2000).

2.5.1. Freundlich İzotermi

Aşağıda gösterilen Freundlich İzoterm denklemi (Eşitlik 1) düşük konsantrasyonlar için başarılı sonuçlar vermektedir.

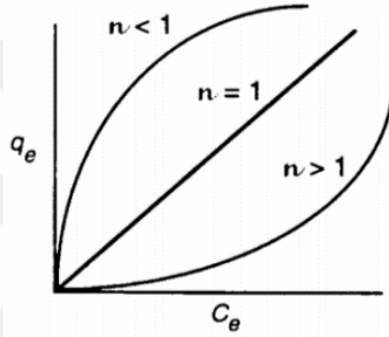
$$\ln q_e = \ln K_F + 1/n \ln C_e \quad \text{Eşitlik 1}$$

q_e : Birim mikroorganizma ağırlığı başına adsorplanan AFM1 miktarı

K_F : Adsorpsiyon kapasitesi

C_e : Denge de adsorplanmadan çözültide kalan AFM1 derişimi

Bu eşitlikte n , adsorpsiyon yoğunluğunun bir ölçüsüdür. Deneysel veriler izoterm ile uygunluk gösteriyorsa $1/n$ değeri 0 ile 1 ($n > 1$) aralığında olmaktadır (Şekil 2.2). $\ln q_e$ 'nin $\ln C_e$ 'ye bağlı grafiği çizildiğinde doğrusal bir eğri elde edilir. Elde edilen eğriden izoterm sabitleri olan K_F ve n değerleri belirlenebilir (Doğan vd., 2000).



Şekil 2.2 “n” değerlerine göre eğri modelleri

2.5.2. Langmuir İzotermi

Aşağıda gösterilen Langmuir İzotermi tek tabaka adsorpsiyonunu açıklayan bir izotermdir. Bu izoterm modeli adsorpsiyonun sabit olduğunu ve adsorbatların hareket edemeyeceğini varsaymaktadır (Doğan vd., 2000). Değerler Eşitlik 2'deki denklem ile hesaplanmaktadır.

$$C_e/q_e = 1/(q_m K) + C_e/q_m \quad \text{Eşitlik 2}$$

C_e : Denge de adsorplanmadan çözeltide kalan AFM1 derişimi

q_e : Birim mikroorganizma ağırlığı başına adsorplanan AFM1 miktarı

K : Adsorpsiyonun net entalpi sabiti

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak aflatoksin M1 standardı, test bakterileri, besiyerleri ve kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kromatografik analizler HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Aflatoksin M1 Standardı

Aflatoksin M1 standardı (R-Biopharm Rhone Ltd.) Ege Laborsis Dış Ticaret Ltd. Şti. tarafından Sincer Dış Ticaret Ltd. Şti. İzmir'den getirilmiştir. 6 ml'lik sıvı formdadır. Standart, 1000 ppb olarak asetonitril içerisinde çözündürülmüş aflatoksin M1 olarak temin edilmiştir.

3.1.2. Test Bakterileri

Test bakterileri Amerikan Tarımsal Araştırma Servisi Kültür Koleksiyonu USA (NRRL)'den ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarları'ndan 38 mikroorganizma suşu temin edilmiştir. Bu suşlar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan mikroorganizma suşları

No	Mikroorganizma	Suş Numarası	Kaynak
1	<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-1922	NRRL
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	NRRL
3	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	İYTE
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CH 1	İYTE
5	<i>Lactobacillus pentosus</i>	NRRL B-227	NRRL
6	<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-441	NRRL
8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	NRRL B-442	NRRL
9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	NRRL B-548	NRRL
10	<i>Lactobacillus fructosus</i>	N 641	İYTE
11	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i>	NRRL B-735	NRRL
12	<i>Lactobacillus pentosus</i>	NRRL B-1560	NRRL
13	<i>Lactobacillus brevis</i>	NRRL B-1830	NRRL

Çizelge 3.2 Kullanılan mikroorganizma suşları (devamı)

14	<i>Lactobacillus brevis</i>	N 1836	İYTE
15	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	NRRL B-1843	İYTE
16	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL B-1910	İYTE
17	<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-1922	İYTE
18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1954 DSM	İYTE
19	<i>Lactobacillus fructosus</i>	NRRL B-2041	İYTE
20	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp <i>torquens</i>	NRRL B-4390	İYTE
21	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp <i>coryniformis</i>	NRRL B-4391	İYTE
22	<i>Lactocobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	İYTE
23	<i>Lactobacillus fermentum</i>	N 4524	İYTE
24	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	NRRL B-4525	NRRL
25	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>	NRRL B-4560	NRRL
26	<i>Lactobacillus farciminis</i>	NRRL B-4566	NRRL
27	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 8768	İYTE
28	<i>Lactobacillus reuteri</i>	NRRL B-14170	NRRL
29	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	NRRL B-1821	NRRL
30	<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-441	NRRL
31	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>	NRRL B-4560	NRRL
32	<i>Lactobacillus rhamnasus</i>	NRRL B-442	NRRL
33	<i>Lactobacillus helveticus</i>	NRRL B-734	NRRL
34	<i>Lactobacillus buchneri</i>	NRRL B-1862	NRRL
35	<i>Pediococcus acidilactici</i>	NRRL B-23864	NRRL
36	<i>Lactobacillus fermentum</i>	NRRL B-1932	NRRL
37	<i>Lactobacillus reuteri</i>	NRRL B-14172	NRRL
38	<i>Lactobacillus brevis</i>	NRRL B-3065	NRRL

3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

Besiyerleri ve kullanılan kimyasal maddelerin hepsi Ege Laborsis Dış Ticaret Ltd. Şti. İzmir'den temin edilmiştir. Analizlerde kullanılan besiyerleri ve kimyasallar aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

- MRS Broth Merck M110661.0500
- M 17 Broth Merck M115029.0500
- Nutrient Broth Merck M105443.0500
- Bacteriological Pepton Oxoid LP037 500 g
- Agar AppliChem A0949 1 kg
- HPLC grade su, 2,5 L Merck 1.15333.2500
- HPLC grade methanol, 2,5 L 106018.2500
- HPLC grade acetonitrile, 2,5 L Merck 1.00030.2500
- Phosphate buffered saline tablet (PBS tablet) Sigma-Aldrich SIAL-P4417-100TAB
- Saf su (ADÜ Gıda Mühendisliği Bölümü Kimya Laboratuvarı)

3.1.4. BIOSAN DEN-1 Hücre Densitometre Cihazı

Hücre yoğunluğuna bağlı olarak sıvı ortamdaki bulanıklığın ölçülmesinde kullanılmıştır. Cihaz, Ege Laborsis Dış Ticaret Ltd. Şti. İzmir'den temin edilmiştir. Cihazın özellikleri aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

- Işık kaynağı olarak ışık diyotu kullanılmaktadır.
- Dalga boyu; $\lambda = 565 \pm 15$ nm'dir.
- Ekran hassasiyeti 0,1 McF'dir.
- Doğruluk ± 3 'dür.
- Ölçüm süresi 1 saniyedir.
- Numune hacmi ≥ 2 ml'dir
- Tüp giriş çapı 18 mm'dir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizma Stoklarının Hazırlanması

Tüp içerisinde toz halinde NRRL'den temin edilen mikroorganizmaların sıvı besiyerine aktarılması ile gelişmeleri sağlanmıştır (37°C, 24 saat inkübasyon). 2 pasaj işlemi uygulanmıştır. Aynı zamanda %50 gliserol içeren besiyeri hazırlanmış, son konsantrasyon %20 gliserol olacak şekilde 3:2 oranında karıştırılarak stok mikroorganizmalar elde edilmiştir. İYTE'den temin edilen mikroorganizmalar ise sıvı besiyeri içerisinde olduğu için 2 pasaj işlemi uygulandıktan sonra %50 gliserol içeren besiyeri ile 3:2 oranında karıştırılarak stok mikroorganizmalar elde edilmiştir.

Stok mikroorganizmalar (-20°C)'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. PBS Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde satın alınan PBS'ten (Sigma-Aldrich SIAL-P4417-100TAB) 200 ml saf suya 1 tablet eklenerek PBS sıvısı hazırlanmıştır. Tabletin homojen olarak karışması için manyetik karıştırıcılar ile karıştırma işlemi uygulanmıştır. Otoklavda sterilize edilip (121°C, 15 dakika) kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.3. Aflatoksin M1 Standartının Hazırlanması

Aflatoksin M1 standartı 1000 ppb'lik asetonitril içerisinde çözülmüş halde temin edilmiştir. PBS ile seyreltilerek kullanıma uygun konsantrasyonlar elde edilmiştir. 1000 ppb'lik standart ile PBS 1:4 oranında karıştırılarak 200 ppb'lik, 1:9 oranında karıştırılarak 100 ppb'lik AFM1 standartları hazırlanmıştır. 100 ppb'lik standart ile PBS 1:1 oranında karıştırılarak 50 ppb'lik AFM1 standart çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.4. Stok Mikroorganizmaların Canlandırılması

(-20°C)'de muhafaza edilen mikroorganizmalar kullanım durumlarına göre analiz edilmeden önce 2 ml'lik besiyeri ortamına öze ile aktarılmış ve inkübasyona bırakılmıştır (37 °C'de 24 saat). Gelişmeleri sağlandıktan sonra 2 kez pasaj işlemi uygulanmış (2 ml'lik bir besiyerine 20 µl) ve yine inkübasyona bırakılmıştır (37 °C'de 24 saat). İnkübasyon sonrasında 30 ml'lik falkon tüplerde steril halde bulunan besiyerine ekim yapılmış ve inkübasyona bırakılmıştır (300 µl, 37 °C'de 30 saat). İnkübasyon sonucunda analizlerde kullanılacak olan mikroorganizmalar elde edilmiştir.

3.2.5. Bağlanma Denemeleri

Elde edilen mikroorganizmalara 15 dakika, 5000 rpm (3360 g) santrifüj işlemi uygulanmıştır. Çöken mikroorganizmaların üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve 10 ml PBS ile vorteks cihazı kullanılarak birinci yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra yeniden 15 dakika, 5000 rpm (3360 g) santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant (üst faz) uzaklaştırılmış ve 10 ml PBS ile ikinci yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve tekrar 15 dakika, 5000 rpm (3360 g) santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve 4 ml PBS ile

süspansiyon edilerek mikroorganizmalar bağlanma deneyine hazır hale getirilmiştir.

Bağlanma çalışmaları 3 paralel halinde yapılmıştır. Eppendorf tüplere 900 µl mikroorganizma çözeltisi, 100 µl aflatoksin çözeltisi eklenip vorteks işlemi uygulanmıştır. Ardından farklı parametrelere göre inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Bağlanmış AFM1 Miktarının Belirlenmesi (HPLC Tekniği İle)

3.2.6.1. Kromatografik Analizler İçin Ön Çalışmalar

Kromatografik analizlerde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Enstrümental Gıda Analizleri Laboratuvarı'nda bulunan HPLC cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.1). İzokratik (tek kanallı) mobil faz kullanılmıştır. Örneğin enjeksiyon miktarı 20 µl'dir. Kolon sıcaklığı 25 °C, mobil faz akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Çalışmanın başında mobil faz bileşimi olarak hacimce (su:asetonitril:metanol) (50:30:20) (v:v:v) kullanılmıştır. Net bir ayırımın yapılabilmesi için sonrasında mobil faz değiştirilmiştir. AFM1 ile ilişkili olan pikin, solüsyonun diğer içerikleri ile ilgili olabilecek piklerden bağımsız ve sağlıklı bir şekilde gözlemlenmesi için diğer mobil faz karışımı olarak (Su:asetonitril) (75:25) (v:v) ile çalışılmıştır. Bu şekilde mobil fazda su miktarı artırılarak AFM1 pikinin alıkonma zamanının daha uzun olması beklenmiştir.



Şekil 3.1 HPLC cihazı

3.2.6.2. AFM1 Miktarının Belirlenmesi ve Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Deneylerde bağlanmış AFM1 miktarının belirlenmesi için PBS solüsyonunda kalan AFM1 miktarı aşağıdaki HPLC analiz koşulları ile tespit edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 HPLC tekniği koşulları

HPLC Bileşenleri	Özellikler
Kolon	C18 hypersil 250 mm×4,6 mm 5 micron 250×4,6 mm 5u ODS2 Hypersil Column Thermo 31605-254630
Kolon Fırın	Shimadzu Column Oven CTO-10AS VP
Detektör	Shimadzu Fluorescence Deceptor RF-10AXL
Kontroller	Shimadzu System Controller SCL-10A VP
Kolon	C18 hypersil 250 mm×4,6 mm 5 micron 250×4,6 mm 5u ODS2 Hypersil Column Thermo 31605-254630
Akış Hızı	1 ml/dk
Mobil Faz	Su:Asetonitril (25:75)
Kolon Sıcaklığı	25 C
Enjeksiyon Hacmi	20 µl
Eksitasyon dalga boyu	360 nm
Emisyon dalga boyu	430 nm

Farklı AFM1 konsantrasyonlarında hazırlanan mobil faz ile farklı pik alanları elde edilmiştir. Analiz sonucunda gözlenen pik alanlarına karşılık AFM1 konsantrasyonu grafiği hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği 0,005 ppb, 0,025 ppb, 0,01 ppb, 0,05 ppb, 0,25 ppb, 0,5 ppb, 1 ppb, 2 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb ve 20 ppb AFM1 konsantrasyonlarında yapılmıştır.

3.2.6.3. Tespit Limiti (LOQ)'nin Belirlenmesi

Tespit limitinin belirlenmesi için 10 kez 0,25 ppb aflatoksin M1 konsantrasyonuna sahip çözelti ile HPLC'de analizler yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarının pik alanları ve pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyon olan LOD/LOQ değerleri Çizelge 3.3'de görülmektedir.

Çizelge 3.3 Pik alanları ve LOD/LOQ değerleri

Analiz Sayısı	LOD/LOQ	Pik Alanları
1	0,3200	572835
2	0,2300	420934
3	0,2500	455362
4	0,3100	551344
5	0,2600	470181
6	0,2500	453254
7	0,2700	488702
8	0,2400	439198
9	0,2600	470431
10	0,2600	470799

LOD/LOQ değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanarak Eşitlik 3 ve Eşitlik 4'e göre LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.4).

$$\text{LOD} = x + (3 \cdot \text{ss}) \quad \text{Eşitlik 3}$$

$$\text{LOQ} = x + (10 \cdot \text{ss}) \quad \text{Eşitlik 4}$$

Çizelge 3.4 LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması

Ortalama (x)	0,265
Standart Sapma (ss)	0,029
3 ss	0,086
10 ss	0,288
LOD	0,351
LOQ	0,553

3.2.6.4. Mikroorganizma Tarama İşlemi

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla her mikroorganizma ile aynı koşullarda inkübasyon işlemi uygulanarak (1 saat inkübasyon süresi, 37 °C inkübasyon sıcaklığı, 10⁸kob/ml mikroorganizma yoğunluğu) 5 ppb AFM1 konsantrasyonunda bağlama çalışmaları yapılmıştır. Yüksek bağlama gösteren mikroorganizmalar tespit edilmiştir.

3.2.7. Mikroorganizma Yoğunluğunun Belirlenmesi

3.2.7.1. BIOSAN DEN-1 Hücre Densitometre Cihazı Kullanımı

Mikroorganizma yoğunluğunu belirlemek için ilk olarak BIOSAN DEN-1 Hücre Densitometre Cihazı kullanılmıştır. Cihaz kullanılmadan önce kalibrasyon sıvıları ile kalibre edilmiştir. Mikroorganizma yoğunluğu 0,5 McFarland olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.2). Fakat bu birimin cihaz üzerinde değişken olduğu gözlenmiştir. Daha net bir sonuç almak için analiz edilmeye hazır olan mikroorganizmaların petrilere sayımı yapılmıştır.

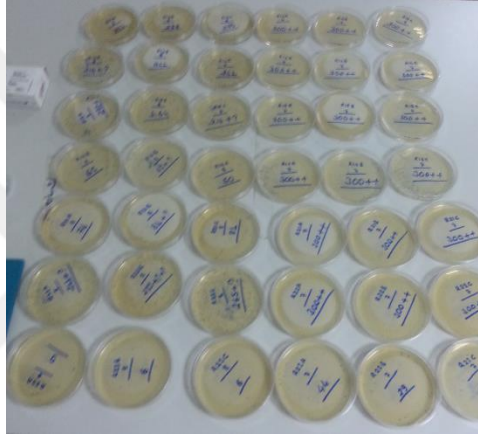


Şekil 3.2 BIOSAN DEN-1 hücre densitometre cihazı 0,5 McF

3.2.7.2. Mikroorganizma Sayımı

Mikroorganizma sayısının belirlenmesinde seri dilusyona plaka ile dökme plaka yöntemine dayalı canlı sayımı tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla, analiz edilmeye hazır olan mikroorganizma süspansiyonundan 1 ml alınarak daha önceden hazırlanmış olan 9 ml'lik peptonlu suya (1 g pepton/1 L su) aktarılmıştır. Bu -1 dilusyonu ifade etmiştir. -1 dilusyon tüpünden 1 ml alınarak diğer 9 ml lik peptonlu suya (-2 dilusyon tüpüne) aktarılmış ve böylece seri aktarmalar ile -10 dilusyona kadar seyreltmeler yapılmıştır. Her mikroorganizma için 10 tüp peptonlu su hazırlanmıştır. Öngörülen dilüsyonlardan 1'er ml alınarak çift tabaka dökme plaka yöntemi ile mikroorganizma sayıları belirlenmiştir. Çift tabaka yöntemi oksijenle temasın kesilmesi bakımından önemlidir ve bu nedenle petrilere

2. kat olarak MRS agar veya %1,5'lik agarlı su (agaroz-agoropektin-su bileşimi) dökülmüştür. Petriler 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda mikroorganizma kolonileri incelenmiştir. 30-300 arası koloniye sahip olan petrilerin verileri kullanılmıştır (Şekil 3.3). Çalışmaların tümü 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 Petride mikroorganizma sayımı

3.2.7.3. İnkübasyon Süresi

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizma ile çalışma yapılmıştır. Diğer koşullar aynı kalarak (37 °C inkübasyon sıcaklığı, 10^8 kob/ml mikroorganizma yoğunluğu) 5 ppb AFM1 konsantrasyonuna sahip PBS sıvısında farklı inkübasyon sürelerinde analizler yapılmıştır. İnkübasyon süreleri 30 dk, 2 saat, 4 saat, 16 saat, 24 saat olarak çalışılmıştır.

3.2.7.4. İnkübasyon Sıcaklığı

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizma ile çalışma yapılmıştır. Diğer koşullar aynı kalarak (1 saat inkübasyon süresi, 10^8 kob/ml mikroorganizma yoğunluğu) 5 ppb AFM1 konsantrasyonuna sahip PBS sıvısında farklı inkübasyon sıcaklıklarında analizler yapılmıştır. İnkübasyon sıcaklıkları 4 °C, 15°C, 37 °C ve 45 °C olarak çalışılmıştır.

3.2.7.5. Aflatoksin Konsantrasyonu

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizma ile çalışma yapılmıştır. Diğer koşullar aynı kalarak (1 saat inkübasyon süresi, 10^8 kob/ml mikroorganizma yoğunluğu, 37 °C inkübasyon sıcaklığı) farklı AFM1 konsantrasyonlarına sahip PBS sıvısında analizler yapılmıştır. AFM1 konsantrasyonları 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb ve 20 ppb olarak çalışılmıştır.

3.2.7.6. Mikroorganizma Konsantrasyonu

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizma ile çalışma yapılmıştır. Diğer koşullar aynı kalarak (1 saat inkübasyon süresi, 37 °C inkübasyon sıcaklığı) 5 ppb AFM1 konsantrasyonuna sahip PBS sıvısında farklı mikroorganizma konsantrasyonlarında analizler yapılmıştır. Çalışmalar yüksek yoğunlukta (10^{10} kob/ml) ve düşük yoğunlukta (10^8 kob/ml) hücre sayısı olmak üzere iki farklı yoğunlukta yapılmıştır.

3.2.7.7. Canlılığın Etkisi

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizma ile çalışma yapılmıştır. Analizler 2 bölümden oluşmuştur. Birinci bölümde canlı hücreler kullanılmış, ikinci bölümde ise 100 °C'de 1 saat otoklav kullanılarak ısıl işlem uygulanan cansız hücreler ile analiz yapılmıştır. Diğer koşullar aynı bırakılmıştır (1 saat inkübasyon süresi, 37 °C inkübasyon sıcaklığı, 10^8 kob/ml mikroorganizma yoğunluğu, 5 ppb AFM1).

3.2.7.8. Bağlanma Stabilitesi

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizma ile çalışılmıştır. 1 saat inkübasyon süresi, 37 °C inkübasyon sıcaklığı, 10^8 kob/ml mikroorganizma yoğunluğu ve 5 ppb AFM1 konsantrasyonuna sahip PBS sıvısında analizler yapılmıştır. Bağlanma işlemi gerçekleştirildikten sonra üst faz uzaklaştırılıp mikroorganizma-AFM1 kompleksine PBS ile yıkama işlemi (1 dakika vorteks uygulaması ile) yapılmış, süpernatanta geçen AFM1 miktarı belirlenmiş ve 1. yıkama sonuçları olarak değerlendirilmiştir. Ardından santrifüj işlemi ile süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve tekrar 1 ml PBS ile 2. yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bağlanma stabilitesinin belirlenmesi için yıkama işlemi 5 kez tekrar edilmiştir.

3.2.7.9. pH

Yüksek bağlama gösteren mikroorganizma ile çalışılmıştır. 1 saat inkübasyon süresi, 37 °C inkübasyon sıcaklığı, 10⁸ kob/ml mikroorganizma yoğunluğu ve 5 ppb AFM1 konsantrasyonuna sahip PBS sıvısında analizler yapılmıştır. Farklı pH değerlerinin (pH 3, pH 6,8 ve pH 7,4) bağlanmaya olan etkisi araştırılmıştır.

3.2.8. Adsorpsiyon İzoterm Eğrisinin Oluşturulması ve İzoterm Modellerinin Uygulanması

Farklı AFM1 konsantrasyonlarında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen adsorblanan madde miktarına ilişkin denge verileri kullanılarak adsorpsiyon izoterm grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafikteki veriler Langmuir, Freundlich ve Sip's model denklemleri kullanılarak modellerin uygunluğu karşılaştırılmıştır. İzoterm modellerinin çözümlenme basamakları ve çözümlenmeleri Çizelge 3.5'de görülmektedir.

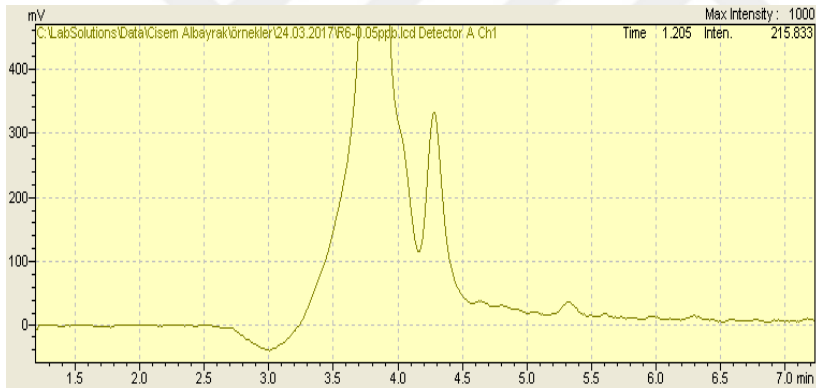
Çizelge 3.5 İzoterm modelleri ve çözümlenmeleri

Adsorpsiyon İzoterm Modelleri	Çözümlenme Basamakları	Çözümlenme
Langmuir $q_e = \frac{K_L \times C_e}{1 + a_1 \times C_e}$	Doğrusallaştırma $\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_1 \times C_e}{K_L \times q_m}$	C_e ve $\frac{C_e}{q_e}$ grafiği çizilir. Kesişim; $\frac{1}{K_L}$ Eğim; $\frac{a_1}{K_L}$
Freundlich $q_e = K_F \times C_e^{(1/n)}$	Doğrusallaştırma $\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e$	Kesişim; $\ln K_F$ Eğim; $\frac{1}{n}$
Langmuir-Freundlich (Sip's) $q_e = \frac{K_{LF} \times C_e^{(n_{LF})}}{1 + a_{LF} \times C_e^{(n_{LF})}}$	Doğrusal olmayan regresyon analizi	Excel programı (problem çözücü aracı) kullanılmıştır

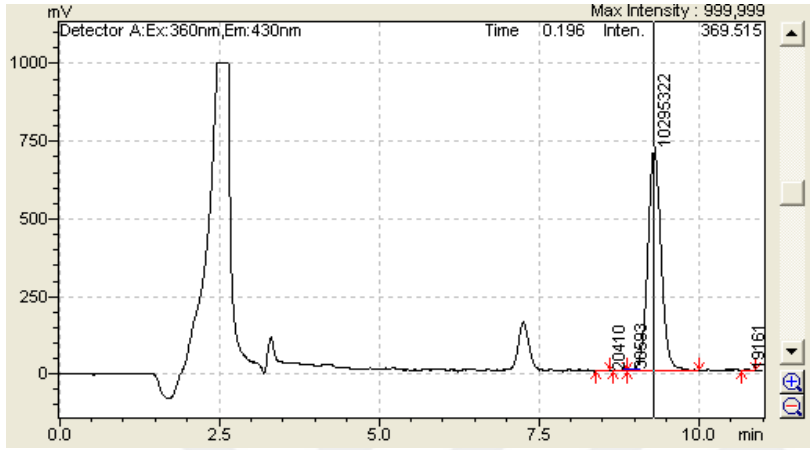
4. BULGULAR

4.1. Kromatografik Analizler İçin Ön Çalışmalar

Mobil fazı belirlemek amacıyla ön çalışmalar yapılmıştır. Hacimce (su:asetonitril:metanol) (50:30:20) (v:v:v) mobil faz ile yapılan çalışmalarda AFM1 pikinin alıkonma zamanı 4,3 dakika olarak gözlenmiş ve kromatogramlar net olarak ayrılmamıştır (Şekil 4.1). Mobil faz bileşimi piklerin ayrılması için değiştirilmiş ve hacimce (su:asetonitril) (75:25) (v:v) olarak ayarlanmıştır. Bu mobil faz ile AFM1'in alıkonma zamanı 9 dakika olarak gözlenmiş ve piklerin birbirinden ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Mobil faz bileşimi hacimce (su:asetonitril:metanol) (50:30:20) (v:v:v)

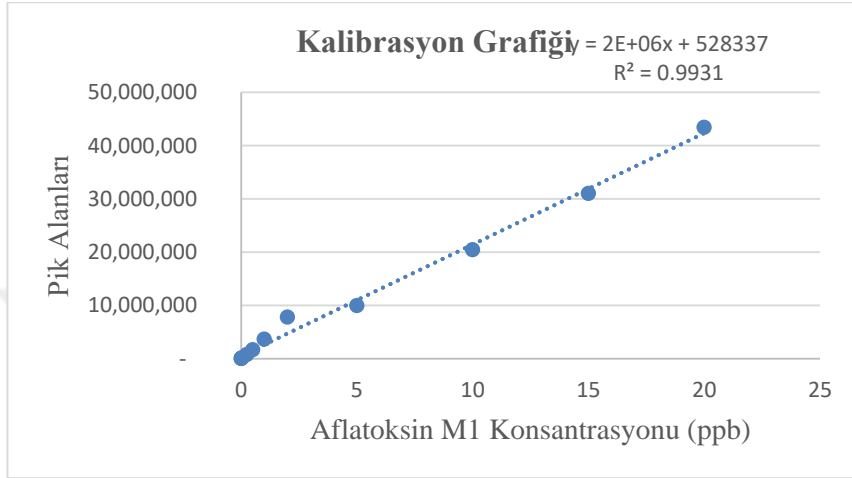


Şekil 4.2 Mobil faz bileşimi hacimce (su:asetonitril) (75:25) (v:v)

İçeriği değiştirilen mobil faz ile analizlere başlamadan önce kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği 0,005 ppb, 0,025 ppb, 0,01 ppb, 0,05 ppb, 0,25 ppb, 0,5 ppb, 1 ppb, 2 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb ve 20 ppb AFM1 konsantrasyonları için oluşturulmuştur. Pik alanları Çizelge 4.1’de, grafik ise Şekil 4.3’de görülmektedir. R^2 değeri 0,9931 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Kalibrasyon Grafiği Verileri

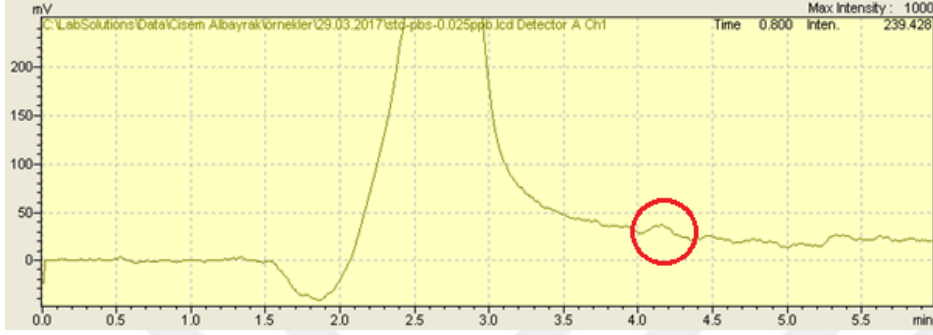
AFM1 Konsantrasyonu (ppb)	Pik Alanı
0,005 ppb	12388
0,025 ppb	91446
0,01 ppb	21449
0,05 ppb	159181
0,25 ppb	767863
0,5 ppb	1642217
1 ppb	3645421
2 ppb	7770948
5 ppb	9946993
10 ppb	20435034
15 ppb	31003820
20 ppb	43423216



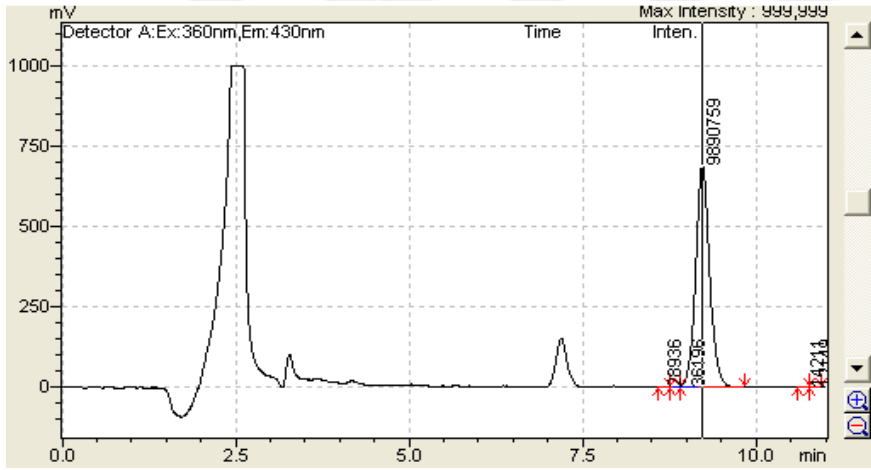
Şekil 4.3 HPLC kalibrasyon grafiği

4.2. Mikroorganizma Tarama İşlemi

Çalışmanın bu bölümünde farklı mikroorganizmalar kullanılarak AFM1'i bağlama miktarları belirlenmiştir. Literatürde genellikle çalışmaların ppm düzeyinde yapıldığı görülmüştür (El-Nezami vd., 1998; Shah ve Wu, 1999; Peltonen vd., 2000; Elsanhoty vd., 2014). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne (2011) göre çiğ süt, ısıl işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütlerde aflatoxin M1'in maksimum limiti 0,05 ppb'dir. Bu düzey bebek formülleri ve devam formüllerinde 0,025 ppb olarak belirtilmiştir. Öncelikle çalışmalar Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirtilmiş değerlere yakın olması amacı ile 0,01 ppb AFM1 konsantrasyonu içeren PBS sıvısında yapılmıştır. Ancak bu çalışma sonucunda elde edilen kromatogramlarda piklerin belirgin olmadığı ve pik alanlarında hata payının çok yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Piklerin daha net sonuç vermesi ve AFM1'in limit değerlerinin üzerinden kabul edilebilir değerlere indirilmesi amacı ile çalışmalar sırasıyla 0,05 ppb, 0,1 ppb, 0,5 ppb, 1 ppb ve 5 ppb olarak yapılmıştır. Piklerin en sağlıklı değerlendirildiği aflatoxin konsantrasyonu da düşünülerek 5 ppb'lik AFM1 konsantrasyonu ile çalışılmaya karar verilmiştir. 5 ppb konsantrasyondaki analiz sonuçları değerlendirildiğinde standart sapmaların kabul edilebilir seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4 Düşük konsantrasyondaki (0,01 ppb) AFM1 kromatogram görüntüsü



Şekil 4.5 5 ppb AFM1'in kromatogram görüntüsü

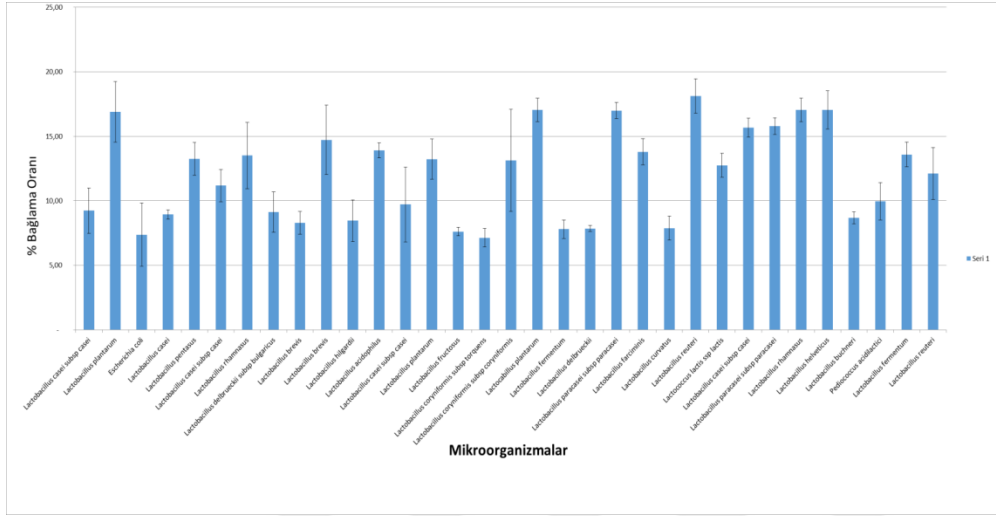
Analizlerde mikroorganizma yoğunluğu 10^8 kob/ml, inkübasyon sıcaklığı 37°C , inkübasyon süresi 1 saat ve AFM1 konsantrasyonu 5 ppb'dir.

Analiz yapılan mikroorganizmalar içerisinde yüksek bağlama gösterenler; *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NRRL B-4560, *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14170, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* NRRL B-441, *Lactobacillus rhamnusus* NRRL B-442 ve *Lactobacillus helveticus* NRRL B-734'tür. Bu mikroorganizmalar %15 ile %20 arasında bağlama göstermiştir. Düşük bağlama oranı gösteren mikroorganizmalar ise; *Escherichia coli* ATCC 35218, *Lactobacillus casei* CH 1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* NRRL B-735, *Lactobacillus pentosus* NRRL B-1560, *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1843, *Lactobacillus fructosus* NRRL B-2041, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* NRRL B-4390, *Lactobacillus*

fermentum N 4524, *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-4525, *Lactobacillus curvatus* DSM 8768, *Lactobacillus buchneri* NRRL B-1862 ve *Pediococcus acidilactici* NRRL B-23864'tür. Bu mikroorganizmalar %10'un altında bağlama göstermiştir. Kullanılan mikroorganizmalar ve bağlama miktarları Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.6'da ayrıntılı olarak verilmiştir. Yapılan bir literatür çalışmasında 0,15 ppm AFM1 konsantrasyonunda, 37°C'de 15-16 saat inkübasyon süresinde, PBS sıvısında *L.rhamnosus* GG suşunun kullanıldığı görülmüştür. Bu çalışma sonucunda % 50,7±2,1 oranında bağlanmanın olduğu belirtilmiştir (Shah ve Wu, 1999). Süt ve PBS sıvısında *L.bulgaricus* ve *S.thermophilus* ile AFM1 üzerine yapılan bir çalışmada *L.bulgaricus*'un yüzdesel olarak daha yüksek bağlama özelliği gösterdiği belirtilmiştir (Pizzalitto vd., 2011).Yine Kabak ve Var, 2008'de 5ppb AFM1 içeren PBS sıvısında 5 probiyotik bakteri suşu ile yaptıkları çalışmalarında %16,05±3,51 ve %23,48±6,12 aralığında bağlanma gözlemişlerdir. Benzer çalışmalarda da görüldüğü gibi AFM1 bağlama özelliği mikroorganizma türüne ve hatta suşuna göre değişiklik göstermektedir. Minimum bağlanma yüzdesi *L. pentosus* için ve maksimum bağlanma yüzdesi *L. reuteri* için belirlenmiştir. Bağlanma özellikleri incelendiğinde Gram (+) hücre yapısına sahip olan mikroorganizmaların Gram (-) hücre yapısına sahip olan mikroorganizmalara göre daha yüksek bağlama özelliği gösterdiği belirtilmiştir (El-Nezami vd., 1998). Yapılacak olan analizler için gıdalarda yüksek oranda bulunan, yüksek bağlama özelliği gösteren ve analiz aşamasında santrifüj işlemi sonrasında yıkanması kolay olan *Lactobacillus plantarum* seçilmiştir.

Çizelge 4.2 Mikroorganizmaların AFM1'i bağlama oranları

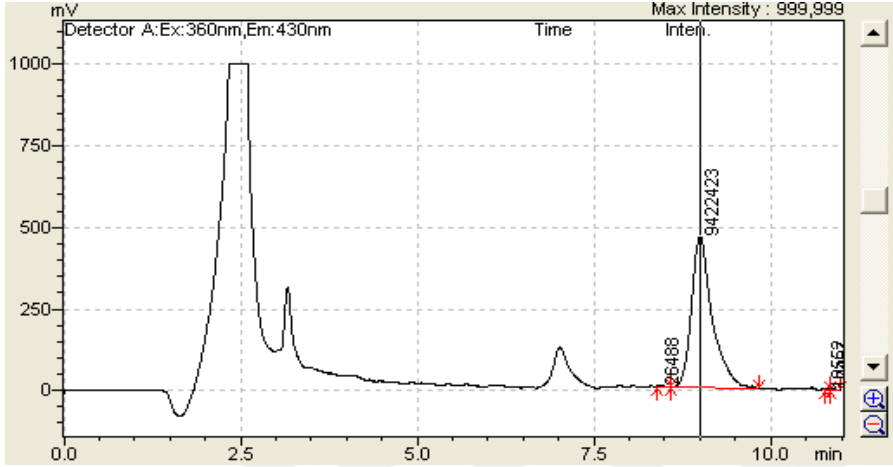
Mikroorganizma	Suş Numarası	% Bağlanma	Mikroorganizma Sayısı
<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-1922	9,23 ± 1,77	49×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	16,89 ± 2,34	15×10 ⁸ kob/ml
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	7,38 ± 2,44	108×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	CH 1	8,94 ± 0,37	76×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus pentosus</i>	NRRL B-227	13,25 ± 1,26	67×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-441	11,18 ± 1,24	81×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus rhamnasus</i>	NRRL B-442	13,51 ± 2,56	32×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	NRRL B-548	9,12 ± 1,57	75×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus pentosus</i>	NRRL B-1560	5,68 ± 5,45	84×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus brevis</i>	NRRL B-1830	8,30 ± 0,89	141×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus brevis</i>	N 1836	14,72 ± 2,68	126×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	NRRL B-1843	8,47 ± 1,61	51×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL B-1910	13,92 ± 0,58	35×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-1922	9,72 ± 2,89	84×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1954 DSM	13,23 ± 1,56	68×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus fructosus</i>	NRRL B-2041	7,62 ± 0,32	156×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp <i>torquens</i>	NRRL B-4390	7,14 ± 0,71	68×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp <i>coryniformis</i>	NRRL B-4391	13,15 ± 3,96	37×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	17,05 ± 0,91	138×10 ⁷ kob/ml
<i>Lactobacillus fermentum</i>	N 4524	7,80 ± 0,72	64×10 ⁷ kob/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	NRRL B-4525	7,86 ± 0,24	3×10 ⁷ kob/ml
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>	NRRL B-4560	17,00 ± 0,64	53×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus farciminis</i>	NRRL B-4566	13,80 ± 1,02	169×10 ⁷ kob/ml
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 8768	7,88 ± 0,93	42×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus reuteri</i>	NRRL B-14170	18,12 ± 1,33	140×10 ⁷ kob/ml
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	NRRL B-1821	12,75 ± 0,92	118×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	NRRL B-441	15,67 ± 0,74	71×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>	NRRL B-4560	15,79 ± 0,63	56×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus rhamnasus</i>	NRRL B-442	17,05 ± 0,92	103×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NRRL B-734	17,04 ± 1,48	60×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus buchmeri</i>	NRRL B-1862	8,68 ± 0,45	280×10 ⁷ kob/ml
<i>Pediococcus acidilactici</i>	NRRL B-23864	9,96 ± 1,45	96×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus fermentum</i>	NRRL B-1932	13,58 ± 0,96	88×10 ⁸ kob/ml
<i>Lactobacillus reuteri</i>	NRRL B-14172	12,11 ± 2,03	141×10 ⁷ kob/ml



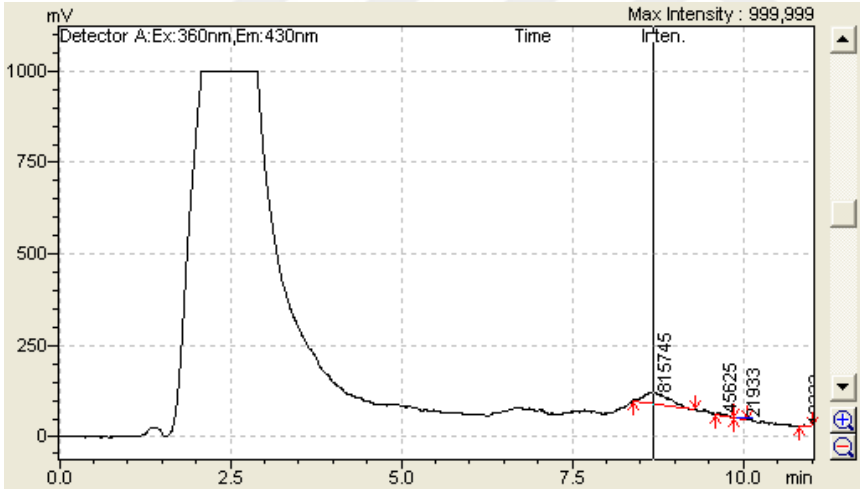
Şekil 4.6 Mikroorganizmaların AFM1'i bağlama oranları

4.3. Mikroorganizma Yoğunluğunun Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile farklı mikroorganizma yoğunluklarında analizler yapılmıştır. Bu değerler; 10^8 kob/ml ve 10^{10} kob/ml'dir. 10^8 kob/ml yoğunluğunda yapılan analizlerdeki AFM1 pikleri belirgin olarak görülmüştür (Şekil 4.7). Mikroorganizma yoğunluğu artırıldığında ise (10^{10} kob/ml) kromatogramdaki AFM1 piklerinde gözle görünür bir azalmanın olduğu görülmüş ancak baz çizgisinde gürültü gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu çalışmalarda inkübasyon süresi 1 saat, inkübasyon sıcaklığı 37°C ve AFM1 konsantrasyonu 5 ppb'dir. Mikroorganizma yoğunluğunun artırılmasının bağlama oranı üzerine pozitif bir etkisinin olduğu görülmüştür. Bir literatür çalışmasında *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 kullanılarak farklı mikroorganizma yoğunluklarında analizler yapılmıştır. Mikroorganizma yoğunluğunun artmasının bağlama oranı üzerine olumlu etkisi olduğu belirtilmiştir. Minimum 2×10^9 kob/ml mikroorganizma yoğunluğunda dikkate değer bir AFB1 bağlama oranı görüldüğü, 2×10^{10} kob/ml mikroorganizma yoğunluğunda ise bağlanmadan kalan AFB1 oranının *L.rhamnosus* GG için %0,1'den az, *L.rhamnosus* LC-705 için ise %13'den az olduğu belirtilmiştir (El-Nezami vd., 1998).



Şekil 4.7 10^8 kob/ml mikroorganizma yoğunluğunda kromatogram görüntüsü



Şekil 4.8 10^{10} kob/ml mikroorganizma yoğunluğunda kromatogram görüntüsü

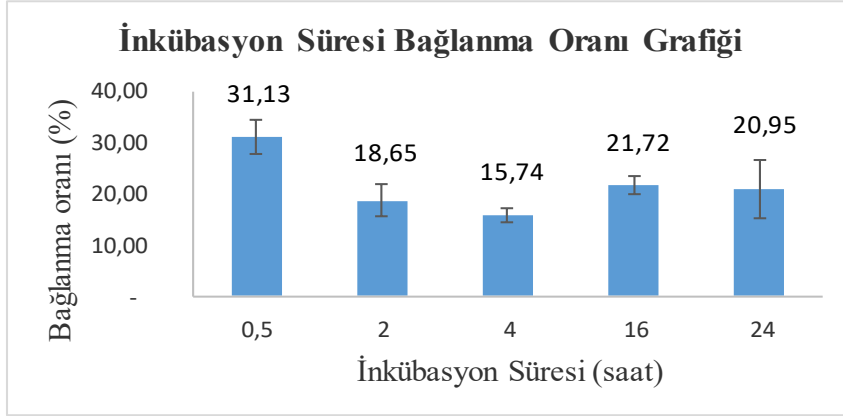
4.4. İnkübasyon Süresi

Çalışmanın bu bölümünde yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile farklı inkübasyon sürelerinde analizler yapılmıştır. Bu inkübasyon süreleri; 30 dk, 2 saat, 4 saat, 16 saat ve 24 saattir. Analizlerde mikroorganizma yoğunluğu 10^8 kob/ml, inkübasyon sıcaklığı 37°C ve AFM1 konsantrasyonu 5 ppb'dir. En yüksek bağlama oranı ilk 30 dk içerisinde gerçekleşmiş ve %31,13 olarak tespit edilmiştir. 2 saat inkübasyon süresinde bağlama oranı %18,65, 4 saat inkübasyon süresinde bağlama oranı %15,74, 16

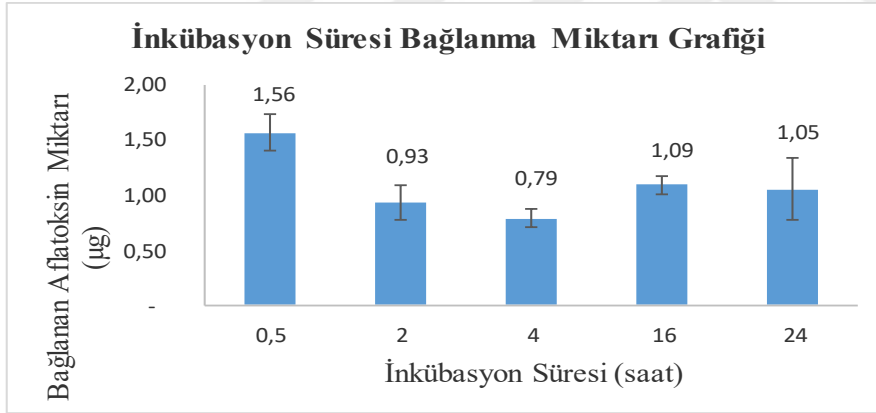
saat inkübasyon süresinde bağlama oranı %21,72, 24 saat inkübasyon süresinde ise bağlama oranı %20,95 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre inkübasyon süresinin bağlama oranı üzerine doğrusal bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Literatürde de UHT yağsız sütte *S. cerevisiae* ve laktik asit bakterileri kullanılarak 37°C’de bağlanma çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar 30 dakika ve daha uzun sürelerde gerçekleştirilmiştir. *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmada ilk 30 dk’da %90,3±0,3 bağlanmanın olduğu bildirilmiş ve bu sonuçlara göre etkileşim sürelerinin bağlanmayı önemli düzeyde etkilemediği belirtilmiştir (Serrano-Niño vd., 2013). AFB1 ile PBS sıvısında yapılan bir çalışmada ise adsorbant olarak *L. rhamnosus* GG ve *L. rhamnosus* LC-705 suşları kullanılmıştır. *L. rhamnosus* GG ile yapılan çalışmada 4 saat inkübasyon süresinde %77,0±0,4, 24 saat inkübasyon süresinde ise %75,3±1,3 bağlanma gözlenmiştir. *L. rhamnosus* LC-705 suşu kullanıldığında 4 saat inkübasyon süresinde %75,2±1,2, 24 saat inkübasyon süresinde ise %76,1±4,3 bağlanma olduğu gözlenmiştir (Pierides vd., 2000). Bu sonuçlara göre inkübasyon süresinin bağlanmayı önemli düzeyde etkilemediği görülmüştür. Bu çalışmadaki inkübasyon süreleri ve bağlama oranları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.9’da ayrıntılı olarak verilmiştir. İnkübasyon süreleri ve bağlanma miktarları Şekil 4.10’da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.3 İnkübasyon süresinin bağlanmaya etkisi

Mikroorganizma	Suş Numarası	Süre	% Bağlanma
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	30 dk	31,13 ± 3,28
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	2 saat	18,65 ± 3,28
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	4 saat	15,74 ± 1,53
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	16 saat	21,72 ± 1,69
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	24 saat	20,95 ± 5,64



Şekil 4.9 İnkübasyon süresinin bağlanmaya etkisi



Şekil 4.10 İnkübasyon süresinin bağlanma miktarına etkisi

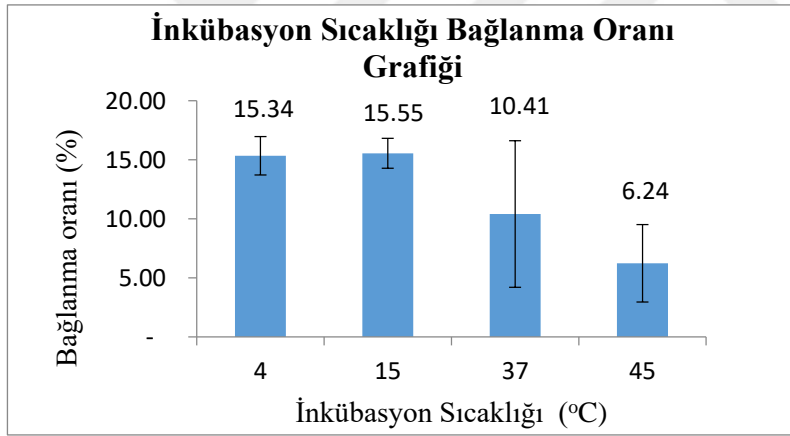
4.5. İnkübasyon Sıcaklığı

Çalışmanın bu bölümünde yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında analizler yapılmıştır. Bu sıcaklık değerleri; 4 °C, 15 °C, 37 °C ve 45 °C'dir. Analizlerde mikroorganizma yoğunluğu 10^8 kob/ml, inkübasyon süresi 1 saat ve AFM1 konsantrasyonu 5 ppb'dir. En yüksek bağlama oranı 4 °C'de gerçekleşmiş ve %15,34 olarak tespit edilmiştir. 15 °C inkübasyon sıcaklığında bağlama oranı %15,55, 37 °C inkübasyon sıcaklığında bağlama oranı %10,41 ve 45 °C inkübasyon sıcaklığında bağlama oranı %6,24 olarak tespit edilmiştir. Literatürde ise genellikle 37 °C inkübasyon sıcaklığında çalışıldığı görülmüştür (Shah ve Wu,

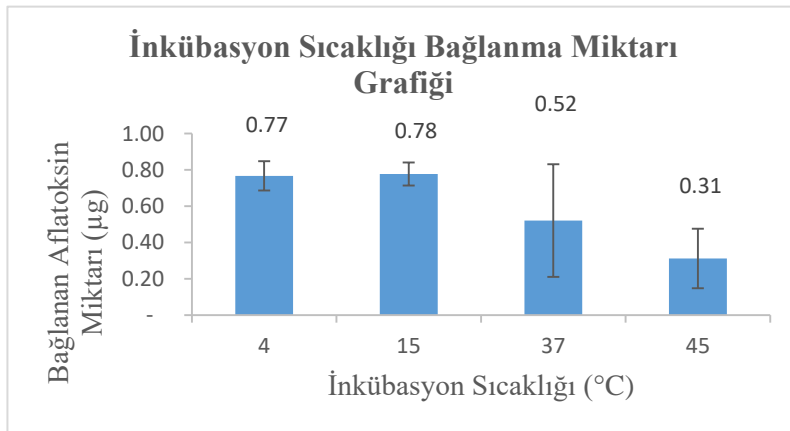
1999; El-Nezami vd., 1998; Peltonen vd., 2000; Shah ve Wu, 1999; Lahtinen vd., 2004; Serrano-Niño vd., 2013; Ismail vd., 2016). İnkübasyon sıcaklıkları ve bağlama oranları Çizelge 4.4 ve Şekil 4.11’de ayrıntılı olarak verilmiştir. İnkübasyon sıcaklıkları ve bağlanma miktarları Şekil 4.12’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.4 İnkübasyon sıcaklığının bağlanmaya etkisi

Mikroorganizma	Suş Numarası	Sıcaklık	% Bağlanma
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	4 °C	15,34 ± 1,62
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	15 °C	15,55 ± 1,27
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	37 °C	10,41 ± 6,21
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	45 °C	6,24 ± 3,28



Şekil 4.11 İnkübasyon sıcaklığının bağlanmaya etkisi

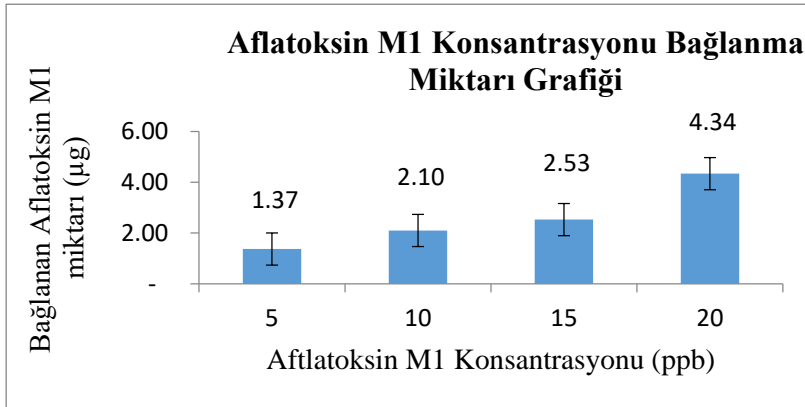


Şekil 4.12 İnkübasyon sıcaklığının bağlanma miktarına etkisi

4.6. AFM1 Konsantrasyonu

Çalışmanın bu bölümünde yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile farklı AFM1 konsantrasyonlarında analizler yapılmıştır. Bu konsantrasyon değerleri; 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb ve 20 ppb'dir. AFM1 konsantrasyonunun bağlanan AFM1 miktarına ve bağlama oranına etkisi incelenmiştir. Analizlerde mikroorganizma yoğunluğu 10^8 kob/ml, inkübasyon süresi 1 saat ve inkübasyon sıcaklığı 37°C 'dir.

En yüksek bağlanan AFM1 miktarı 20 ppb konsantrasyonda gerçekleşmiş ve 4,34 μg olarak tespit edilmiştir. 5 ppb konsantrasyonda bağlanan AFM1 miktarı 1,37 μg , 10 ppb konsantrasyonda bağlanan AFM1 miktarı 2,10 μg ve 15 ppb konsantrasyonda bağlanan AFM1 miktarı ise 2,53 μg olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre AFM1 konsantrasyonunun arttırılmasının bağlanan AFM1 miktarı üzerine pozitif bir etkisinin olduğu görülmüştür. Literatürde miktarsal olarak bağlanma çalışmalarının kısıtlı olduğu görülmüştür. AFM1 konsantrasyonları ve bağlanan AFM1 miktarları Şekil 4.13'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



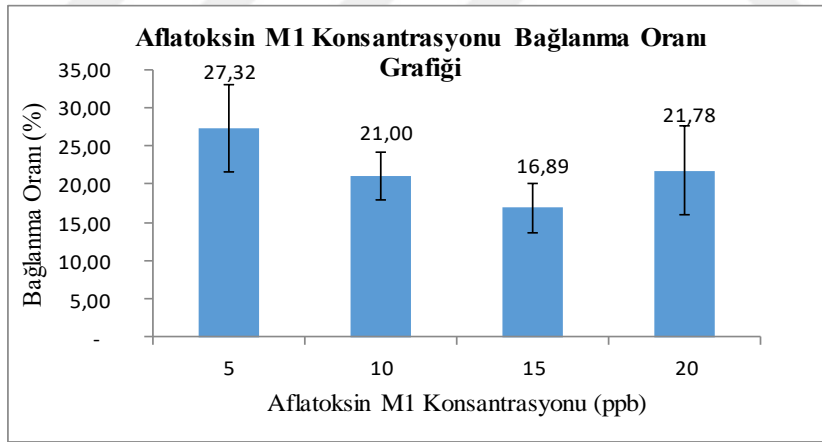
Şekil 4.13 AFM1 konsantrasyonunun bağlanma miktarına etkisi

En yüksek bağlama oranı 5 ppb konsantrasyonda gerçekleşmiş ve %27,32 olarak tespit edilmiştir. 10 ppb konsantrasyonda bağlama oranı %21,00, 15 ppb konsantrasyonda bağlama oranı %16,89 ve 20 ppb konsantrasyonda bağlama oranı ise %21,78 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre AFM1 konsantrasyonunun

bağlama oranı üzerine doğrusal bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Literatürde AFM1 konsantrasyonunun bağlanma oranı üzerine etkisi ile ilgili kısıtlı çalışmanın olduğu, 0,05 ppb ve 0,1 ppb konsantrasyonlarda yapılan bir çalışmada bağlanma oranında dikkate değer bir farklılık olmadığı belirtilmiştir (Lahtinen vd., 2004). AFM1 konsantrasyonları ve bağlama oranları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.14’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.5 AFM1 konsantrasyonunun bağlanmaya etkisi

Mikroorganizma	Suş Numarası	AFM1 Konsantrasyonu	% Bağlanma
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	5 ppb	27,32±5,63
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	10 ppb	21,00±3,15
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	15 ppb	16,89±3,16
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496	20 ppb	21,78±5,84



Şekil 4.14 Konsantrasyonunun bağlanmaya etkisi

4.7. Canlılığın Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile canlı ve ölü hücreler kullanılarak analizler yapılmıştır. Mikroorganizmaların öldürme işlemi otoklav kullanılarak 1 saat, 100°C’de yapılmıştır. Bu çalışmalarda inkübasyon süresi 1 saat, inkübasyon sıcaklığı 37°C, AFM1 konsantrasyonu 5 ppb ve mikroorganizma yoğunluğu 10⁸ kob/ml’dir. Canlı hücrelerde bağlama oranı %40,11, ölü hücrelerde ise bağlama

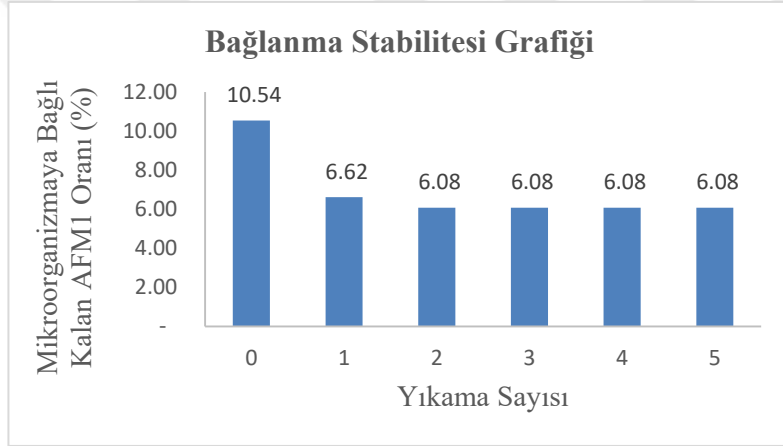
oranı %39,07 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre hücrelerin canlı ya da ölü olmasının bağlama oranı üzerine dikkate değer bir etkisinin bulunmadığı görülmüştür. Yapılan bir literatür çalışmasında UHT yağsız sütte laktik asit bakterilerinin ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin AFM1'i bağlama etkinliği araştırılmıştır. Kullanılan mikroorganizmalar ısı işlem (100 °C, 1 saat) ile öldürülmüş ve 37°C'de bağlanma denemeleri yapılmıştır. *S. cerevisiae* hücrelerinin 30 dakikada %90,3±0,3 bağlama gösterdiği gözlenmiştir. (Serrano-Niño vd., 2013). Yapılan başka bir literatür çalışmasında ise *L. rhamnosus* GG ve *L. rhamnosus* LC-705 suşları kullanılmıştır. Bağlanma denemeleri canlı hücrelerde ve 1 saat kaynatılarak öldürme işlemi uygulanan ölü hücrelerde gerçekleştirilmiştir. PBS sıvısında 15-16 saat inkübasyon süresinde yapılan bağlanma denemelerinde *L. rhamnosus* GG suşu için canlı hücrelerde %50,7±2,1, ölü hücrelerde ise % 57,8±3,3 bağlanmanın olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada *L. rhamnosus* LC-705 suşu ile yapılan bağlanma denemelerinde canlı hücrelerde %46,3±2,6, ölü hücrelerde ise %51,6±3,0 bağlanmanın olduğu gözlenmiştir (Pierides vd., 2000). Literatür çalışmalarındaki sonuçlara göre ölü hücrelerle de çalışmaların olduğu ve bağlanmanın gerçekleştiği görülmüş ancak bu artışın dikkate değer düzeyde olmadığı gözlenmiştir (Serrano-Niño vd., 2013; Pierides vd., 2000).

4.8. Bağlanma Stabilitesi

Çalışmanın bu bölümünde yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile analizler yapılmıştır. Bu çalışmalarda inkübasyon süresi 1 saat, inkübasyon sıcaklığı 37°C, AFM1 konsantrasyonu 5 ppb ve mikroorganizma yoğunluğu 10^8 kob/ml'dir. Bağlanma işlemi gerçekleştikten sonra PBS ile 5 kez yıkama işlemi yapılarak AFM1'in geri kazanımı sağlanmıştır. Yıkama işlemi 1 dakika vorteks ile yapılmıştır. Bu işlemlerin sonucunda ilk bağlanma %10,54 iken 1. yıkamada %6,62, 2. yıkamada %6,08 oranında AFM1 mikroorganizmalara bağlı olarak kalmıştır. Diğer yıkamalarda ise süpernatanta geçen AFM1 tespit edilmemiştir (Şekil 4.15).

Yapılan bir literatür çalışmasında iki farklı AFM1 konsantrasyonunda *Lactobacillus plantarum* ile analizler yapılmış ve PBS ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. 0,05 ppb AFM1 konsantrasyonunda 1. yıkama işlemi sonucunda geri kazanım oranı %29,4, 2. yıkama işlemi sonucunda geri kazanım

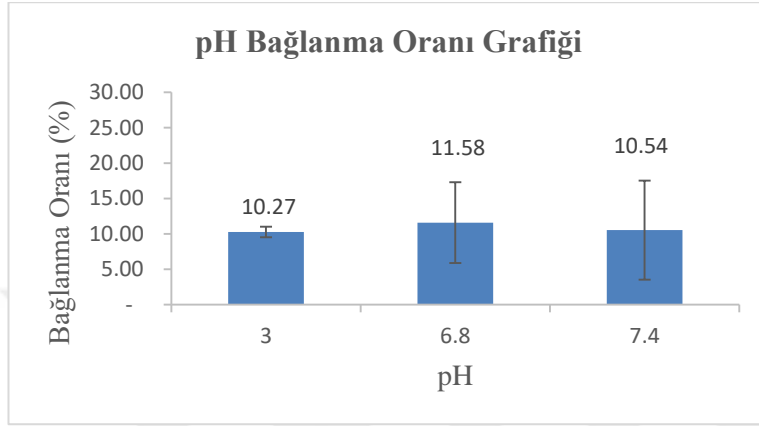
oranı %4,4 olarak tespit edilirken 3. yıkama işlemi sonucunda tespit edilmemiştir. 0,1 ppb AFM1 konsantrasyonunda ise 1. yıkama işlemi sonucunda geri kazanım oranı %52,3, 2. yıkama işlemi sonucunda geri kazanım oranı %9,2 ve 3. yıkama işlemi sonucunda geri kazanım oranı %1,2 olarak tespit edilmiştir. Literatür çalışmasındaki sonuçlara göre bizim çalışmamızda da olduğu gibi AFM1 ile mikroorganizma arasındaki bağın yıkama ile ayrıldığı, stabil olmadığı belirtilmiştir (Ismail vd., 2016).



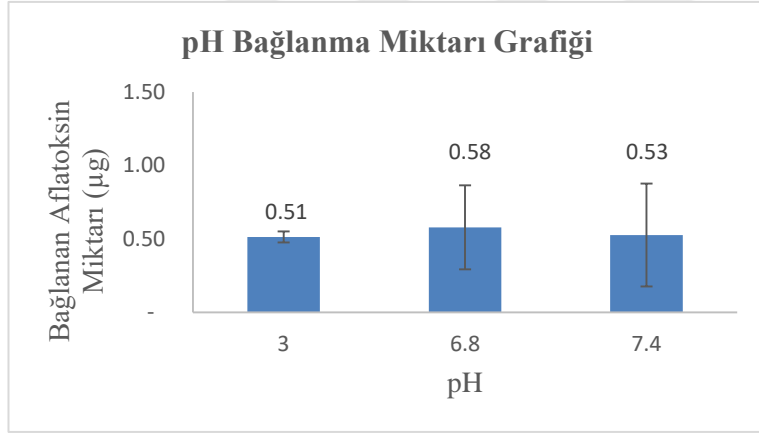
Şekil 4.15 Yıkama sayısına bağlı bağlanma stabilitesi grafiği

4.8. pH

Çalışmanın bu bölümünde yüksek bağlama özelliği gösteren *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 ile farklı pH değerlerinde analizler yapılmıştır. pH değerleri; 3, 6,8 ve 7,4 olarak ayarlanmıştır. Analizlerde mikroorganizma yoğunluğu 10^8 kob/ml, inkübasyon sıcaklığı 37°C ve AFM1 konsantrasyonu 5 ppb'dir. Bağlanma oranlarının birbirine yakın değerler olduğu gözlenmiştir. pH 3'de %10,27, pH 6,8'de %11,58, pH 7,4'de %10,54 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bağlanma miktarları ise pH 3'de $0,51\mu\text{g}$, pH 6,8'de $0,58\mu\text{g}$, pH 7,4'de $0,53\mu\text{g}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Bu bulgulara göre farklı pH değerinde çalışmanın bağlama oranı üzerine doğrusal bir etkisinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.16 pH değerinin bağlanmaya etkisi



Şekil 4.17 pH değerinin bağlanma miktarına etkisi

4.9. Adsorpsiyon İzotermeleri

Yapılan çalışmalar sonucunda Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (Sip's) izoterm modelleri oluşturulmuştur. İzoterm modelleri için hesaplanan sabitler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

10^8 kob $\approx 0,1$ mg mikroorganizma olarak hesaplama yapılmıştır.

Doğrusallaştırmaya dayalı modeller karşılaştırılmış olduğunda, adsorpsiyon verilerinin Freundlich izoterm modeline daha uygun olduğu görülmektedir (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

Doğrusal olmayan denklem çözümüne dayalı Sip's adsorpsiyon izoterm modeli ile adsorplanan madde miktarı deneysel veriler ile en fazla uyum göstermiştir.

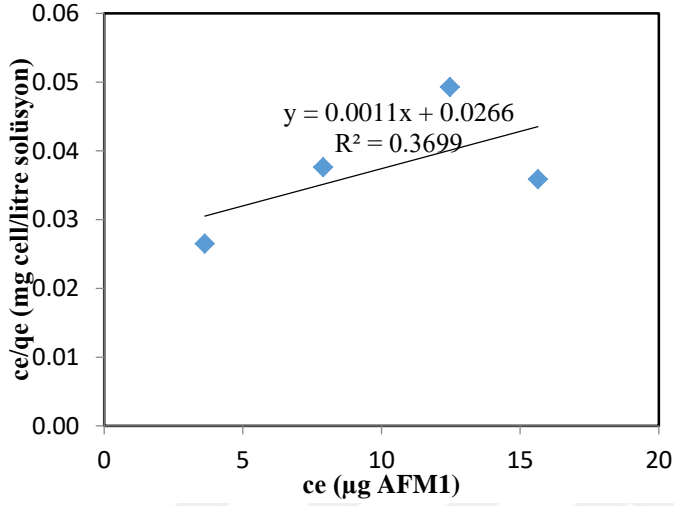
Çizelge 4.6 İzoterm modellerinin verileri

Modeller					
Langmuir	Sıcaklık	K_L (mL/mg)	a_L (mL/ μ g)		R^2
	37°C	3,7608	0,0406		0,3699
Freundlich	Sıcaklık	K_F $\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \left(\frac{\text{mL}}{\mu\text{g}} \right)^{1/n_F}$	n_F		R^2
	37°C	5,2509	1,4300		0,8824
Langmuir-Freundlich (Sip's)	Sıcaklık	K_{LF} $\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \left(\frac{\text{mL}}{\mu\text{g}} \right)^{1/n_{LF}} \right)$	n_{LF}	a_{LF} $\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)^{1/n}$	R^2
	37°C	32,1839	0,4644	1,1675	-

Langmuir izoterm modeli için C_0 , C_e , q_e ve C_e/q_e değerleri Çizelge 4.7'de, izoterm grafiği ise Şekil 4.18'de görülmektedir

Çizelge 4.7 Langmuir izoterm modeli verileri

C_0 (μ g AFM1/L)	C_e (μ gAFM1/L)	q_e (μ gAFM1 /mg cell)	C_e/q_e (mg cell/L)
5 ppb	3,63 ppb	13,70	0,03
10 ppb	7,90 ppb	21,00	0,04
15 ppb	12,47 ppb	25,30	0,05
20 ppb	15,64 ppb	43,60	0,04

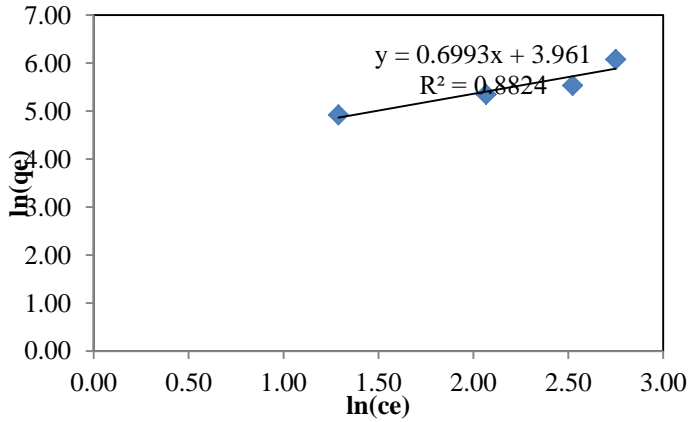


Şekil 4.18 Langmuir izoterm grafiği

Freundlich izoterm modeli için C_0 , C_e , q_e , $\ln(C_e)$ ve $\ln(q_e)$ değerleri Çizelge 4.8'de, izoterm grafiği ise Şekil 4.19'da görülmektedir.

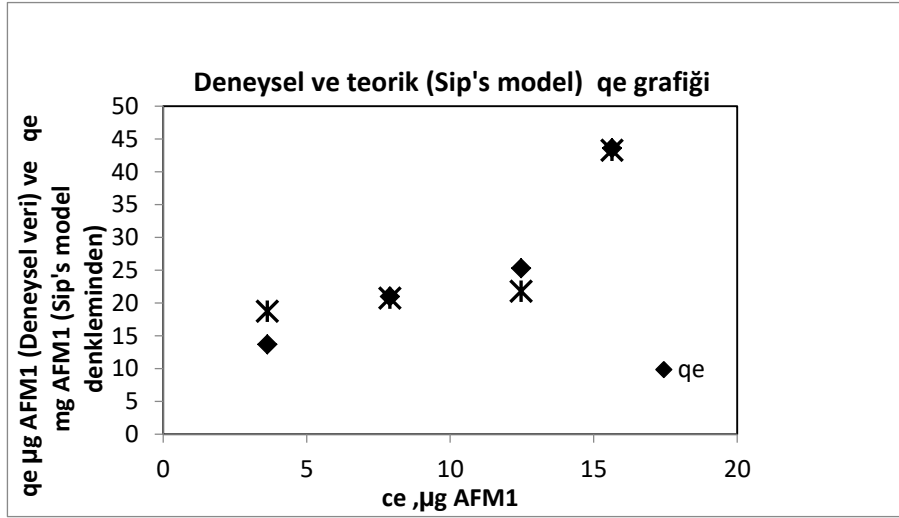
Çizelge 4.8 Freundlich izoterm modeli verileri

C_0 (µg AFM1/L)	C_e (µgAFM1/L)	q_e (µgAFM1/mg cell)	$\ln(C_e)$	$\ln(q_e)$
5 ppb	3,63 ppb	13,70	1,29	4,92
10 ppb	7,90 ppb	21,00	2,07	5,35
15 ppb	12,47 ppb	25,30	2,52	5,53
20 ppb	15,64 ppb	43,60	2,75	6,08



Şekil 4.19 Freundlich izoterm grafiği

Adsorpsiyon denge verilerinin Sip's izoterm modeli kullanılarak modellenmesi ile bulunan izoterm sabitleri Çizelge 4.6'da sunulmuştur. AFM1 adsorpsiyon deneysel verilerin teorik model verileri ile uyumu şekil 4.20'de değerlendirilmiştir. Doğrusal olmayan denklem çözümüne dayalı Sip's modelinin deneysel verilerle daha uyumlu olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.20 Adsorpsiyon verilerinin Sip's izoterm modeli ile uyumu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında süt ve süt ürünlerinde bulunan, sağlık üzerine olumsuz etkileri olan AFM1'in fonksiyonel gıda ürünlerinin üretiminde kullanılan ve insan sağlığına olumsuz etkisi olmayan laktik asit bakterileri ile bağlanarak ortamdan uzaklaştırma özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla mikroorganizma tarama işlemi yapılmış ve mikroorganizma yoğunluğu, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, AFM1 konsantrasyonu, canlılık, pH gibi parametrelerin bağlanma üzerine etkileri tespit edilmiştir.

Yapılan bağlanma denemeleri sonucunda analiz yapılan mikroorganizmalar içerisinde yüksek bağlama özelliği gösterenler; *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NRRL B-4560, *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14170, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* NRRL B-441, *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 ve *Lactobacillus helveticus* NRRL B-734 olarak bulunmuştur.

Çalışmalarda kullanılan *Lactobacillus plantarum* insan sağlığına olumsuz etkisi olmayan ve gıdalarda doğal olarak bulunan probiyotik bir mikroorganizmadır. Turşu, boza, şalgam suyu ve geleneksel fermente et ürünleri gibi gıdaların üretiminde kullanılır. Bu nedenle , detoksifikasyon çalışmaları için de uygundur.

Çalışılan farklı parametreler içerisinde inkübasyon süresi ve canlılığın bağlanma oranı üzerine dikkate değer bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

İnkübasyon sıcaklığının arttırılmasının bağlama oranı üzerine negatif bir etkisinin olduğu gözlenmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, AFM1'in mikroorganizmaya bağlanması ile ilgili farklı sıcaklıkların etkisi üzerine sonuca rastlanamamıştır. Bu anlamda tez çalışmasındaki sonuçlar önemli olabilir ve ayrıca sıcaklığın arttırılması ile adsorpsiyonun azalması fiziksel adsorpsiyonu destekler niteliktedir.

AFM1 konsantrasyonunun artmasının bağlanan aflatoksin miktarı üzerine olumlu etkisi bulunurken bağlama oranı üzerine doğrusal bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Mikroorganizma yoğunluğunun arttırılmasının bağlama oranı üzerine pozitif bir etkisinin olduğu, mikroorganizma ve AFM1 arasında oluşan bağlanmanın PBS ile yıkamalar neticesinde sınırlı düzeyde desorpsiyonun olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç da fiziksel adsorpsiyonu destekleyen niteliktedir ve bağlanma mekanizmasında AFM1'in yapısında bir değişiklik olmadan PBS solüsyonuna geri dönmüş olduğunu göstermektedir.

Bu bulgular doğrultusunda, gıda uygulamalarında toksin bağlayıcı organizmalar ile daha iyi sonuçlar alınabilmesi adına plan ve dizayn yapmak mümkün olabilecektir. Bu çalışmadaki veriler süttten AFM1 uzaklaştırılmasında kullanılabilir. Bir çok mikroorganizmayı taramak, sıcaklıkla ilgili farklı değerlerde çalışılması ve adsorpsiyon izoterm modellerinin oluşturulması tez çalışmasının literatüre katmış olduğu yeni bilgilerdir ve AFM1'in olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için gelecekteki çalışmalarda faydalı olacaktır. Sonuç olarak, bağlanma mekanizmasının fiziksel adsorpsiyon olduğu , AFM1 uzaklaştırma verimliliği en yüksek suşların seçilmesinin ve en uygun şartların belirlenmesinin AFM1 dekontaminasyonu çalışmalarında kullanılabileceği görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2006. European Commission. Commission regulation (EC) No 1881 of 19 December 2006, setting maximum levels for 124 certain contaminants in foodstuffs. Off J Europ Union L364:5–24.
- Anonim, 2011. TGGK, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (29.12.2011 Tarih ve 28157 (3. Mükerrer) Sayılı RG).
- Anonim, 2019. International Agency for Research on Cancer (IARC). List of classifications.[<https://monographs.iarc.fr/wpcontent/uploads/2018/06/mono82.pdf>] Erişim tarihi: 10.01. 2019.
- Adams, M.R., Moss, M.O. 2000. Food Microbiology, 2nd Edition., RSC, Cambridge.
- Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., Oliver, G. 2007. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. **Journal of Food Protection**, 70(9): 2148-2154.
- Bullerman, L.B. 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, 42: 65-86.
- Ceyhan, N., Alıç H., 2012. Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi**, 5(1): 107-113.
- Codex Alimentarius. International Food Standards. General Standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Stan 193-1995. Amended in 2015.
- Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F. D. 2013. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. **Food Control**, 31(1), 80-83.
- Di Natale, F., Gallo, M., Nigro, R. 2009. Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. **Journal of Food Engineering**, 95(1): 186-191.
- Doğan, M., Alkan, M., Onganer, Y. 2000. Adsorption of methylene blue from aqueous solution onto perlite. **Water, Air, and Soil Pollution**, 120(3-4): 229-248.

- El Khoury, A., Atoui, A., Yaghi, J. 2011. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, 22(10): 1695-1699.
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, 36(4): 321-326.
- El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, 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(4): 549-552.
- Elsanhoty, R. M., Salam, S. A., Ramadan, M. F., Badr, F. H. 2014. Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. **Food Control**, 43: 129-134.
- Ergun, B., Altıokka, G., Atkoşar, Z. 2006. Aflatoksinler: Tayin yöntemleri üzerine. **Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 7(1): 75-81.
- Gacem, M.A., El Hadj-Khelil, A.O. 2016. Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 6(9): 808-814.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Jimenez-Espinoza, R., Eom, H. J., Block, D.E., Mills, D.A. 2013. Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. **Food Microbiology**, 33(2): 262-270.
- Gerbaldo, G. A., Barberis, C., Pascual, L., Dalcero, A., Barberis, L. 2012. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. **FEMS Microbiology Letters**, 332(1): 27-33.
- Gowda, N.K.S., Malathi, V., Suganthi, R.U. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. **Animal Feed Science and Technology**, 116(3-4): 281-291.
- Gratz, S., Mykkänen, H., El-Nezami, H. 2005. Aflatoxin B1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. **Journal of Food Protection**, 68(11): 2470-2474.

- Guan, S., Zhou, T., Yin, Y., Xie, M., Ruan, Z., Young, J. 2011. Microbial strategies to control aflatoxins in food and feed. **World Mycotoxin Journal**, 4(4): 413-424.
- HAO, Y. Y., Brackett, R. E. 1988. Removal of aflatoxin B1 from peanut milk inoculated with *Flavobacterium aurantiacum*. **Journal of Food Science**, 53(5): 1384-1386.
- Hamutoğlu, R., Dinçsoy, A. B., Cansaran-Duman, D., Aras, S. 2012. Biyosorpsiyon, adsorpsiyon ve fitoremediasyon yöntemleri ve uygulamaları. **Türkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi**, 69, 69.
- Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Chemico-Biological Interactions**, 128(1): 39-49.
- Ismail, A., Levin, R.E., Riaz, M., Akhtar, S., Gong, Y.Y., de Oliveira, C.A. 2016. Effect of different microbial concentrations on binding of aflatoxin M1 and stability testing. **Food Control**, 73: 492-496.
- Kabak, B., Var, I. 2008. Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, 43(7): 617-624.
- Kabak, B., Ozbey, F. 2012a. Aflatoxin M 1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. **Food Control**, 28(2): 338-344.
- Kabak, B., Ozbey, F. 2012b. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. **Journal of Food Composition and Analysis**, 27(1): 21-31.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 41(2): 103-125.
- Koirala, P., Kumar, S., Yadav, B.K., Premarajan, K.C. 2005. Occurrence of aflatoxin in some of the food and feed in Nepal. **Indian Journal of Medical Sciences**, 59(8): 331-336.

- Lahtinen, S.J., Haskard, C. A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Ahokas, J.T. 2004. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. **Food Additives and Contaminants**, 21(2): 158-164.
- Madalı, B., Ayaz, A. 2017. Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M1: maruziyet ve sağlık riskleri. **H.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi**, 4(1): 1-14.
- Masimango, N., Remacle, J., Ramaut, J. 1979. Elimination of aflatoxin B1 by clays from contaminated substrates. **In Annales de la Nutrition et de L'alimentation**, 33(1): 137-147.
- McDonald, L. C., McFeeters, R. F., Daeschel, M. A., Fleming, H. P. 1987. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 53(6): 1382-1384.
- Molina, M., Giannuzzi, L. 2002. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. **Food Research International**, 35(6): 585-594.
- Móricz, Á.M., Fatér, Z., Otta, K.H., Tyihák, E., Mincsovcics, E. 2007. Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in red paprika. **Microchemical Journal**, 85(1): 140-144.
- 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(8): 1133-1136.
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobetti, M., Kleerebezem, M., ... & Turróni, F. 2016. Stress physiology of lactic acid bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 80(3): 837-890.
- Peltonen, K.D., El-Nezami, H.S., Salminen, S. J., Ahokas, J.T. 2000. Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80(13): 1942-1945.
- 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(5): 645-650.

- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcero, A.M., Salvano, M.A. 2011. Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *saccharomyces cerevisiae* in vitro: A useful model to determine the most efficient microorganism. In: *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology* (Guevara-Gonzalez, R.G., Ed.), InTech, pp.323-346, Europe-China.
- Sabuncuoğlu, S.A., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G. 2008. Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. **Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 28(1): 63-92.
- Sarimehmetoğlu, B., Küplülü, Ö. 2004. Binding ability of aflatoxin M1 to yoghurt bacteria. **Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 51(3): 195-198.
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., San Martin-González, M. F., García, H. S. 2013. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. **Food Control**, 31(1): 202-207.
- Sezen, A. G. 2013. Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri. **Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi**, 8(3): 248-258.
- Shah, N., Wu, X. 1999. Aflatoxin B 1 binding abilities of probiotic bacteria. **Bioscience and Microflora**, 18(1): 43-48.
- Sömer, V. F., Akpınar, D., Kılıç, G. B. 2012. *Lactobacillus casei*'nin sağlık üzerine etkileri ve gıda endüstrisinde kullanımı. **Gıda Dergisi**, 37(3): 165-172.
- Tunail, N. 2000. Aflatoksinlerin detoksifikasyonu In: **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları p153**, Sim Matbaacılık, Ankara.
- Var, I., Kabak, B., Özkarlı, M. 2004. Mikotoksin aranmasında kullanılan analiz yöntemleri. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 2(11): 1-11.
- Yentür, G., Er, B. 2011. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. **Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi**, 69(1): 41-52.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mustafa YÜCEL
Doğum Yeri ve Tarihi :Kozaklı/Nevşehir 15.11.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : İzmir Ege Üniversitesi (09/2007-07/2013)
Yüksek Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi (09/2016-2018)
Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : mustafa_yucel@live.com
Tarih :11/01/2019