

***İN VİTRO* ŞARTLARDA LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
VE YOĞURDUN KURŞUN VE KADMIYUM BAĞLAMA
ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF LEAD AND CADMIUM BINDING
PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA AND
YOGHURT IN *İN VİTRO* CONDITIONS**

BARAN ÖZKALP

DOÇ. DR. ALİ TOPCU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

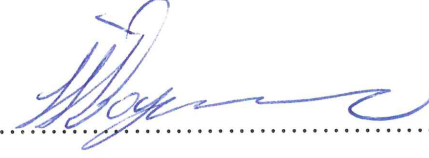
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

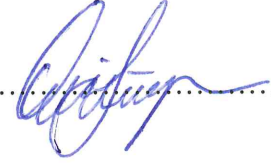
2018

BARAN ÖZKALP'ın hazırladığı “*İn Vitro* Şartlarda Laktik Asit Bakterilerinin ve Yoğurdun Kurşun ve Kadmiyum Bağlama Özelliğinin İncelenmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

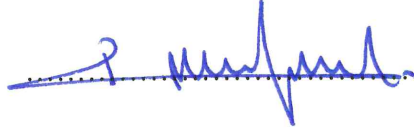
Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI
Başkan



Doç. Dr. Ali TOPCU
Danışman



Doç. Dr. Remziye YILMAZ
Üye



Prof. Dr. Ebru ŞENEL
Üye



Doç. Dr. Birce TABAN
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 07/06/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

07/06/2018

BARAN ÖZKALP

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

07/06/2018



BARAN ÖZKALP

*Annem Zübeyde Giritli, Babam Emin Özkalp ve
yol arkadaşım Sinem Bayar'a...*

ÖZET

***İN VİTRO* ŞARTLARDA LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN VE YOĞURDUN KURŞUN VE KADMIYUM BAĞLAMA ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

BARAN ÖZKALP

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışman: Doç. Dr. Ali TOPCU

Haziran 2018, 75 sayfa

Bu çalışmada; laktik asit bakterilerinin (LAB) (canlı ve cansız) ağır metalleri (Pb ve Cd) bağlama özelliklerinin ve bağlama stabilitelerinin araştırılması, farklı LAB kombinasyonları içeren yoğurt örneklerinin ağır metal biyosorpsiyon potansiyelinin incelenmesi ve *in vitro* model sindirim sistemde biyosorpsiyon etkilerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Deneyler 3 grup altında planlanmıştır. İlk kısımda sıcaklık, süre, biyokütle ve ağır metal konsantrasyonu, pH gibi etkenler karşısında 7 farklı ticari LAB kültürünün biyosorpsiyon performansları test edilmiştir. Bu sayede LAB kültürlerinin farklı koşullardaki biyosorpsiyon kapasiteleri belirlenmiştir.

Deneylerden elde edilen veriler Langmuir adsorpsiyon izotermine yerleştirilerek her kültürün azami bağlama kapasitesi birbiriyle kıyaslanabilecek şekilde hesaplanmıştır.

Elde edilen veriler LAB'lerin ağır metal biyosorpsiyonundaki en etkili parametrenin pH olduğunu göstermektedir. Genel bir eğilim olarak pH değerleri düştükçe biyosorpsiyon kapasitesi azalmakta, pH 3 ve daha asidik pH'larda oldukça sınırlı kalmaktadır. Sıcaklığın biyosorpsiyonda etkili olduğu belirlense de, 4 - 37 °C aralığında bu etki sınırlı kalmıştır. Farklı inkübsasyon sürelerinde yapılan deneyler ise biyosorpsiyon işleminin hızlı bir şekilde yüzeyde, büyük oranda 5–30 dakikada gerçekleştiğini, daha uzun sürelerde yüzeye bağlama

dışındaki mekanizmaların devreye girmiş olabileceğini göstermiştir. Kurşun ve kadmiyumun aynı ortamda bulunduğu bağlanma önceliği denemesinde kurşunun daha çok bağlandığı belirlenmiştir. İdeale yakın koşullardaki biyosorpsiyon kapasitesine bakıldığında genelde probiyotik LAB suşlarının daha yüksek bağlama kapasitesine (q_{max}) sahip olduğu görülmüştür. Probiyotik *Lactobacillus acidophilus* NCFM suşuna ait q_{max} değeri Pb için, 75.1 mg/g (canlı) ve 68.2 mg/g (cansız) Cd için 16.4 mg/g (canlı) ve 28.1 mg/g (cansız) olarak hesaplanmıştır.

İkinci kısımda, iyi performans gösterdiği belirlenen bazı suşların ve suş kombinasyonlarının biyosorpsiyon performansları yoğurt matrisi içerisinde incelenmiştir. Yoğurta bulunan mikroorganizma haricindeki bileşenlerin de biyosorpsiyon kapasitesini artırıcı bir etkisinin olduğu, biyosorpsiyon kapasitesi yüksek suşlarla hazırlanan yoğurtların ağır metalleri bağlamada daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Üçüncü kısımda ise *in vitro* model sindirim sistemi kullanılarak, önceden biyosorpsiyon kapasitesinin yüksek olduğu belirlenen suşların ve matrislerin, insan vücudundaki sindirim işlemine yakın koşullarda (pH, süre, sıcaklık, sindirim sıvıları) gösterdiği bağlama performansı test edilmiştir.

LAB ve probiyotik suşları içeren yoğurtların ağır metalleri biyosorpsiyon yoluyla bağlama ve sindirim yoluyla alınan ağır metallerin vücut tarafından emilimini azalma yönünde önemli bir potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, probiyotikler, yoğurt, biyosorpsiyon, kadmiyum, kurşun

ABSTRACT

INVESTIGATION OF LEAD AND CADMIUM BINDING PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA AND YOGHURT IN *IN VITRO* CONDITIONS

BARAN ÖZKALP

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Ali TOPCU

June 2018, 75 pages

The main purpose of this study is to investigate the heavy metal (Pb and Cd) binding and binding stability properties of lactic acid bacteria (LAB), to examine the heavy metal biosorption potential of yoghurts containing different LAB combinations and to determine biosorption effects in *in vitro* model digestion system.

Experiments are conducted under 3 main groups. In the first part, biosorption performances of 7 different commercial cultures of LAB were tested against factors such as temperature, incubation time, biomass and heavy metal concentration and pH. Thus, biosorption capacity of LAB strains under different conditions was determined.

The data obtained from experiments were fitted into the Langmuir adsorption isotherm. Maximum binding capacities are calculated with this method and allowed us to compare biosorption capacities of different LAB cultures.

It is observed that the most indicative parameter in the heavy metal biosorption of LABs is the pH. As an overall trend, as the pH values decreases, the biosorption capacity decreases as well; and is very limited at pH 3 and more acidic pH values. Although the temperature

was seen to affect biosorption, this effect was limited in the range of 4 - 37 ° C. Experiments with different incubation times showed that the biosorption process takes place rapidly on the surface, largely in the first 5-30 minutes. But over a longer time, different mechanisms other than surface bonding may have took place. In the experiment of binding priority in which lead and cadmium were in the same environment, lead had been bound more. It has been found that probiotic LAB strains generally have a higher binding capacity (q_{max}) when examining biosorption capacities in conditions close to ideal. q_{max} value of the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* NCFM was found 75.1 mg/g (viable) and 68.2 mg/g (non-viable) for Pb; 16.4 mg/g (viable) and 28.1 mg/g (non-viable) for Cd.

In the second part, biosorption performances of some strains (individually) and strain combinations that were found to perform well in the first experiments were examined in the yogurt matrix. It is determined that components other than the microorganisms found in yoghurt had an enhancing effect of biosorption capacity, and yoghurt prepared with higher binding strains performed better at binding heavy metals.

In the third part, *in vitro* model digestive system was used to test the binding performance of strains which were found to have higher biosorption capacity in the previous experiments and certain matrices in conditions close to human digestive system (pH, duration, temperature, digestive fluids).

It is determined that yoghurts containing LAB and probiotic strains have a significant potential to bind heavy metals via biosorption and reduce the absorption of heavy metals in the body.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotics, yoghurt, biosorption, cadmium, lead

TEŞEKKÜR

Lisans bitirme projemden başlayarak uzun süren yüksek lisans sürecimin sonuna kadar her zaman bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, içten ilgi ve desteğini esirgemeyen, çalışmalarımı yapmam ve tezimi tamamlamam için tüm olanak ve motivasyonu bana sağlayan değerli hocam, akademik hayat dışında da ağabeyim olan Doç. Dr. Ali TOPCU'ya, Özellikle tezim için laboratuvar çalışmaları yaptığım dönemde hem tecrübeli ve yardımsever bir hoca olarak bana birçok açıdan katkı sağlayan, hem de değerli bir ablam olan Dr. Tuğba BULAT'a,

Çalışmalarımın ağır metal analizi kısmında fazlasıyla zahmet verdiğim, hayatımda çok değerli bir insan olarak yer edinmiş olan Yelda ZENCİR'e,

Bir hocanın yanında her şeyiyle çok özel bir insan olan ve geçtiğimiz yıl zamansız bir şekilde aramızdan ayrılan değerli Prof. Dr. Yaşar Kemal ERDEM'e,

İhtiyaç duyduğumdan daha fazla desteği bana sağlamak için hayatımın her aşamasında hem yanımda hem de arkamda duran annem Zübeyde GİRİTLİ ve babam Emin ÖZKALP'e, tanıdığım günden bugüne hayatımda kıymetli yere sahip olan ve beni tamamlayan Sinem BAYAR'a, başarılı bir eğitim hayat geçirmesini gönülden temenni ettiğim kardeşim Dilan ÖZKALP'e çok teşekkür ederim.

010 01 602 008 nolu “*In vitro* şartlarda, laktik asit bakterilerinin ve yoğurdun detoksifikasyon özelliğinin incelenmesi” isimli proje kapsamında sağlanan maddi katkılardan dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Laktik Asit Bakterileri	4
2.2. Bakteri Hücre Duvarı.....	4
2.2.1. Gram-pozitif Bakteri Hücre Duvarı.....	4
2.2.2. Gram-negatif Bakteri Hücre Duvarı	6
2.2.3. Bakteri Yüzey Tabakaları.....	7
2.3. Yoğurt	7
2.3.1. Tarihsel Arka Plan.....	8
2.3.2. Fermente Ürün Çeşitleri	9
2.3.3. Yoğurt ve Sağlık.....	11
2.3.4. Yoğurdun Tedavi Edici Özellikleri	12
2.3.5. Probiyotik Yoğurdun Sağlığa Faydalı Özellikleri	13
2.4. Ağır Metaller.....	15
2.4.1. Kadmiyum	16
2.4.2. Kurşun	18
2.5. Biyosorbentler ve Biyosorpsiyon.....	21
2.5.1. Bağlanmada Etkili Fonksiyonel Gruplar	25

2.5.2.	Bağlanmada Sıcaklık Etkisi.....	28
2.5.3.	Bağlanmada pH Etkisi	28
2.5.4.	Bağlanmada İyonik Kuvvet Etkisi.....	29
2.5.5.	Bağlanmada Diğer Anyonların Mevcudiyeti.....	29
2.5.6.	Bağlanmada Diğer Etkenler.....	29
2.6.	Biyosorpsiyon İzotermi 29	29
2.6.1.	Basit Biyosorpsiyon Modelleri.....	31
2.6.2.	Sorpsiyon Performansının Karşılaştırılması.....	34
3.	MATERYAL ve METOT	37
3.1.	Materyal	37
3.2.	Metot.....	38
3.2.1.	Ağır Metal Çözeltilerinin Hazırlanması	38
3.2.2.	Bakteri Biyokütlelerinin Hazırlanması.....	38
3.2.3.	Bakteri Canlılığının Biyosorpsiyon Kapasitesine Etkisi	39
3.2.4.	İnkübasyon Süresi ve Koşulları.....	39
3.2.5.	İnkübasyon Süresinin Bağlanmaya Etkisi	39
3.2.6.	Biyokütle Miktarının Bağlanmaya Etkisi	40
3.2.7.	pH Değerinin Bağlanmaya Etkisi	40
3.2.8.	Bağlanma Stabilitesi	40
3.2.9.	İnkübasyon Sıcaklığı Etkisi	40
3.2.10.	Langmuir Adsorpsiyon Modeli Bağlanma Katsayılarının Belirlenmesi	40
3.2.11.	Farklı Suşlarla Hazırlanan Yoğurtların Biyosorpsiyon Kapasiteleri.....	43
3.2.12.	Model Sindirim Sistemi.....	44
3.2.13.	Kurşun-Kadmiyum Bağlanma Önceliği Deneyi	45
3.2.14.	Ağır metallerin tayini.....	45
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	47
4.1.	Canlılığın Biyosorpsiyon Kapasitesine Etkisi	47

4.2.	İnkübasyon Süresinin Bağlanmaya Etkisi	47
4.3.	pH Değerinin Bağlanmaya Etkisi	51
4.4.	Kurşun ve Kadmiyum Bağlanma Önceliği	54
4.5.	Langmuir Adsorpsiyon Modeli Bağlanma Katsayılarının Belirlenmesi	55
4.6.	Biyokütle Miktarının Bağlanmaya Etkisi	57
4.7.	İnkübasyon Sıcaklığının Bağlanmaya Etkisi	58
4.8.	Bağlanma Stabilesi	60
4.9.	Farklı Suşlarla Hazırlanan Yoğurtların Biyosorpsiyon Kapasiteleri	62
4.10.	Model Sindirim Sistemi Deneyleri.....	63
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR.....		68
ÖZGEÇMİŞ.....		75

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Ağır metaller ve insanlar üzerindeki etkileri [1]	1
Çizelge 2.1. Yoğurtla ilişkilendirilen sağlığa faydalı etkilerden bazıları ve bu etkilerin insanlar için geçerliliği [19].....	14
Çizelge 2.2. Metal Hidroksit oluşumu için pH değerleri [1]	15
Çizelge 2.3. Biyosorpsiyonda görev alan temel bağlama grupları [1], [6], [75]	27
Çizelge 2.4. Yaygın şekilde kullanılan tek bileşenli adsorpsiyon modelleri [6]	34
Çizelge 3.1. Sindirim sıvılarının kimyasal bileşimi	45
Çizelge 4.1. Laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd bağlaması için Langmuir izoterminden elde edilen q_{max} ve b parametreleri	55
Çizelge 4.2. Farklı LAB suş, suş kombinasyonları, süt ve aktif karbon için model sindirim sisteminden elde edilen yüzde bağlama değerleri (%)	64

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Gram-pozitif laktik asit bakterilerin hücre duvarı (Stok görsel sitesi www.shutterstock.com'dan ücretli şekilde indirilmiş, kısmi modifikasyonlar ile son hali verilmiştir)	5
Şekil 2.2. Fermente süt ürünlerinin sınıflandırması. ABT <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> ve <i>S. thermophilus</i> ; BRA, <i>B. infantis</i> , <i>L. reuteri</i> ve <i>L. acidophilus</i> [16].....	9
Şekil 2.3. Yoğurtla ilgili ürünlerin üretimindeki farklı işlemlerin şematik gösterimi [16] .	10
Şekil 2.4.Toksikantların (Ağır metelelerin) vücuda girişi, dağılımı, metabolizma ve atılım yolları [67].....	21
Şekil 2.5. Liyofilize <i>B. longum</i> 46 ve <i>L. fermentum</i> ME3'ün kurşun bağlamadan önce ve sonraki geçirimli elektron mikroskobu (TEM) mikrografları. Bağlama sonrasında her iki türün de yüzeyinde büyük kurşun çökeltileri görünürken (B ve D), kontrol mikrograflarında (A ve C) kurşun görünmemektedir [73]	24
Şekil 2.6. Probiyotik <i>L. plantarum</i> HD 48'ün kadmiyum bağlamadan önce (a) ve sonraki (b) geçirimli elektron mikroskobu (TEM) mikrografları (soldaki resim). Aynı bakterinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (a: bisorpsiyon öncesi, b:bisorpsiyon sonrası) [9], [74].	25
Şekil 2.7. Sorbat alımı kütle dengesi ile hesaplanır [69]	30
Şekil 2.8. Adsorpsiyon izotermi [1]	31
Şekil 2.9. Biyosorpsiyon–Langmuir izotermiyle ilgili eğri [81]	35
Şekil 3.1. Mavi renkteki hücreler deneysel veriler, sarı renkli hücreler rastgele denklem sabitleri, bordo hücreler ise rastgele verilen sabitlerle hesaplanan q değerleri	42
Şekil 3.2. Solver ile R^2 maksimize edilecek hücre olarak, q_{max} ve b ise değiştirilecek hücreler olarak seçilir	42
Şekil 3.3. Solver fonksiyonu sonrasında, deneysel veriler ve modele uydurulan veriler aynı grafikte gösterilmektedir. R^2 değerinin de 1'e oldukça yakın olduğu görülmektedir	43
Şekil 4.1. İnkübasyon süresinin, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi.....	47
Şekil 4.2. Ortam pH'sının, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi	51
Şekil 4.3. Canlı (A) ve cansız (B) laktik asit bakterileriyle yapılan bağlanma önceliği deneyleri	54

Şekil 4.4. Biyokütle miktarının (konsantrasyonunu) biyosorpsiyona etkisini gösteren grafikler	57
Şekil 4.5. Ortam sıcaklığının biyosorpsiyon kapasitesine etkisini gösteren grafikler.....	59
Şekil 4.6. Farklı pH değerlerindeki bağlanma stabilitelerine ilişkin grafikler	60
Şekil 4.7. Farklı LAB suşları ile hazırlanan yoğurt ve laktik asitle koagüle edilen süt jelinin biyosorpsiyon kapasiteleri	63



SİMGELER VE KISALTMALAR

µL	Mikrolitre, 10 ⁻⁶ Litre
AAS	Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
Cd	Kadmiyum
dk	Dakika
g	Gram
HNO ₃	Nitrik asit
LAB	Laktik asit bakterileri
mL	mililitre
Pb	Kurşun
ppm	Milyonda bir birim, mg/L
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
Kob	Koloni oluşturan birim

1. GİRİŞ

Ağır metallerin neden olduğu kirlilik, günümüzde karşı karşıya olduğumuz en büyük çevresel sorunlar arasındadır. Birçok ağır metal iyonu insanlar için toksiktir. Belirli iyonların toksisiteleri Çizelge 1.1’de sıralanmıştır. İndirgenemeyen bu metal iyonları, çevrede kalıcı olarak birikebilmektedir. Bu nedenden ötürü, çevresel bulaşlarla kirlenmiş gıdaların tüketimine bağlı olarak ortaya çıkabilecek sıkıntılar önemli bir halk sağlığı sorunudur.

Çizelge 1.1. Ağır metaller ve insanlar üzerindeki etkileri [1]

Ağır metal	Ana kaynak	Toksik etki
Kurşun	Madencilik, boyalar, pigmentler, elektrokaplama, pil üretimi, kömür yakılması	Anemi, beyin hasarı, anoreksi, halsizlik, iştah kaybı; karaciğer, böbrek ve bağırsak hasarı, çocuklarda zihin geriliği
Kadmiyum	Plastik, kaynak, pestisit, gübre, madencilik, rafinasyon	Böbrek hasarı, bronşit Sindirim sistemi bozukluğu, kemik iliği kanseri, akciğer yetmezliği, hipertansiyon, İtai-İtai hastalığı, kilo kaybı
Bakır	Kaplama, bakır cilalama, boya, baskı işlemleri	Nörotoksikite ve akut toksisite, baş dönmesi, ishal
Çinko	Madencilik, rafineriler, pirinç imalatı	Kısa dönemli metal dumanı ateşine yol açar, sindirim rahatsızlığı
Cıva	Piller, kağıt endüstrisi, boya endüstrisi, madencilik	Sinir sistemi hasarı, protoplazma zehirlenmesi; cilt, gözler, kaslar için aşındırıcı, böbrek hasarı
Arsenik	Eritme/dökmecilik, kaya sedimentasyonu, pestisitler	Bronşit, dermatit, kemik iliği çöküntüsü, hemoliz (alyuvar yıkımı), hepatomegali (karaciğer büyümesi)

Cıva haricindeki en toksik metaller arasında yer alan kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb), birçok gıda ürününde farkı miktarlarda bulunabilmektedir. Dünya genelinde bazı ülkelerde söz konusu metallere maruz kalma seviyesi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafında belirlenen haftalık tolere edilebilir alım miktarını aşmaktadır (Cd için 7 µg/kg vücut ağırlığı, Pb için 25 µg/kg vücut ağırlığı). Ancak bu sınır değerler, kimi belirsizlikler nedeni ile kaldırılmıştır. İdeal olan bu ağır metallerin vücuda hiç alınmaması veya olabildiğince az alınmasıdır. Normal koşullarda ağır metallerin doğadaki düzeyi düşüktür [2].

Gümüş, cıva, bakır, Cd ve Pb gibi ağır metaller, doğal konsantrasyon seviyelerinin üzerinde bulunduğunda organizmaya toksik etki yapmakta ve enzimleri inhibe etmektedir. Pb etkisini en fazla merkezi sinir sistemi ve böbrekler üzerinde gösterirken, Cd böbrek ve karaciğer üzerinde tahribata neden olmaktadır. Ayrıca Cd kemik kırılmasına ve şiddetli kemik ağırlarına sebep olmaktadır. Bu ve buna benzer sağlık sorunlarına neden olmasından dolayı bu ağır metallerin gıdalardaki miktarı belli limitlerle sınırlandırılmıştır [3].

Beslenme ile sağlık arasında yakın bir ilişki vardır ve bu ilişkide, fermente ürünler insan sağlığının korunmasında önemli bir yere sahiptir. Laktik asit bakterileri (LAB) GRAS

(Generally Recognized as Safe) listesinde yer almakta ve birçok fermente gıdanın üretiminde kullanılmaktadır. LAB grubunda yer alan probiyotik suşların sağlık açısından birçok olumlu etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle günümüzde probiyotik bakteri içeren fermente ürünler giderek artan bir popüleriteye sahiptir.

Yapılan çalışmalarda probiyotik ve LAB'ların ağır metalleri bağladığı belirtilmiştir. Buradan hareketle, LAB'ların, çeşitli yollarla vücuda alınan ağır metalleri **biyosorpsiyon** yoluyla bağlayarak emilimi azaltmak için etkili bir araç olabileceği araştırmacılar tarafından öngörülmektedir [4], [5].

Biyosorpsiyon işlemi, metal ve metaloid türlerinin, bileşiklerin ve partiküllerin, biyolojik malzemeler tarafından çözeltiden uzaklaştırılması şeklinde tanımlanmaktadır [6]. Genel olarak bu olay, bir adsorban üzerine pasif ve enerji-bağımsız moleküler tutulmayı ifade etmektedir.

Ağır metallerin sıvı ortamdan uzaklaştırılmasında, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler uygulanabilmekle birlikte, gıda ve/veya diğer yollarla vücuda alınan ağır metallerin uzaklaştırılmasında veya emiliminin azaltılmasında en etkili ve akılcı yaklaşımın LAB olduğu kabul edilmektedir. Bu bakterilerde biosorpsiyon mekanizması; iyon değişim, kompleks oluşturma, adsorpsiyon, elektrostatik etkileşimler, kelat oluşumu, mikropresipitasyon yöntemlerinden biriyle veya bunların bileşimiyle gerçekleşmektedir [6].

Ülkemizde yapılan ve SCI kapsamındaki dergilerde de yayımlanmış olan bilimsel araştırmalarda, çoğu gıda ürününde kabul edilebilir düzeyin üzerinde ağır metal varlığı ortaya konulmaktadır. Ayrıca endüstrileşme ve bunun sonucu olarak çevre kirliliğindeki artış gıda ürünlerinde (deniz ürünleri, tahıllar, meyve ve sebze vb.) toksik kontaminantların artmasına neden olmaktadır. Küresel ısınma sonucu iklimsel değişiklikler ve güvenli olmayan su kaynaklarının kullanım oranının artması, sigara kullanımındaki artış insanların toksik maddelerle karşı karşıya gelme olasılığını artırmaktadır.

TÜİK 2017 verilerine göre; Türkiye'de yılda 163.500 civarında yeni kanser vakası teşhis edilmektedir. Ülkemizde bir günde yaklaşık 450 kişinin kanser teşhisi aldığı söylenebilir. En sık görülen kanser türleri arasında kolorektal kanserin görülme sıklığı kadınlarda %8, erkeklerde %9'dur.

Kuzey Avrupa'da kolon kanseri vakalarının daha seyrek görülmesi, yerel beslenme alışkanlığı çerçevesinde süt ve hububat ürünlerinin sık tüketilmesi ile ilişkilendirilmektedir. LAB gerçekleştirdikleri birçok faaliyet sonucunda kolon kanseri riskini azaltabilmektedir

[7]. Risk azaltma; intestinal içeriğin mutajenitesinin değiştirilmesi, intestinal mikrobiyotanın kompozisyonunun ve metabolik aktivitelerinin değiştirilmesi ve bunun yanında bakteriyal glukuronidaz, glukosidaz, nitroredüktaz ve üreaz enzimlerinin miktarlarının düşürülmesi gibi etkilerle söz konusu olmaktadır [8].

Yoğurt, sütün *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerin gerçekleştirdiği laktik asit fermentasyonu ile üretilen, pıhtılaşmış süt ürünüdür. Geleneksel bir ürün olmakla birlikte büyük bir ticari değeri de olan yoğurt; toplumumuzda geleneksel olarak zehirlenme durumunda tüketilmesi önerilen bir gıda ürünüdür. Dünya genelinde de detoksifikasyon diyetlerinde yoğurda yer verilmektedir.

Yoğurt tüketiminin ağır metallere maruz kalmayı önleyip önlemediği sorusu bağlamında; probiyotik yoğurt üretiminde kullanılabilecek LAB'lerin gıda matriksiyle birlikte insan sindirim sistemi koşullarındaki biyosorpsiyon özelliği ve yoğurdun LAB biyosorpsiyonu üzerine etkisi araştırmaya değer bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu doğrultuda, çalışmamızda temel olarak;

- Ticari probiyotik ve laktik starter kültürlerinin (canlı ve cansız) ağır metalleri (Pb ve Cd) bağlama özelliklerinin ve bağlama stabilitesinin araştırılması,
- Yoğurdun ağır metalleri bağlama özellikleri ile bağlama stabilitesinin araştırılması
- *In vitro* model sindirim sisteminde biosorpsiyon etkilerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik Asit Bakterileri (LAB) Gram-pozitif, sporsuz, mikroaerofilik, fakültatif anaerobik, kok ve rod şekilli, karbonhidrat fermentasyonunda temel ürün olarak laktik asit üreten mikroorganizmalardır.

LAB; *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sterptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinslerine ait türlerden oluşmaktadır. LAB terimi, şeker fermente etme yolları kendilerine özgü ve filogenetik açıdan laktik asit bakterileriyle ilişkisiz olmasına rağmen, bifidobakter cinsi için de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [9], [10].

LAB insan ve diğer hayvanlarda yerleşik olarak bulunmaktadır. Bu bakteriler, konak organizma ile simbiyoz içerisinde yaşamakta; sindirim sistemi, tüm mukoz membranlar ve ciltte yaygın olarak yer almaktadır. LAB grubunda yer alan bazı suşlar, faydalı teknolojik özellikleri veya faydalı sağlık etkileri nedeniyle gıda ve içecekleri fermente etmek için kullanılmaktadır [10], [11].

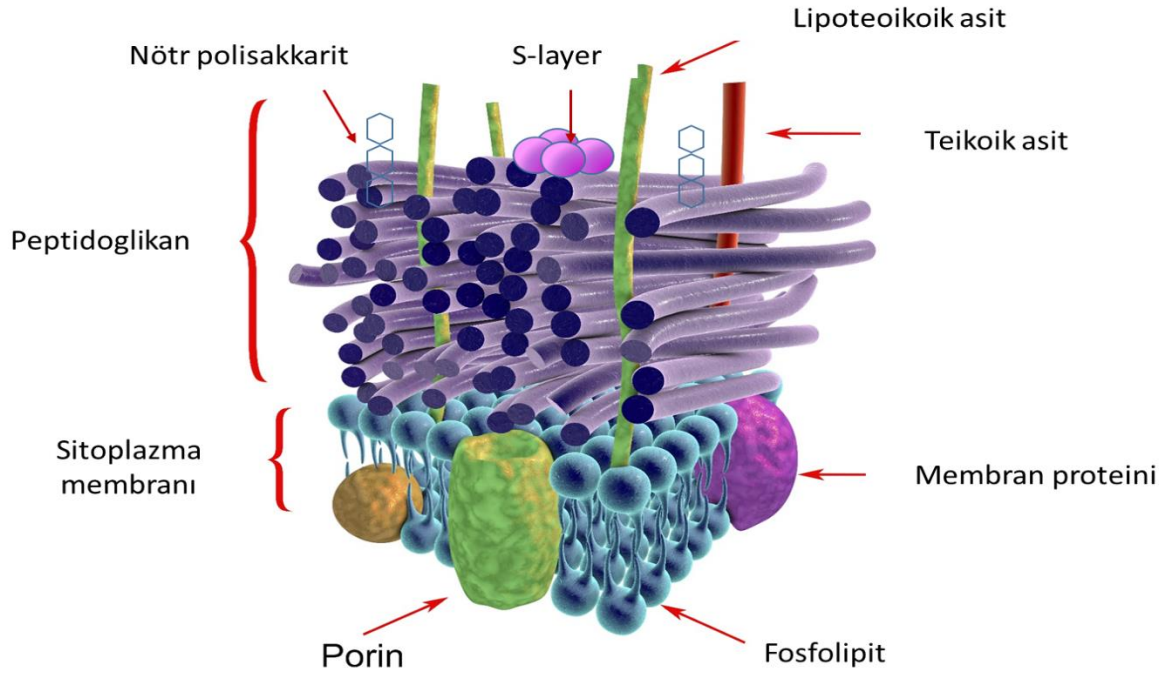
2.2. Bakteri Hücre Duvarı

Bakteri hücre duvarı antibiyotiklerin keşfinden beridir bilim insanlarının dikkatini çeken bir konudur. Tüm bakterilerin hücre duvarı ortak özellikler göstermektedir ve peptidoglikan ve bitişik tabakaların önemine dayanarak 3 ana bakteri hücre duvarı grubundan bahsedilebilir: Gram-pozitif bakteri, Gram-negatif bakteri ve arkebakter [12].

2.2.1. Gram-pozitif Bakteri Hücre Duvarı

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı 50-150 nm kalınlıktadır ve hücre duvarı malzemesinin %40-90'ı peptidoglikandan oluşmaktadır. Peptidoglikan sıkı, porlu ve amorf bir maddedir ve tüm bakterilerde aynıdır. 3 boyutlu yapısı kitinin kristal yapısından farklılık göstermektedir [13].

Şekil 2.1'de, Gram-pozitif bakteriye ait hücre duvarı bileşenleri görülmektedir. Hücre duvarının ana bileşenleri; plazma membranı, peptidoglikan (murein), teikoik asitler, proteinler, karbonhidratlar ve kısmet peptidoglikan tabakasına bağlı durumdaki S-tabakası proteinleridir.



Şekil 2.1. Gram-pozitif laktik asit bakterilerin hücre duvarı (Stok görsel sitesi www.shutterstock.com'dan ücretli şekilde indirilmiş, kısmi modifikasyonlar ile son hali verilmiştir)

Peptidoglikan molekülü genel olarak N-asetilglukozamin-beta (1→4)-N-asetilmuramik asit disakkaritinin lineer zincirlerinden oluşmaktadır. N-asetilglukozamin aynı zamanda kitinin de ana bileşenidir.

Genellikle 4 veya 5 amino asitten oluşan peptit zincirleri muramik asitin karboksil grubu yerine geçmiştir. Belirli amino asitlerin D-izomerik formda bulunması önemli bir karakteristik özelliktir. Disakkarit peptit birimleri doğrudan peptit bağları veya kısa peptitlerle bağlanmıştır. Bu genel model, örneğin peptit köprüsünün doğası ve yerleşimine bağlı olarak birkaç peptidoglikan tipi olmasını sağlamaktadır. Bu peptidoglikan tiplerinin taksonomik önemi vardır. Peptidoglikan anyonik grupları açığa çıkaran birkaç tabakadan oluşturmaktadır ve ağ yapısından dolayı moleküler ağırlığı 1200 ve 70000 dalton arasında olan moleküllere karşı yüksek geçirgenliğe sahiptir [14]. Peptidoglikanın çalışması, her oluşumunda oluşturulan maddelerin %8-10'unu teşkil eden disakkarit peptit birimlerinin sitoplazmadaki sürekli sentezi sayesinde yürütülmektedir.

Mikrobiyal hücre duvarının metal bağlama kapasitesi sadece sayı, fonksiyonel grupların tipi ve erişimi tarafından değil, çökelti veya çekirdeğin miktarı ile şeklini belirleyen hücre duvarı çerçevesinin tel çapı ve hücre duvarı iskeletindeki boşlukların derecesine bağlıdır. Aynı zamanda peptidoglikanın boyutsal yapısının da daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Disakkarit bağları helikoidal bir çizgi boyunca arka arkaya tutunmuş olan peptit çapraz bağlarını ortaya çıkaracak bir tübüler heliks şeklinde organize olmuştur. Bu model Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri hücre duvarlarındaki peptit bağlanma derecesinin ve mevcut peptit tiplerinin (oligomerler, dimerler ve trimerler) tahmin edilmesini mümkün kılmaktadır [6].

Bahsedildiği gibi Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları anyonik grupları açığa çıkaran birkaç tabakadan oluşmaktadır. Peptidoglikana kovalent olarak bağlanmış 2 duvar bileşeni duvarın anyonik özelliğine katkı sağlamaktadır. Bunlar; teikoik asitler ve teikuronik asitlerdir. Teikoik asitler 30-40 gliserol veya ribitol fosfat kalıntısı molekülünden oluşmaktadır. Ester grupları (glikozik ve D-alanin) fosfat grubu tarafından peptidoglikanın N-asetilmuramik asitine bağlanmış olan teikoik asit doğrusal zincirine bağlıdır. Teikuronik asitlerde fosfat yoktur ve hekzuronik asit doğrusal zincirlerinden oluşmuştur. Teikoik asit ve teikuronik asitlerin oranı kültür koşullarına, özellikle fosfat miktarına bağlıdır. Plazma membranının bir bileşeni olan lipoteikoik asit membrana molekülün lipit ucu tarafından bağlıdır ve hücre duvarı peptidoglikanı ağı boyunca devam eder. Teikoik asit ve teikuronik asitlerin metal yakalamada rolü olduğu ispatlanmıştır, ancak genelde özellikle plazma membranına magnezyum sağlama gibi fizyolojik rolleri ile bilinirler [12].

2.2.2. Gram-negatif Bakteri Hücre Duvarı

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı pozitif türlerinkinden daha incedir. Kalınlığı 30-80 nm arasındadır. Peptidoglikan plazma membranı ve dış membran arasında sandviç benzeri bir durumdadır. Bazı özellikler yönünden Gram-pozitif bakteri peptidoglikanından farklıdır. İnce peptidoglikan tabakası yalnızca 15-20 nm kalınlıktadır ve hücre duvarı maddesinin yaklaşık olarak %10'una denk gelmektedir. Gram-pozitif bakterideki gibi yoğun bir şekilde çapraz bağlanmış değildir. Glikan zincirleri arasında yalnızca bir tip peptit köprüsü oluşmaktadır. Dış membran lipopolisakkaritin (LPS) dış tabakası ile fosfolipitler ve proteinlerden oluşmaktadır. Magnezyum kimyasal stabilitesine katkıda bulunmaktadır. Gram-negatif bakterilerin ağır negatif yüzeyi ağırlıklı olarak LPS'nin net negatif yükünden kaynaklanmaktadır [6], [10].

Dış membran lipoproteinleri, magnezyum veya kalsiyum gibi bivalent katyonları tarafından ortaya çıkarılan iyonik bağlarıyla peptidoglikan üzerine bağlı olduğundan hücre duvarı sağlamlığına katkıda bulunmaktadır. Bazı lipoproteinler serbest kalır ve bağlamada yer almaz. Çözünen maddeler dış membran içinden kolayca geçemez. Transferler genellikle belirli proteinler (porinler) tarafından oluşturulan kanallar yoluyla gerçekleşir. Bu kanallar

molekül ağırlığı 600-6000 dalton arasındaki moleküllerin akışına mücade eder [6], [11], [12].

2.2.3. Bakteri Yüzey Tabakaları

Gram-pozitif, Gram-negatif ve arkaebakteri gruplarına ait bazı bakteri suşlarının hücreleri genelde alttaki hücre duvarı ile ilişkili ilave ancak kovalent olmayan bir bağla bağlanmış, 25-50 kDa boyutunda, bazik karakterde, pI değeri 9.35-10.88 arasında olan bir yüzey tabakası ile kaplanmıştır. S-tabakaları (S-tabaka proteinleri), bakterinin “doğal” ortamında hayatta kalması için hayati öneme sahip olduğu kabul edilmekte, ancak birçok yabancı bakteri suşu laboratuvar alt kültürlerinde bu yüzeyleri kaybetmektedir. S-tabakası genelde homojen polipeptitler ve bazen de ikinci bileşik olarak karbonhidratların düzenli diziliminden oluşmaktadır [11], [12]. S-tabakaları hücre dışı polimerleri karboksil ve bazı durumlarda fosfonat veya sülfonat grupları içermektedir. Bunun haricinde, belirli bakteriler SO_4^{2-} veya S^{2-} veya HPO_4^{2-} yi serbest bırakan enzimler üretmektedir. Ligandlar metal katyonlarıyla mikro çökelti oluşturabilmektedir [15].

2.3. Yoğurt

Yoğurt, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kültürlerini içeren fermente bir süt ürünüdür. Yoğurt, kent yaşamındaki insanların diyetinde yeterli miktarda alınamayan kalsiyum, D vitamini ve potasyum gibi besinleri içermektedir.

Hem müdahaleye hem de gözleme dayalı çok sayıda çalışma, yoğurt tüketimini insan sağlığı üzerindeki birçok olumlu etkiyle ilişkilendirmiştir. Bunlar arasında laktozun ve bazı diğer belirli besin maddelerinin daha iyi sindirilmesi, kemik minerali alımının artması, vücut ağırlığı yönetimi, kalp sağlığı, metabolik sağlık, ve bağışıklık sistemi sağlığı bulunmaktadır [16].

Sağlık faydalarını arttırmak amacıyla geleneksel yoğurda özel faydalı (probiyotik) kültürler eklenebilmektedir [17]. Bu ürünler probiyotik yoğurt veya biyo-yoğurt olarak ifade edilmekte olup, bireylerin bağırsak mikroflorasını veya sağlığını tehdit eden bazı risklerin, bu ürünlerin tüketimiyle azaltılabileceği öngörülmektedir. Genel olarak aşağıdaki şartların sağlanması koşuluyla probiyotik yoğurtların olumlu sağlık etkilerine sahip olduğu kabul edilmektedir [16].

- Tükedildiğinde üründe en az gramında 1.0×10^6 canlı probiyotik *Lactobacillus* ve/veya *Bifidobacterium* bulunması gerekmektedir.

- Mide ve sindirim sisteminin üst kısmından geçerken dayanabilmesi, sindirim sisteminin alt kısımlarının epitel duvarlarında kolonize olabilmesi/yerleşebilmesi gerekmektedir.
- Tüketimin düzenli olması, (haftada yaklaşık 200-300 g) gerekmektedir. Düzenli ifadesinin kesin tanımı bireye ve bireyin yaşam tarzına bağlıdır.

Bu koşullar mevcut olduğunda biyo-yoğurttaki kültürler ağız yoluyla alınan probiyotikler olarak tanımlanabilmekte ve sağlık üzerine ilave olumlu etkiler gösterebilmektedir [18]. Toplum sağlığındaki işlevselliğiyle birlikte tüketici talebi hesaba katıldığında, bu ürünlere yönelik pazarın sürekli büyüdüğü görülmektedir.

2.3.1. Tarihsel Arka Plan

Fermantasyon insanlar tarafından uygulanan ve sütün daha uzun raf ömrüne sahip ürünlere dönüştürüldüğü en eski metotlardan biridir. Fermente süt yapmanın kesin çıkış noktasını (veya noktaları) belirlemek zordur, ancak insanların gıda toplayıcılığından gıda üreticiliğine geçmesi ile 10,000-15,000 yıl öncesine dayandığı söylenebilir. Bu değişim bazı hayvanların (örneğin inek, koyun, keçi, manda ve deve) evcilleştirmesini de kapsamaktadır ve muhtemelen dünyanın farklı bölgelerinde farklı zamanlarda gerçekleşmiştir.

Arkeolojik kanıtlar bazı medeniyetlerin (örneğin Mezopotamya’da Sümerler ve Babilliler, kuzey doğu Afrika’da Antik Mısır ve Asya’da Hintliler) tarım ve hayvancılık ile yoğurt gibi fermente sütlerin üretiminde gelişmiş olduğunu göstermektedir.

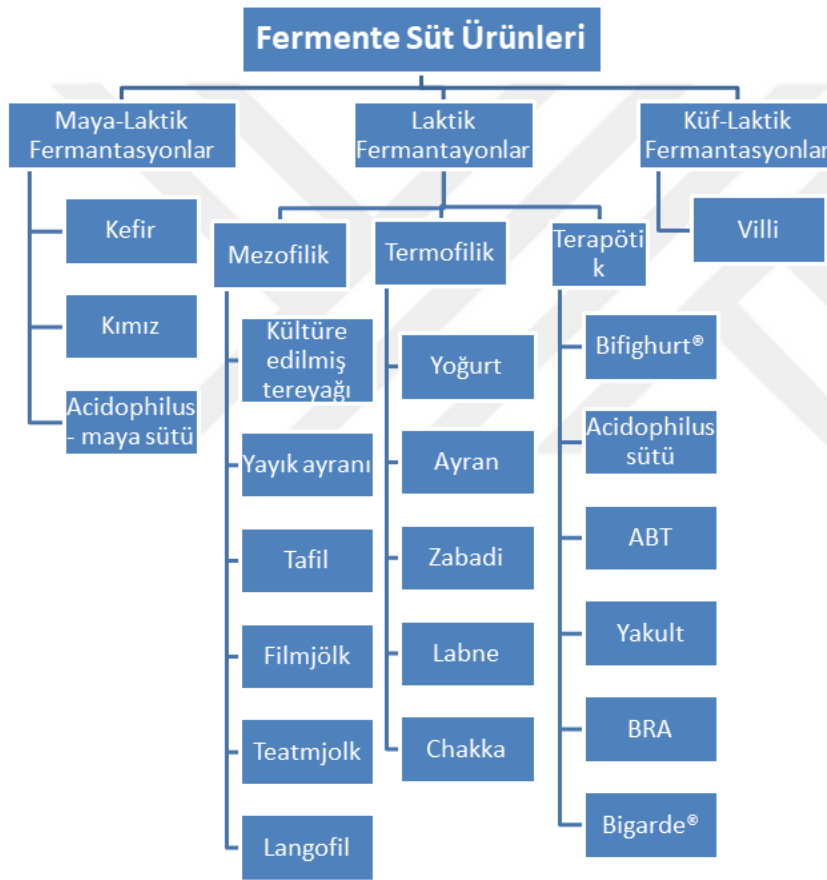
Yoğurdun kökeni ile ilgili mevcut bir kayıt olmasa da, insan sağlığı ve beslenme üzerindeki faydalı etkisine olan inanç uzun bir dönem boyunca birçok medeniyet tarafından benimsenmiştir. Pers geleneğine göre İbrahim yaratıcılık ve uzun ömürlülüğünü yoğurda borçluydu, ve daha yakın zamanlarda Fransa İmparatoru Francis I’ın keçi sütünden yapılan yoğurdu tüketerek kendisini güçsüzleştiren hastalığını tedavi ettiği söylenmektedir.

Buna karşın yoğurdun kökeninin Orta Doğu olması muhtemeldir ve bu fermente ürünün zamanla geçirdiği evrim dünyanın bu bölgesinde yaşayan göçebe insanların aşıcılık yetenekleriyle ilişkilendirilebilir [19]. Bu konuda bir diğer görüş ise çok eski çağlardan beri Orta Asya kavimleri ile İskitlerin temel tüketim maddeleri arasında yer aldığı ve göçebe Türklerce tüketildiği şeklindedir. Günümüzde yaygın görüşe göre yoğurt bir Türk buluşudur [20]. Fermente süt ürünleri (yoğurt) üretimi endüstriyel olarak 1900’lerin başından itibaren yaygın bir muhafaza şekli haline gelmiş, belirlenen mikroorganizmalar bu ürünleri

fabrikalarda büyük ölçeklerde üretmek için kullanılmıştır. Bu ürün Türkçe'deki "yogurt" kelimesinden ötürü İngilizce'ye yoghurt olarak geçmiştir [16].

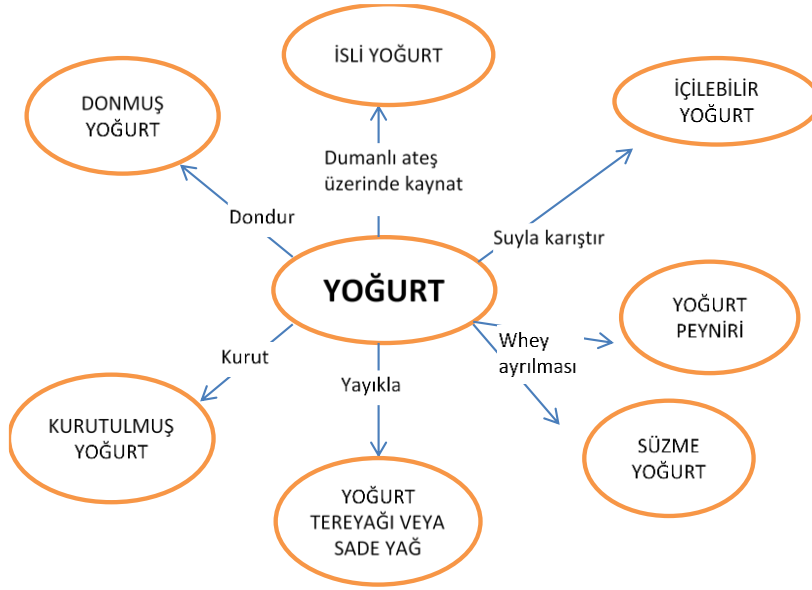
2.3.2. Fermente Ürün Çeşitleri

Dünyada üretilen geleneksel ve endüstriyel fermente süt ürünlerinin 400 civarında jenerik ismi vardır [19]. Bu ürünlerin isimleri farklı da olsa pratikte hepsi aynıdır. Robinson ve Tamime [16] kullanılan süt çeşidini, floraya hakim mikrobiyal türü ve asıl metabolik ürünleri hesaba katarak fermente sütleri 3 geniş kategoriye ayırmıştır: Bunlar; laktik fermentasyonlar, maya-laktik fermentasyonları ve küf-laktik fermentasyonlar olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Fermente süt ürünlerinin sınıflandırması. ABT *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* ve *S. thermophilus*; BRA, *B. infantis*, *L. reuteri* ve *L. acidophilus* [16]

Yoğurt birçok istenen özelliğe sahip olmasına karşın, özellikle ortam sıcaklığında, birkaç gün içerisinde bozulma eğilimindeki bir üründür. Bu nedenle çeşitli işlemlerle daha uzun raf ömrüne sahip ürünlere dönüştürülebilir veya yeni ürünlerin hammaddesi olarak kullanılabilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Yoğurtla ilgili ürünlerin üretimindeki farklı işlemlerin şematik gösterimi [16]

Alternatif bir muhafaza işleminde yoğurt birkaç saatliğine kısık ateşte belirli bir odun tipiyle ısıtılır, elde edilen ürüne isli yoğurt denir. Bu tip yoğurt kavanozlara konarak ve üzeri zeytinyağı veya iç yağla kaplanarak saklanabilir.

Yoğurt üretim metotları yıllar geçtikçe az bir değişim geçirmiş ve özellikle fermentasyonu gerçekleştiren LAB'lerle ilgili bazı gelişmeler yaşanmış olsa da, yoğurt üretim işlemindeki ana adımlar halen aynıdır ve şu şekildedir:

- Sütteki toplam katı madde miktarını 14-16 g/100 g'a çıkarmak.
- İdeal olarak sütün yüksek sıcaklıkta 5-30 dakikalık bir süre tutulabileceği bir yöntemle sütü ısıtmak (Kesin süre seçilen sıcaklığa göre değişecektir).
- Sütü *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un baskın organizma olduğu bakteri kültürüyle aşılama.
- Mayalanmış sütü ambalajda veya tankta, topaksız viskoz bir pıhtının ve istenen aromatik tadın/aromanın elde edileceği koşullarda inkübe etmek.
- Soğutmak ve istenirse ileri işleme tabi tutmak; örneğin meyve ve diğer bileşenlerin katılması, pastörizasyon veya konsantrasyon.
- Soğuk koşullar altında tüketiciye dağıtım için ambalajlama.

Bununla birlikte, yoğurt kelimesi geniş bir yelpazedeki ürün çeşitliliği içinde kullanılmaktadır (Örneğin kurutulmuş yoğurt, dondurulmuş yoğurt ve hatta pastörize edilmiş yoğurt). Yoğurt esasen bol miktarda starter kaynaklı canlı bakteri içermesi

gerektiğinden bu çeşitlerin de yoğurt adı altına dahil edilmesi bazı insanları rahatsız etmektedir. Ancak ambalaj son işlem hakkında yeterince bilgi verdiği takdirde (örneğin pastörize yoğurt), popüler kullanımların temel ürünün bütünlüğünden taviz vermediği anlaşılmaktadır.

Bu yaklaşım aynı zamanda yoğurt üretiminde her zaman fermentasyon aşaması yer alması ve doğrudan laktik asit eklenmesiyle elde edilen pıhtının asla yoğurt ve hatta yoğurt benzeri ürün olarak tanımlanmaması gerektiği ve bu aşamanın ticari uygulamada son derecede değişken olduğu anlamına gelmektedir.

Süt bileşimindeki değişimler, starter organizmaların düzensiz davranışları, inkübasyon sıcaklığındaki hatalı uygulamalar ve bunların yanında bazı diğer işlem değişkenleri toplam kalite yönünden yetersiz ürüne yol açabilir. Hatalı ürün riskini azaltmanın tek yolu fermentasyona tüm yönleriyle hakim olmaktır.

2.3.3. Yoğurt ve Sağlık

Yoğurt ve benzeri fermente gıdalar insanların beslenmelerinde uzun zamandır önemli bir yere sahiptir. İnsanlardaki sağlık sorunlarının bağırsaktaki zararlı bileşiklerin kana geçmesiyle tetiklendiği bilinmektedir. Bu zararlı bileşikler dışarıdan alınabildiği gibi ince bağırsağın alt yarısı ve kalın bağırsaktaki çürütücü (putrefektif) bakterilerin faaliyeti neticesinde de ortaya çıkabilmektedir. Bu bakterilerin faaliyeti baskılandığında bakterilerin metabolik ürünlerinin olumsuz etkileri ortaya çıkmayacak ve birey daha uzun ve sağlıklı bir yaşam sürebilecektir.

Böyle bir hipotez kulağa çok mantıklı gelmektedir, ve yoğurdun bu çürükçül bakteri faaliyetini engellemekteki rolü şu şekilde açıklanmıştır; ilk olarak yoğurttaki laktik asit bakterileri düşük pH değerlerini tolere edebilir, oysa ki çoğu bakteri ideal büyüme ve metabolizma faaliyetini nötr pH değerleri civarında göstermektedir. O nedenle asidik yoğurt bağırsaklardan geçtikçe gıdadaki laktik asit istenmeyen florayı öldürebilir. İkinci olarak, yoğurdun bu etkisinin *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un bağırsakta yerleşmesi ve yerleşik mikrofloraya hakim olması tarafından arttırıldığı ileri sürülmektedir. Bu ikinci değişiklik yoğurdun tüketilmediği zamanlarda dahi çürükçük organizmaların bulunmamasını sağlamak ve tüketicinin sağlığını korumaktadır. Şu anda bilim insanları arasındaki fikir birliği yoğurt bakteri kültürlerinin bağırsak yolunun mukozal yüzeylerine tutunamadığı yönündedir, ancak bazı durumlarda tür farklılığı, deneysel tasarım ve/veya hayvan çalışmalarının insanlara yanlış bir şekilde uygulanması nedeniyle çelişen sonuçlar ortaya çıkmaktadır [16].

Yıllar boyunca bu orijinal fikirler yoğun bir tartışma ve araştırmaya konu olmuş ve kritik etmenin ürünün mikroflorası olduğu netleşmiştir. Dolayısıyla yoğurt tanımı gereği yalnızca *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'tan oluşan bir mikrofloraya sahip olmalıyken [21], pazara yeni giren bazı ürünlerde *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. paracase* subsp. *paracasei* ve/veya *Bifidobacterium* spp. bulunabilmektedir. Son bahsedilen ürünler sıklıkla probiyotik-yoğurt olarak isimlendirilir ve kimyasal bileşim olarak yoğurtla benzer özelliğe sahiptir, ancak mikrofloranın tüketicinin sindirim sistemi üzerindeki etkisi tamamen farklıdır. Bu nedenle söz konusu ürünleri tüketenlerdeki sağlık etkileri ayrı değerlendirilmelidir [16].

2.3.4. Yoğurdun Tedavi Edici Özellikleri

Kalın bağırsaktaki bakterilerin sketol ve indol gibi canlı dokuya zarar veren birtakım fenolik bileşikler ürettiği bilinmektedir. Bu maddelerin bağırsak duvarında fark edilebilir etkilere yol açması veya emilmesi, bu maddelerin konsantrasyonuna, bağırsaktaki diğer maddelerin onları içine alma kabiliyetine ve alıkonma süresine bağlıdır. Bununla birlikte bu maddelerin kalın bağırsakta kanser başlangıcında rolleri olduğu yönünde endişe vardır [16]. Bu maddelerin üretilmesini baskılayacak herhangi bir işlem faydalı olacaktır. Laktik asitin çürükçül bakterilerin büyümesini/metabolizmasını inhibe etmesi buna örnek olarak gösterilebilecek bir işlemdir.

Gerçekte yoğurttaki laktik asitin bir kısmının safra bileşenlerinin nötrleştirici etkisinden etkilenmeyeceği tartışmaya açık olsa da, yoğurdun az da olsa bağırsaktaki pH gradyanını değiştirebileceği görüşü devam etmektedir.

Yoğurdun hipokolesterolemik (düşük kolesterol) etkisi olduğu öne sürülmüştür. Bu etkinin gerçek sebebi belli değildir, ancak yoğurdun bu yönden fermente olmamış süte kıyasla daha aktif olması mikrobiyal kaynaklı enzim sistemi veya biyokimyasal bileşenlerin etkili olduğunu düşünülmektedir. Hidroksimetil glutaratın kolesterol sentezini sınırlayan bir starter kültür metaboliti olduğu öne sürülmüştür, ancak hem bu fenomenin gerçekliği hem de olası sebebi spekülasyona açıktır [16].

Farelerle yapılan çalışmalarda canlı veya pastörize edilmiş yoğurt tüketiminin belirli tümör tiplerinin büyümesini önlediğini, ve bakterinin hücre duvarındaki bazı faktörlerin bu etkiyi sağlamış olabileceği öne sürülmüştür [22]. Bunun gibi sonuçların insanlar için uygulanabilmesi başka bir konu olsa da, yoğurt tüketiminin göz ardı edilemeyecek olası bir faydası söz konusudur.

Benzer şekilde, bağırsaktaki normal mikrofloranın uyarılması düzenli yoğurt tüketimi ile ilişkilendirilmiş ve starter bakterilerin parçalanmış hücrelerinin bağırsakta örneğin *L. acidophilus* gelişimini teşvik eden vitamin veya diğer büyüme faktörleri açığa çıkardığı öne sürülmüştür. Bu fikri destekleyen insan çalışmalarından elde edilmiş klinik kanıtlar bulunsa da, belirli bir toplumdaki normal tüketici nüfusundaki düzenli tüketimin etkisinin ne kadar yaygın olacağını saptamak güçtür.

2.3.5. Probiyotik Yoğurdun Sağlığa Faydalı Özellikleri

S. thermophilus'un asitliği tolere edemediği ve bu türe ait çok az sayıdaki hücrenin mideden canlı kalarak geçebileceği; hatta asitliğe daha dayanıklı *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un dahi canlı durumda bağırsağa ulaşma ihtimalinin zayıf olduğu bilinmektedir. Aynı bakterilerin sodyum taurokolat ve glikolat dahil olmak üzere safra tuzlarına karşı direnci de zayıftır. Hatta bazı *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları laboratuvar farelerinin bağırsaklarına yerleştirilmesine rağmen bu durum değişmemiştir. Bunun sonucunda genel fikir birliği *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un insanlardaki sindirim işleminde canlı kalamadığı yönündedir [16].

Buna karşın, probiyotik yoğurt olarak isimlendirilen yeni ürünlerin geleneksel üründen farklı bir mikroflorası vardır. Bu ürünlerde *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un hakim bir şekilde yer almama durumu bu ürün için yoğurt isminin kullanılması konusunda tartışmalara yol açmıştır. O nedenle probiyotik yoğurtların florasında genelde *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* veya *L. paracasei* biovar *shirota*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* ve *B. longum*, ve son zamanlarda *B. lactis* gibi suşlar yer almaktadır [16], [23]. Ek olarak bazı ürünler *B. animalis* içermektedir, bu suş diğer *Bifidobacterium* türlerine göre sütte daha hızlı çoğaldığından üreticiler için çekicidir, ancak hiçbir zaman insan bağırsağından izole edilmemiştir. Belirli *in vitro* çalışmalar *B. animalis* suşlarının insan kaynaklı epitel hücrelere tutunabildiğini göstermiştir, yine de bu türlerin sağlığa faydalı etkileri olduğu iddia edilen ürünlerde kullanılması tartışmaya açıktır.

Bu grubun önemi, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un aksine tüm diğer türlerin insan bağırsağında doğal olarak bulunmasıdır, LAB'ler ince bağırsağın uç kısmında kolonize olur, *Bifidobacterium* ise kalın bağırsaktaki dominant gruplardan biridir. İnce bağırsakta, laktik asit bakterileri hem bağırsak lumeninde yer tutmakta hem de epitel hücrelerindeki belirli reseptörlere fiziksel olarak tutunmaktadır [24]. Örneğin; tutunan *Lactobacillus* suşları burada mikroflorayı oluşturacak, bağırsağın yüzey alanını işgal edecek,

besinleri alacak, laktik asit ve muhtemelen antimikrobiyel bileşikler salgılayacaktır [23]. Bu nedenle; LAB insan sağlığı açısından belirli bir dereceye kadar koruma sağlayabilmektedir. Ayrıca, LAB popülasyonu kalın bağırsağa ulaşan kalıntı şekerin (laktoz) olumsuz etkilerini de azaltabilmektedir.

İnce bağırsaktaki laktik asit bakterisi kolonizasyonunun bu iki etkisi iyice anlaşılmıştır. Aynı popülasyonun vücudun bağışıklık sistemini tetikleyebileceği, serum kolesterol seviyesini düşürebileceği ve bazı hastalık türlerine karşı koruma sağlayabileceği öne sürülmüştür [25]. Bu fikirleri destekleyen kanıtlar mevcuttur, ancak bu sonuçlar bireyler arasındaki değişikliklerin söz konusu etkilerin geçerliliği açısından kritik olduğunu söylemektedir [20].

Sonuç olarak yoğurtların ve/veya probiyotik yoğurtların sağlığa katkıları vardır ancak bulunan etkileriyle ilgili ifadelerde büyük itina gösterilmelidir. Çizelge 2.1’de laktik kültürlerin genel olarak geçerli kabul edilen etkileri gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Yoğurtla ilişkilendirilen sağlığa faydalı etkilerden bazıları ve bu etkilerin insanlar için geçerliliği [19]

Faaliyet/etki	İddia edilen sağlık faydası	İnsanlarda belirlenmesi
Sindirim sistemi üzerinde	<i>Helicobacter pylori</i> ’ye karşı etkili Artan laktoz sindirimi Bağırsak bağışıklığının tetiklenmesi Crohn hastalığının dengelenmesi Bağırsakta peristalsis hareketinin tetiklenmesi	✓
Bağırsak mikroflorası üzerinde	Mikrobiyel popülasyonlar arasındaki dengeyi iyileştirmesi Dışkı enzim aktivitesinde azalma Bağırsak yolunun kolonizasyonu <i>Salmonella</i> spp. için düşük taşıma süresi	Dışkı bifidobakterinden artış ✓ ✓
İshal üzerinde	Akut diyarenin önlenmesi/tedavisi Rotavirüs diyarenin önlenmesi/tedavisi Antibiyotiğe bağlı diyarenin önlenmesi	✓ ✓ ✓
Diğer etkiler	Hastalığa karşı gelişmiş bağışıklık Serum kolesterolunda azalma Hipertansiyonda azalma	

Bifidobakterler ve diğer probiyotikler kalınbağırsak lumenini işgal etmekte ve daha spesifik bir şekilde çok yüksek sayılarda duvarlarda kolonize olmaktadır. Bu bölgede besinleri almakta; laktik asit,asetik asit ve muhtemelen antimikrobiyal bileşikler salgılamaktadır. Dışkıdaki çürükçül bakterilerin çoğalmasının baskılanması faal bir LAB ve probiyotik LAB nüfusu varlığının diğer bir avantajıdır, ve bu baskılamanın kalın bağırsaktaki fermentasyon

sırasında kanserojen bileşiklerin serbest kalma riskini azalttığı öne sürülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, LAB ve probiyotik LAB bakterilerinin vücuda alınmış kimi toksik maddelerin (mikotoksinler, ağır metaller vb.) emilimini azalttığı ve biyosorbe ettiği böylece bu zararlı maddelerin dışkı ile atılmasına katkı sağladığına dair ciddi çalışmalar bulunmaktadır [5], [6], [26]–[28].

2.4. Ağır Metaller

Suda, farklı mikroorganizmalar (bakteriler, virüsler, parazitler) ve kimyasal bulaşanlar (ağır metaller, siyanotoksinler, pestisitler dezenfektan yan ürünler) bulunabilmektedir. İçme sularının büyük ölçekli kirlenmesi genellikle flor, arsenik, uranyum, selenyum, kurşun, nitrit ve nitrat gibi bulaşanlar nedeniyle yaşanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), içme suyuna bulaşabilen 160'un üzerinde mikrobiyal ve kimyasal bulaşandan söz etmektedir [29].

Cd, Pb ve arsenik, insana bağlı kaynaklardan çevreye bulaşmaktadır [11], [30]. Arsenik, yer altı sularına bulaşabilen doğal bir ağır metaldir. Arsenik, Cd ve Pb maddelerinin düşük dozlarda dahi ağız yoluyla kronik alımı, cilt, iç organlar ve sinir sistemi üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır [11].

Ağır metallerin sudan uzaklaştırılması için çöktürme, topaklaştırma, iyon değişimi ve filtrasyon gibi yöntemler uygulanmaktadır [6]. Metallerin çözünürlükleri ile ortam pH'sı arasında yakın bir ilişki vardır. Yüksek pH'larda metallerin çözünürlüğü düşer, metal hidroksit kompleksi oluşur ve çökelmeler meydana gelir. Kimi metallerin metal hidroksit çökeltileri oluşum pH değerleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Metal Hidroksit oluşumu için pH değerleri [1]

Metal	pH değeri
Kurşun	6.3
Kadmiyum	9.7
Bakır	7.1-7.3
Nikel	9.2-9.4
Çinko	8.3-8.5
Demir	4.3
Aluminyum	5.2
Kalay	1.0-4.5

İnaktive edilmiş algal, fungal ve bakteriyel biyokütleler kullanarak ağır metallerin uzaklaştırılması, özellikle son 20-25 yıllık dönemde geleneksel yöntemlere alternatif, düşük maliyetli bir yöntem olarak birçok araştırmada incelenmiştir [6], [31]–[34].

İnsan kaynaklı kirlilik hayvan ve insanlar üzerinde felaket anlamına gelen, yüksek seviyede metal seviyesine sahip yerel koşullara yol açabilir. Aslında insan ırkının dünyanın mineral kaynaklarını işletmesi ve teknolojik aktiviteler; kimyasal elementlerin topraktan çıkarılması, yerinden alınması ve dağıtılması anlamına gelmektedir.

Bu kimyasal elementler arasında özellikle son zamanlarda çevreye benzeri görülmemiş miktar ve konsantrasyonlarda ve aşırı yüksek hızlarda dağılan metalik elementler bulunmaktadır. Birçok metalik element canlı organizmaların işlevlerinde temel görevlere sahiptir; besinsel bir ihtiyaç teşkil ederler ve fizyolojik rolleri yerine getirirler. Buna karşın temel iz elementlerin fazla bulunma durumu ve özellikle temel olmayanlarla yer değiştirmeleri (mesela Cd, nikel, Pb veya gümüş) zehirlenme semptomları veya ölümle sonuçlanabilir. İnsanlar iz elementlerini gıda ve su yoluyla almaktadır. Gıda zincirindeki yeri doldurulamayan bir bağlantı olan bitki yaşamı da aynı zamanda hayvan yaşamını desteklemektedir. Metallerin özümsemesinin mikrobiyal dünya ve bitkilerde gerçekleştiği bilinen bir gerçektir ve bu elementler gıda zincirinde ilerledikçe daha konsantre bir hale gelmektedir. Zincirdeki dengesizlikler ve metal türlerinden birinin aşırı miktarda olması toksisite semptomlarına, hücresel fonksiyonlarda bozukluklara ve netice olarak ölüme yol açmaktadır [6], [12].

İz elementlerin alımı genelde yük ve iyonik yarıçapın oranı ile belirlenen iyonik potansiyeliyle ilişkilidir. Düşük iyonik potansiyele sahip Na^+ ve Ca^{+2} gibi elementler kolayca çözünür katyonlar oluşturmakta, öte yandan yüksek iyonik potansiyele sahip elementler (P^{-5} ve N^{-5}) çözünür olmayan hidrolizatlar oluşturmaktadır. Cd bitkiler yoluyla biriken toksik bir metaldir ve genelde endüstriyel atıklardan bulaşmaktadır. İyonik potansiyeli 2.0'dır. İyonik potansiyeli 5.9 olan berilyum kolayca çökebilmekte ve çevrede birikme eğilimi düşük olmaktadır. İyonik potansiyel grafiklerine bakarak bu maddelerin çevredeki göçünü tahmin etmek, birikimini ve insanlara vereceği olası zararı değerlendirmek mümkündür [12].

2.4.1. Kadmiyum

Kadmiyum (Cd, atom numarası 48) yumuşak, gümüşümsü mavimsi beyaz renkte bir ağır metaldir. Kimyasal özellikleri iki kararlı metal olan çinko (Zn) ve cıvaya (Hg) benzemektedir. Genellikle Cd^{+2} şeklinde (okside) ortamda bulunmaktadır. Doğal olarak

havada, suda, toprakta bulunur. Ancak bulunma düzeyi çevresel kirleticiler nedeniyle artan bir eğilim içersindedir [9].

Dünyanın farklı bölgelerinden bildirilen içme suyu ve doğal sularla ilgili raporlarında 0-3 µg/L'a kadar kadmiyum konsantrasyonları olduğu belirlenmiştir [11]. Cd konsantrasyonu yüksek sular genelde terkedilen ve faal durumdaki madenler ve metal dökümcülerin etrafında [11], özellikle demir bulunmayan metallerin üretildiği yerlerde belirlenmiştir [35], [36]. Tarımda kullanılan fosfat gübrelerinde de yüksek Cd konsantrasyonu görülebilmektedir. Toprak ve suyun asitlendirilmesi, toprağa ve çökeltilere bağlı kadmiyumun serbest kalmasına, sonrasında da bulaşıya yol açabilir. Çeşme suyu ve çeşme açıldığında ilk anda akan sularda (boruda beklemiş su), lehimli bağlantı ve çinko galvanizli tesisattan kaynaklanan yüksek Cd konsantrasyonları 57 µg/L'ye kadar ulaşabilmektedir [37]–[40]. Buna karşın çalışmalarda incelenen çoğu evde kabul edilebilir Cd seviyeleri belirlenmiştir; örneğin Almanya'da incelenen örneklerdeki Cd konsantrasyonlarının WHO talimat değeri olan 3 µg/L'yi yalnızca %0.7 oranında aştığı belirlenmiştir [39].

Cd doğal sularda 3 farklı şekilde bulunmaktadır: çözünmüş, asılı partiküllere bağlı ve çökelmiş halde. Cd'nin partikül maddesi için yüksek bir afinitesi vardır ve çökeltiler 100 mg/kg'ın üzerinde konsantrasyonlara sahip olabilir [41], [42]. Bunun bir sonucu olarak, çözünmüş organik madde konsantrasyonunun yüksek olması [43] ve düşük pH, çözünmüş Cd miktarını arttırabilse de, sulardaki çözünür Cd konsantrasyonu genelde düşüktür.

Kadmiyum akut toksisitesi nedeniyle Pb ve civa ile birlikte insanlara ve çevreye potansiyel tehlikesi en büyük olan ağır metallerin yer aldığı “büyük üçlüyü” oluşturmaktadır. Cd kirliliğini azaltmak için gelecekte çok daha büyük çalışmalara ihtiyaç duyulacaktır. Cd'nin endüstriyel kullanımı elektrolizle kaplama, boya pigmentleri, plastikler ve gümüş-kadmiyum piller alanında yaygındır ve gittikçe artmaktadır. Dünyanın yıllık Cd üretimi 20000 ton civarındadır. Cd'nin doğal sulara dökülmesi kısmen elektrolizle kaplama endüstrisinden kaynaklanmakta ve ABD'deki yıllık Cd tüketiminin yaklaşık %50'sine tekabül etmektedir [32].

Cd'ni son derecede toksik bir ağır metal olduğu kabul edilmektedir. Japonya'da “**Itai-Itai**” adıyla bilinen bir hastalık özellikle Cd zehirlenmesiyle ilişkilendirilmekte ve osteomalaziden kaynaklanan çok sayıda kırıkla sonuçlanmaktadır [44]. Kadmiyum insan vücudunda birikme eğilimindedir, birikimin %33'i böbreklerde %14'ü karaciğerde görülmektedir. Kronik Cd zehirlenmesi proteinüri üretmekte ve böbrek taşı oluşumuna yol açmaktadır. Cd ve hipertansiyon arasında bir bağlantı olduğu yönünde de kanıtlar vardır [9].

Beslenme yoluyla kadmiyuma maruz kalmanın böbrekler, karaciğer, kemik, periferik vasküler dokular, meme bezi, plasenta, protat, göğüs, pankreas ve kolonda olumsuz sağlık etkilerine yol açtığı belirlenmiştir [45].

Daha önce değinildiği gibi, Cd'nin asıl hedefi böbreklerdir ve vücuttaki Cd'nin yaklaşık olarak üçte biri böbrek korteksinde yer almaktadır. Böbrekteki Cd idrar ile çok yavaş salgılanmaktadır ve böbrekteki Cd'nin yarı ömrünün onyıllarla ifade edilebileceği bildirilmiştir [11]. Sonuç olarak Cd'ye ağız yoluyla kronik maruz kalmanın ilk olumsuz etkisi böbreklerde ortaya çıkmaktadır. Yüksek konsantrasyonlara maruz kalmak böbrek yetmezliğine dahi yol açabilir, ancak genelde proteinuri, kalsiüri, aminoasidüri, glukozüri ve tübüler doku ölümüne yol açan renal tübüler bozukluğu gözlenmektedir [46]. Olumsuz kemik etkileri, kemik yumuşaması, osteoporoz olumsuz böbrek etkileriyle kombinasyon halinde kronik Cd'ye maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir [47]. Kemikler üzerindeki olumsuz etkiler Cd'ye bağlı tübüler bozukluğun [48] ve böbrekteki vitamin D₃ öncüllerinin düşük faaliyetinin kandaki kalsiyum konsantrasyonunu arttırmak ve kemik desorpsiyonu suretiyle yol açtığı hiperkalsurinin bir sonucu olabilmektedir [49]. Genelde akciğer yoluyla, mesleki olarak yüksek konsantrasyonlarda Cd'ye maruz kalmanın akciğer kanserine yol açtığı belirlenmiştir [11]. Buna karşın beslenme yoluyla alınan Cd'nin kanser oluşumuna katkısı yalnızca hayvan çalışmaları ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir [50]. Hayvan çalışmaları aynı zamanda Cd'nin başta hipertansiyon olmak üzere olumsuz kalp damar etkilerindeki olası rolünü göstermiştir, ancak bu durum insan çalışmalarında onaylanmamıştır [11].

Ortak Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Örgütü Gıda Katkıları Uzman Komitesi (WHO/FAO) [51] Cd'nin böbrek toksisitesine dayanarak geçici tolere edilebilir haftalık alım düzeyini 7 µg Cd/kg vücut ağırlığı/hafta (PTWI) olarak belirlemiştir. Buna karşın yakın dönemdeki çalışmalar bu kılavuz değere çok yüksek olduğunu söyleyerek karşı çıkmıştır. Buradaki dayanak kısa zaman önce mevcut veriler üzerinde yapılan bir meta analizde yalnızca 3 µg Cd/kg vücut ağırlığı seviyesindeki bir maruz kalmada proteinürinin bir biyoişaretçisi olan beta-2-mikroglobulin konsantrasyonunun yükseldiğinin belirlenmesidir [9], [52].

2.4.2. Kurşun

Kurşun (Pb, atom numarası 82) yumuşak, kolayca şekil alabilen, düşük erime noktasına sahip, mavimsi-beyaz renkte (bekledikçe griye dönüşen) bir ağır metaldir. Genellikle Pb⁺² şeklinde (oksidi) ortamda bulunmaktadır.

WHO içme suyundaki kurşun konsantrasyonu için 10 µg/L sınır koymuştur [29]. Suların doğal Pb konsantrasyonu genelde düşüktür ve yer altı sularının <0.45—14 µg/L arka plan kurşun konsantrasyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir [53]. Buna karşın insan kaynaklı bulaşı daha yaygındır, metal madenleri ve izabe tesisi etrafında yüksek kurşun konsantrasyonları belirlenmiştir [36], [54], [55]. Endüstriyel emisyon, tarım ve arıtma çamurunun boşaltımına bağlı olarak daha küçük ölçekte bulaşlar da meydana gelmektedir. Kurşunsuz benzin kullanılmadan önce, kurşunlu benzinin kullanılması en önemli kurşun kirliliği kaynaklarından biriydi. Pb aynı zamanda eski tesisat sistemlerinin boru, lehim ve bağlantı parçalarından (%50'ye kadar kurşun içerebilen malzemeler) çeşme suyuna geçmektedir. Musluk suyunda 5.580 µg/L'a kadar çıkan kurşun konsantrasyonları belirlenmiştir [40], [56], [57]. Buna karşın söz konusu aşırı yüksek konsantrasyonlar nadir görülmektedir, ve bir Alman çalışmasına göre musluktan alınan ilk su örnekleri (beklemiş su) 10 µg/L'lık WHO kılavuz değerini yalnızca %7.7 oranında geçmiştir [39].

Cd gibi Pb de suda üç farklı şekilde bulunmaktadır: çözünmüş, asılı (süspanse) partiküllere bağlı ve çökelmiş halde. Kurşunun partikül halindeki maddeye yüksek bir ilgisi vardır ve bu nedenle büyük oranda asılı partikülat maddesine bağlı ve çökelti şeklinde bulunmaktadır, bu nedenle çözünen Pb miktarı azdır [58], [59]. Buna karşın kurşunun partikül maddelerine bağlanması kısmen de olsa tersinir bir süreçtir ve uygun koşullarda etraftaki suya geçebilir [60]. Çözünen kurşun miktarı çözünmüş organik maddenin yüksek olması gibi bazı etkenler [43] ve düşük pH nedeniyle artmaktadır.

Belki de arsenik dahil hiçbir metalin toksikolojisi Pb'ninki kadar çalışılmamıştır. Kurşun zehirlenmesi aslında Roma İmparatorluğu'nun çöküşü ile dahi ilişkilendirilmektedir. Roma döneminde yaşamış insanların kemiklerinde bulunan yüksek kurşun içeriği; şarap ve diğer içecekler için kullanılan Pb kapların kullanımı, Pb su boruları kullanımı ve toprak kapların Pb içeren seramikle sırlanması sebebiyle Pb kapları satın alması daha kolay olan yönetici sınıfının büyük bir kısmının ölmesi hipotezini desteklemektedir. Çocuklarda Pb zehirlenmesi modern sırlanmış seramikler ve eski boyaların pigmentleri ile ilişkilendirilmiştir. En güncel acil sorun motorlu araç egzozlarındaki kurşun emisyonlarının kontrolüdür [12].

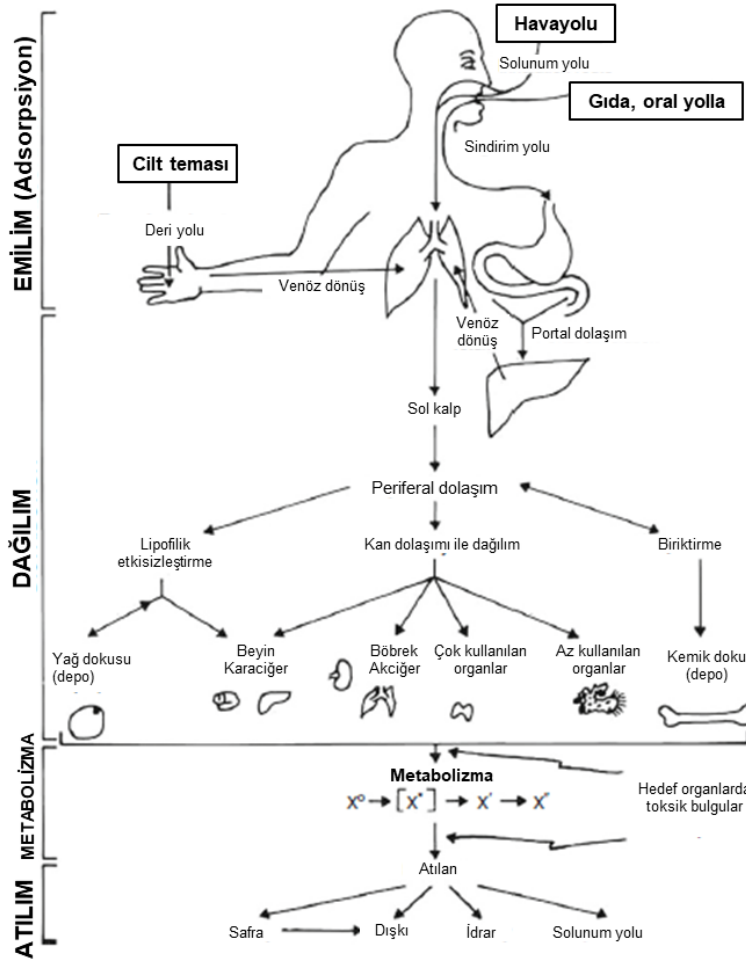
Sonuçları tartışmalı olmasına rağmen, çevredeki Pb birikiminin ortaya çıkması, kuzey Grönland'daki eski kar tabakalarının analizi ile olmuştur. Bu tabakalarda Sanayi Devrimi'nin (1750'den itibaren) başından itibaren kademeli olarak artan ve 1930'lardan itibaren büyük bir logaritmik artış gösteren kurşun miktarı belirlenmiştir. Otoban trafiğinden

kaynaklanan yüksek kurşun miktarı yoldan itibaren 80 metrelik bir mesafeye kadar izlenebilmektedir [61]. Havadaki Pb nedeniyle okyanus sularının yüzeyleri hatırı sayılır derecede kirlenmektedir.

Madencilik faaliyetlerinden kaynaklanan kurşun kirliliği nispeten yerel bir sorun teşkil etse de büyüklük açısından önemlidir. Döküm işlemlerinin yarattığı kirlilik uzun zamandır bilinmektedir. Birincil dökümcüler madenleri işler, büyük ve sayıca küçüktür; buna karşın ikincil dökümcüler eski pil, kablo kaplaması vs. hurdaları işler ve ağır metal kirliliğinin daha dağınık kaynağını teşkil eder.

Kurşunun toksikolojisi yaygın bir şekilde çalışılmıştır. İnorganik kurşun (Pb^{+2}) genel bir metabolik zehirdir ve diğer ağır metallerin çoğu gibi enzim inhibitörüdür. TEL (tetra etil kurşun) veya TML (tetra metil kurşun) olarak organik kurşun, inorganik kurşundan daha zehirlidir. Kurşun zehirlenmesinin ilk semptomlarının fiziksel olduğu görülmektedir (heyecan, depresyon ve sinirlilik). Küçük çocuklar özellikle etkilenmekte, zihin geriliği ve uzun dönemli beyin hasarı gibi sorunlar görülebilmektedir. İnorganik Pb'nin en sinsi etkilerinden biri kemiklerdeki kalsiyumun yerine geçebilmesi ve ilk baştaki soğrulmadan sonra uzun bir süre boyunca burada geçici bir birikim oluşturmaktır. İnsanlardaki inorganik Pb zehirlenmesinin derecesinin göstergesi kandaki kurşun seviyesidir. Farklı uzmanlar 0.2-0.8 ppm aralığındaki seviyeleri güvenli olarak değerlendirmektedir [12].

Yetişkinlerin vücudunda bulunan kurşunun yaklaşık olarak %90'ı kemiklerde ve dişlerde yer alır. Aynı değer çocuklarda %70'tir. Pb çocuklardaki yüksek hareketliliğinin sebebi olan sürekli büyüme ve salım/tekrar oluşturma, çocukları kurşunun olumsuz etkilerine karşı daha duyarlı hale getirmektedir. Pb HEM (kanın kırmızı pigmenti hemoglobinin bileşenleri) sentezinde yer alan enzimatik süreçleri etkilemektedir [62] ve Pb'nin kandaki konsantrasyonunu yüksek olması hemoglobin sentezi ve kırmızı hücre miktarının düşük olmasıyla [63], en kötü durumda ise anemiyle ilişkilendirilmiştir [11]. Cd gibi, kurşunun kandaki konsantrasyonunun yüksek olması küçük moleküler proteinlerin üriner boşaltımıyla kendini gösteren böbrek bozukluğu ile ilişkilidir [64]. Erken çocuklukta çevresel olarak Pb maruz kalmak, zihinsel tahribat ile ilişkilendirilmektedir [65]. Kandaki Pb konsantrasyonunun 10 $\mu\text{g/dL}$ 'den 30 $\mu\text{g/dL}$ 'a çıkmasının zeka düzeyinde (IQ) yaklaşık 1-4 puanlık düşüşe yol açtığı belirlenmiştir [66]. Bir grup araştırmacı kandaki kurşun miktarı 1 $\mu\text{g/dL}$ 'den 10 $\mu\text{g/dL}$ çıktığında IQ'da benzer bir düşüş olduğunu belirlemiştir [65]. Şekil 2.4'de ağır metallerin vücut sıvısındaki konsantrasyonuna bağlı olarak etkileri şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.4.Toksikantların (Ağır metelelerin) vücuda girişi, dağılımı, metabolizma ve atılımyolları [67]

2.5. Biyosorbentler ve Biyosorpsiyon

Bazı metallerin artan değerinin yanında çevreye bırakılan toksik metallerin ekolojik etkileriyle ilgili artan farkındalığa bağlı olarak, metal geri kazanımı ve çözeltilerden metal uzaklaştırılması gibi amaçlarla metal toplama çalışmaları yapılmaktadır. *Günümüzde bu amaçlara ilave sağlık faydaları sağlayan fonksiyonel gıdalar üretmek de eklenmiştir.* Metalleri uzaklaştırmada kullanılan geleneksel yöntemler arasında kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon veya redüksiyon, iyon değişimi, filtreleme, elektrokimyasal uygulama, membran teknolojileri ve evaporasyon geri kazanımı vardır [6], [68].

Alternatif metal uzaklaştırma ve/veya geri kazanım metotlarından birisi de biyolojik kaynaklı bazı doğal malzemelerin kullanılmasıdır. Birçok biyolojik material, özellikle bakteriler, algler ve mayalar ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilmektedir. Son yıllarda bununla ilgili birçok çalışma yapılmış olup bu biyolojik materyallerin düşük

maaliyetleri ile uygulanabilir olması bunlara duyulan ilgiyi artırmaktadır. **Biyosorbent** olarak ifade edilen bu biyolojik materyaller, diğer adsorbanlardan (iyon değişim reçineleri gibi) farklı olarak birçok fonksiyonel gruba sahiptir. Bu fonksiyonel gruplar; karboksil, imidazole, sülfidril, amino, fosfat, sülfat, tioeter, fenol, karbonil, amide ve hidroksil kısımlarında oluşan kompleks yapılardır [6]. **Biyosorbentler** ucuz olmakla birlikte özellikle sıvı ortamlarda metalik kalıntıların uzaklaştırılmasında çok etkilidirler.

Bu biyosorbentler yada mikrobiyel biyokütleler “pasif” sorpsiyon ve/veya kompleks oluşturma yoluyla yüksek miktarda metal iyonunu tutabilir. Bu olayın adı **biyosorpsiyondur** ve enerji gerektirmemektedir.

Bu noktada metalik türlerin belirli mikroorganizma tipleri ve onların ürünleri tarafından tutulması ve konsantrasyonu ile ilgili uygun terminolojinin kullanımı önemlidir. Biyolojik materyaller tarafından metal bağlanmasının aktif modeli genelde **biyobağlama** olarak isimlendirilmektedir. Bu amaçla canlı veya ölü biyokütleler, polisakkaritler gibi hücrel ürünler bu amaçla kullanılabilir.

Metallerin uzaklaştırılmasında birçok material **biyosorbent** olarak araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan veya test edilen biosorbentler bazı katagorilere ayrılmıştır. Bunlar; **bakteriler** (LAB, *Basillus subtilis* vb), küf mantarları (*Rhizopus arrhizus* vb), mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* vb), algler, ve diğer polisakkarit yapıdaki materyaller olarak sıralanabilmektedir [6], [69].

Mikrobiyel biyosorbentlerin ağır metalleri bağlamak için kullanılması fikri 30-40 yıl önce alışılmış su arıtma yöntemleri için daha ekonomik ve etkili alternatifler araştırılırken keşfedilmiştir. Kullanışlılığı belirlendikten sonra metallerin biyosorpsiyonu kıymetli metallerin zenginleştirilmesi gibi suyun arıtılması dışındaki alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır. Son birkaç on yıllık dönemler boyunca bakteri, küf ve alg dahil olmak üzere çeşitli biyosorbentlerle birtakım metallerin biyosorpsiyonu (örneğin Al, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Th, U, Zn) çalışılmıştır [14], [31], [70]

Cd ve Pb'nin algal, fungal ve bakteriyel biyokütleler tarafından uzaklaştırılması, uzaklaştırmanın büyük bir kısmının metal çözeltisi ve biyokütlenin temas ettiği ilk birkaç dakikada gerçekleştiği hızlı bir işlemdir [11]. Uzaklaştırma pH'dan etkilenir ve genelde pH 2-3'ün altında çok düşük uzaklaştırma görülürken pH 3'ün üzerinde uzaklaştırmada keskin bir artış görülür ve en yüksek uzaklaştırma genellikle pH 4-6'da gözlenir. pH'nın etkisi negatif yüklü bağlama konumları için katyonik metaller ve protonlar arasındaki rekabetin

sonucudur. Diğer katyonik metaller ve bu rekabete katılabilir ve Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} and Al^{+3} dahil olmak üzere birtakım metallerin Cd ve Pb'nin uzaklaştırılmasını **azalttığı** belirlenmiştir [11], [34], [56].

Bu tez kapsamında bakteriler (özellikle LAB) esas olarak ele alındığı için biosorbent olarak bu bakterilere ağırlıklı olarak değinilmiştir. Gıdalarla alınan mikrobiyota, özellikle bağırsak mikrobiyotası, büyük ölçüde metallerle ve diğer kontaminantlar ile temas halindedir. Daha önce de bahsedildiği gibi insan vücudunda metal absorpsiyonu bağırsakta başlamaktadır. Bu nedenle, bağırsak mikroflorası ve özellikle probiyotikler, gıda ile alınan ağır metaller ile etkileşime girerek bunların absorpsiyonunun engellenmesinde önemlidir [9].

Gram-negatif bakteriler için lipopolisakkaritler, Gram-pozitif bakteriler içinse (lipo)teikoik asitlerle birlikte peptidoglikan karakteristiktir (bu konuda detaylı bilgi **bölüm 2.2**'de verilmiştir) [6]. Metal bağlamadan sorumlu fonksiyonel grupların konsantrasyonları biyokütleler arasında değişiklik gösterebilmektedir. Ek olarak farklı fonksiyonel grupların belirli metallerle yönelik afiniteleri farklıdır. Bu da farklı biyokütlelerin uzaklaştırma kapasitelerinin değişik olmasına neden olmaktadır [11].

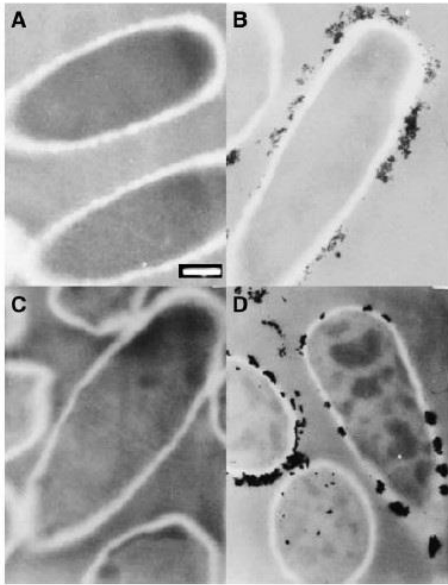
Bakterilerin metal bağlamasında mikro çökeltme yaygın şekilde görülmektedir ancak hücre dışı maddeler veya hücre duvarında azot (N) veya oksijen (O) ligandlarının kompleks oluşturması ve bunun yanında hücre duvarındaki yüklü gruplara elektrostatik çekim de görülebilir. Mikro çökeltme sıklıkla çekirdekleşme noktaları sağlayan belirli konumlara bağlanmadan sonra görülmektedir. Gram-pozitif yapının Gram-negatife kıyasla daha yüksek metal bağlama kapasitesinin nedeni gram pozitif bakteri daha kalın bir peptidoglikan tabakaya sahip olmasıdır [6].

Literatürde, LAB kullanılarak ağır metallerin uzaklaştırılmasına dair birçok araştırma bulunmaktadır. Topcu ve Bulat [5], yaptıkları çalışmada gıdalarda sık rastlanan Cd ve Pb'nin *E.faecium* EF031 ve M74 suşları tarafından detoksifiye edildiğini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada, ortam pH'sının 5 olduğu 48 saatlik inkübasyon periyodu boyunca EF031 suşunun Cd'yi %77.3 ve %98.1 arasında, Pb'yi %66.9 ve %98.9 arasında uzaklaştırdığı, M74 suşunun ise Cd'yi %53.5 ve %91 arasında, Pb'yi %42.9 ve %93.1 arasında uzaklaştırdığını bildirmişlerdir.

Haltunen ve ark. [71] yaptıkları çalışmada, *L. rhamnosus* GG (LGG), *L. rhamnosus* LC-705 ve *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* JS kullanılmıştır. LGG ve PJS suşlarının hem canlı hem ısıl işlem görmüş formlarının, toksinleri sıvı ortamdan

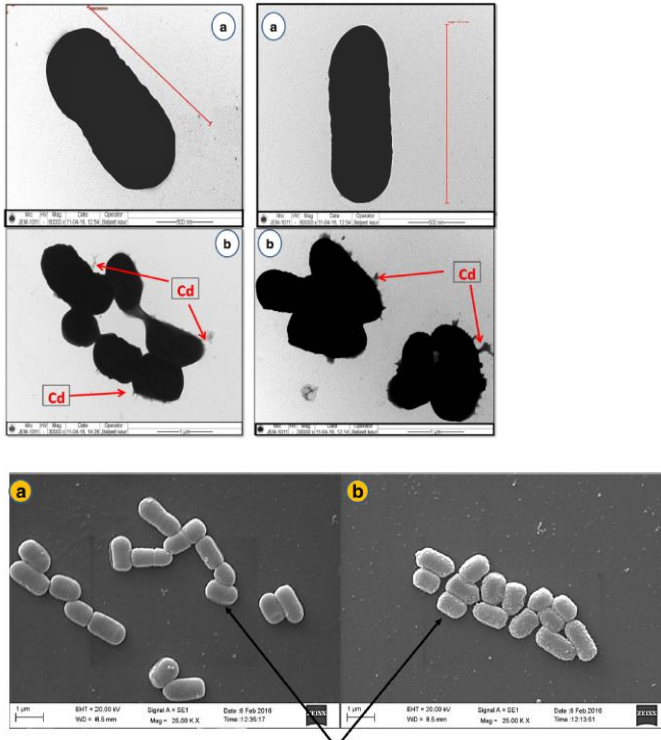
uzaklaştırmada, LC-705 suşundan daha etkili olduğu belirlenip, uzaklaştırma mekanizması bağlama olarak varsayılmıştır. *Lactobacillus*'larda bağlanmayı, hücre duvarındaki polisakkarit ve peptidoglikan sağlamakta olduğu gözlenmiştir. *L.rhamnosus* LC-705 (LC705) ve *P. freundenreichii* subsp. *shermanii* JS suşları kullanılarak yapılan çalışmada,metallerin uzaklaştırılmasında bu bakteriler için pH'nın optimum olduğu değerlerin 2.9-3.9 olduğu sonucuna varılmıştır [72]

Yapılan bir diğer çalışmada, LAB ve bifidobakter tarafından Cd ve Pb'nin yüzeye bağlanma özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada *L.fermentum* ME3 and *B.longum* 46 suşları kullanılmıştır. Ortamda bulunan diğer katyonik metallerin (Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2}) bulunması, karboksil ve fosforil grupların bloke edilmesi Pb ve Cd bağlanmasını azaltmaktadır. Bu sonuç bağlanmada elektrostatik ve iyonik etkileşimlerin önemli olduğunu göstermektedir. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntülerinde de bakteri yüzeyinde metalik kurşun çökeltilerinin olduğu ve bağlamanın bakteri yüzeyinde olduğu not edilmiştir (Şekil 2.5). Ancak Cd'ye ait benzer bir görüntü elde edilememiştir [73].



Şekil 2.5. Liyofilize *B. longum* 46 ve *L. fermentum* ME3'ün kurşun bağlamadan önce ve sonraki geçirimli elektron mikroskobu (TEM) mikrografları. Bağlama sonrasında her iki türün de yüzeyinde büyük kurşun çökeltileri görünürken (B ve D), kontrol mikrograflarında (A ve C) kurşun görünmemektedir [73]

Kumar ve ark. yaptıkları çalışmada *in vitro* model sistemde LAB'nin Cd bağlama özelliklerini incelemişlerdir. Sonuçta %24-41 arasında Cd bağlanma olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada TEM görüntüsünü aşağıdaki şekilde vermişlerdir [74].



Şekil 2.6. Probiyotik *L. plantarum* HD 48 'ün kadmiyum bağlamadan önce (a) ve sonraki (b) geçirimli elektron mikroskobu (TEM) mikrografları (soldaki resim). Aynı bakterinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (a: bisorpsiyon öncesi, b:bisorpsiyon sonrası) [9], [74].

Bakteriler, yaygın olarak bulunması, küçük yapıları, kontrollü şartlarda çoğaltılabilmeleri nedeniyle uygun biosorbentler olarak ön plana çıkmaktadır. Bununla beraber, biosorpsiyon kapasiteleri türler ve/veya cinsler arasında farklılık göstermektedir. Bunun nedeni biosorbsiyonda aktif olarak yer alan fonksiyonel gruplarındaki farklılıklarıdır.

2.5.1. Bağlanmada Etkili Fonksiyonel Gruplar

Hidroksil, karbonil, karboksil, sülfidril, tioeter, sülfonat, amin, imin, amid, imidazol, fosfonat, fosfodiester grupları içeren alg, bakteri veya biyopolimerlerin çeşitli kimyasal gruplarının biyosorpsiyon metal bağlamaya katkıda bulunduğu öne sürülmüştür. Herhangi bir grubun, belirli bir metalin biyosorpsiyonu için önemli olup olmaması aşağıdaki etmenlere dayanmaktadır:

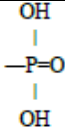
- Biosorbentteki konumların miktarı
- Konumların erişilebilirliği
- Konumların kimyasal durumu, örneğin uygunluğu
- Konum ve metal arasındaki ilgi, örneğin bağlanma kuvveti

Bir konumun metal tarafından ne derecede kullanılabileceği, konumu halihazırda işgal eden metale kıyasla, söz konusu metalin bağlanma kuvvetine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Bir konum yalnızca halihazırda iyonlaşmışsa elektrostatik metal bağlama için uygundur.

Biyosorpsiyondaki ana bağlama konumları asidiktir. Birçok grup (hidroksil, karboksil, sülfidril, sülfonat, fosfonat) protonlandığında nötrdür ve deprotonlandığında negatif yüklüdür. Çözeltinin pH değeri onların pKa'sını aştığında, gruplar çoğunlukla katyonların çekimi için uygun hale gelmektedir. Öte yandan amin, imin, amid, imidazole grupları deprotonlandığında nötrdür, protonlandığında ise pozitif yüklüdür. Bu nedenle pH düştüğünde ve gruplar protonlandığında anyonları çekmektedirler. Bağlama gruplarının yapısal formülleri ve pKa değerleri Çizelge 2.3'de verilmiştir. pH 3.0-10.0 arası mikroorganizma hücresi yüzey yükü genellikle ve ağırlıklı olarak negatiftir. pH 3.0'ün altında ise pozitif olurlar.

Biyosorbentler, çok sayıda farklı molekülden oluşan farklı yapı taşları bloklarının birtakım bağlanma konumları olduğu, son derecede karmaşık bir yapıdaki farklı hücre tiplerinden oluşmaktadır. Ayrıca, bir bağlanma konumu dahi farklı bağlanma mekanizmaları gösterebilmektedir; örneğin karboksil grupları, metal katyonların hem kompleks oluşturmasını hem de elektrostatik bağlanmasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda genellikle birkaç mekanizma kombinasyon halinde etki göstermektedir. Mekanizma aynı zamanda pH gibi dış etkenlerle de değişmektedir. Toplam metal bağlama mekanizmaları için iyon değişimi, elektriksel olarak nötr maddenin (çözünabilir metal ligand kompleksleri) belirli bağlanma konumlarına sorpsiyonu ve mikro çökeltme arasında ayırım yapılmaktadır. Bu ana mekanizmalar kovalent, elektrostatik ve van der Waals kuvvetlerinin kombinasyonuna bağlı olan sorbat/sorbent veya çözünen/çözücü etkileşimlerine dayanmaktadır. Bağlanan belirli metal miktarı yalnızca verilen biyosorbente değil aynı zamanda metal iyonunun tipine, konsantrasyonuna ve çözelti sıcaklığı, pH, iyonik kuvvet ve mevcut diğer metallerin iyon girişi gibi diğer fizikokimyasal etkenlere bağlıdır [75]. Örneğin yüksek pH değerlerinde metallerin çözünürlüğü azalmakta ve metal iyonları çökelmekte, bu da sorpsiyonu güçleştirmektedir. Bağlanma bölgelerinin aktivite düzeyleri pH ayarlanmalarıyla modifiye edilebilmektedir. Bakteriyal biyosorpsiyon için ideal pH aralığı pH 3.0 ve 6.0 aralığındadır [1], [6], [31], [69].

Çizelge 2.3. Biyosorpsiyonda görev alan temel bağlama grupları [1], [6], [75]

Bağlama grubu	Yapısal formül	pK _a	Ligand atomu	Seçilen biyomoleküllerde görülmesi
Hidroksil	- OH	9.5 – 13	O	PS, UA, SPS, AA
Karbonil (keton)	C=O	-	O	peptit bağı
Karboksil	- COOH , - C=O OH	1.7 – 4.7	O	UA, AA
Sülfidril (tiol)	- SH	8.3 – 10.8	S	AA
Sülfonat	- SO ₃ , O - S=O O	1.3	O	SPS
Tiyoeter	- S	-	S	AA
Amin	- NH ₂	8 – 11	N	Cto, AA
İkincil Amin	- NH	13	N	Cti, PG
Amid	- C=O NH ₂	-	N	peptit bağı AA
İmin	= NH	11.6 – 12.6	N	AA
İmizdazol		6.0	N	AA
Fosfonat		0.9 – 2.1	O	PL
Fosfodiester		1.5	O	TA, LPS

PS = Polisakkaritler, UA = Üronik asitler, SPS = Sülfatlanmış PS Cto = Kitozan, PG = PeptidoGlikan, AA = Amino Asitler, TA = Teikoik Asitler, PL = Fosfolipitler, LPS = LipoPS, O= Oksijen, S= Kükürt, N= Azot

2.5.2. Bağlanmada Sıcaklık Etkisi

Biyobirikim prosesinden farklı olarak, biosorpsiyon olayı 20-30 °C'ler arası sıcaklık değişimlerinden etkilenmemektedir. Bununla beraber yüksek sıcaklıklara çıkılması, örneğin, 40 °C'ye çıkması bağlamada çok az bir artışa, 50-60 °C'ye çıkması ise sorbent yapısında değişikliğe ve malzeme bozulmasına neden olduğundan, sorpsiyon kapasitesinin azalmasına yol açmaktadır [1], [76].

Sıcaklığın biyosorpsiyon üzerindeki etkisi adsorpsiyon ısısına (entalpi değişimi) bağlıdır [77]. Fiziksel adsorpsiyon için, adsorpsiyon ısısı $\Delta H^0 < 0$ olduğunda adsorpsiyon reaksiyonu **ekzotermiktir** ve düşük sıcaklıklarda önceliklidir. Kimyasal tutunma (kemisorpsiyon) için adsorpsiyon reaksiyonu **endotermiktir** ve yüksek sıcaklıklarda önceliklidir. Örneğin, Cu (bakır) bağlanması reaksiyonu denge sabiti sıcaklıkla arttığından pozitif entalpi değişimi göstermektedir (endotermik). Pratik biyosorpsiyon uygulamaları için dar bir sıcaklık aralığı beklenebilir. Bu aralıkta sıcaklığın etkisi diğer etki eden faktörlere kıyasla kısıtlıdır [78].

2.5.3. Bağlanmada pH Etkisi

Biyosorpsiyon prosesinde pH en önemli parametredir. Biosorpsiyon, iyon değişim kromatografisine benzemektedir. Biyosorbentler iyon değişim materyali gibi davranmaktadır. Bunun nedeni yapılarında birçok zayıf asidik ve bazik grubun yer almasıdır. Genellikle, ağır metallerin uzaklaştırılması pH'nın 6.0 dan 2.5'a düşmesiyle azalmaktadır. Bu nedenle çalışmalarda optimum pH düzeyinin bilinmesi son derece önemlidir. Ayrıca, çözeltideki metallerin türlerinin de bilinmesi pH seçiminde önemlidir. pH metal biyosorpsiyonunu 3 şekilde etkilemektedir;

- Kimyasal olarak aktif konumların durumu çözelti pH'sı tarafından değiştirilebilmektedir. Metal bağlayan gruplar zayıf asidik veya bazik olduğunda, serbest konumların uygunluğu pH'ya bağlı olmaktadır.
- Rejenerasyon (desorpsiyon) için kullanılan aşırı düşük pH değerleri biyosorbent malzemesinin yapısına zarar verebilir. Hücrelerin biçiminin bozulması mikroskop altına gözlenmiş ve biyokütlede önemli ağırlık kaybı ve sorpsiyonik kapasitesinde azalma meydana gelmiştir.
- Başta yüksek yüklü ve düşük boyutlu metal anyonları olmak üzere, sulu çözeltideki metaller pH düşük olduğunda hidrolize iyonlar haline geldiğinden çözeltideki metallerin çeşitlenmesi pH'ya bağlıdır [75].

2.5.4. Bağlanmada İyonik Kuvvet Etkisi

Yüksek iyonik kuvvet artan elektrostatik yük neticesinde biyosorpsiyonu baskılamaktadır [69]. Aynı zamanda iyonik kuvvetin adsorpsiyon üzerindeki etkisinin metalin bağlanma şekliyle ilişkili olduğu belirlenmiştir.

2.5.5. Bağlanmada Diğer Anyonların Mevcudiyeti

Çözeltide bulunan sorbe edilebilir durumdaki diğer iyonlar ilgilenilen metallerle sorpsiyon konumları için rekabet edebilirler. Bu durumda birincil metal iyonunun bağlanması azalmaktadır. Örneğin ortamda bulunan klorid iyonu bazı metal iyonları ile kompleks oluşturarak sorpsiyon prosesini etkileyebilir.

2.5.6. Bağlanmada Diğer Etkenler

Biosorbent miktarı ve boyutu, karıştırma hızı, çözünen konsantrasyonu biyosorpsiyonu etkileyen parametrelerdir. Bakteri konsantrasyonu arttıkça hücreler arası elektrostatik etkileşimler bağlanma miktarını azaltabilmektedir. Biosorbentlerin hücre boyutu da bağlanmada önemlidir. Boyut ne kadar küçük olursa bağlanma miktarı artan yüzey alanına bağlı olarak artmaktadır. Başlangıç madde konsantrasyonu da biyosorpsiyonda önemlidir. Başlangıç konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa o derece fazla metal adsorpsiyonu gerçekleşecektir [1], [69].

2.6. Biyosorpsiyon İzotermeleri

Biyosorpsiyon işleminde katı bir faz (biyosorbent) ve sorbe edilecek çözünmüş bir madde (sorbant, örneğin metal iyonları) içeren sıvı bir faz (solvent, normalde su) yer alır. Biyosorbentin sorbat türlerine olan yüksek ilgisi nedeniyle sorbat katıya doğru çekilmekte ve burada farklı mekanizmalar yoluyla bağlanmaktadır. Bu işlem katıya bağlanmış sorbat türü ve çözücüde kalan kısmı (kalan, final veya denge konsantrasyonu C_f) arasında bir denge kurulana kadar devam etmektedir. Biyosorbentin sorbata olan ‘afinitesi’ (çekimi) katı ve sıvı fazlar arasındaki dağılımını etkilemektedir.

Biyosorbent malzemesinin kalitesi metal iyonlarını bağlama şekli ve tutabileceği miktar ile belirlenmektedir. Bu amaçla genelde biyosorbentin metal alımı (q) birim katı faz tarafından bağlanan sorbat miktarı (ağırlıkça, hacimce, vs.) olarak belirlenmektedir.

Metal alımı [mg Metal/g biyosorbent] hesaplaması sorpsiyon sisteminin kütle dengesi temeline dayanmaktadır.

Buna bağı olarak, çözeltiden eksilen ve sorbent tarafından bağlanan metal miktarı sorbent sistemindeki kütle dengesi temelinde hesaplanabilir. Aşağıdaki formülde ortamdan uzaklaştırılan metal konsntrasyonunun hesaplanması için kullanılan eşitlik verilmiştir [69].

Alım (katı fazdaki sorbat) aşağıdaki farka eşit olacaktır:

$$q = V \times (C_i - C_f) / S$$

q bağlanan metal konsantrasyonu (mg/g)

V metal içeren, sorbent ile temas halinde olan çözeltinin hacmi (L)

C_i ve **C_f** sırayla çözeltideki metalin başlangıç ve final(kalıntı) konsantrasyonudur. Analitik olarak belirlenmeleri gerekir (mg/L)

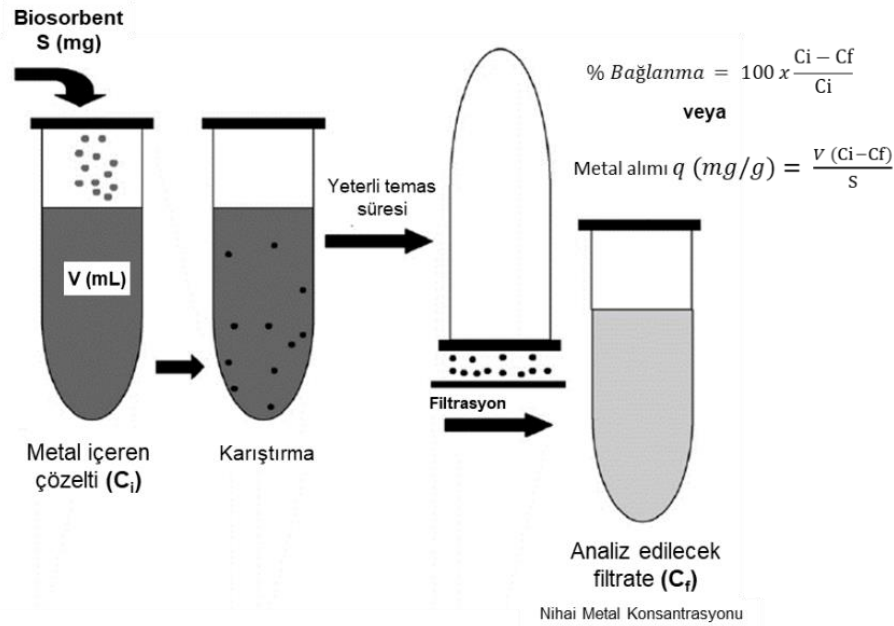
S eklenen (biyo)sorbentin miktardır (g).

Sorpsiyon alım **q**, uygulamanın amacına göre farklı birimlerde de ifade edilebilir (mg/g, mg/L, mmol/g, meq/g).

mmol/g = Sorpsiyon Alımı (mg/g) / Moleküler (Atomik) Ağırlık

meq/g = Sorpsiyon Alımı (mmol/g) / İyon Değer

Bu birimlerin tamamı göreceli olarak kendi içinde değiştirilebilir. Ortaya çıkan tek problem sorbent ağırlık-hacim dönüşümlerindedir. Bilimsel yorumlar için sorbent malzemesi kuru ağırlık esasında tercih edilmektedir.



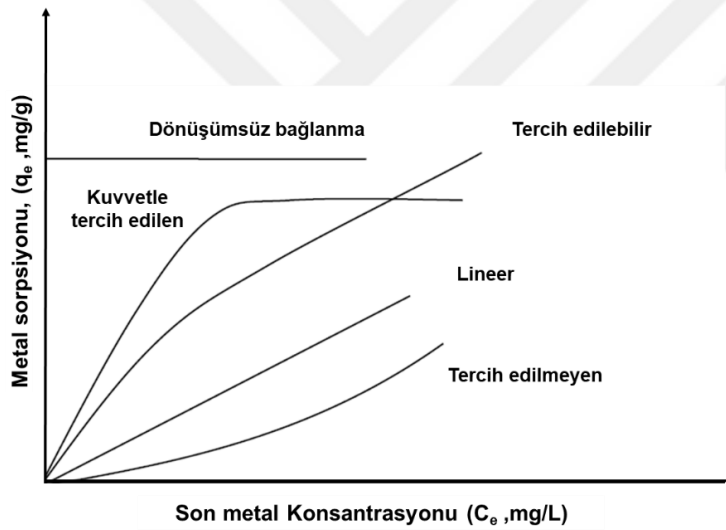
Şekil 2.7. Sorbat alımı kütle dengesi ile hesaplanır [69]

2.6.1. Basit Biyosorpsiyon Modelleri

Sorpsiyon işlemi **ekzotermik** olma eğiliminde olduğundan ve sorpsiyon performansı sıcaklıkla değişebildiğinden sorpsiyon süresinde sabit sıcaklık sağlanması temel bir gereksinimdir. Sorpsiyon izotermi sorpsiyon alımı (q) ve çözeltide kalan sorbatın son denge konsantrasyonu (C_f) arasındaki grafiklerdir. Bu basit ilişki kısmen farklı şekillerde ifade edilebilmektedir.

Biyosorpsiyon diğer fiziksel adsorpsiyon reaksiyonları gibi mutlaka ekzotermik bir şekilde gerçekleşmez. Biyosorpsiyon uygulamalarındaki sıcaklık aralığı göreceli olarak dardır, kabaca 10 – 70 °C arasındadır [75]. Ancak LAB için bu değer 4-40 °C aralığındadır.

Biyosorpsiyon genellikle **izoterm** yolu ile ifade edilmektedir. C_f ve q sorpsiyon izoterm ilişkisi aynı zamanda matematiksel olarak ifade edilebilir. Çeşitli adsorpsiyon izotermi Çizelge 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.8. Adsorpsiyon izotermi [1]

Bu konuda ilk çalışmalar 1900'lü yıllarda, aktif karbon adsorpsiyonu ile ilgilenen Langmuir ve Freundlich'in çalışmalarında yapılmıştır. **Langmuir** izotermi hiperbolik şekildedir. Biyosorpsiyon modellerinde en sık kullanılan denklemdir.

$$\text{Langmuir: } q = q_{max} \frac{b C_f}{1 + b C_f}$$

Langmuir bağıntısı ($1/q$)'ya karşı ($1/C_f$) veya (C_f/q)'ya karşı C_f grafikleriyle lineerleştirilebilir.

Burada q_{max} belirli koşullar altındaki en yüksek sorbat alımını; örneğin (mg/g)

b ise sorbent ve sorbat arasındaki ilgiyle (afinite) ilişkili katsayı ifade etmektedir.

Langmuir'in **Scatchard** lineerleştirilmesi ise şu şekildedir:

$$(q/C_f) = b q_{max} - b q$$

Langmuir izotermi 1918 yılında Langmuir tarafından ortaya konan eski bir yaklaşımdır. Bu izoterm kimyasal bir fenomen olarak değerlendirmektedir [79]. İlk kez teorik olarak gazların katı yüzeylere adsorpsiyonunda incelenmiştir. Langmuir sabiti $b = 1 / K$ Arrhenius denklemi yoluyla adsorpsiyon enerjisiyle ilişkilidir. Büyük b ve küçük K değerleri sorbentin sorbat için daha yüksek ilgisi anlamına gelmektedir. q_{max} biyosorpsiyon için uygun durumda olan bağlanma konumlarının toplam sayısı, q ise C_f konsantrasyonunda sorbat tarafından işgal edilen bağlanma konumlarının sayısı olarak düşünülebilir.

Langmuir modeli sorpsiyonun mekanistik yönlerini aydınlatmasa da, alım kapasiteleriyle ilgili bilgi sağlamakta ve olağan sorpsiyon işlemi davranışını yansıtabilmektedir. Langmuir kimyasal olarak doygun olmayan yüzey atomları (toplam bağlanan konumu sayısı) tarafından uygulanan kuvvetlerin sorbe edilen tek molekülün çapının ötesine ulaşmadığını ve bu nedenle sorpsiyonun tek yüzeyle kısıtlı olduğunu varsaymıştır [75]. Temel olarak aşağıdaki varsayımlar yapılmaktadır:

- i) Sabit sayıdaki adsorpsiyon konumları, adsorbentlerin yüzeyleri üniformdur
- ii) Sorbe edilen türler arasında etkileşim yoktur
- iii) Tüm adsorpsiyon aynı mekanizma ile gerçekleşir
- iv) Bir sorbat molekülü bir aktif konum ile tepkimeye girmektedir

Kısıtlamalar ve sınırlamaların ayrımı açık bir şekilde yapıldığı sürece Langmuir denklemi farklı sorbat-sorbent sistemleri veya herhangi bir sistemdeki değişken koşulların denge koşullarını tanımlamak için kullanılabilir.

Bir diğer denklem olan **Freundlich** izotermi ilişkisi üsteldir:

$$q = k C_f^{(1/n)}$$

şeklindeki Freundlich izoterminde k ve n Freundlich sabitleridir.

Freundlich bağıntısı ampirik bir denklemdir. Sorbentin sınırlı bir alım kapasitesi olduğunu göstermektedir ve bu nedenle ancak düşük ve orta konsantrasyon aralıklarında doğru bir şekilde uygulanabilmektedir (C_f). Buna karşın matematiksel olarak daha karmaşık hesaplamaları (örneğin dinamik kolon davranışını) ile çalışmak daha kolaydır. Freundlich modeli (log-log) şeklinde grafiğe geçirilerek kolayca lineerleştirilebilmektedir.

Langmuir modeli, sorpsiyon sisteminin iki önemli özelliğini temsil etmesi, kolay anlaşılan parametrelere (q_{max} ve b) sahip olması ve kolay uygulanabilmesi nedeniyle ampirik olarak en sık kullanılan modeldir [80].

Bu orijinal bağıntılar için yapılan varsayımların, katı faz sorbenti olan aktif karbonla yapılan çalışmalardan esinlendiği unutulmamalıdır. Sorbatların depolanması için hesaba katılan monomoleküler tabaka, yüzey esaslı adsorpsiyon anlamına gelmektedir ve biyosorpsiyon bundan ibaret değildir.

Aşağıda verilen **diğer sorpsiyon izotermi** bağıntılarına biyosorpsiyon literatüründe rastlanmaktadır [75]. Bu bağıntıların sorpsiyon işleminin esasını oluşturan fizikokimyasal prensipleri yansıtmadığı bilinmelidir. Bu bağıntılar sadece tüm pratik amaçlar için deneysel olarak gözlenen (q)'ya karşı (C_f) ilişkisini tanımlamaya yarayan matematiksel modellerdir. Bu kapasite dahilinde, bu modellerin hiçbirisi sorpsiyon mekanizmasıyla ilgili önemli ipuçları vermemektedir ve harici işlem değişkenleri (pH, iyonik kuvvet vs.) ile ilgili hassasiyete sahip değildir.

Langmuir adsorpsiyon modeli tek tabakalı adsorpsiyon için geçerliken, **Braunauer-Emmett-Teller (BET)** modeli çok tabakalı adsorpsiyonu yansıtmaktadır. Her iki eşitlikte de yüzey adsorpsiyonu enerjilerinin eşit olduğu varsayımı bir kısıtlamadır. İki denklem arasında daha genel bir uygulama alanına sahip olan **BET** izotermi, adsorpsiyon sınırı tek tabakalı olduğunda Langmuir modeline indirgenmektedir. Her iki denklem de kinetik değerlendirmeler veya adsorpsiyon termodinamikleri sonucundan çıkarılabilir. İkinci türev olan adsorpsiyon termodinamikleri daha az varsayıma sahip olduğundan kinetik uygulamalara kıyasla biraz daha karmaşık ancak daha az sezgiseldir (örneğin ileri ve geri hız işlemlerinin varsayılan bir mekanizmaya göre dengelenmesi).

BET modeli yüzeyde belli bir sayıda adsorbat molekülü tabakası bulunduğunu ve her tabakada Langmuir eşitliğinin geçerli olduğunu kabul etmektedir. **BET** modelinin daha ileri bir kabulü ise, sonraki bir tabakanın kullanılması için bir önceki tabakanın düzenlenmesinin gerekmemesidir. Bir diğer değişler denge koşulunda molekül tabaka sayısı anlamında farklı yüzey tipleri yer alacaktır. Yaygın şekilde kullanılan adsorpsiyon modelleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Yaygın şekilde kullanılan tek bileşenli adsorpsiyon modelleri [6]

İzoterm tipleri *	Denklemler	Terimler
Langmuir	$q_e = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e}$	q_e denge metal sorpsiyon kapasitesidir; C_e çözeltideki denge durumundaki çözünen madde konsantrasyonudur. Kimi kaynaklarda C_f şeklinde final denge konsantrasyonu olarak ifade edilmektedir. $q_{\max}$ ve b , sırasıyla maksimum sorpsiyon kapasitesi (tek tabaka kapasitesi) ve adsorpsiyon bağlanma enerjisi (afinite) ile ilişkili Langmuir sabitleridir.
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n}$	K_F , sorpsiyon kapasitesini temsil eden biyosorpsiyon denge sabitidir, n ise biyosorpsiyon yoğunluğunu gösteren sabittir
Langmuir – Freundlich	$q_e = \frac{q_{\max} b C_e^{1/n}}{1 + b C_e^{1/n}}$	Yüzeyin homojen olduğu ancak sorpsiyonun adsorbat-adsorbat etkileşimlerine bağlı ortak bir işlem olduğu varsayılmaktadır.
BET model (çok tabakalı sorpsiyon)	$q_e = \frac{B Q^0 C_e}{(C_s - C_e)[1 + (B - 1) C_e / C_s]}$	C_s adsorbe edilen bileşenin doygunluk konsantrasyonudur, B adsorban yüzeyi ve çözünen madde arasındaki etkileşimin enerjisini gösteren sabittir, Q^0 tam bir tek tabaka oluşturacak şekilde adsorbe edilen çözünen maddeyi gösteren sabittir.
Redlich – Peterson	$q_e = \frac{K_{RP} C_e}{1 + a_{RP} C_e^{\beta}}$	K_{RP} , a_{RP} ve β Redlich-Peterson parametreleridir. β kuvveti 0 ve 1 arasındadır. $\beta = 1$ olduğunda model Langmuir denkleminde dönüşmektedir.
Radke - Prausnitz	$q_e = \frac{a r C_e^p}{a + r C_e^{p-1}}$	a , r ve p ilişkili model sabitleridir
Dağıtım sabitleri modeli	$q_e = K_d C_e$	K_d dağılım katsayısıdır

* “Yüzey alanı” konsepti jel benzeri biyosorbentler için uygun değildir. Basit izoterm modellerinin kullanılması “eğri uydurma”dan ibarettir

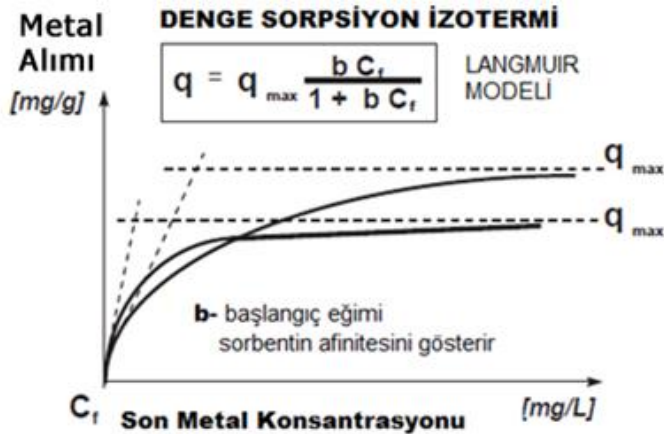
2.6.2. Sorpsiyon Performansının Karşılaştırılması

Sorpsiyon malzemelerinin performansının karşılaştırılması önemli bir gereksinimdir. En basit durumda sistemde yalnızca bir sorbat türü bulunmaktadır. Tek sorbat sorpsiyon performansının karşılaştırılması en iyi şekilde bütün tek sorbat sorpsiyon izoterm eğrisi esasına göre yapılmaktadır. İki veya daha fazla sorbentin ‘uygun’ karşılaştırılması için her zaman aynı koşullar geçerli olmalıdır. Bunlar sorpsiyonun gerçekleştiği çevresel etkilerle sınırlı olabilir (pH, sıcaklık, iyonik kuvvet, vs.). Geniş bir aralıkta ayarlanmaları gerekmez. Önemli olan sorpsiyon performansını örneğin aynı pH koşullarında (izotermeler pH ile değiştiğinden) karşılaştırmaktır.

Sorbent ‘performansı’ ifadesiyle kastedilen genelde alımdır (q). Sorbentler kendi q_{max} değerlerine göre karşılaştırılabilir. q_{max} değerleri, deneyden elde edilen verileri Langmuir izoterm modelin uydurarak (uyuyorsa) hesaplanabilir. Bu yaklaşım karakteristik q_{max} sorpsiyon performans platosu (en yüksek sorbent doygunluğu) mevcutsa uygulanabilir. Sorpsiyon alım kapasitesi q_{max} ’ın yüksek olması bir sorbentin ‘iyi’ olarak değerlendirilmesini sağlar.

Buna karşın sorbent ve sorbat arasındaki yüksek ilgi (afinite), düşük konsantrasyonlardaki (C_f) iyi alım değerlerini yansıtmaktadır ve istenen bir özelliktir. Bu durum da izoterm eğrisinin başlangıç noktası yakınında dik bir artış ile karakterizedir. Bu bölgedeki performans Langmuir sabiti b tarafından temsil edilmektedir [75].

İdeal bir Langmuir izotermi Şekil 2.8’de verilmiştir. Şekilde farklı iki biosorbentin q_{max} değerleri göz önüne alındığında büyük olan değer daha fazla bağlama kapasitesine sahip olduğu söylenebilir. Ancak bağlanma hızları açısından q_{max} değeri küçük olan biyosorbentin daha etkili olduğu, düşük C_f değerlerinde daha yüksek bağlama kapasitesine sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 2.9. Biyosorpsiyon–Langmuir izotermiyle ilgili eğri [81]

Sonuçta, genel olarak ‘iyi’ sorbentlerde yüksek q_{max} ve Langmuir parametresi b ’nin yüksek olmasıyla da gösterilen sorpsiyon izoterminde dik başlangıç eğimi görülmektedir. Sorpsiyon performansı karşılaştırmasını deneysel olarak elde edilen sorpsiyon izoterm grafiklerinin tamamını göz önünde bulundurarak yapmak gerekmektedir [14].

Ağır metal biyosorpsiyonu kullanılan bakteri suşlarına bağlı olarak da değişmektedir. Bu nedenle farklı suşlarla yapılacak çalışmalar literatüre değerli bilgiler katabilecektir. Ayrıca, literatürler incelendiğinde ağır metal bisorpsiyonu ile ilgili çalışmalar genelde su veya tampon matriksinde yapılmıştır. Bu tez kapsamında yoğurt matriksi ve insan sindirim sisteminin taklit edildiği *in vitro* koşullarda biyosorpsiyon kabiliyetleri test edilmiştir. Bu açıdan ilgili konudaki önemli literatür eksikliğinin giderileceği düşünülmektedir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada 7 farklı (karışık ve/veya tek kültür) ticari kültürü ile çalışılmış ve biyosorpsiyon özellikleri ortaya konulmuştur. Tüm deneylerde Direct Vat Set (DVS), yani kullanıma hazır, liyofilize LAB kültürleri kullanılmıştır. Kullanılan ticari kültürler ve tez metni içinde tarafımızdan yapılan kısaltmaları aşağıda verilmiştir

Tez içindeki Kısaltmalar	Bakteri İçerikleri
ABT2	(<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12) (Nu-trish, Chr. Hansen)
BB12	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12 (Nu-trish, Chr. Hansen),
La-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (Nu-trish, Chr. Hansen),
YC350	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> karışık kültür (YoFlex-Chr. Hansen)
Dophilus	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM (HOWARU Dophilus, Danisco) ,
L.acido	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (YO-MIX single strain, Danisco),
YOMix	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> karışık kültür (YO-MIX, Danisco).

Standart kadmiyum ve kurşun çözeltileri (%2'lik HNO₃ içerisinde 1000 mg/l konsantrasyonunda) Fluka firmasından Fluka firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan farklı pH değeri ve konsantrasyonlara sahip çözeltiler, standart çözeltilerden deiyonize su kullanılarak hazırlanmış, pH değerleri %1'lik HCl ve/veya NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır.

Aksi belirtilmediği müddetçe çalışmada kullanılan tüm kimyasallar, Merck markadır. Ayrıca, çalışmada kullanılan tüm malzemeler %5'lik HNO₃ çözeltisinde bekletilmiş ve daha sonra deiyonize suyla durulanarak kullanılmıştır. Süt ile yapılan deneylerde UHT yağsız süt kullanılmıştır.

Çalışmamızda yer alan bazı kültürlerle ait deney ve analiz sonuçlarına tezde yer verilmemiştir.

3.2. Metot

Tüm çalışmalar 2 paralel ve 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Ağır Metal Çözeltilerinin Hazırlanması

Pb ve Cd stok çözeltisi kullanılarak deiyonize su içinde, her 2 ağır metalin de 30 ppm konsantrasyona sahip çözeltileri hazırlanmıştır. Kurşun için hazırlanan çözelti pH 5, kadmiyum için hazırlanan çözelti pH 6 değerine ayarlanmıştır. 30 ppm konsantrasyondaki Pb ve Cd çözeltileri ilerideki kısımlarda açıklanan süre, inkübasyon sıcaklık etkisi, biyokütle (biomass) miktarı etkisi deneylerinde kullanılmıştır.

Pb ile pH etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde kullanılmak üzere, stok çözelti kullanılarak, deiyonize su içerisinde 30 ppm konsantrasyona ve pH 3, 4, 5 değerlerine sahip 3 farklı çözelti hazırlanmıştır.

Cd ile yapılan pH etkisini belirlemeye yönelik deneylerde kullanılmak üzere 30 ppm konsantrasyona ve pH 3, 4, 5, 6 değerlerinde 4 farklı çözelti hazırlanmıştır.

Ayrıca Langmuir adsorpsiyon izotermi bağlanma katsayılarının belirlendiği deneylerde kullanılmak üzere; Pb için pH 5 ve Cd için pH 6 değerinde ve 0.1, 1, 5, 20, 50, 75, 100 ppm konsantrasyonlara sahip 7'şer farklı çözelti hazırlanmıştır.

3.2.2. Bakteri Biyokütlelerinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılacak bakteri pelletlerinin elde edilmesi ve deney tamamlandıktan sonra süspansiyondan biyokütlenin pellet formunda ayrılması için Sigma 3K-30 soğutmalı santrifüj kullanılmıştır. Santrifüj işlemleri aksi belirtilmedikçe tüm deneylerde aynı şekilde; 5000 g, 4-5 °C sıcaklıkta 10 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir [26].

Deneylerde kullanılacak DVS kültürler, bakterilerin ağır metalleri bağlama özelliklerinin etkilenmemesi amacıyla deiyonize suda çözündürüldükten sonra santrifüj işlemiyle bakteri hücreleri dışında kalan suda çözünür maddeler suyla birlikte uzaklaştırılarak kullanılmıştır.

Bunun için DVS kültürler deiyonize su içerisinde, 15 dakika süreyle manyetik karıştırıcı ile orta hızda karıştırılarak çözündürülmüş, daha sonra santrifüjlenerek süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet bir kez daha deiyonize su ile Heidolph Reax Top karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak santrifüjlenmiş, bu şekilde toplam 2 kez yıkama yapılmıştır. Tartılan belli miktardaki DVS kültürde bulunan bakteri hücre biyokütlesini belirlemek için, santrifüj sonrasında elde edilen bakteri pelleti önceden darası alınmış tüpler içerisinde liyofilizasyon işlemi ile kurutularak tartılmıştır.

Elde edilen miktarın başta eklenen DVS kültür miktarına oranına bakılarak, DVS kültür içerisinde hangi oranda hücre ve hücre dışı madde bulunduğu belirlenmiştir. Bu sayede deneylerde son konsantrasyonda tercih edilen miktarlarda bakteri biyokütlesi kullanılmıştır. DVS kültür içerisindeki bakteri biyokütlesi her suş için ayrı ayrı belirlenmiştir.

Yukarıda sıralanan işlemlerin ardından elde edilen bakteri biyokütleleri deneyler için deiyonize su içerisinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Aksi belirtilmediği sürece (biyokütle miktarı deneyi hariç) tüm deneyler, bakteri biyokütlesi konsantrasyonu 1 g/L olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Bakteri Canlılığının Biyosorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Bakterilerin canlı olup olmasının biyosorpsiyon üzerindeki etkilerini görebilmek için tüm deneyler hem canlı hem cansız hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Bakterileri inaktive ederek deneylerin cansız hücrelere de uygulanabilmesi amacıyla hücreler benmari (95°C, 1 saat) ve otoklav (121°C, 15 dakika) ile ısıl işleme tabi tutularak cansız hale getirilmiş, bu iki yolla elde edilen cansız hücrelerin bağlama kapasiteleri değerlendirilmiştir. Yapılan denemelerde, otoklav ve benmaride cansız hale getirilen biyokütlelerin bağlama kapasiteleri karşılaştırılmış, benmaride işlem gören biyokütlenin bağlama kapasitesinin daha yüksek olması nedeniyle cansız biyokütle elde etmek için deneylerde benmari yöntemi (95°C, 1 saat) kullanılmıştır [26].

3.2.4. İnkübasyon Süresi ve Koşulları

Deneylerde inkübasyon, aksi belirtilmediği sürece 37 °C’de (inkübasyon sıcaklığı etkisinin belirlendiği deneyler hariç) ve 4 saat (inkübasyon süresi etkisinin belirlendiği deneyler hariç) süreyle gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının sağlanması için etüv kullanılmış, bakteriler deney süresince etüv içerisinde Heidolph Vibramax 100 karıştırıcı aleti ile sabit hızda (900 rpm) sürekli karıştırılmıştır. Deney sonucunda bakterilerin bağladığı ağır metal miktarının tayin edilebilmesi amacıyla, bakteriler ortamdan santrifüj işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Süpernatant kısım atomik absorpsiyon spektroskopisi ile, 3.2.14’te anlatıldığı şekilde analiz edilerek bakteriler tarafından tutulmayan serbest ağır metal konsantrasyonu belirlenmiş ve bu sayede bakterilerin bağladığı miktar (%) hesaplanmıştır.

3.2.5. İnkübasyon Süresinin Bağlanmaya Etkisi

İnkübasyon süresinin bağlanmaya etkisini ve bağlanma işleminin hızını belirlemek için 5-360 dakika arası sürelerde (5, 30, 60, 120, 240, 360 dk.) inkübasyon gerçekleştirilmiş ve bağlanma miktarları tespit edilmiştir.

3.2.6. Biyokütle Miktarının Bağlanmaya Etkisi

Biyokütle miktarının bağlanmaya olan etkisini belirlemek için, son çözeltide biyokütle konsantrasyonu 0.5-2.0 g/L arasında değişecek şekilde (0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 g/L) deneyler yapılmıştır.

3.2.7. pH Değerinin Bağlanmaya Etkisi

pH değerinin ağır metalin bağlanması üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla kurşunda pH değeri 3, 4 ve 5 olan çözeltilerle, kadmiyumda pH değeri 3, 4, 5 ve 6 olan çözeltilerle deneyler yapılmıştır [5]. Genel anlamda yüksek pH değerleri metallerin çökmesine yol açabildiği için deneylerde yüksek pH değerleri kullanılmamıştır [82]. Özellikle, Pb’de pH 6 değerinden kaçınılmasının sebebi, göreceli olarak yüksek pH değerlerinde kurşunun kısmı olarak çökmesi ve stabil olmamasıdır [72].

3.2.8. Bağlanma Stabilitesi

Bağlanma stabilitesinin belirlenebilmesi için inkübasyon sonrasında bakteri biyokütlesi 3’er kez pH 2 ve pH 7 değerine sahip deiyonize su çözeltileri ile 15 dakika süreyle karıştırılarak yıkanmıştır. Daha sonra bu karışım santrifüjlenerek bakteri ile süpernatant birbirinden ayrılmış, çözeltideki ağır metal konsantrasyonu belirlenerek hücrelerin her yıkamayla bıraktığı ağır metal miktarı belirlenmiştir. Bu sayede hücrelerin ağır metalleri bağlama stabilitesi ortaya konmuştur.

3.2.9. İnkübasyon Sıcaklığı Etkisi

Bu bölümde 4, 22 ve 37 °C’lik koşullarda, 4 saat süreyle inkübasyon yapılarak inkübasyon sıcaklığının bağlanma üzerindeki etkisi incelenmiştir.

3.2.10. Langmuir Adsorpsiyon Modeli Bağlanma Katsayılarının Belirlenmesi

Langmuir İzotermi bağlanma katsayılarının belirlenmesi amacıyla, aynı miktarda bakteri biyokütlesi farklı konsantrasyonlarda (0.1 - 100 g/l) Pb için pH 5, Cd için pH 6’de çözeltileriyle aynı koşullarda inkübe edilmiş, farklı suşlara ait bağlama kapasiteleri ve katsayılar aşağıdaki denklem’e göre belirlenmiştir [26].

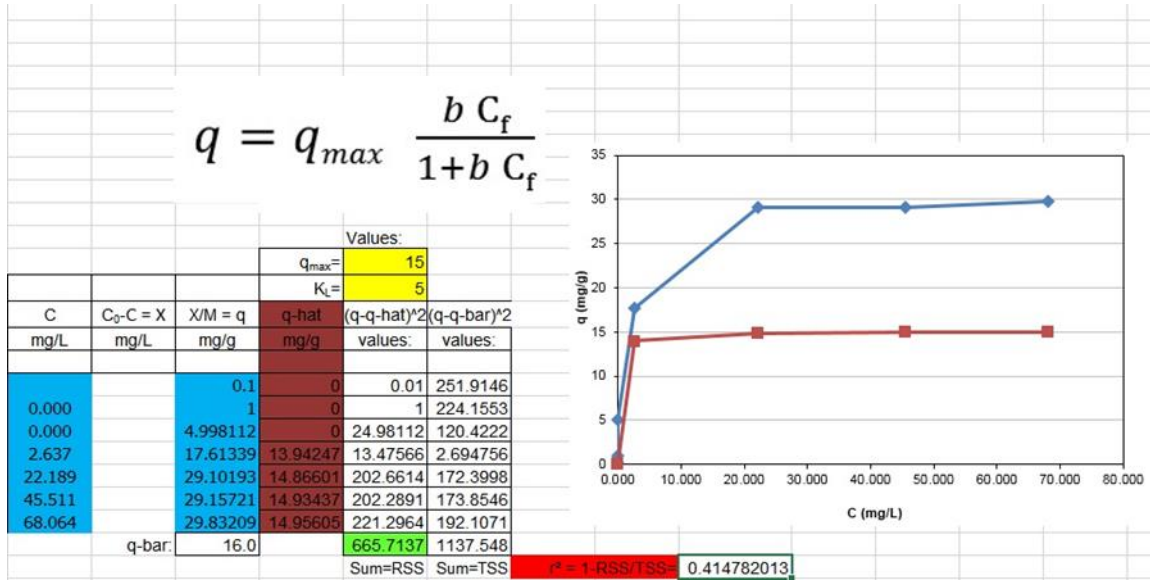
$$q = q_{max} \frac{b C_f}{1 + b C_f}$$

C_f ’ye (denge durumundaki serbest ağır metal konsantrasyonu) karşı q ’nın (denge durumunda biyokütleyle bağlanmış metal konsantrasyonu) grafiğe geçirilmesiyle; q_{max} (mevcut koşullardaki maksimum bağlama kapasitesi) ve b (bağlanma afinitesi ve grafiğin ilk kısmındaki eğimiyle ilişkili bir sabit) hesaplanmıştır. Bunu yapabilmek için veriler OriginPro ve/veya Microsoft Excel’in Solver fonksiyon programları kullanılarak grafikler

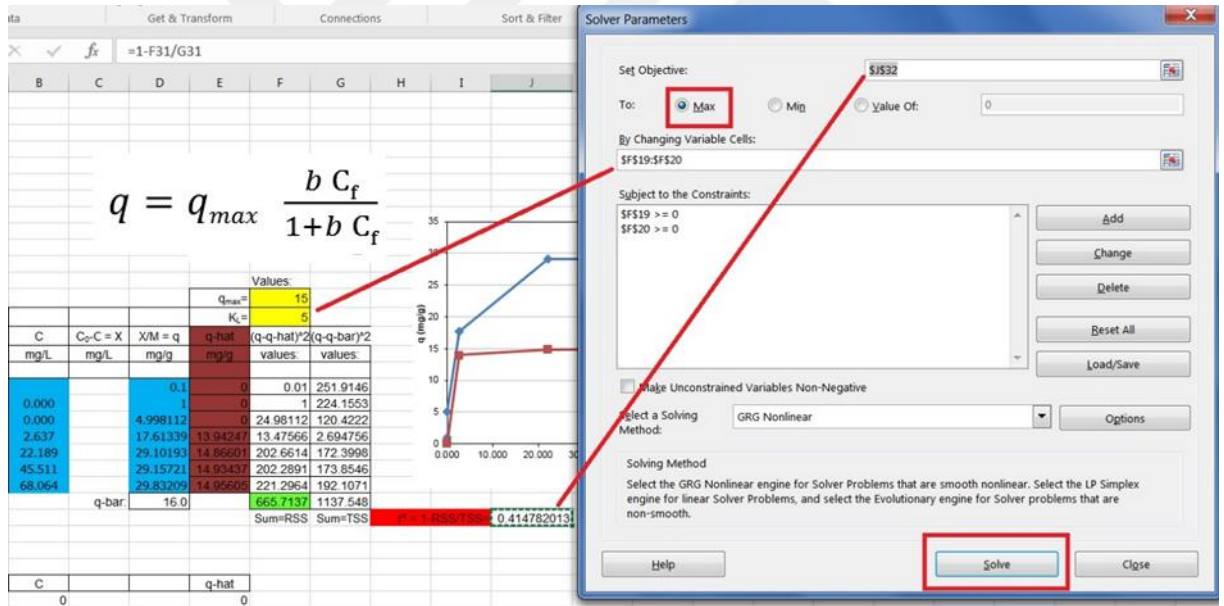
C_f 'ye (denge durumundaki serbest ağır metal konsantrasyonu) karşı q 'nın (denge durumunda biyokütleyle bağlanmış metal konsantrasyonu) grafiğe geçirilmesiyle; q_{max} (mevcut koşullardaki maksimum bağlama kapasitesi) ve b (bağlanma afinitesi ve grafiğin ilk kısmındaki eğimiyle ilişkili bir sabit) hesaplanmıştır. Bunu yapabilmek için veriler OriginPro ve/veya Microsoft Excel'in Solver fonksiyon programları kullanılarak grafikler çizilmiş, katsayılar hesaplanmıştır. Solver, tekrarlayan algoritma ile lineer olmayan fonksiyonların verilerini modele uydurmak için işlevsel bir fonksiyondur.

Solver kullanılırken elden edilen veriler ve tahmini denklem sabitleri (bizim uygulamamızda q_{max} ve b) uygulanacak modele yerleştirilerek uygun formüllerle regresyon katsayısı (R^2) hesaplanır. Daha sonra Solver fonksiyonu kullanılarak, R^2 değerinin 1'e en yakın olacağı, yani verilerin modele en iyi uyacağı q_{max} ve b değerleri belirlenir. Bunun için Solver fonksiyonunda q_{max} ve b değişken olarak, R^2 ise 1'e en yakın değeri bulunacak hücre olarak seçilir.

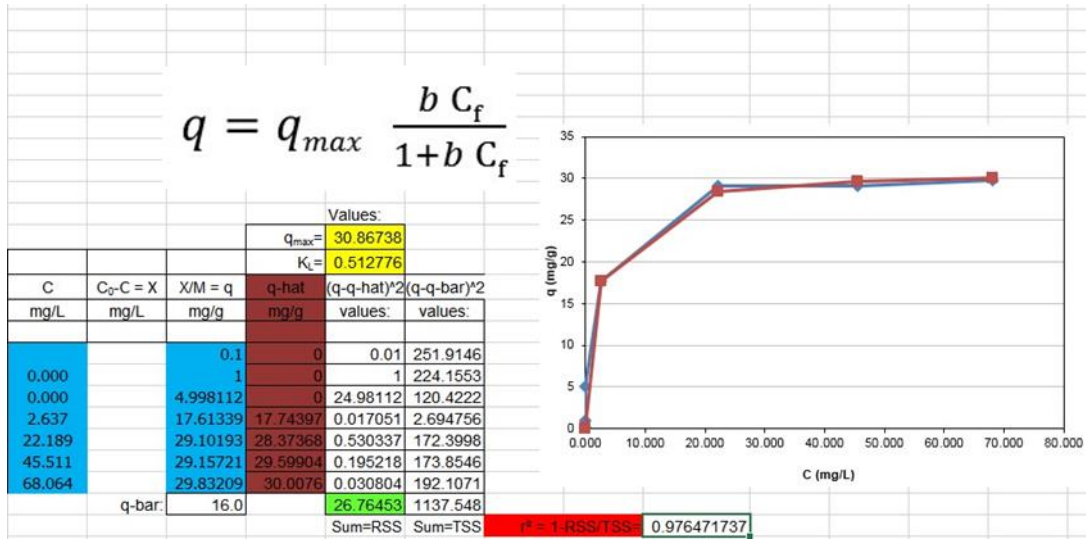
Bu yöntem, izoterm ve kinetik modellerin karmaşık, lineer olmayan analizi için kolay, kullanıcı dostu ve doğru sonuç veren bir alternatif olması nedeniyle tercih edilmiştir. Solver; LMMPPro, Origin ve literatürde bulunan biyosorpsiyon çalışmaları verileriyle karşılaştırılmış ve sonuçların birbiriyle tutarlı olduğu görülmüştür. Solver fonksiyonunu MATLAB programıyla kıyaslayan bilimsel istatistiki çalışmalar da Microsoft Excel'in biyosorpsiyon modellerinde kullanmaya uygun, kolay bir araç olduğunu ortaya koymuştur [83]. Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'de örnek program arayüzleri verilmiştir.



Şekil 3.1. Mavi renkteki hücreler deneysel veriler, sarı renkli hücreler rastgele denklem sabitleri, bordo hücreler ise rastgele verilen sabitlerle hesaplanan q değerleri



Şekil 3.2. Solver ile R^2 maksimize edilecek hücre olarak, q_{max} ve b ise değiştirilecek hücreler olarak seçilir



Şekil 3.3. Solver fonksiyonu sonrasında, deneysel veriler ve modele uydurulan veriler aynı grafikte gösterilmektedir. R² değerinin de 1'e oldukça yakın olduğu görülmektedir

3.2.11. Farklı Suşlarla Hazırlanan Yoğurtların Biyosorpsiyon Kapasiteleri

Yoğurdun biyosorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi için farklı LAB suşları ve kombinasyonları ile set tipi yoğurt üretilmiştir. Farklı suşlarla üretilen yoğurtlara Cd ve Pb ağır metalleri eklenmiş, diğer denemelerde yapıldığı şekilde biyosorpsiyon işlemi için inkübe edilmiş ve sonuçlar AAS'de analiz edilmiştir. Deney planı aşağıda verilmiştir.

Üretimde yağsız UHT süt kullanılmıştır ve kültür ilavesi 10⁷ kob/mL süt olacak şekilde yapılmıştır. Probiyotik kültürler normal kültürlerle ek kültür olarak ilave edilmiştir (1:1 oranında). 5 dakika karıştırılan süt örnekleri 25 mL olacak şekilde plastik falkon tüplere alınmıştır. 42 °C'de pH 4.7'ye düşene kadar (yaklaşık 4 saat) inkübe edilmiştir. Sonra yoğurtlar 1 gece 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Ertesi gün pH ölçümleri alınarak denemelerde kullanılmıştır.

LAB hücrelerinin yoğurt matriksinde bulunmasının biyosorpsiyon işlemine olan etkisini belirleyebilmek amacıyla 200 mL yağsız sütün pH'sı laktik asit kullanılarak pH 4.5 olacak şekilde ayarlanmış ve asit jeli elde edilmiştir.

Ağır metal çözeltileri (konsantre, 1000 ppm Pb veya Cd) direkt olarak son hacimde 30 ppm olacak (yaklaşık 0.78 µL) şekilde 25 mL falcon tüpü içinde bulunan yoğurt örneklerine ve asit jeline ilave edilmiştir. Biyosorpsiyon için örnekler 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda santrifüj yapılan örneklerden elde edilen supernatantlar filtre edilmiş ve %65'lik HNO₃ çözeltisi ile yaş yakmaya tabi tutularak AAS'de okumaları yapılmıştır (Bkz. 3.2.14).

Deney kodları aşağıda verilmiştir.

Kodlar	Açıklama	Analiz öncesi pH değerleri
Jel	Laktik asitle koagüle edilmiş süt jeli	pH 4.44
1	YC350 ile hazırlanmış yoğurt	pH 4.35
2	YOMix ile hazırlanmış yoğurt	pH 4.42
3	ABT2 ile hazırlanmış yoğurt	pH 4.45
4	YC350 ve ABT2 ile hazırlanmış yoğurt	pH 4.40
5	YC350 ve L.acido ile hazırlanmış yoğurt	pH 4.32

3.2.12. Model Sindirim Sistemi

Laktik asit bakterilerinin ağır metal bağlama kapasitesini *in vitro* şartlarda incelemek amacıyla yapay sindirim sistemi hazırlanmıştır. Çalışmada uyguladığımız model sindirim sistemi literatürlere uygun olarak yapılmıştır. Versantvoort ve ark. [84] tarafından uygulanan yöntem, SCI kapsamında yayınlanan farklı çalışmalarda [74], [85] kullanılmış ve kabul görmüştür.

Sindirim sisteminde bulunan ve besinlerin sindirilmesini sağlayan tükürük (saliva), mide, oniki parmak bağırsağı ve safra sıvısı, yukarıda anılan yöntemlere göre hazırlanmıştır. Sindirim sıvılarının bileşimleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Bağlanma deneyleri sırasında sıcaklık aksi belirtilmediği müddetçe 37 °C’de sabit tutulmuştur.

Model sindirim sisteminde başta 3.2.10 olmak üzere, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6, 3.2.7, 3.2.8, 3.2.9 deneylerinden elde edilen sonuçlar da göz önünde bulundurularak daha yüksek bağlama kapasitesine sahip olduğu tespit edilen suşlar test edilmiştir. Bunun yanın sıra süt matriksinin biyosorpsiyon üzerindeki etkisini belirleyebilmek amacıyla model sindirim sistemi deneylerinde deiyonize suyun yanında süt ve yoğurt jeli de bakterilerin bulunduğu ortam olarak kullanılmıştır.

Sindirim modeli çalışması, 4 mL tükürük sıvısının, 3 mL hacimdeki örneklerle (LAB hücreleri ve ağır metal) karıştırılmasıyla başlatılarak 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada ortam pH’sı 6.8 olarak ölçülmüştür. Sonrasında örneklerle 8 mL mide sıvısı eklenerek pH 2-3 ölçülmüş (örneklerle göre değişen ölçümler), çalkalayıcı ile 2 saat süreyle karıştırılmıştır.

Model sindirim sisteminin son aşamasında 8 mL oniki parmak bağırsağı sıvısı ve 4 mL safra sıvısı ilave edilmiş, pH 6.7 – 7 olarak ölçülmüş ve çalkalayıcı ile 2 saat daha karıştırılmıştır.

Sindirim modeli yukarıda anlatıldığı şekilde tamamlandıktan sonra tüpler santrifüj edilerek süpernatant ve pellet ayrılmıştır. Süpernatant 0.45 µm filtreden geçirilmiş ve/veya asit hidroliz sonrası ağır metal ölçümleri AAS’de gerçekleştirilmiştir (Bkz. 3.2.14).

Çizelge 3.1. Sindirim sıvılarının kimyasal bileşimi

	Tükürük sıvısı (0.5 L)	Mide sıvısı (1 L)	Onikiparmak bağırsağı sıvısı (1 L)	Safra sıvısı (0.5 L)
	0.45 g KCl	2.75 g NaCl	7.01 g NaCl	2.63 g NaCl
	0.1 g KSCN	0.27 g NaH ₂ PO ₄	3.39 g NaHCO ₃	2.895 g NaHCO ₃
	0.45 g NaH ₂ PO ₄	0.82 g KCl	0.08 g KH ₂ PO ₄	0.19 g KCl
Bu kısım	0.285 g NaSO ₄	0.4 g CaCl ₂ .2H ₂ O	0.56 g KCl	0.075 mL HCl
stok	0.15 g NaCl	0.31 g NH ₄ Cl	0.05 g MgCl ₂	0.125 g üre
olarak	0.85 g NaHCO ₃	6.5 mL (%37) HCl	0.1 g üre	
hazırlandı	0.1 g üre	0.5 g glikoz	0.18 mL HCl	
		0.02 g glukronik asit		
		0.085 g üre		
		0.33 g glukozamin hidroklorit		
Deneyden önce	145 mg α-amilaz	1 g BSA	0.2 g CaCl ₂ .H ₂ O	0.11 g CaCl ₂ .H ₂ O
stok	7.5 mg ürik asit	2.5 g pepsin	1 g BSA	0.9 g BSA
sindirim	12.5 mg musin	3 g musin	9 g pankreatin	15 g safra sıvısı
sıvılarına eklendi			1.5 g lipaz	
pH	6.8	1.7	8.1	8.2

3.2.13. Kurşun-Kadmiyum Bağlanma Önceliği Deneyi

Suşların kurşun ve kadmiyum arasındaki bağlanma önceliğinin belirlendiği deneyde kullanılmak üzere, Pb ve Cd konsantrasyonları ayrı ayrı 30’ar ppm olacak şekilde bir çözelti (Pb-Cd çözeltisi) hazırlanmıştır (pH 5).

Hazırlanan Pb-Cd çözeltisi ile 4 saat süreyle 37 °C’de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda santrifüj işlemi ile hücreler uzaklaştırılmış, süpernatant AAS’de analiz edilmiştir.

3.2.14. Ağır metallerin tayini

Bağlama miktarının belirlenebilmesi amacıyla, inkübasyon bitiminde santrifüj işlemi ile hücreler pelletlenerek çözeltiden ayrılmış, çözelti ise Thermo Scientific iCE3000 marka Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (AAS) cihazında analiz edilmiştir.

Kurşun analizi için, kurşun katot lambası kullanılarak, 283.3 nm dalgaboyunda; kadmiyumla yapılan deneylerde kadmiyum katot lambası kullanılarak 228.8 nm dalgaboyunda analiz edilmiştir.

Ölçüm doğruluğunu sağlamak için konsatrasyonu bilinen ağır metal çözeltileri de diğer ölçümlerle birlikte AAS’de analiz edilmiştir. Bağlama oranın hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{Bağlanma} = 100 \times \frac{C_i - C_f}{C_i}$$

C_i ; Başlangıç ağır metal konsantrasyonu (ppm)

C_f ; Kalıntı ağır metal konsantrasyonu (ppm)

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

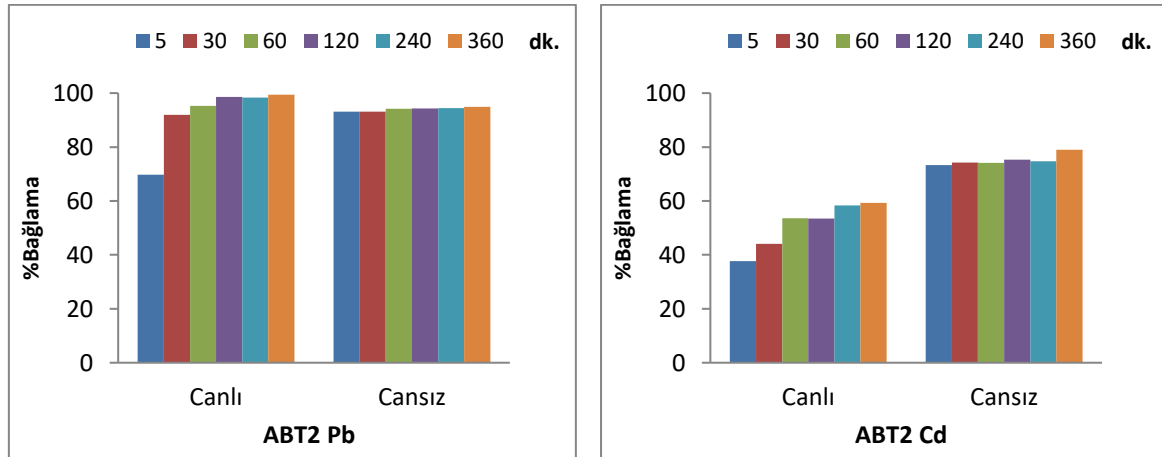
4.1. Canlılığın Biyosorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Bakterileri inaktive ederek deneylerin cansız hücrelere de uygulanabilmesi amacıyla, LAB; benmari (95°C, 1 saat) ve otoklav (121°C, 15 dakika) ile ısıtılma tabi tutularak cansız hale getirilmiş, bu iki yolla elde edilen cansız hücrelerin bağlama kapasiteleri değerlendirilmiştir.

Bu deneyler sonucunda benmari ile cansız hale getirilen hücrelerin bağlama kapasitesinin otoklav ile elde edilenlere kıyasla daha yüksek, canlı hücrelerin bağlama kapasitesine yakın olduğu görülmüştür. Bu durum, otoklavlama işlemindeki yüksek sıcaklık ve basınç değerinin hücrelere, ağır metallerin bağlandığı hücre duvarına zarar vermesi ve bağlama kapasitesini bu yolla olumsuz yönde etkilemesiyle açıklanabilir. Literatürdeki diğer çalışmalarda da [26], [74] hücreleri kaynatmanın maksimum ağır metal bağlanma kapasitesi üzerindeki etkisinin düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuçta çalışmamızda cansız hücrelerin biyosorpsiyon kapasitesini belirlemek amacıyla bu yöntem tercih edilmiştir. Yapılan tüm deneylerde kullanılacak cansız hücreler, canlı hücrelerin 95°C'ye ayarlanmış benmaride 1 saat tutulması ve hızlıca soğutulmasıyla elde edilmiştir.

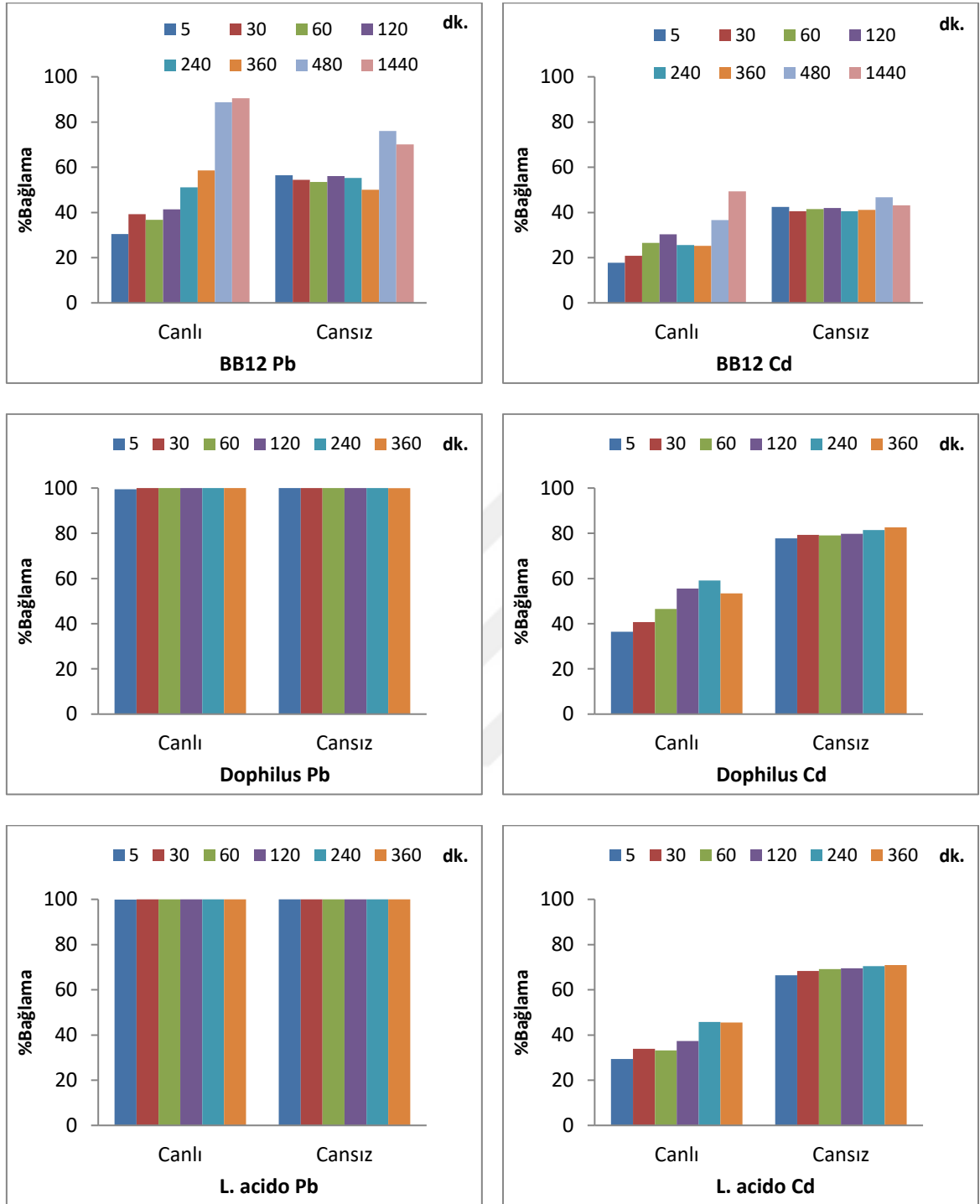
4.2. İnkübasyon Süresinin Bağlanmaya Etkisi

Çalışılan suşlarda farklı inkübasyon süresinin bağlanma üzerine etkisi Şekil 4.1'de verilmiştir.



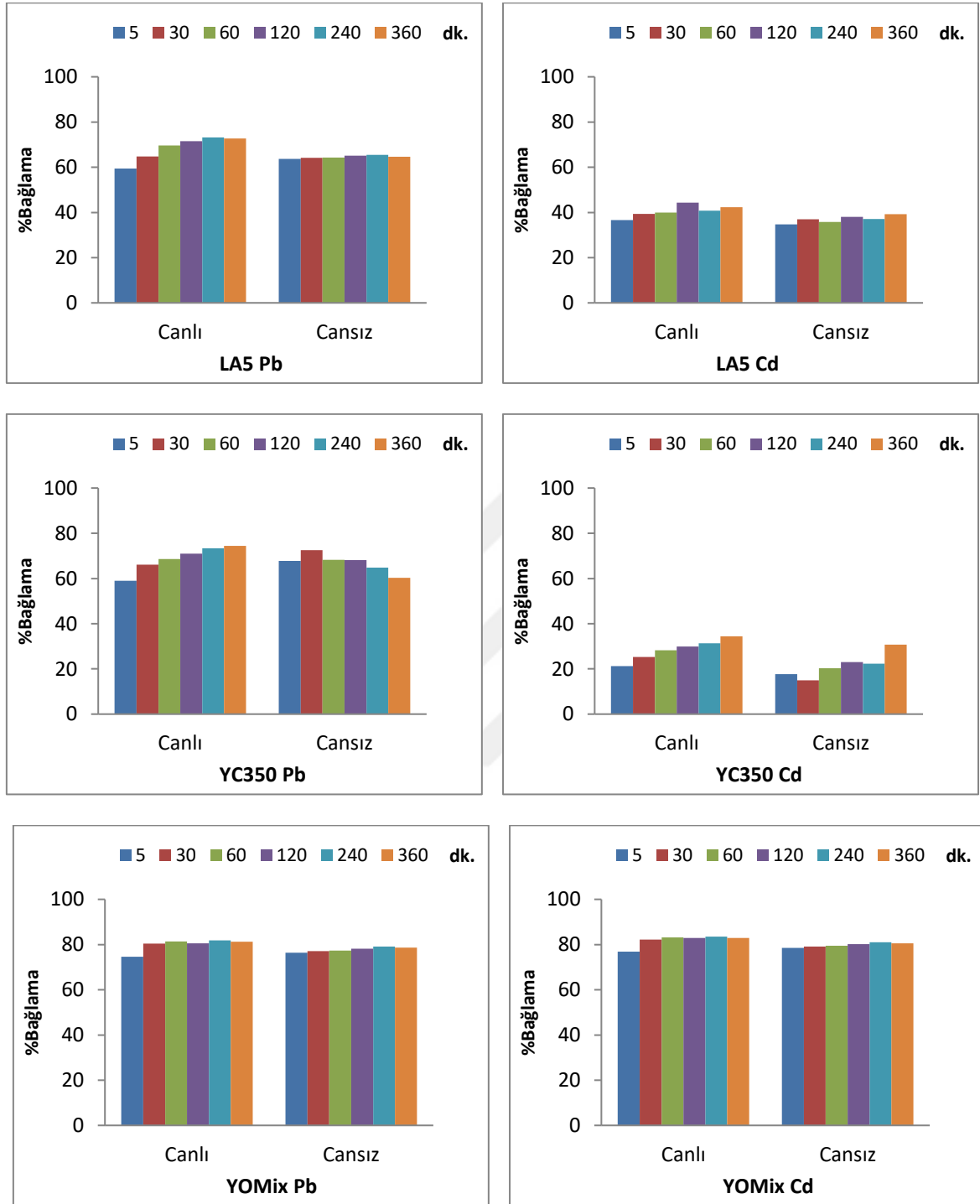
Şekil 4.1. İnkübasyon süresinin, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi

Şekil 4.1 devam ediyor



Şekil 4.1. İnkübasyon süresinin, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi

Şekil 4.1 devam ediyor



Şekil 4.1. İnkübasyon süresinin, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi

Pb için en yüksek biyosorpsiyon oranı ABT2, *Dophilus* ve *L. acido* suşlarında gözlenmiştir. Genel anlamda tüm deneylerde olduğu gibi Cd bağlama oranı Pb'ye kıyasla daha düşük kalmıştır. Canlı ve cansız hücrelerin Pb biyosorpsiyonunun birbirine oldukça yakın olduğu görülmüştür. Cd biyosorpsiyonunda ise YC350 ve LA5 haricinde cansız hücrelerin daha çok bağlama kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Biyosorpsiyon işlemi BB12 suşu haricinde büyük oranda ilk 5 dakikada gerçekleşmiş, bağlanma hızı ilerleyen sürelerde ilk 5 dakikaya kıyasla daha düşük kalmıştır. Bu da bazı diğer çalışmalardakine [72] benzer şekilde biyosorpsiyon işleminin hızlı olduğunu ve ağırlıklı olarak yüzeyde gerçekleştiğini [26] düşündürmektedir.

Dophilus ve *L. acido* suşları ortamda bulunan Pb'nin tamamını 30 dakikadan itibaren uzaklaştırmıştır. ABT2 suşu daha uzun bir sürede yüksek biyosorpsiyon kapasitesi göstermiştir.

ABT2, Şekil 4.1'den görüleceği üzere canlı hücreler cansız hücrelerin ilk 5 dakikada ulaştığı bağlama miktarına (>%90) 30 dakikada ulaşmakta ve süre ilerledikçe bu değerin üzerine çıkmaktadır. Buradan canlı ve cansız hücreler arasında biyosorpsiyon kapasitesi açısından bir fark olduğu da anlaşılmaktadır.

BB12 suşu, düşük bağlama oranından ötürü diğer suşlara uygulanan deneylerden farklı olarak 480 ve 1440 dakikalık (6 ve 24 saat) inkübasyonlara da tabi tutulmuştur. BB12 suşunun kurşunu bağlama kapasitesi inkübasyon süresi uzatıldıkça artmış, 6 ve 24 saatlik inkübasyonlarda en yüksek miktarlara ulaşmıştır

Biyosorpsiyonun hızlı başlayarak uzun sürelerde yavaş devam etmesi ilk etapta yüzeydeki bağlanma konumlarında hızlı bir adsorpsiyon gerçekleştiğini, devam eden sürede ise daha düşük hızda hücre içine alma ile bağlama olduğunu düşündürmektedir. Malik [86] kısa sürelerde gerçekleştirilen biyosorpsiyon çalışmalarının, görece yavaş gerçekleşen hücre içine alma olayını gözlemlene ihtimalinin zayıf olduğunu ve bu çalışmaların yalnızca yüzeyde bağlanmayı tespit edebildiğini öne sürmüştür.

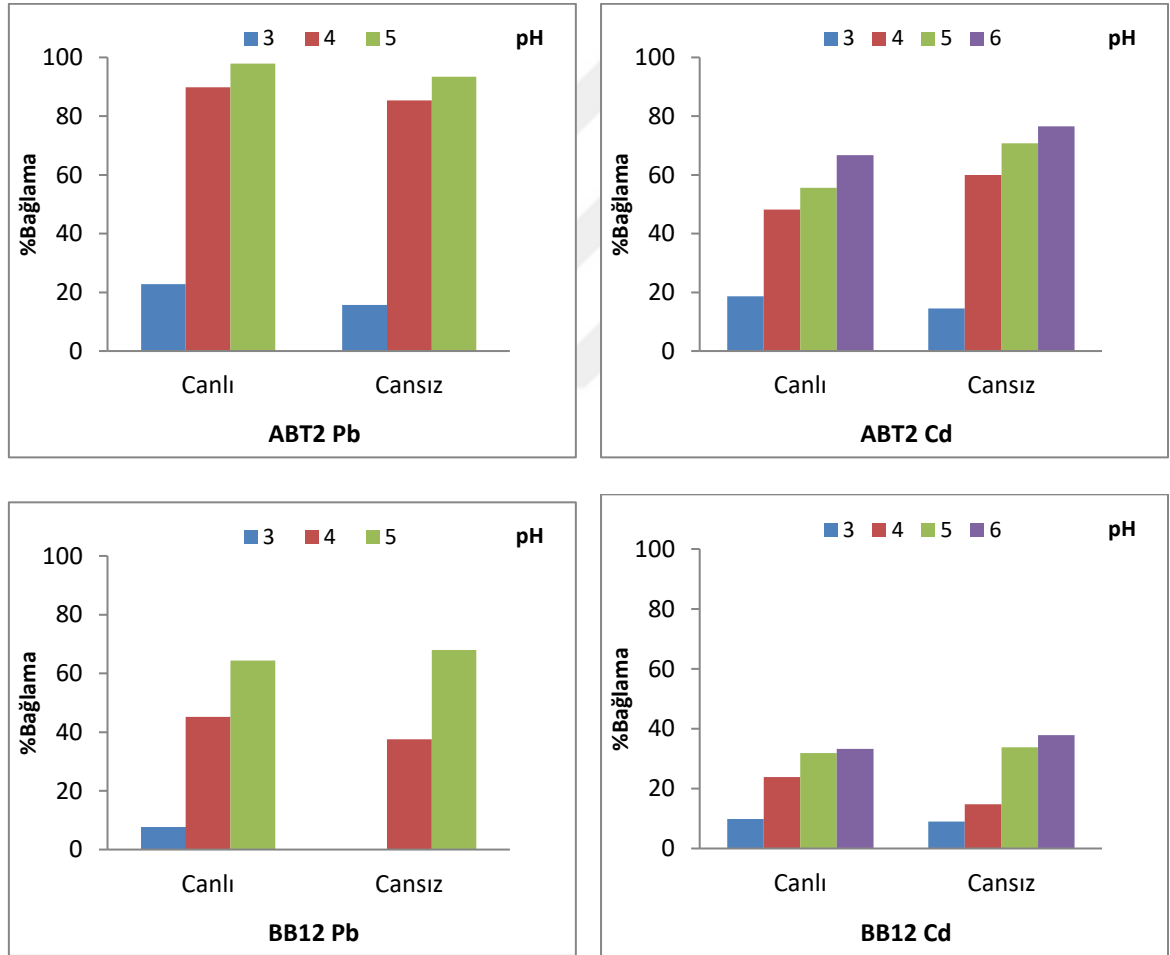
Bizim çalışmamızda olduğu gibi kimyasal bir işleme tabi tutulmamış bakteri hücrelerinin biyosorpsiyonunda, yüzeye tutunma haricinde spesifik olmayan katyon transferiyle metallerin sitoplazmaya alımı veya yüzeyde çökeltme gibi diğer işlemlerin de gerçekleştiği bildirilmiştir [87]. Süre devam ettikçe yavaş da olsa biyosorpsiyon seviyesi artan suşlarda, yüzeydeki bağlama alanlarının dolduğu ve inkübasyon sürdükçe diğer biyosorpsiyon işlemlerinin yavaş bir şekilde devam ettiği düşünülmektedir. Ağır metal adsorpsiyonuna

ilişkin bu 2 aşamalı mekanizma Goyal ve ark [88] tarafından yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir.

Dophilus suşu, ortamda bulunan kurşun ağır metallerini çok hızlı şekilde ve tamamen ortamdaki uzaklaştırmıştır. Bu durum hem canlı hem de cansız hücreler için geçerlidir. Bu deney, Dophilus'un yüksek ağır metal bağlama kapasitesi yanında, bağlama işlemini hızlı ve etkili şekilde yapabilecek bir suş olduğunu ortaya koymuştur.

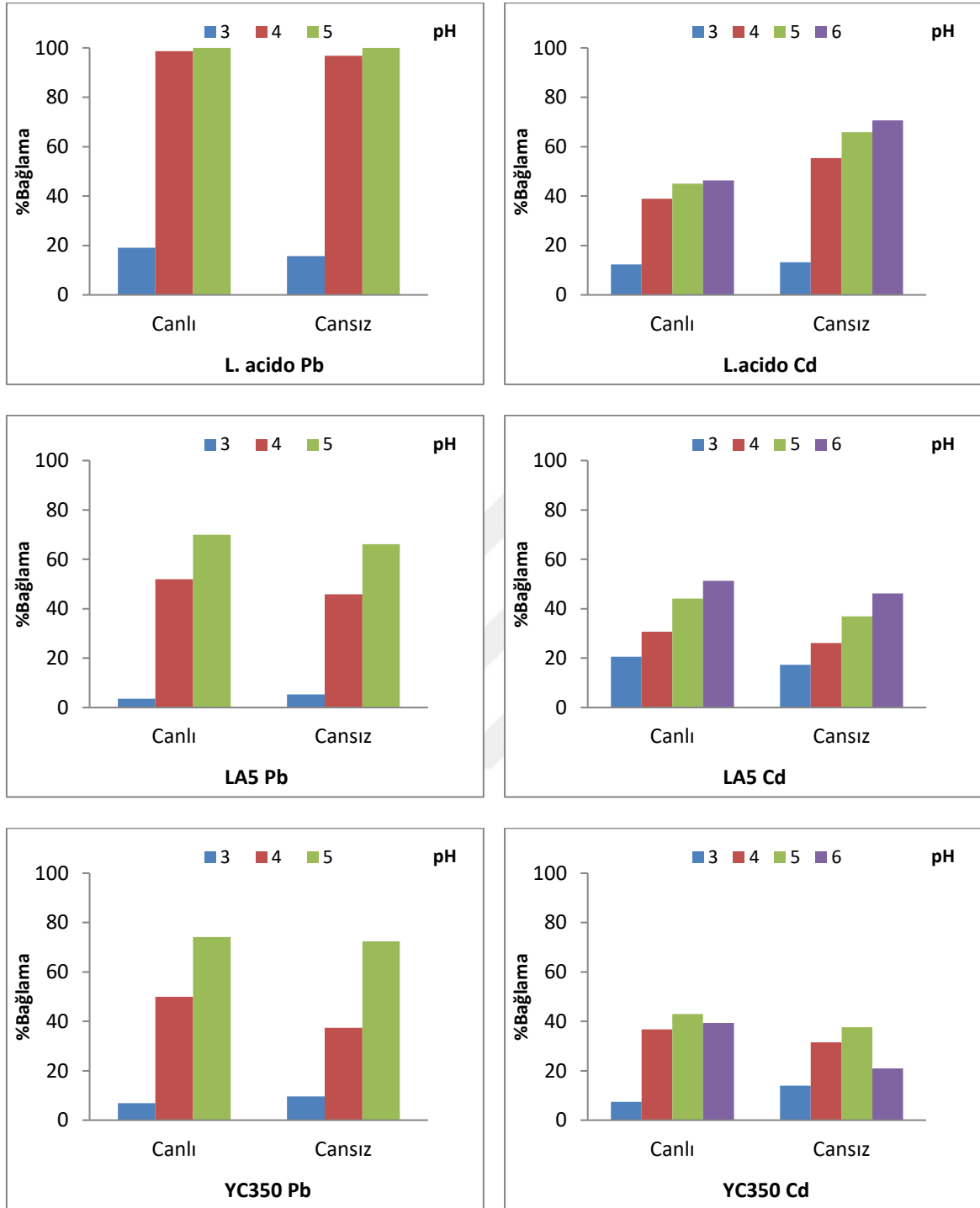
4.3. pH Değerinin Bağlanmaya Etkisi

pH etkisi deneyleri, kurşun için pH değer 3, 4 ve 5 olan çözeltilerle, kadmiyum için ise pH değeri 3, 4, 5 ve 6 olan çözeltilerle yapılmıştır. Tüm ağır metal çözeltilerinin konsantrasyonu 30 ppm'dir. pH etkisine ilişkin grafikler Şekil 4.2'de verilmiştir.



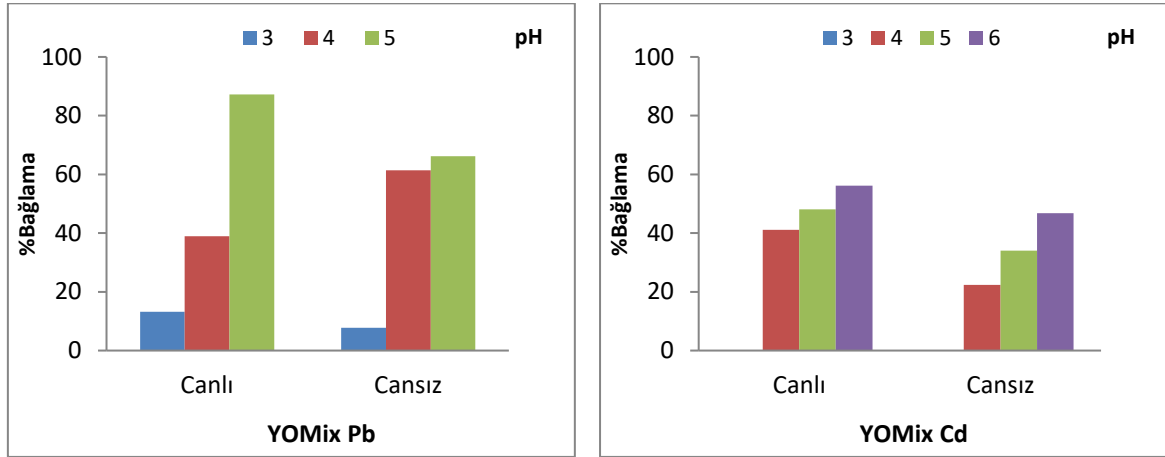
Şekil 4.2. Ortam pH'sının, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi

Şekil 4.2 devam ediyor.



Şekil 4.2 Ortam pH'sının, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi

Şekil 4.2 devam ediyor.



Şekil 4.2 Ortam pH'sının, laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd biyosorpsiyonu üzerindeki etkisi

Ortamın pH değerinin biyosorpsiyon kapasitesi üzerinde etkisinin test edildiği tüm suşlarda (ABT2, BB12, LA5, L.acido, YC350 ve YOMix), hem Cd hem Pb'de, pH değeri düştükçe biyosorpsiyon kapasitesinin de azaldığı görülmüştür. Gram-pozitif bakteri hücre duvarı yapısı göz önünde bulundurulduğunda, ortam pH'sı yükseldikçe (pH 5-6'ya kadar) biyosorpsiyon kapasitesinin artması beklenen bir durumdur. Bu etki literatürdeki birçok çalışmada da gözlenmiştir [72]. Buradaki tek istisna, YC350 suşunun Cd biyosorpsiyonundaki en yüksek bağlanma yüzdesinin pH 5'te görülmesidir.

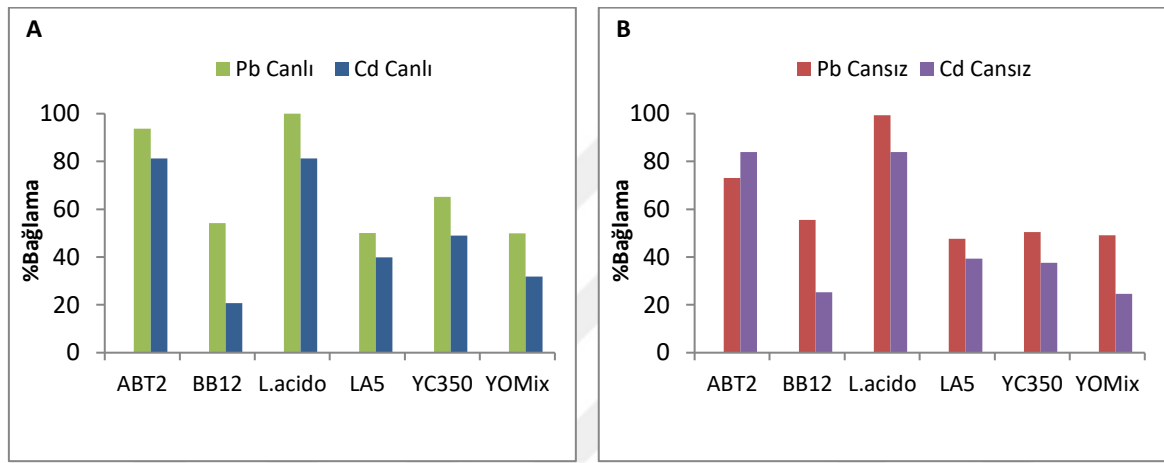
pH değerinin değişmesi metal iyonlarının çözünürlüğünü ve biyokütle hücre duvarındaki fonksiyonel grupların karşı iyonlarını da etkilemektedir. Bu etkiler yapılan diğer çalışmalarda da ortaya konmuştur [94].

Çözelti pH'sı adsorban, iyonlaşma derecesi ve yüzey gruplarının türleşmesini de etkilemektedir. pH değeri arttıkça biyosorpsiyonun artması, aynı işlevsel gruplar üstündeki proton ve metal katyon rekabetinin azalması ve yüzey ile metal iyonu arasındaki elektrostatik itmenin düşmesiyle açıklanmaktadır [89]. Ortam pH'sının biyosorpsiyon performansı üzerindeki en belirleyici çevresel faktör olduğu belirlenmiştir. Bu bilgi literatürdeki diğer çalışmalarda da ortaya konmuştur [1]. Canlı ve cansız hücreler arasında, Pb biyosorpsiyonunda önemli bir fark görülmemiştir. Cd biyosorpsiyonunda ise, ABT2 ve L.acido'de cansız hücrelerin; YOMix ve LA5'te cansız hücrelerin daha iyi bağlama özelliği görülmüş, diğer suşlarda canlı ve cansız hücrelerin bağlama bir fark görülmemiştir.

4.4. Kurşun ve Kadmiyum Bağlanma Önceliği

Gerçek koşullarda birçok farklı ağır metal aynı ortamda (tüketilen gıda ve yiyeceklerde) bulunabilmektedir. Bu nedenle birden fazla ağır metalin aynı ortamda bulunmasının biyosorpsiyon kapasitesini nasıl etkilediği de önemli bir araştırma konusudur.

Pb ve Cd ağır metallerinin birlikte bulunduğu çözelti ile yapılan deneyde, suşların hangi ağır metali daha fazla bağladığı belirlenmiştir. Bu deney her suş için canlı ve cansız hücrelerle ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Grafikler (Şekil 4.3A ve 4.3B) bu nedenle canlı ve cansız suşlar için ayrı, suşların bağlama kapasitelerinin karşılaştırılabilmesi için tüm suşlar bir arada olacak şekilde verilmiştir.



Şekil 4.3. Canlı (A) ve cansız (B) laktik asit bakterileriyle yapılan bağlanma önceliği deneyleri

Pb'nin canlı hücrelerle yapılan tüm deneylerde, ABT2 suşu haricinde de cansız hücrelerle yapılan tüm deneylerde Cd'den daha fazla bağlandığı görülmüştür (Şekil 4.3).

Hem Pb hem Cd için belirlenen en yüksek bağlama yüzdeleri L.acido ve ABT2'ye aittir. Buradan söz konusu 2 suşun, Pb ve Cd'nin bir arada bulunduğu ortamlarda daha iyi biyosorpsiyon özelliği gösterdiği anlaşılmaktadır.

Diğer çalışmalarda, aynı ortamda birden fazla metal bulunmasının her metale ait biyosorpsiyon kapasitesini etkilediği, ancak tüm metallerin toplam bağlanma kapasitesinin değişmediği bildirilmiştir [82]. Bu da biyokütlenin sabit olduğu ortamda birden fazla ağır metal bulunmasının metaller arasında rekabet ve çakışmaya yol açtığını göstermektedir. Bazı çalışmalarda ise ortamdan bağlanması istenen iyonlar dışındaki katyon ve anyonların genellikle metal birikimi üzerinde olumsuz bir olduğu belirtilmiştir [90].

4.5. Langmuir Adsorpsiyon Modeli Bağlanma Katsayılarının Belirlenmesi

Langmuir adsorpsiyon modeli bağlanma katsayılarının belirlenmesi için 3.2.10’da anlatılan deneyinden elde edilen veriler Microsoft Office Excel Solver fonksiyonu, OriginPro ve LMMpro programları ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda maksimum bağlama kapasitesi q_{max} (mg bağlanan metal/g biyokütle), bağlanma afinite katsayısı b (L/mg) ve regresyon katsayısı R^2 (deneyden elde edilen verilerin Langmuir Adsorpsiyon İzotermi Modeli’ne uyma derecesi) hesaplatılmıştır. Tüm deneylerin sonucunda elde edilen katsayılar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Materyal ve metot bölümünde belirtilmemekle birlikte *Lactobacillus rhamnosus* (HOLDBAC LC, Danisco) bakterisine ait Langmuir izoterm katsayıları da aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Laktik asit bakterilerinin Pb ve Cd bağlaması için Langmuir izoterminden elde edilen q_{max} ve b parametreleri

		Pb			Cd		
		q_{max}^a	b^b	$R^2, ^c$	q_{max}	b	R^2
ABT2	Canlı	73.0	0.66	0.934	24.4	0.24	0.967
	Cansız	45.6	2.29	0.956	30.9	0.51	0.977
BB12	Canlı	25.8	0.23	0.966	12.0	0.24	0.936
	Cansız	23.0	0.49	0.944	12.8	0.16	0.967
Dophilus	Canlı	75.1	4.26	0.934	16.4	2.05	0.947
	Cansız	68.2	0.94	0.929	28.1	0.77	0.957
L.acido	Canlı	70.2	4.23	0.935	20.0	0.14	0.876
	Cansız	54.4	2.05	0.899	29.0	0.28	0.959
LA5	Canlı	35.6	0.38	0.973	20.6	0.23	0.960
	Cansız	32.1	0.32	0.961	22.2	0.16	0.944
HOLDBAC	Canlı	54.9	3.84	0.971	24.5	0.13	0.962
	Cansız	47.8	0.48	0.952	32.5	0.22	0.924
YC350	Canlı	76.0	0.02	0.884	26.2	0.08	0.952
	Cansız	36.6	0.10	0.843	31.0	0.04	0.947
YOMix	Canlı	38.3	0.80	0.985	15.9	0.84	0.956
	Cansız	29.0	0.89	0.979	11.8	2.42	0.933

^a En yüksek bağlanma kapasitesi (mg/g), ^b Bağlanmaya ilişkin afinite sabiti (L/mg), ^c Regresyon katsayısı HOLDBAC (*Lactobacillus rhamnosus*, Danisco)

Tabloda ilk göze çarpan noktalardan biri, genel olarak kurşuna ait katsayıların tüm suşlarda daha yüksek olmasıdır. Bu durum Pb’nin Cd’ye göre daha fazla bağlanabildiğini göstermektedir ve bizim diğer analizlerimiz ile literatürdeki araştırmalarda da gözlemiştir [26], [91]. Genel olarak cansız ve canlı bakterilerin biyosorpsiyon kapasiteleri arasında büyük bir fark olmadığı görülmüştür. Canlı ve cansız hücrelerinin Pb biyosorpsiyonu arasında 2 kattan fazla fark gözlenen YC350 suşunda, hücrenin cansız hale getirildiği

kaynatma işleminin Pb'nin bağlandığı hücre duvarı bileşenlerine zarar verdiği düşünülmektedir.

Çizelge 4.1 aynı şekilde hücrelerin canlı ve cansız durumdaki bağlama kapasitelerinin farkını da göstermektedir. Bir diğer önemli bulgu da YOMix suşu haricinde test edilen suşların tamamında Cd biyosorpsiyonu kapasitesinin cansız hücrelerde daha yüksek olmasıdır. Canlı hücrelerin daha yüksek biyosorpsiyon kapasitesi gösterdiği Pb için ise tam tersi bir durum söz konusudur.

Bazı araştırmalarda ortaya konduğu üzere [92], kısmen hücre içine alınarak da bağlanabilen Cd'nin hücre içine girişi, hücrelerin cansız hale gelmesiyle kolaylaşıyor olabilir.

Öte yandan, bazı suşlara ait verilerdeki regresyon katsayılarının düşük olduğu, sonuçların Langmuir modeline iyi uymadığı görülmüştür. Bunun temel sebebi, suşa ait doygunluk (q_{max}) noktasının deneylerde kullanılan ağır metal konsantrasyonu aralığının dışında kalması olabilir. İlgili sonuçlara göre hazırlanmış grafikte lineer bir görünüm elde edilmesi de bu gözlemi teyit etmektedir.

En yüksek biyosorpsiyon kapasitesi Pb için, canlı durumdaki ABT2 (73 mg/g), Dophilus (75.1 mg/g), L.acido (70.2 mg/g) ve YC350 (76 mg/g) suşlarında gözlenmiştir. Halttunen ve ark. [26] tarafından 6 LAB suşu ve birden fazla LAB içeren 2 Starter kültürün Cd ve Pb biyosorpsiyon kapasitesinin belirlendiği benzer bir çalışmada; en yüksek biyosorpsiyon kapasiteleri Cd için 54.7 mg/g (*B. Longum* 46), Pb için 175.7 mg/g (*B. Longum* 46) olarak belirlenmiştir. Bizim de test ettiğimiz *B. lactis* BB12 ve *L. Rhamnosus* GG suşlarının biyosorpsiyon kapasiteleri Halttunen ve ark. [26] tarafından Cd için sırasıyla 32.1 – 34.2 mg/g ve 12.5 – 13.2 mg/g; Pb içinse 113.3 mg/g ve 46.8 – 107.4 mg/g olarak belirlenmiştir. *L. Rhamnosus*'un Cd biyosorpsiyon kapasitesi haricindeki değerler, bizim çalışmamızda bulduğlarımızda yüksektir.

YC350'ye ait q_{max} değeri de yüksek olmasına karşın, bu suşun Pb bağlama deneyinden elde edilen veriler Langmuir modeline uyarlandığında düşük regresyon katsayısı düşük olduğundan dolayı, elde edilen q_{max} katsayısını diğer suşlarla karşılaştırma yapmak için kullanmak yanıltıcı olabilir.

Regresyon katsayıları incelendiğinde, elde edilen verilerin genel anlamda Langmuir izotermine uygun olduğu görülmüştür. Langmuir izotermi çalışmamızda farklı LAB suşlarının canlı ve cansız hücrelerinin Cd ve Pb biyosorpsiyonu kapasitesilerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla faydalı bir araç olarak kullanılmıştır. Çizelgeden ayrıca ağır

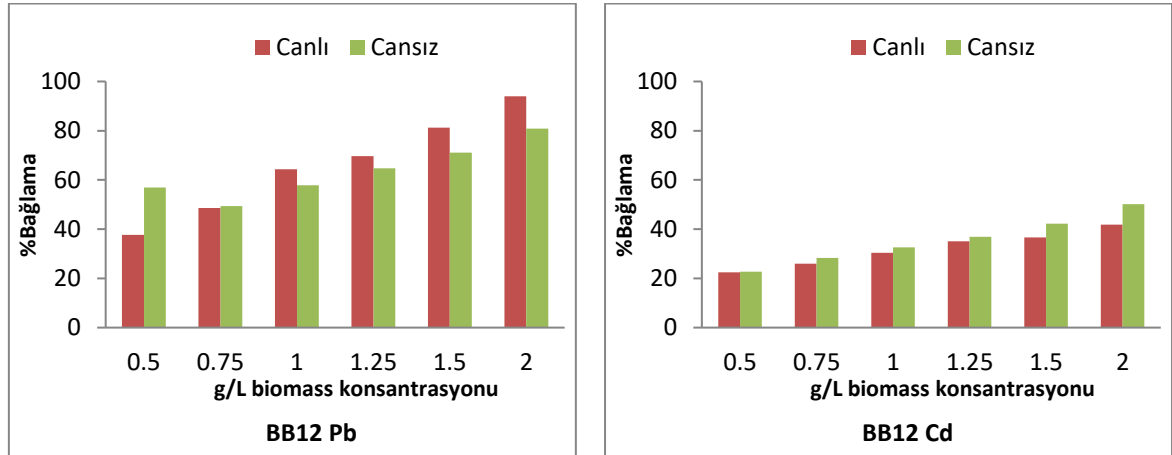
metallerin biyosorpsiyon yoluyla bağlanabilme kapasiteleri kıyaslanabilmektedir. Örneğin Pb için; farklı suşlara ait biyosorpsiyon kapasitelerinin (Cd'ye kıyasla) daha yüksek olması, hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasının ve peptidoglikana kovalent bağlı bileşenlerin ağır metal biyosorpsiyonunda önemli olduğunu düşündürmektedir.

Adsorban yüzeyinin tekdüze, tüm adsorpsiyon konumlarının denk olduğu; tüm adsorpsiyonun aynı mekanizmayla gerçekleştiği ve adsorbe edilen moleküller arasında interaksiyon olmadığı varsayımlarına dayanan Langmuir modeli [1], test ettiğimiz suşların Cd ve Pb biyosorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi için ideal bir modeldir.

Ağır metallerin başlangıç konsantrasyonu arttıkça uzaklaştırılan metal miktarının arttığı, ancak bağlama yüzdesinin düştüğü görülmüştür. Bu durum LAB'lerin ağır metalleri bağlayabileceği konumların sınırlı sayıda olduğunu ortaya koymaktadır.

4.6. Biyokütle Miktarının Bağlanmaya Etkisi

Farklı biyokütle konsantrasyonları (0.5 – 2 g/L) ile yapılan deneylerde, ortamdaki biyokütle miktarı arttıkça ortamdaki daha fazla ağır metalin uzaklaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bu durum hem kurşun hem de kadmiyumda aynı şekildedir. BB12 ile yapılan deneylerden elde edilen veriler biyokütle konsantrasyonunun artmasının bağlanmayı arttırdığını göstermektedir. Bu genel eğilim diğer bir çalışmada da verilmiştir [26]. Bu nedenle diğer suşlar için bu deneyin yapılmasına gerek duyulmamıştır.



Şekil 4.4. Biyokütle miktarının (konsantrasyonunu) biyosorpsiyona etkisini gösteren grafikler

Çözeltideki biyokütle konsantrasyonunun spesifik alımı etkilediği diğer çalışmalarda da gösterilmiştir [1], [26]. Hücreler arasındaki elektrostatik etkileşimin de metal alımında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Çok yüksek biyokütle konsantrasyonu bağlanma

konumları arasında girişime neden olmakta ve metal iyonlarının bağlanma konumlarına erişimini engelleyebilmektedir.

Bazı çalışmalar bu etkiyi, düşük biyosorbent miktarının düşük uzaklaştırma etkisi ve yüksek alımla ilişkili olduğunu ifade ederek açıklamıştır [69]. Çok yüksek biyokütle konsantrasyonlarında test yapmadığımız için bizim çalışmamızda bu etki gözlenmemiştir.

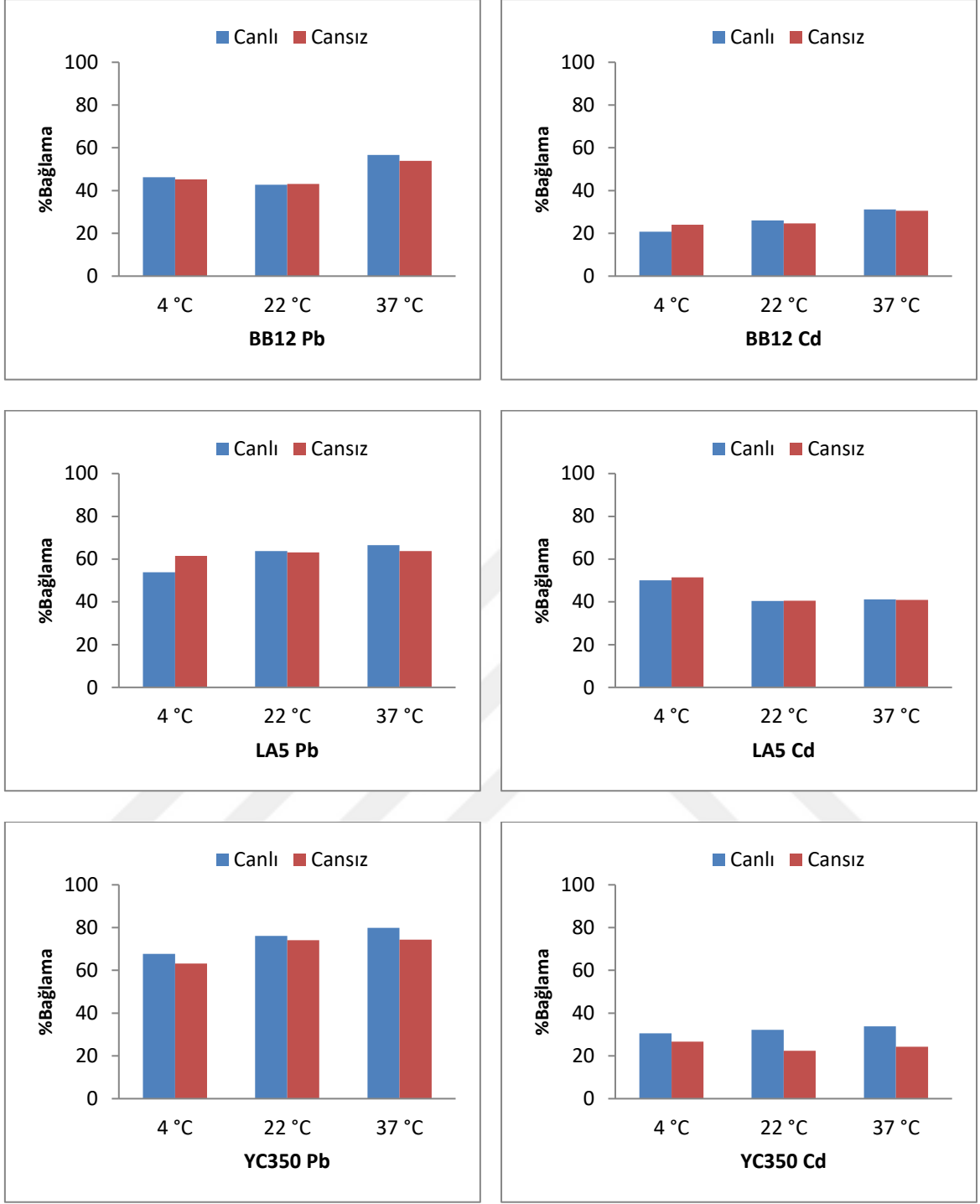
Literatür çalışmalarında; biyosorpsiyon kapasitesinin ortam pH'sına göre biyosorbent konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artabileceği gibi bazı pH değerlerinde biyosorbent konsantrasyonundaki değişimin biyosorpsiyonu etkilemediği de gözlenmiştir [93].

4.7. İnkübasyon Sıcaklığının Bağlanmaya Etkisi

Bakteriler farklı sıcaklıklarda inkübasyona tabi tutularak, sıcaklığın bağlama üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Deneyler YC350, LA5 ve BB12 suşları ile; 4, 22 ve 37 °C sıcaklıklarda; Pb ve Cd için yapılmış ve tüm diğer parametreler sabitken, sıcaklığın biyosorpsiyon işleminde sınırlı düzeyde de olsa etkileri olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).

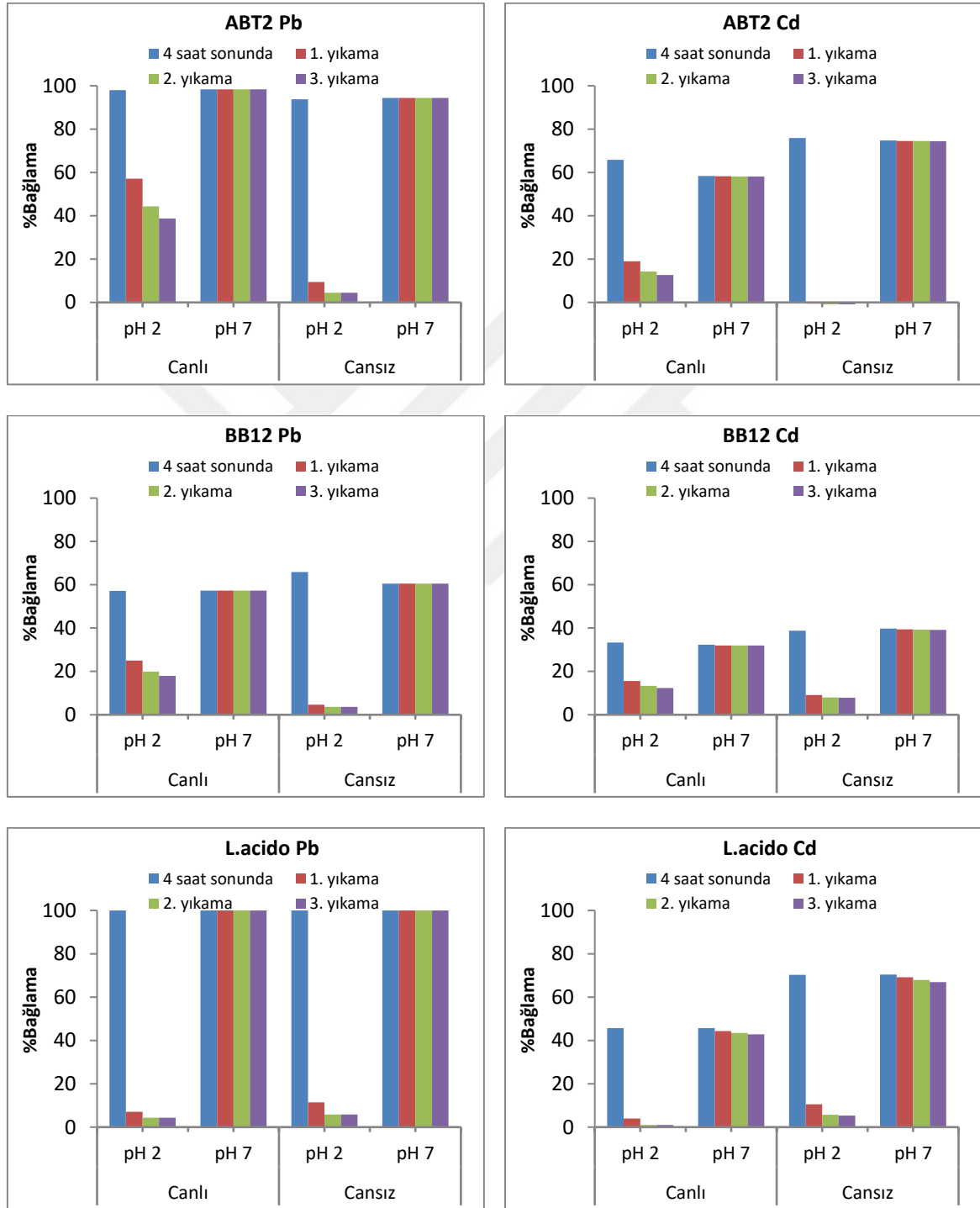
Canlı hücrelerin 37 °C sıcaklıkta yapılan inkübasyonda bağladığı ağır metal miktarının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Cansız hücrelerde bu durumun geçerliliği ikna edici şekilde orya konamamış, inkübasyon sıcaklığı ve bağlama miktarı arasında tutarlı bir ilişki tespit edilememiştir. Deneylerden elde ettiğimiz veriler, sıcaklığın biyosorpsiyon üzerinde etkili olduğunu, ancak bu etkinin belirli bir sıcaklık aralığında (4 - 37 °C) sınırlı olduğu göstermiştir. Bu bulgu diğer çalışmalarda da bildirilmiş [82], özellikle 20 – 30 °C sıcaklık aralığında biyosorpsiyon etkinliğinin değişmediği ortaya konmuştur. Bazı çalışmalarda [1] adsorpsiyon reaksiyonlarının ekzotermik olması nedeniyle adsorpsiyon derecesinin sıcaklığın düşmesiyle birlikte arttığı ifade edilse de, elde ettiğimiz sonuçlarda böyle bir eğilime rastlanmamıştır.



Şekil 4.5. Ortam sıcaklığının biyosorpsiyon kapasitesine etkisini gösteren grafikler.

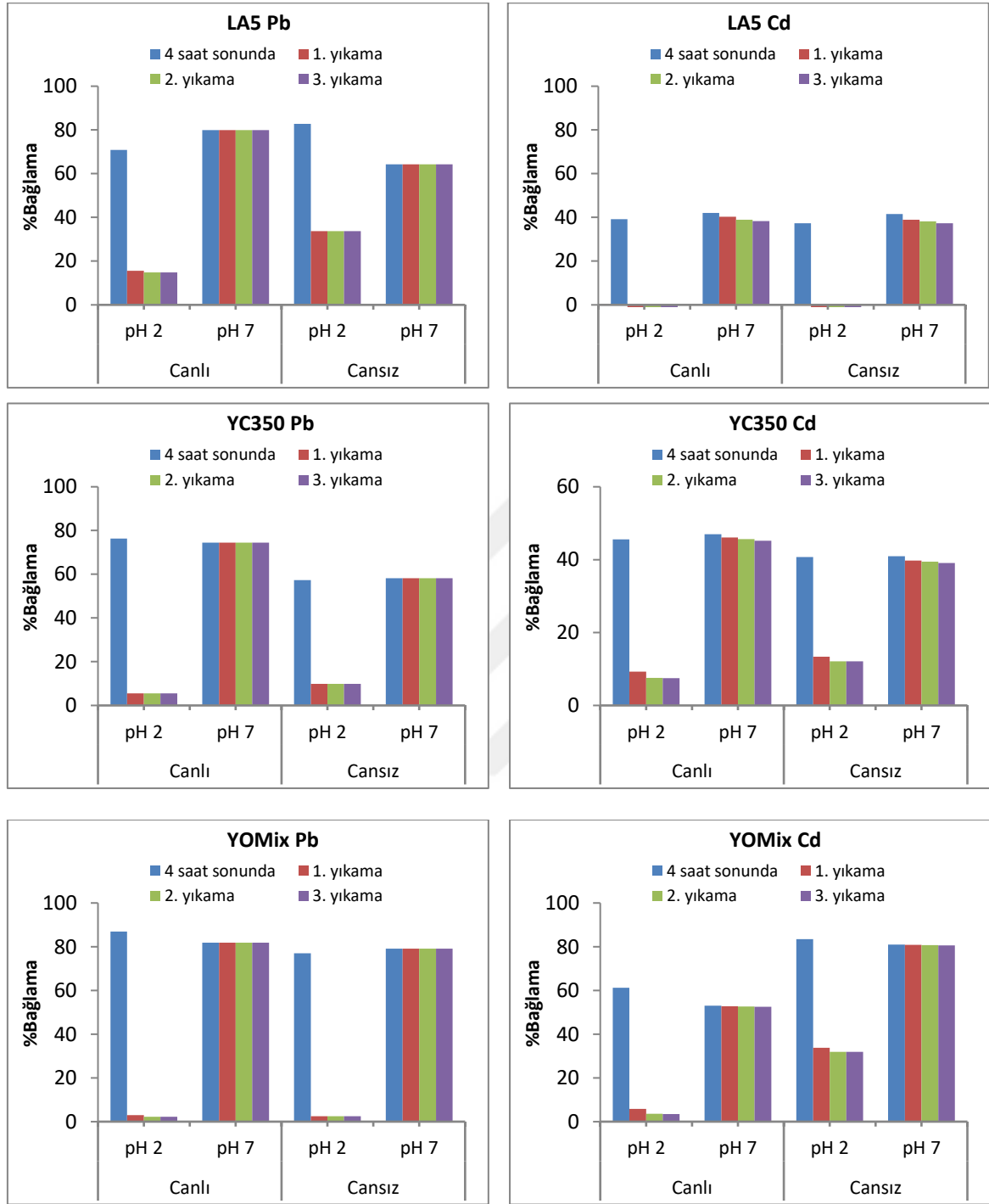
4.8. Bağlanma Stabilitesi

pH değeri 2 ve 7 olarak ayarlanan çözeltilerle ağır metalin bağlanma stabilitesini belirlemek amacıyla 3'er kez yıkama yapılmış, her yıkama ile hücrelerin bağladığı ağır metalin ne kadarını bıraktığı belirlenmiştir. LAB'lerin bağlanma stabilitelerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı pH değerlerindeki bağlanma stabilitelerine ilişkin grafikler

Şekil 4.6 devam ediyor



Şekil 4.6 Farklı pH değerlerindeki bağlanma stabiliteğine ilişkin grafikler.

Deneylerin tamamına bakıldığında, pH 2’de yapılan yıkama işlemi ile hücrelerin bağlamış olduğu ağır metali büyük oranda bıraktığı görülmektedir. Düşük pH değerlerinde; HNO₃ ve EDTA gibi asidik özelliğe sahip maddelerle yıkanan biyokütlelerde bağlı halde bulunan Cd

ve Pb'nin desorbe olduğuna ilişkin bulgularımız ağır metallerin geri kazanımına ilişkin çalışmalarda da teyit edilmiştir [73].

pH 7 ile yıkamada bağlanmanın oldukça stabil olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu da diğer çalışmalarla tutarlıdır [94]. Düşük pH değerlerine inildikçe stabilite azalmakta, bağlanmış olan ağır metaller desorbe olarak ortama salınmaktadır.

Ağır metal bağlamış olan hücrelerin düşük pH ortamına alındığı deneylerden elde ettiğimiz veriler, biyosorpsiyon işleminin tersinir olduğunu göstermektedir.

Bakterilerin hücre yüzeyi pH 3 – 10 arasında genellikle ve ağırlıklı olara negatif yüklüdür. Ph 3'ün altında ise pozitif olurlar. Dolayısıyla asidik ortamda pozitif yüklü metal iyonları hücre duvarlarında tutunamazlar. Bağlanmanın pH 7'de stabil olup, pH 2'de bağlanmış olan ağır metallerin desorbe olmasının nedeni bu şekilde açıklanabilir.

Öte yandan, pH 2'de yapılan yıkamalarda da farklı bağlanma stabilitesi özellikleri gözlenmiştir.

pH 2 çözeltisinde yıkanan bazı bakteriler bağladığı ağır metali ilk yıkamada büyük oranda bırakırken, bazı bakterilerde yıkamalardaki desorpsiyon oranı daha düşük kalmıştır. Bağlanma stabilitesinin yüksek olması, sindirim sisteminde düşük pH değerleriyle karşılaşan suşun göstereceği biyosorpsiyon performansının da daha iyi olabileceğini öngörmektedir.

Canlı ve cansız hücrelerin bağlama stabilitesinde, YOMix ve L.acido suşlarının Cd bağlama stabilitesi haricinde önemli bir fark görülmemiştir.

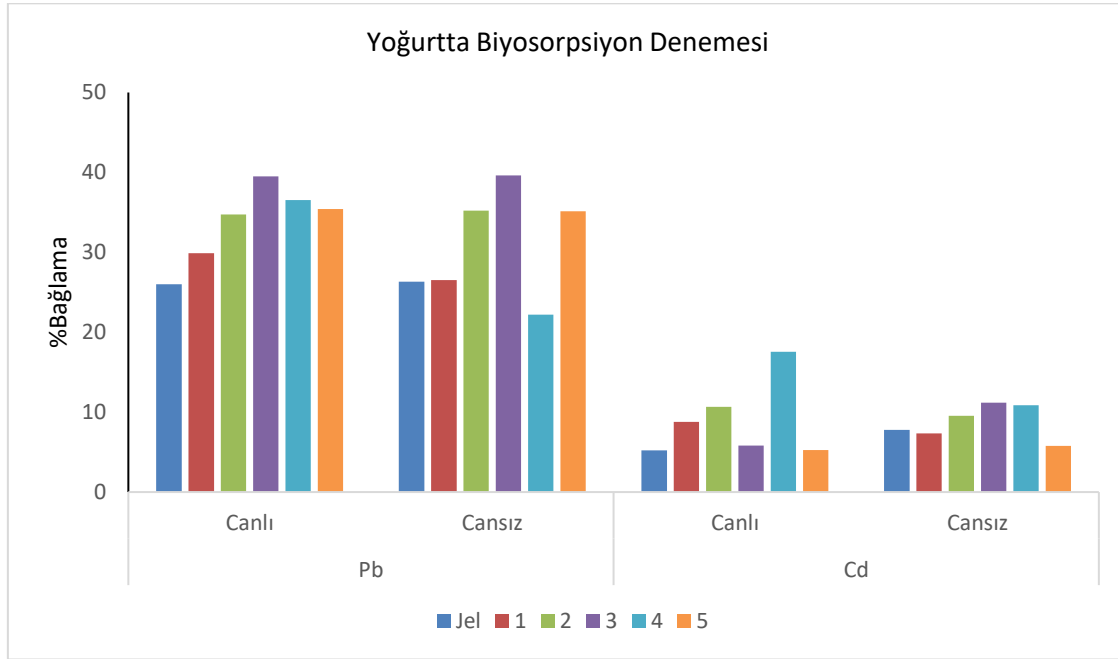
4.9. Farklı Suşlarla Hazırlanan Yoğurtların Biyosorpsiyon Kapasiteleri

Şekil 4.7'de farklı suşlarla hazırlanan yogurt örneklerinde biyosorpsiyon kapasiteleri verilmiştir.

Pb'nin deneylerin tamamına yakınında olduğu gibi Cd'den fazla bağlandığı görülmüştür. Canlı ve cansız hücreler arasında belirgin bir farka gözlenmemiştir.

YC350 ve L.acido ile hazırlanan yogurt Cd için jelden daha düşük biyosorpsiyon kapasitesi göstermiştir. Bu dikkat çekici bir bulgudur. Bu durumun sebebi olarak bağlanma konumlarının rekabeti gösterilebilir.

Bu sonuçlar, ağır metal biyosorpsiyon kapasitesi yüksek bir yogurt ürünü hazırlanırken suş veya suş kombinasyonu seçiminin ne kadar önemli olduğunu ve bu amaçla bir ürün üretilmeden önce mutlaka suşlara ait biyosorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.7. Farklı LAB suşları ile hazırlanan yoğurt ve laktik asitle koagüle edilen süt jelinin biyosorpsiyon kapasiteleri

Jel: Laktik asitle koagüle edilmiş süt jeli (pH 4.44)

1 YC350 ile hazırlanmış yoğurt (pH 4.35)

2 YOMix ile hazırlanmış yoğurt (pH 4.42)

3 ABT2 ile hazırlanmış yoğurt (pH 4.45)

4 YC350 ve ABT2 ile hazırlanmış yoğurt (pH 4.40)

5 YC350 ve L.acido ile hazırlanmış yoğurt (pH 4.30)

4.10. Model Sindirim Sistemi Deneyleri

Diğer deneylerden elde ettiğimiz veriler ışığında pH'nın biyosorpsiyon işlemini en çok etkileyen ortam koşulu olduğu görülmüştür. Literatürdeki diğer çalışmalar da bu gözlemi desteklemektedir [1]. Bu gözle bakıldığında model sindirim sistemi koşullarının LAB'lerin ağır metal biyosorpsiyonu için zorlayıcı koşullara sahip olduğu anlaşılmaktadır. Zira, toplam 4 saat 5 dakikalık temas süresinin ilk 5 dakikadan sonraki 2 saati (mide) pH 2-3 aralığında, son 2 saati de pH 6.7 – 7 koşullarında geçmektedir. Bahsedilen her iki pH aralığı da farklı nedenlerle biyosorpsiyon için ideal olmayan koşullardır. Çizelge 4.2'de *in vitro* koşullarda belirlediğimiz bazı suşların ve kontrollerin (su, aktif karbon, süt) Pb ve Cd bağlama yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı LAB suş, suş kombinasyonları, süt ve aktif karbon için model sindirim sisteminden elde edilen yüzde bağlama değerleri (%)

	Pb		Cd	
	Canlı	Cansız	Canlı	Cansız
Aktif Karbon (Kontrol)		57.93		28.32
Süt (Kontrol)		36.72		23.34
Su (Kontrol)		22.86		21.04
YC350	49.31	47.51	35.90	33.56
ABT2	66.02	51.53	45.51	39.79
Dophilus	64.04	51.49	38.79	37.13
YC350 + ABT2	51.32	50.10	39.62	38.51
YC350 + Doph	51.73	49.96	38.87	37.86
Yoğurt 1 (YC350)	47.80	46.97	26.89	25.21
Yoğurt 2 (YC350 + ABT2)	50.27	52.40	30.07	31.29

Daha önce de belirttiğimiz gibi, yüksek pH değerlerinde ağır metaller çökelti oluşturabilmektedir. Pb için bu etki daha pH 5'ten itibaren kademeli olarak gözlenmektedir [72]. Düşük pH ise literatürdeki birçok çalışmada olduğu gibi [95] bizim çalışmamızda da ortaya konduğu şekilde, biyosorpsiyon oranını düşürmektedir. Buradan hareketle, bir miktar ağır metalin saliva ile temas ettiği kısa sürede bağlandığı, düşük pH 3'ün altındaki mide sıvısı ortamında bağlanma gerçekleşmediği, mideden sonra pH'ın arttığı kısımda ise bağlanmanın gerçekleştiği düşünülmektedir.

Tüm bu koşullara rağmen, yüksek biyosorpsiyon performansı nedeniyle model sindirim sistemi denemelerinde kullanmak üzere seçtiğimiz LAB suşları iyi bir biyosorpsiyon performansı göstermiş, beslenme yoluyla vücuda alınan ağır metallerin emilimini azaltabilecekleri ispatlamıştır. Diğer çalışmalarda kazeinin yüzeye ağır metal bağlama kapasitesinin pH ile yakından ilişkili olduğu, kazeinin yüksek pH değerlerinde ağır metalleri daha iyi bağladığı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda pH 3'ün altındaki pH değerlerinin metal iyonu sorpsiyonunu önlediği, bu koşullarda kazein yüzeyine bağlanabilen metal iyonlarının önemsiz sayılacak kadar düşük miktarda olduğu gözlenmiştir [96]. Aynı çalışmada metal iyonlarının kazein tarafından bağlanmasının tersinir olmayan ve endotermik bir özellikte olduğu ortaya konmuştur. Buradan hareketle, bir miktar ağır metalin kazein başta olmak üzere süt ve yoğurt matriksindeki bileşenler tarafından bağlandığı düşünülmektedir.

Bir miktar bağlamanın da kontrol örneğinde (yalnızca su içeren) tespit edilmesi, sindirim sıvılarında bulunan madde ve bileşenlerin de bağlamaya katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Besin zincirinde ve çevrede yer alan Cd ve Pb kalıntıları insan sağlığı için ciddi bir tehdit arz etmektedir. Birçok doğal kaynaktaki Cd ve Pb kalıntı miktarı düşük olmasına rağmen, uzun dönemli maruz kalma, insan ve hayvan sağlığını tehlikeye atmaktadır.

Dünyadaki birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede çevrede bulunan toksik ağır metal konsantrasyonunun belirlenmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Devletler ve uluslararası kuruluşlar tarafından yapılan ağır metal toksisitesini azaltma çalışmaları genellikle çevreye bulaşmayı önleme odaklıdır. Bu çalışmalar ağır metal bulaşısının seviyesini azaltmakta bir dereceye kadar etkili olabilmekte ancak endüstriyel faaliyetler kaçınılmaz şekilde bir miktar ağır metalin çevreye yayılmasına yol açmaktadır. Buradan hareketle, insan ve hayvanların ağır metal toksisitesinden korunması için ağır metal bulaşısının önlenmesi haricinde başka önlemlere de ihtiyaç vardır.

Örneğin, yapılan bir araştırmada [97] endüstriyel faaliyetler nedeniyle kirlenen yemlerle beslenen ineklerin sütlerindeki kurşun konsantrasyonunun 0.20 µL/ml'ye kadar çıkabildiği belirlenmiştir.

Ağır metalleri bağlayabilen LAB'ler bu noktada devreye girmektedir. Bu tezde, düşük seviyelerde ağır metal bulunan olan gıdaların yanında, yoğurt matriksi ile vücuda alınan LAB'lerin biyosorpsiyon yoluyla ağır metalleri bağlayabileceği ve toksik metallerin sindirim sistemi tarafından emilmeden dışkı yoluyla vücuttan uzaklaşabileceği hipotezi test edilmiştir. Aynı zamanda farklı LAB suşlarının biyosorpsiyon performansı da değişen ortam koşullarında incelenmiş, biyosorpsiyon kapasitesi yüksek LAB içeren bir ürün üretilmesi için veri toplanmıştır.

Elde edilen veriler sayesinde biyosorpsiyon kapasitesi yüksek LAB'leri içeren yoğurtların düzenli tüketimi ile toplum sağlığı ağır metal toksisitesinden korunacak, ağır metal bulaşısı konusunda özellikle riskli meslek gruplarına alternatif bir biyo-tedavi yöntemi ve önlem sağlanabilecektir.

Yapılan tüm çalışmalar neticesinde LAB hücrelerinin yüksek miktarda Pb ve Cd metal iyonlarını bağlama kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada test ettiğimiz tüm bakteri suşları, suda bulunan düşük konsantrasyonlardaki Cd ve Pb ağır metallerini biyosorpsiyon yoluyla bağlamada etkili olmuştur. Model sindirim sisteminde yapılan çalışmalarda gözlenen bağlama yüzdeleri, sindirimdeki belli aşamaların pH değerlerinin

biyosorpsiyon işlemi için ideal olmamasına rağmen, LAB'lerin ağır metal toksisitesinden kısmende olsa koruyucu etki gösterdiğini söylemek için yeterlidir.

Böyleyse LAB'nin hem *in vivo* hem *in vitro* şartlarda sıvı ortamdan ağır metal uzaklaştırmak amacıyla kullanılabileceği kaydedilmiştir. Diğer çalışmalar da bu bulguyu desteklemektedir [98]. Son dönemde yapılan bazı *in vivo* çalışmalarda, belirli LAB suşlarının farelerde [27], [99] ve tavuklarda [100] kurşun toksisitesini azalttığına ilişkin sonuçlar ortaya konmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlar çerçevesinde, biyosorpsiyon kapasitesi yüksek LAB suşlarının, gıda ve içecekler yoluyla sindirim sistemine giren Pb ve Cd'nin emilmeden vücuttan uzaklaşmasına katkıda bulunduğu söylenebilir.

Bizim çalışmamızda LAB'lerin yalnızca ağır metallere yönelik biyosorpsiyon kapasitesi test edilmiş olsa da, aynı bakteri grubunun aflatoksin gibi beslenme yoluyla vücuda alınabilen bir diğer önemli toksik madde grubunu da benzer şekilde bağladığı bilinmektedir [33], [101].

Yoğurt tüketiminin kültürel olarak oldukça yüksek olduğu ülkemizde, yaygın tüketilen ve uygun fiyatlı bir gıda ürünü yoluyla halk sağlığının ağır metal ve aflatoksin gibi maddelerin toksik etkilerinden korunmak kısmen de olsa mümkündür.

Gıda endüstrisinde de güvenli ve kolay bir biçimde kullanılabilen ve sağlık üzerinde daha birçok olumlu etkilere sahip LAB'lerin daha yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip suşlarının geliştirilerek yoğurt başta olmak üzere fermente gıdalar yoluyla topluma sağlanması önemli bir toplum sağlığı stratejisi olarak değerlendirilebilir. Yapılan çalışmalarda, mikroorganizmalardaki ağır metal bağlamakta ilişkili genlerin diğer mikroorganizmalara aktarılabileceği ve biyosorpsiyon kapasitesinin geliştirilebileceği belirlenmiştir [102].

Buradan hareketle, gelecekte, insan ve hayvan sağlığını korumak amacıyla daha yüksek ağır metal bağlaması potansiyeline sahip suşların geliştirilmesini önermekteyiz. Bu noktada, LAB'ler sindirim sisteminde midedeki düşük pH değeri ve sonrasında safra tuzları gibi zorlayıcı koşullarla karşılaştığından, geliştirilecek veya seçilecek suşların asit ve safra gibi sindirim sıvılarına dirençli olması önemli bir koşuldur. Literatürde metallere dirençli LAB suşlarının izole edilmesi ve tanımlanması üzerine yapılmış bir çalışma bulunmaktadır [28]. Benzer bir çalışma yoğurtta kullanılabilecek suşlar için de yapılabilir.

Farklı suşların Cd – Pb bağlanma önceliği deneylerinde, her iki metalin biyosorpsiyonun ayrı ayrı belirlendiği deneylere kıyasla farklı sonuçlar vermesi, suşların hücre duvarında

kendine özgü peptidoglikan tabakasına ve peptidoglikana kovalent bağılı bileşenlere sahip olduğunu, bunların da ağır metal biyosorpsiyonunda önemli olduğunu göstermektedir.

Bazı çalışmalarda ağır metal varlığının mikroorganizmaların canlılığı üzerine etkisi incelenmiş ve mikroorganizmaların ağır metal varlığı nedeniyle inhibe olabildiği gösterilmiştir. Çalışmamızın tamamında hem canlı hem de cansız bakterilerin biyosorpsiyon özelliklerini test ederek LAB'lerin ağır metal biyosorpsiyonunda canlılığın önemli olup olmasının test edilmiş olup, cansız hücrelerin de biyosorpsiyon yaptığı tespit edilmiştir.

Hesaplamalarımız neticesinde, literatürdeki birçok çalışmada çeşitli ağır metallerin biyokütleler tarafından biyosorpsiyonunu modellemek için kullanılan Langmuir izoterminin verilerimiz için de uygun bir model olduğu görülmüştür. Buradan hareket bizim çalışmamızda da farklı suşların biyosorpsiyon kapasitesilerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla faydalı bir araç olarak kullanılmıştır.

Özetle, elde ettiğimiz sonuçlar gıdalarda kullanmaya uygun LAB'lerin, özellikle probiyotik suşlarının, Cd ve Pb biyosorpsiyonunu hızlı bir şekilde yapabildiğini ve uygun bir dekontaminasyon aracı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızdaki LAB suşlarının (özellikle biyosorpsiyon kapasitesinin yüksek olduğu tespit edilenler) yoğurt matriksinde kontamine bir beslenmeye dahil edilmesi, toksik ağır metallerin bir kısmının sindirim sisteminden emilmeden geçmesini ve dışkıyla vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Abbas, S. H., Ismail, I. M., Mostafa, T. M., Sulaymon, A. H., "Biosorption of Heavy Metals: A Review," *Journal of Chemical Science and Technology*, vol. 3, no. October, pp. 74–102, **2014**.
- [2] Almela, C., Algora, S., Benito, V., Clemente, M. J., Devesa, V., Súñer, M. A., Vélez, D., Montoro, R., "Heavy metal, total arsenic, and inorganic arsenic contents of algae food products," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 4, pp. 918–923, **2002**.
- [3] Yazkan M., F. Özdemir., M. G., "Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacea caught in the Gulf of Antalya.," *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 28, pp. 95–100, **2004**.
- [4] Halttunen, T., Kankaanpää, P., Tahvoenen, R., Salminen, S., Ouwehand, A. C., "Cadmium Removal by Lactic Acid Bacteria," *Bioscience and Microflora*, vol. 22, no. 3, pp. 93–97, **2003**.
- [5] Topcu, A., Bulat, T., "Removal of cadmium and lead from aqueous solution by Enterococcus faecium strains," *Journal of Food Science*, vol. 75, no. 1, pp. T13–T17, **2010**.
- [6] Wang, J., Chen, C., "Biosorbents for heavy metals removal and their future," *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 2, pp. 195–226, **2009**.
- [7] Zhong, L., Zhang, X., Covasa, M., "Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 24. Baishideng Publishing Group Inc, pp. 7878–7886, **2014**.
- [8] Gratz, S., "Aflatoxin Binding by Probiotics. Experimental Studies on Intestinal Aflatoxin Transport , Metabolism and Toxicity," University of Kuopio, **2007**.
- [9] Kumar, N., Kumari, V., Ram, C., Thakur, K., Tomar, S. K., "Bio-prospectus of cadmium bioadsorption by lactic acid bacteria to mitigate health and environmental impacts," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 102, no. 4, pp. 1599–1615, **2018**.
- [10] Wright, A. Von, Axelsson, L., "Lactic acid bacteria: an introduction," in *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, Fourth Edi., A. von W. Sampo Lahtinen, Arthur C. Ouwehand, Seppo Salminen, Ed., pp. 1–16., **2011**
- [11] Halttunen, T., "Removal of Cadmium , Lead and Arsenic From Water By Lactic Acid," PhD Thesis, University of Turku, Finland, **2007**.
- [12] Volesky, B., *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, **1990**.
- [13] Naumann, D., Barnickel, G., Bradaczek, H., Labischinski, H., Giesbrecht, P., "Infrared spectroscopy, a tool for probing bacterial peptidoglycan. Potentialities of infrared spectroscopy for cell wall analytical studies and rejection of models based on crystalline chitin.," *European journal of biochemistry*, vol. 125, no. 3, pp. 505–15, **1982**.
- [14] Volesky, B., Holan, Z. R., "Biosorption of Heavy Metals," *Biotechnology Progress*, vol. 11, no. 3. pp. 235–250, **1995**.
- [15] McLean, R. J. C., Beveridge, T. J., "Metal Binding capacity of bacterial surfaces and their ability to form mineralized aggregates," *Microbial Mineral Recovery*, pp. 185–

222, **1990**.

- [16] Tamime, A. Y., Robinson, R. K., *Tamime and Robinsons's yoghurt science and technology*. CRC, **2007**.
- [17] Freitas, M., "The Benefits of Yogurt, Cultures, and Fermentation," in *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, Elsevier, pp. 209–223, **2017**.
- [18] Buttriss, J. L., "Food and nutrition: attitudes, beliefs, and knowledge in the United Kingdom," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 65, no. 6, p. 1985S–1995S, **1997**.
- [19] Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (Richard K., *Yoghurt : science and technology*. CRC Press, **1999**.
- [20] Özer, B., *Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi*, 1. Baskı. **2006**.
- [21] Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission., B. L. (ed. ., Smith, B. L., Joint FAO/WHO Food Standards Programme., *Codex alimentarius : abridged version*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **1990**.
- [22] Gilliland, S. E., "Properties of yoghurt.," in *Therapeutic Properties of Fermented Milks*, R. K. Robinson, Ed., pp. 81–116, **1991**.
- [23] Tamime, A. Y., Marshall, V. M. E., "Microbiology and technology of fermented milks," in *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Boston, MA: Springer US, pp. 57–152 , **1997**.
- [24] Mattila-Sandholm, T., Mättö, J., Saarela, M., "Lactic acid bacteria with health claims—interactions and interference with gastrointestinal flora," *International Dairy Journal*, vol. 9, no. 1, pp. 25–35, **1999**.
- [25] Sellars, L. R., "Acidophilus Products," *Therapeutic Properties of Fermented Milks*, pp. 81–116, **1991**.
- [26] Halttunen, T., Salminen, S., Tahvonen, R., "Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 114, no. 1, pp. 30–35, **2007**.
- [27] Yi, Y. J., Lim, J. M., Gu, S., Lee, W. K., Oh, E., Lee, S. M., Oh, B. T., "Potential use of lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* as a probiotic for the removal of Pb(II) toxicity," *Journal of Microbiology*, vol. 55, no. 4, pp. 296–303, **2017**.
- [28] Bhakta, J. N. N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., Wei, M. Q. Q., "Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 112, no. Iarc 1994, pp. 1193–1206, **2012**.
- [29] WHO, *WHO guidelines for drinking-water quality. Volume 1 - Recommendations*, vol. 38, no. 3. **2006**.
- [30] Smedley, P. L., Kinniburgh, D. G., "A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters," *Applied Geochemistry*, vol. 17, no. 5, pp. 517–568, **2002**.
- [31] Davis, T. A., Volesky, B., Mucci, A., "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae," *Water Research*, vol. 37, no. 18, pp. 4311–4330, **2003**.
- [32] Holan, Z. R., Volesky, B., "Biosorption of Heavy Metals: Review," *Biotechnology Progress*, vol. 11, no. 3, pp. 235–250, **1995**.

- [33] Topcu, A., Bulat, T., Wishah, R., Boyacı, I. H., "Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 139, no. 3, pp. 202–205, **2010**.
- [34] Göksungur, Y., Üren, S., Güvenç, U., Uren, S., Güvenç, U., "Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass.," *Bioresource technology*, vol. 96, no. 1, pp. 103–9, **2005**.
- [35] Fischer, A. B., Georgieva, R., Nikolova, V., Halkova, J., Bainova, A., Hristeva, V., Penkov, D., Alandjiisk, D., "Health risk for children from lead and cadmium near a non-ferrous smelter in Bulgaria," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 206, no. 1, pp. 25–38, **2003**.
- [36] Florea, R. M., Stoica, A. I., Baiulescu, G. E., Capotă, P., Capotă, P., "Water pollution in gold mining industry: A case study in Roşia Montană district, Romania," *Environmental Geology*, vol. 48, no. 8, pp. 1132–1136, **2005**.
- [37] Al-Saleh, I., Al-Doush, I., "Survey of trace elements in household and bottled drinking water samples collected in Riyadh, Saudi Arabia," *Science of The Total Environment*, vol. 216, no. 3, pp. 181–192, **1998**.
- [38] Barton, H., "Predicted intake of trace elements and minerals via household drinking water by 6-year-old children from Kraków, Poland. Part 2: Cadmium, 1997-2001.," *Food Additives and Contaminants*, vol. 22, no. 9, pp. 816–28, **2005**.
- [39] Seifert, B., Becker, K., Helm, D., Krause, C., Schulz, C., Seiwert, M., "The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): reference concentrations of selected environmental pollutants in blood, urine, hair, house dust, drinking water and indoor air.," *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology*, vol. 10, no. 6 Pt 1, pp. 552–565, **2000**.
- [40] Rajaratnam, G., Winder, C., An, M., "Metals in drinking water from new housing estates in the Sydney area.," *Environmental Research*, vol. 89, no. 2, pp. 165–70, **2002**.
- [41] Appleton, J., Williams, T., "Fluvial contamination associated with artisanal gold mining in the Ponce Enriquez, Portovelo-Zaruma and Nambija areas, Ecuador," *Water, Air, and Soil Pollution*, **2001**.
- [42] Woo, N. C., Choi, M. J., "Arsenic and metal contamination of water resources from mining wastes in Korea," *Environmental Geology*, vol. 40, no. 3, pp. 305–311, **2001**.
- [43] Linnik, P. N., "Complexation as the most important factor in the fate and transport of heavy metals in the Dnieper water bodies," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 376, no. 3, pp. 405–412, **2003**.
- [44] Kasuya, M., Teranishi, H., Aoshima, K., Katoh, T., Horiguchi, H., Morikawa, Y., Nishijo, M., Iwata, K., "Water Pollution by Cadmium and the Onset of Itai-itai Disease," *Water Science and Technology*, vol. 25, no. 11, **1992**.
- [45] Satarug, S., Moore, M. R., "Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke.," *Environmental health perspectives*, vol. 112, no. 10, pp. 1099–103, **2004**.
- [46] Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., Vahter, M., "Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate," *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, vol. 1, pp. 1–52, **1998**.

- [47] Järup, L., Alfvén, T., “Low level cadmium exposure, renal and bone effects - The OSCAR study,” in *BioMetals*, vol. 17, no. 5, pp. 505–509, **2004**.
- [48] Wu, X., Jin, T., Wang, Z., Ye, T., Kong, Q., Nordberg, G., “Urinary calcium as a biomarker of renal dysfunction in a general population exposed to cadmium,” *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine*, vol. 43, no. 10, pp. 898–904, **Oct. 2001**.
- [49] Chalkley, S. R., Richmond, J., Barltrop, D., “Measurement of vitamin D3 metabolites in smelter workers exposed to lead and cadmium,” *Occupational and environmental medicine*, vol. 55, no. 7, pp. 446–52, **1998**.
- [50] Michael P, W., “Cadmium carcinogenesis in review,” *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 79, no. 1–4, pp. 241–244, **2000**.
- [51] WHO, FAO, “Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Sixty-first meeting. Summary and conclusions. World Health Organization, Geneva. JECFA. 2003 Safety evaluation of certain food additives and contaminants,” no. 52, p. 22, **2003**.
- [52] Omarova, A., Phillips, C. J. C., “A meta-analysis of literature data relating to the relationships between cadmium intake and toxicity indicators in humans,” *Environmental Research*, vol. 103, no. 3, pp. 432–440, **2007**.
- [53] Smedley, P. L., Nicolli, H. B., Macdonald, D. M. J., Barros, A. J., Tullio, J. O., “Hydrogeochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwaters from La Pampa, Argentina,” **2002**.
- [54] Miller, J. R., Hudson-Edwards, K. A., Lechler, P. J., Preston, D., Macklin, M. G., “Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Río Pilcomayo basin, Bolivia,” *Science of the Total Environment*, vol. 320, no. 2–3, pp. 189–209, **2004**.
- [55] Lee, J. Y., Choi, J. C., Lee, K. K., “Variations in heavy metal contamination of stream water and groundwater affected by an abandoned lead–zinc mine in Korea,” *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 27, no. 3, pp. 237–257, **2005**.
- [56] Fertmann, R., Hentschel, S., Dengler, D., Janßen, U., Lommel, A., “Lead exposure by drinking water: an epidemiological study in Hamburg, Germany,” *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 207, no. 3, pp. 235–244, **2004**.
- [57] Barton, H., Zachwieja, Z., Foltá, M., “Predicted intake of trace elements and minerals via household drinking water by 6-year-old children from Kraków (Poland). Part 1: Lead,” *Food Additives and Contaminants*, vol. 19, no. 10, pp. 906–915, **2002**.
- [58] Balls, P. W., “The control of trace metal concentrations in coastal seawater through partition onto suspended particulate matter,” *Netherlands Journal of Sea Research*, vol. 22, no. 3, pp. 213–218, **1988**.
- [59] Zarazua, G., Ávila-Pérez, P., Tejeda, S., Barcelo-Quintal, I., Martínez, T., “Analysis of total and dissolved heavy metals in surface water of a Mexican polluted river by total reflection X-ray fluorescence spectrometry,” *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 61, no. 10–11, pp. 1180–1184, **2006**.
- [60] Chrastny, V., Komarek, M., Tlustos, P., Svehla, J., “Effects of flooding on lead and cadmium speciation in sediments from a drinking water reservoir,” *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 118, no. 1–3, pp. 113–123, **2006**.

- [61] Sanders, M. E., "Lactic Acid Bacteria as Promoters of Human Health," in *Functional Foods*, Boston, MA: Springer US, pp. 294–322, **1994**.
- [62] Barbosa, F., Tanus-Santos, J. E., Gerlach, R. F., Parsons, P. J., "A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs.," *Environmental health perspectives*, vol. 113, no. 12, pp. 1669–74, **2005**.
- [63] Tripathi, R., Raghunath, R., Mahapatra, S., Sadasivan, S., "Blood lead and its effect on Cd, Cu, Zn, Fe and hemoglobin levels of children," *Science of The Total Environment*, vol. 277, no. 1–3, pp. 161–168, **2001**.
- [64] Weaver, V. M., Jaar, B. G., Schwartz, B. S., Todd, A. C., Ahn, K. D., Lee, S. S., Wen, J., Parsons, P. J., Lee, B. K., "Associations among lead dose biomarkers, uric acid, and renal function in Korean lead workers," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 1, pp. 36–42, **2005**.
- [65] Canfield, R. L., Henderson, C. R., Cory-Slechta, D. A., Cox, C., Jusko, T. A., Lanphear, B. P., "Intellectual Impairment in Children with Blood Lead Concentrations below 10 µg per Deciliter," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 16, pp. 1517–1526, **2003**.
- [66] Wasserman, G. A., Liu, X., Lolacono, N. J., Factor-Litvak, P., Kline, J. K., Popovac, D., Morina, N., Musabegovic, A., Vrenezi, N., Capuni-Paracka, S., Lekic, V., Preteni-Redjepi, E., Hadzialjevic, S., Slavkovich, V., Graziano, J. H., "Lead exposure and intelligence in 7-year-old children: the Yugoslavia Prospective Study.," *Environmental health perspectives*, vol. 105, no. 9, pp. 956–62, **1997**.
- [67] Guidotti, T. L., "Toxicology," in *Essentials of Medical Geology*, O. Selinus, B. Alloway, J. A. Centeno, R. B. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, and P. Smedley, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, , pp. 597–609, **2013**.
- [68] Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X., Matis, K. A., "Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils," *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 8, pp. 909–916, **2004**.
- [69] Vijayaraghavan, K., Yun, Y. S., "Bacterial biosorbents and biosorption," *Biotechnology Advances*, vol. 26, no. 3, pp. 266–291, **2008**.
- [70] Romera, E., González, F., Ballester, A., Blázquez, M. L., Muñoz, J. A., "Biosorption with algae: A statistical review," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 26, no. 4, pp. 223–235, **2006**.
- [71] Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., Salminen, S., "Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 46, no. 2, pp. 160–165, **2008**.
- [72] Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R., Salminen, S., "Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 52, no. 9, pp. 877–885, **2006**.
- [73] Teemu, H., Seppo, S., Jussi, M., Raija, T., Kalle, L., "Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125, no. 2, pp. 170–175, **2008**.
- [74] Kumar, N., Kumar, V., Panwar, R., Ram, C., "Efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus* strains to reduce cadmium bioaccessibility - An in vitro digestion

- model,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, no. 2, pp. 1241–1250, **2017**.
- [75] Volesky, B., *Sorption and biosorption*. St. Lambert, Québec : BV Sorbex, 2003.
- [76] Kuyucak, N., Volesky, B., “Accumulation of cobalt by marine alga,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 33, no. 7, pp. 809–814, **1989**.
- [77] Stumm, W., Morgan, J. J., Drever, J. I., “Aquatic chemistry,” *Journal of Environmental Quality*, vol. 25, no. 5, p. 1162, **1996**.
- [78] Tsezos, M., Deutschmann, A. A., “An investigation of engineering parameters for the use of immobilized biomass particles in biosorption.,” *Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)*, vol. 48, no. 1, pp. 29–39, **1990**.
- [79] Saldamlı, İ., *Gıda Kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, **2007**.
- [80] Holan, Z. R., Volesky, B., “Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 43, no. 11, pp. 1001–1009, **1994**.
- [81] Volesky B.; Schiewer S., “Biosorption of metals in encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation.,” in *Biosorption of metals in encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation.*, Flickinger MC; Drew SW, Ed., pp. 433–53, **1999**.
- [82] Wang, J., Chen, C., “Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review,” *Biotechnology Advances*, vol. 24, no. 5, pp. 427–451, **2006**.
- [83] Hossain, A., Ngo, H. H., Guo, W., “Introductory of Microsoft Excel SOLVER Function - Spreadsheet Method for Isotherm and Kinetics Modelling of Metals Biosorption in Water and Wastewater,” *Journal of water sustainability*, vol. 3, no. 4, pp. 223–237, **2013**.
- [84] Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., Sips, A. J. A. M., “Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, no. 1, pp. 31–40, **2005**.
- [85] Kabak, B., Ozbey, F., “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*, vol. 27, no. 1, pp. 21–31, **2012**.
- [86] Malik, A., “Metal bioremediation through growing cells,” *Environment International*, vol. 30, no. 2, pp. 261–278, **2004**.
- [87] Saradhi, B. V., Rao, S. R. K., Kumar, Y. P., Vijetha, P., Rao, K. V., Kalyani, G., “Applicability of Freundlich and Langmuir Theory for Biosorption of Chromium from Aqueous Solution using Test of Sea Urchin,” vol. 2, no. 2, pp. 139–148, **2010**.
- [88] Goyal, N., Jain, S., Banerjee, U., “Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals,” *Advances in Environmental Research*, vol. 7, no. 2, pp. 311–319, **2003**.
- [89] Reddad, Z., Gerente, C., Andres, Y., Le Cloirec, P., “Adsorption of several metal ions onto a low-cost biosorbent: kinetic and equilibrium studies.,” *Environmental science & technology*, vol. 36, no. 9, pp. 2067–2073, **2002**.
- [90] Suh, J. H., Kim, D. S., “Effects of Hg^{2+} and cell conditions on Pb^{2+} accumulation

- by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Bioprocess Engineering*, vol. 23, no. 4, pp. 327–329, **2000**.
- [91] Wu, S. C., Peng, X. L., Cheung, K. C., Liu, S. L., Wong, M. H., “Adsorption kinetics of Pb and Cd by two plant growth promoting rhizobacteria,” *Bioresource technology*, vol. 100, no. 20, pp. 4559–63, **2009**.
- [92] Mullen, M. D., Wolf, D. C., Ferris, F. G., Beveridge, T. J., Flemming, C. a, Bailey, G. W., “Bacterial Sorption of Heavy-Metals,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 55, no. 12, pp. 3143–3149, **1989**.
- [93] Esposito, A., Pagnanelli, F., Lodi, A., Solisio, C., Vegliò, F., “Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: An equilibrium study at different pH and biomass concentrations,” *Hydrometallurgy*, vol. 60, no. 2, pp. 129–141, **2001**.
- [94] Yin, R., Zhai, Q., Yu, L., Xiao, Y., Wang, G., Yu, R., Tian, F., Chen, W., “The binding characters study of lead removal by *Lactobacillus plantarum* CCFM8661,” *European Food Research and Technology*, vol. 242, no. 10, pp. 1621–1629, **2016**.
- [95] Journal, B., Yilmaz, M., Tay, T., Kivanc, M., Turk, H., “Removal of Copper (Li) Ions From Aqueous Solution By a Lactic Acid Bacterium,” *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 27, no. 02, pp. 309–314, **2010**.
- [96] Mishra, S. P., Tiwari, D., Dubey, R. S., Mishrah, M., “Biosorptive behaviour of Casein for Zn^{+3} , Hg^{+2} and Cr^{+3} : Effects of physico-chemical treatments,” *Bioresource Technology*, vol. 63, pp. 1–5, **1998**.
- [97] Swarup, D., Patra, R., Naresh, R., Kumar, P., Shekhar, P., “Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk,” *Science of The Total Environment*, vol. 349, no. 1–3, pp. 67–71, **2005**.
- [98] Lahtinen, S. J., Haskard, C. a, Ouwehand, a C., Salminen, S. J., Ahokas, J. T., “Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG,” *Food Additives and Contaminants*, vol. 21, no. 2, pp. 158–164, **2004**.
- [99] Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., Zhang, H., Zhang, H., Chen, W., “*Lactobacillus plantarum* CCFM8661 Alleviates Lead Toxicity in Mice,” *Biological Trace Element Research*, vol. 150, no. 1–3, pp. 264–271, **2012**.
- [100] Jahromi, M. F., Liang, J. B., Ebrahimi, R., Soleimani, A. F., Rezaeizadeh, A., Abdullah, N., Shokryazdan, P., “Protective potential of *Lactobacillus* species in lead toxicity model in broiler chickens,” *Animal*, vol. 11, no. 05, pp. 755–761, **2017**.
- [101] Pizzolitto, R. P., Bueno, D. J., Armando, M. R., Cavaglieri, L., Dalcero, A. M., Salvano, M. A., “Binding of Aflatoxin B 1 to Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro : A Useful Model to Determine the Most Efficient Microorganism,” *Culture*, vol. 1, **2011**.
- [102] Hao, Z., Reiske, H. R., Wilson, D. B., “Characterization of cadmium uptake in *Lactobacillus plantarum* and isolation of cadmium and manganese uptake mutants,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 11, pp. 4741–4745, **1999**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Baran ÖZKALP
Doğum Yeri : Mağusa, Kıbrıs
E-posta : gdozka07@hacettepe.edu.tr
Adresi : 1386. Sk. 8/8
Balgat, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : Gazimağusa Türk Maarif Koleji (2004-2007)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2007-2011)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2011-2018)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İleri)
Fransızca (Giriş)

İş Deneyimi

Gıda Mühendisi, Comart Kurumsal İletişim Hizmetleri (2012-devam)

Deneyim Alanları

Gıda Mühendisliği, Ağır Metal Detoksifikasyonu, Biyosorpsiyon, Süt Teknolojisi

Ödül ve Burslar:

2209-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı, TÜBİTAK

Projeler: -

Yayınlar: -



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 08/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: **İN VİTRO ŞARTLARDA LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN VE YOĞURDUN KURŞUN VE KADMİYUM BAĞLAMA ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam **68** sayfalık kısmına ilişkin, **08/06/2018** tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % **4**'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

08/06/2018
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Baran ÖZKALP
Öğrenci No: N10329839
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Yüksek Lisans
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Ali TOPCU