

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BÜLENT KABAK

119972

***Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un *Aspergillus flavus* GELİŞİMİ ve
AFLATOKSİN B₁ ve AFLATOKSİN M₁ ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO*
ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

ADANA, 2002

119972

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

***Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un *Aspergillus flavus* GELİŞİMİ ve AFLATOKSİN B₁ ve AFLATOKSİN M₁ ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO* ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI**

Bülent KABAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Bu Tez 24/01/2002 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

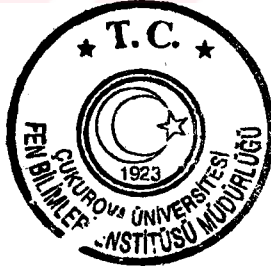
İmza.....
Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR

İmza.....
Prof. Dr. Mehmet BİÇİCİ

İmza.....
Yrd. Doç. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No: 1953



Prof. Dr. Melih BORAL
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FBE.2000.YL.21

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

İÇİNDEKİLER

SAYFA

İÇİNDEKİLER	I
ÖZ	V
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
RESİMLER DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri	3
2.1.1. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri	3
2.1.1.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	5
2.1.1.2. <i>Bifidobacterium</i> spp.	7
2.2. Küfler Hakkında Genel Bilgi	9
2.2.1. <i>Aspergillus flavus</i>	12
2.3. Aflatoksin	15
2.3.1. Aflatoksin Biyosentezi	16
2.3.2. Aflatoksin Oluşum Koşulları	19
2.3.3. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	20
2.3.4. Aflatoksinlerin Toksik Etkileri	22
2.3.5. Aflatoksin B ₁	23
2.3.6. Aflatoksin M ₁	24
2.4. Aflatoksinlerin Detoksifikasyonu	27
2.4.1. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin Detoksifikasyonu	28
2.4.2. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B ₁ ve Aflatoksin M ₁ 'e Bağlanma Aktivitesi İle İlgili Yapılan Çalışmalar	29
2.4.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin Oluşumu Üzerine Etkileri	33

2.4.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin Oluşumuna Etkisi	
Konusunda Yapılan Çalışmalar.....	35
3. MATERYAL VE METOD.....	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Aflatoksin B ₁ ve Aflatoksin M ₁ Standartları	38
3.1.2. Probiyotik Laktik Asit Bakteri Kültürleri.....	38
3.1.3. Küf Kültürü.....	38
3.1.4. İnce Tabaka Plakaları	38
3.1.5. Süt Tozu	39
3.2. Metod.....	39
3.2.1. Liyofilize Bakteri Kültürünün Aktivasyonu.....	39
3.2.2. Bakteri Kültürünün Hazırlanması	39
3.2.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B ₁ 'e Bağlanma Yeteneğinin Belirlenmesi.....	40
3.2.3.1. Aflatoksin B ₁ Standart Çözeltisinin Hazırlanması ve Saklanması	40
3.2.3.2. Aflatoksin B ₁ 'in PBS (fosfat-buffered-saline) Çözeltisine Aşılması.....	40
3.2.3.3. Aflatoksin B ₁ 'in Yağsız Süte Aşılması.....	40
3.2.3.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B ₁ 'e Bağlanma Yeteneğinin Belirlenmesi.....	41
3.2.3.5. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi	41
3.2.3.6. İnce Tabaka Plakalarının Geliştirilmesi	42
3.2.3.7. Plakaların Değerlendirilmesi	43
3.2.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ 'e Bağlanma Yeteneklerinin Belirlenmesi	44
3.2.4.1. Aflatoksin M ₁ Standart Çözeltisinin Hazırlanması ve Saklanması	44
3.2.4.2. Aflatoksin M ₁ 'in PBS Çözeltisine Aşılması.....	44
3.2.4.3. Aflatoksin M ₁ 'in Yağsız Süte Aşılması.....	44
3.2.4.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ 'e Bağlanma Yeteneğinin Belirlenmesi	45

3.2.4.5. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi	45
3.2.4.6. İnce Tabaka Plakalarının Geliştirilmesi	46
3.2.4.7. Plakaların Değerlendirilmesi	46
3.2.4.8. Geri Alma Çalışması.....	46
3.2.4.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	47
3.2.5. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin, <i>Aspergillus flavus</i> Gelişimi ve Aflatoksin B ₁ Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Araştırılması	47
3.2.5.1. Küf Kültürünün Hazırlanması	47
3.2.5.2. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri ve Küf Sporlarının İnokülasyonu	47
3.2.5.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin <i>Aspergillus flavus</i> Gelişimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	48
3.2.5.4. pH Tayini	48
3.2.5.5. <i>Aspergillus flavus</i> Aşılانmış MRS Broth ve Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin B ₁ Aranması.....	49
3.2.5.5.1. Aflatoksin B ₁ 'in Ekstrakte Edilmesi.....	49
3.2.5.5.2. Kalitatif İnce Tabaka Kromatografisi	50
3.2.5.5.3. İnce Tabaka Plakalarının Geliştirilmesi	50
3.2.5.5.4. Kromatografi Plakalarının Değerlendirilmesi.....	50
3.2.5.5.5. Doğrulama Deneyi.....	51
3.2.5.5.6. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi.....	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	52
4.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un Aflatoksin B ₁ 'i Bağlama Yeteneği.....	52
4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un Aflatoksin M ₁ 'i Bağlama Yeteneği.....	59
4.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un <i>Aspergillus flavus</i> Gelişimi ve Aflatoksin B ₁ Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkisi.....	65
4.3.1. pH Değerleri	65

4.3.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un <i>Aspergillus flavus</i> Gelişimi Üzerine Etkisi.....	67
4.3.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un Aflatoksin B ₁ Oluşumu Üzerine Etkisi.....	68
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ	88



ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un *Aspergillus flavus* GELİŞİMİ ve AFLATOKSİN B₁ ve AFLATOKSİN M₁ ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO* ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI**

Bülent KABAK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR

Yıl: 2002, Sayfa:88

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR

Prof. Dr. Mehmet BİÇİCİ

Yrd. Doç. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Bu çalışmada öncelikli olarak probiyotik laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'i bağlama ve detoksifiye etme yeteneği araştırılmıştır. İkinci aşamada ise probiyotik laktik asit bakterilerinin normal metabolik faaliyetleri sırasında ürettiği metabolitlerin aflatoksin B₁ oluşumu üzerine etkisinin olup olmadığı *In Vitro* ve yağsız sütte araştırılmıştır.

Elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Lactobacillus acidophilus* suşlarının *In Vitro* koşullarda aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri %32.2-37.0 arasında bulunmuştur. *Bifidobacterium bifidum* suşlarının *In Vitro* koşullarda aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri %31.0-46.5 arasında bulunmuştur.
- Lactobacillus acidophilus* suşlarının gıda modelinde aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri % 29.5-34.5 arasında bulunmuştur. *Bifidobacterium bifidum* suşlarının gıda modelinde aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri %30.0-38.5 arasında bulunmuştur.
- Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un *In Vitro* koşullarda aflatoksin M₁'e bağlanma yetenekleri %30.5-32.5 arasında olduğu bulunmuştur.
- Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un gıda modelinde aflatoksin M₁'e bağlanma yetenekleri %28.8-29.3 arasında bulunmuştur.
- Test edilen bakteriler arasında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e en yüksek bağlanma aktivitesini *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 göstermiştir.
- Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e farklı bağlanma yeteneği gösterdiği belirlenmiştir.
- Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un, *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik Laktik Asit Bakterileri, Aflatoksin, Detoksifikasyon

ABSTRACT

MSc. THESIS

A RESEARCH on the EFFECTS of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on the GROWTH of *Aspergillus flavus* and on AFLATOXIN B₁ and AFLATOXIN M₁ in *IN VITRO* CONDITIONS

Bülent KABAK

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

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR

Year: 2002, Pages:88

Jury: Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR

Prof. Dr. Mehmet BİÇİCİ

Yrd. Doç. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

In this project firstly detoxification ability and binding capacities of aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ by probiotic lactic acid bacteria such as, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*, were assessed. Secondly, the metabolites which were produced by probiotic lactic acid bacteria during normal metabolic activities and their effects on aflatoxin B₁ in *In Vitro* and food model system (milk) were investigated.

The results obtained can be summarized as follows:

- The binding ability of aflatoxin B₁ was found to range between 32.2 % to 37.0% and 31.0 % to 46.5 % for *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* strains, respectively in *In Vitro* conditions.
- The binding ability of aflatoxin B₁ was found to range between 29.5 % to 34.5% and 30.0 % to 38.5 % for *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* strains, respectively in food model (milk) conditions.
- Abilities of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to bind aflatoxin M₁ were found to range between 30.5% to 32.5% *In Vitro*.
- Abilities of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to bind aflatoxin M₁ were found to range between 28.8% to 29.3 % in a food model system.
- Among the organisms studied, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 demonstrated significantly higher aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ binding ability than the other strains.
- The different binding affinities of various strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ were also determined.
- It has been found that *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* have stimulated aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus*

Key Words: Probiotic Lactic Acid Bacteria, Aflatoxin, Detoxification

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bana yol gösteren, araştırmamın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında katkılarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Işıl VAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Ali KAÇAR'a,

Tezimin çeşitli aşamalarında sunduğu değerli yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya, Yrd. Doç. Dr. Muharrem KANBEROĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Türkan KEÇELİ'ye, Canan KAVAS'a, Adnan YILDIRIM'a, Meva ÖZKARSLI'ya, Özgür GÖLGE'ye, Ankara Tarım İl Kontrol Laboratuvarından Gıda Yüksek Mühendisi Şennur ÖZKAYA ve Biyolog Alaaddin BAŞARAN' a,

İstatistiksel değerlendirmeler sırasındaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Hakan BENLİ ve Arş. Gör. Adnan BOZDOĞAN'a,

Manevi desteğini gördüğüm Arş. Gör. Bülent ZORLUGENÇ'e,

Beni yetiştiren, hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan anne ve babama,

Maddi ve manevi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Araştırma Fonu, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsüne,

Teşekkürlerimi sunarım.

İlgi, sabır ve desteği ile her zaman benimle olan

sevgili eęime...

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Bazı Aflatoksin Türlerinin UV Işığında Verdikleri Renkler	20
Çizelge 2.2. Aflatoksin M ₁ için Düzenleyici Limitler	226
Çizelge 4.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un PBS Çözeltisinde Aflatoksin B ₁ 'i Bağlama Yeteneği.....	52
Çizelge 4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin B ₁ 'i Bağlama Yeteneği	55
Çizelge 4.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin PBS ve Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin B ₁ 'i Bağlama Yetenekleri	58
Çizelge 4.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un PBS Çözeltisinde Aflatoksin M ₁ 'i Bağlama Yeteneği.....	59
Çizelge 4.5. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin M ₁ 'i Bağlama Yeteneği	62
Çizelge 4.6. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> 'un PBS ve Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin M ₁ 'i Bağlama Yetenekleri	64
Çizelge 4.7. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri ve <i>Aspergillus flavus</i> Sporlarının Bulunduğu Karışık Kültürde Saptanan pH Değerleri.....	65
Çizelge 4.8. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin <i>Aspergillus flavus</i> Gelişimi ve Aflatoksin B ₁ Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkisi.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1 Aflatoksin Biyosentez Reaksiyonu.....	18
Şekil 2.2. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları.....	21
Şekil 4.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un PBS Çözeltilisinde Aflatoksin B ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması	53
Şekil 4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin B ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması	56
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un PBS Çözeltilisinde Aflatoksin M ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması	60
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin M ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması	63
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCC 12 ve <i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb 13'ün Aflatoksin B ₁ ve Aflatoksin M ₁ 'i Bağlama Yeteneklerinin Karşılaştırılması	64
Şekil 4.6. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin <i>Aspergillus flavus</i> ' un Aflatoksin B ₁ Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkisi.....	69

RESİMLER DİZİNİ

SAYFA

Resim 2.1. <i>Aspergillus flavus</i> ' un Koloni ve Mikroskopik Görünümü	1
--	---

1. GİRİŞ

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus paraciticus* ve *Aspergillus nomius* türleri tarafından üretilen, ikincil metabolizma ürünleridir (Moss, 1992; Doyle ve ark., 1997).

Aflatoksin B₁, diğer aflatoksinler içerisinde en toksik ve kanserojenik aktiviteye sahip olanıdır (İç ve Yavaş, 1993; Martins ve Martins, 1999; Fan ve Chen, 1999; Leszczynska ve ark., 2000). Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü tarafından yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda, aflatoksinle kontamine olmuş gıda tüketimiyle karaciğer kanseri arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Taylor ve ark., 1997; Martins ve Martins, 1999; El Nezami ve ark., 2000; Saad, 2000).

Aflatoksin B₁'in süt veren hayvanlarda metabolizma faaliyeti sonucunda aflatoksin M₁'e dönüştüğü bildirilmekte ve süt toksini olarak adlandırılmaktadır (Frobish ve ark., 1986; Galvano ve ark., 1996; Pierides ve ark., 2000). Yapılan akut toksisite testlerine göre aflatoksin M₁'in en az aflatoksin B₁ kadar kanserojenik aktivite gösterdiği, mutajenik aktivitesinin ise aflatoksin B₁'den daha düşük olduğu bildirilmektedir (Barbieri ve ark., 1994; Galvano ve ark., 1996).

Yüksek toksik ve kanserojenik aktiviteye sahip olan aflatoksinler, önemli sağlık sorunlarına ve ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Doğal gıda kontaminantı olarak bilinen küfler ve bunların ürettiği aflatoksinler gıda maddesine, ürünün gelişimi, hasat, taşıma ve depolama aşamalarında kontamine olabilmektedir. Bu nedenle aflatoksini oluşum aşamasında engellemek güçleşmekte olup, kontamine olan aflatoksini ortamdan uzaklaştırmak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır.

Aflatoksinlerin gıda maddesinden detoksifikasyonu için uygulanan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin sonuç vermemesi ve insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle, biyolojik detoksifikasyon yöntemleri ve bunların ticari uygulamalarda kullanılabilirliği üzerinde durulmaktadır (El Nezami ve ark., 1998; Özkaya ve ark., 1999; Peltonen ve ark., 2000a).

Son yıllarda aflatoksinlerin biyolojik detoksifikasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan metabolik detoksifikasyon ve bunun yanı sıra, özellikle aflatoksinin bağırsak florasında bulunan probiyotik laktik asit bakterisine bağlanması ve gastrointestinal bölgede absorpsiyonunun azaltılarak bakteri-aflatoksin kompleksi şeklinde vücut dışına salgılanması üzerinde durulmaktadır. (Kankaanpa ve ark., 2000; El Nezami ve ark., 2000; Peltonen ve ark., 2000a). Probiyotik özellik gösteren bakterilerin hücre duvarındaki hidrofobik kısımlara, aflatoksin gibi mutajenik ve kanserojenik maddelerin kovalent olmayan bağlarla bağlanarak, bu maddelerin incebağırsakta birikmesinin engellendiği ve vücut dışına salgılandığı ileri sürülmektedir (Haskard ve ark., 2000).

Bu çalışmanın amacı, yüksek toksik ve kanserojenik aktiviteye sahip olan aflatoksini, üründen uzaklaştırmak için yapılan bazı fiziksel ve kimyasal uygulamaların başarısız olması, bazı uygulamaların da insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle izin verilmemesinden dolayı, sağlık açısından herhangi bir risk oluşturmayan biyolojik detoksifikasyon yollarını ve ticari uygulamalarda kullanılabilirliği araştırmaktır.

Bu araştırma kapsamında öncelikli olarak, probiyotik laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e bağlanma yeteneği *In Vitro* koşullarda ve yağsız süt ortamında araştırılmıştır.

Araştırmada ayrıca, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un normal metabolik faaliyetleri sırasında ürettiği metabolitlerin, aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ oluşturma yeteneği üzerine etkisi *In vitro* koşullarda ve yağsız süt ortamında araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Laktik Asit Bakterileri

“Laktik asit bakterisi” terimi fermentasyon sonucu glukoz ve laktoz gibi şekerlerden laktik asit üreten bakteriler için kullanılan genel bir terimdir (Kaptan, 2000). Laktik asit bakterileri içerisinde, biyokimyasal ve ekolojik özellikleriyle birlikte filogenetik olarak birbirine yakın olan ‘*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenoccus*, *Vagococcus*, *Weissella*’ cinsleri yer almaktadır. *Bifidobacterium* cinsi bakteriler filogenetik olarak diğer laktik asit bakterilerine benzememesine rağmen, biyokimyasal, fizyolojik ve ekolojik özellikleri bakımından benzer olduğundan genellikle laktik asit bakterileri terimi içerisinde yer almaktadır (Adams, 1999).

Laktik asit bakterileri gıdaların ve hafif alkollü içeceklerin üretiminde uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, özellikle son yıllarda çok çeşitli fermente ürünlerin üretiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalar olarak bilinmektedir (Rees, 1997; Batish ve ark., 1997). Laktik asit bakterilerinin gıda patojenleri ve gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmalara karşı inhibitör ve öldürücü etkilerinin yanı sıra, sınırlı sayıda yapılan çalışmalar sonucunda, bazı laktik asit bakterilerinin antifungal ve antiaflatoksijenik aktivite gösterdikleri de bildirilmektedir (Batish ve ark., 1990; Jay, 1992; Gourama ve Bullerman, 1995; Batish ve ark., 1997; Stiles ve ark., 1999; El Nezami ve ark., 2000).

2.1.1. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri

Probiyotik kelimesi, Yunancadan gelmekle birlikte “yaşam için” anlamında kullanılmaktadır. Probiyotik kelimesi ilk defa 1960’lı yıllarda Lily ve Stilwell tarafından, bir protozoa tarafından salgılanıp, diğer bir protozoanın gelişimini teşvik eden metaboliti tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (Shortt, 1999).

Probiyotikler günümüzde, insanların bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyen yararlı, canlı mikrobiyal gıda içerikleri olarak değerlendirilmektedir (Shah ve Lankaputhra., 1997; Oh ve ark., 2000; Yılsay ve Kurdal, 2000; Shah, 2000). Probiyotik mikroorganizmaların tüketim sonrasında sindirim sisteminde canlı olarak bağırsaklara ulaştığı ve burada gelişerek yararlı etkiler göstermelerinin yanısıra, bağırsak çeperlerine tutunarak biyolojik etki gösterdiği bildirilmektedir (Özer ve Akın, 2000).

Gıda maddesi üretiminde kullanılan probiyotik bakterilerde bazı özellikler aranmaktadır. Bu özellikler; insan orijinli olmalı, patojenik olmamalı, asit ve tuzu tolere edebilmeli, sağlığa karşı yararlı etkide bulunabilmeli, proses boyunca canlılığını sürdürebilmeli, bağırsaklarda canlı kalabilmeli ve çoğalabilme özelliğine sahip olmasıdır (Shortt, 1999; Özer ve Akın, 2000; Oh ve ark., 2000).

Probiyotik bakterilerin sağlık üzerinde olumlu etkileri; laktoz toleransı azaltma, patojenik virüsleri ve bakterileri inhibe etme, vitamin üretimi, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, tümör oluşumunu inhibe etme, diyare oluşumunu engelleme, kalsiyum absorpsiyonunu geliştirme, antikanserojenik aktivitede bulunma ve bağırsak mikrobiyal dengesinin düzenlenmesidir (Tamime ve Marshall, 1997; Vinderola ve ark., 2000a; Vinderola ve ark., 2000b). Bağırsak epiteline tutunarak patojenik mikroorganizmaların koloni oluşturmasını önleyen probiyotiklerin ayrıca, antogonistik etki yaptığı, besin elementleri için rekabetçi bir ortam oluşturduğu ve bağışıklığı teşvik ettiği de bildirilmektedir (Karahan ve Çakmakçı, 1996; German ve ark., 1999).

Probiotik bakterilerin belirtilen tıropatik özellikleri gösterebilmesi için minimum olarak 10^6 kob/g konsantrasyonunda canlı hücrenin vücuda alınması gerektiği bildirilmektedir (Samona ve ark., 1996; Shah ve Lankaputhra, 1997; Shortt, 1999; Vinderola ve ark., 2000a; Shah, 2000). Bazı araştırmacılar probiyotik ürünlerin, 10^8 kob/g veya daha yüksek konsantrasyonda canlı bakteri içermesi gerektiğini vurgularken, örneğin Japonya'da marketlerde satılan bir probiotik fermente süt ürününde raf ömrü boyunca şişede 40×10^9 kob probiyotik bakteri bulunması istenmektedir (Shortt, 1999).

Sağlıklı insanların gastrointestinal bölgesi, mide sıvıları, sindirim enzimleri ve safra asitleri içermekte ve bu ortam probiyotik mikroorganizmaların canlılığını devam

ettirebilmesini ve kolonize olmasını güçleştirmektedir (Oh ve ark., 2000; Vinderola ve ark., 2000a). Bağırsaktaki epitel hücreler, fiziksel ve kimyasal etkilere karşı mukoza tabakasıyla kaplanmıştır ve probiyotik bakteriler bu tabakaya bağlanma özelliği göstermektedir (Kirjavainen ve ark., 1998; Tuomaola ve ark., 1999).

Gastrointestinal bölge temelde 3 bölgeye ayrılmakta ve her bölgede hakim olan mikrobiyal flora farklı olmaktadır. Mide bölgesinde pH 1-3 arasında olup, oldukça asidiktir. İntestinal bölgede pH 6,8-8,6 arasında olup, mikrobiyal gelişim için elverişli koşullar bulunmaktadır. İnce bağırsak bölgesi bir geçiş bölgesidir ve bu bölgede 10^3 - 10^4 /g bakteri bulunmakla birlikte, hakim florayı *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* ve *Streptococcus* oluşturmaktadır. Kalın bağırsak bölgesi de, mikrobiyal gelişim için oldukça elverişli olup, 10^{11} - 10^{12} /g anaerob bakteri bulunmaktadır. Bu bölgede hakim florayı oluşturan bakteriler ise *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Eubacterium*'dur (Doyle ve ark., 1997).

Dünyada probiyotik ürünlerin üretiminde kullanılan ve probiyotik olarak tanımlanan laktik asit bakterileri, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salvarius*, *Lactobacillus crispatus* ve *Bifidobacterium* spp.'dir (Shortt, 1999; Oh ve ark., 2000).

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium* spp. içeren gıda maddelerin tüketimiyle sağlanan yararlı etkiler daha iyi anlaşılmalıya başlandıkça bu konu üzerinde durulmuştur ve günümüzde bu bakterilerle üretilen 90'dan fazla ürün çeşidi bulunduğu söylenmektedir. (Shah, 2000; Vinderola ve Reinheimer, 1999; Birollo ve ark., 2000).

2.1.1.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus gram (+), çubuk şeklinde, anaerob veya fakültatif anaerob, hareketsiz, katalaz (-) bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38 °C'dir. (Kırdar, 2000). *Lactobacillus acidophilus* laktozu homofermantatif yönden fermente etmekte ve DL laktik asit oluşturmalarının yanısıra az miktarda da asetik asit,

asetaldehit ve etanol oluşturmaktadır (Jay, 1992; Tamime ve Marshall, 1997; Hayaloğlu ve Erginkaya, 2001).

Tüketilen üründe *Lactobacillus acidophilus* gibi canlı probiyotik bakterilerin varlığı, kanser oluşumunu engelleme, serum kolesterol seviyesini düşürme, bağırsak mikrobiyal florasına hakim olma ve laktoz tolerans kişilerde laktoz kullanımını geliştirme gibi çeşitli tıropatik yararlar sağlamanın yanısıra, ürünün duyuşal özelliklerini de etkilemektedir (Shah ve ark., 1997; Vinderola ve ark., 2000b). Bu nedenle son yıllarda yoğurt ve diğfer fermente süt ürünlerinde kullanımı gittikce yaygınlaşmaktadır. Yoğurt üretiminde kullanılan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, insanların bağırsak florasında doğal olarak bulunmamakta ve bağırsaklarda kolonize olamamaktadır. Bu nedenle insan sağlığı üzerine doğrudan herhangi olumlu bir etkide bulunmadığı ileri sürülmektedir (Shah ve ark., 1997).

Lactobacillus acidophilus türleri, intestinal bölgede yoğun bir şekilde bulunması nedeniyle süt ürünlerinde ve eczacılık (pharmaceutical) ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Oh ve ark., 2000).

Lactobacillus acidophilus, asidik koşullara ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olması ve aynı zamanda antogonistik maddeler üretmesi nedeniyle bağırsaktaki epitel hücrelere başarılı bir şekilde kolonize olmakta ve gastrointestinal bölgede patojen mikroorganizmalarla rekabet etmektedir. *Lactobacillus acidophilus* pH 3 ve daha aşağı değerlerde gelişebilmekte ve bazıları gastrointestinal bölgenin mide kısmından geçerken canlılığını sürdürmektedir. Laktik asit bakterisinin aside karşı toleransı, sitoplazmik membran tabakasının kompozisyonuna bağlı olduğu söylenmektedir. Safra tuzlarına karşı dayanıklılık ise, bir türün probiyotik olarak kullanılabilmesi için gerekli olan kriterlerden biri olduğu söylenmektedir. Safra tuzları, yüzey aktif maddeleri olup, karaciğerde kolesterolün katabolizması sonucu üretilmektedir. Safra asitleri, chenodeoksikolik asit, kolik asit, deoksikolik asit ve diğfer küçük komponentlerden oluşmakta ve dalaktan incebağırsaktaki duodenum kısmına salgılandığı bildirilmektedir (Oh ve ark., 2000).

Lactobacillus acidophilus'un tümör hücrelerini inhibe ettiği ve pro-kanserojenleri kanserojen maddelere dönüştürebilen mikroorganizmalara karşı antogonistik etkide bulunduğu da bildirilmektedir (Yılsay ve Kurdal, 2000; Yıldırım ve Kurdal, 2000). Araştırmacılar bağırsak florasında bulunan laktobasillerin karaciğer kanseri üzerine azaltıcı etkisi olduğunu da belirtmişlerdir. Bunun sebebini, zararlı bağırsak bakterilerinin metabolik aktivitelerinin azalması, bu zararlı bakterilerin ürettiği kanser yapıcı maddelerin yok edilmesi ve bu tip zararlı bakterilere karşı bağışıklığın artırılması şeklinde açıklamışlardır (Kırdar, 2000).

2.1.1.2. *Bifidobacterium* spp.

Bifidobakteriler ilk defa 1899 yılında Pasteur enstitüsünden Henry Tıssier tarafından keşfedilmiştir (Chung ve ark., 1999; Kaptan, 2000). Başlangıçta bu bakterilerin bebeklerin bağırsak florasında hakim olduğu düşünülse de, sonraki çalışmalar bifidobakterilerin erişkin insanlarda ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda da bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (Kaptan, 2000).

Bifidobacterium spp. gram(+), anaerobik bakteri olarak tanımlanmaktadır (Chung ve ark., 1999). Bifidobakterilerin morfoolojik ve fizyolojik özellikleri bir dereceye kadar farklılık gösterse de, hepsi hareketsiz, spor oluşturmeyen, katalaz(-) bakterilerdir. Glukozu kendilerine has bir yolla asetat ve laktata fermente etmeleri açısından heterofermantattiftirler. Bu yüzden bu özel mekanizmanın enzimi olan fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz, rutin olarak bifidobakterilerin diğer mikroorganizmalardan ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Bifidobakteriler için optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerleri sırasıyla 37-43 °C ve 6.5-7.0 pH arasındadır (Kaptan, 2000).

Bifidobakterilerin 9. Bergey's Manual'de 24 türü belirlenmiştir. Bunlardan bazıları, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium pseudolongum*'dur (Yıldırım ve Yıldırım, 2000). Bifidobakterilerden yalnızca *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*,

Bifidobacterium infantis ve *Bifidobacterium longum* terapötik/probiyotik fermente süt ürünlerinin üretilmesine starter kültür olarak kullanılmaktadır (Tamime ve Marshall, 1997).

Bifidobakteriler karbon kaynağı olarak karbonat veya bikarbonata (ya da CO₂ gazına) ihtiyaç duyarlar. Organik asitler, yağ asitleri ve amino asitler bifidobakteriler için etkin karbon kaynakları değildir. Yalnızca sistein ve sistin zorunlu azot kaynaklarıdır. Bunun yanı sıra, bifidobakteriler “bifidojenik faktörler” olarak bilinen belirli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu maddeler genelde, N-asetilglukozamine gibi amino şekerleri veya fruktooligosakkaritler ve laktuloz gibi karbonhidratları içermektedir (Kaptan, 2000).

Bifidobakteriler sağlıklı insanların intestinal florasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır ve ilk defa 1906 yılında Tissier tarafından sindirim bozukluklarına karşı tıropatik özellik göstermesi amacıyla kullanılmıştır (Chung ve ark., 1999). İnsanların bağırsak florasının düzenlenmesinde *Bifidobacterium* türlerinin önemli ve yararlı bir rol oynadığı bildirilmektedir (Chung ve ark., 1999). *Bifidobacterium*’lar bağırsaklardaki epitel dokulara kolonize olmakta ve çeşitli asitler üretmektedir. Bu şekilde kolon pH’sını düşürmekte, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmekte ve patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemektedirler (İbrahim ve Bezkorovainy, 1993; Samona ve ark., 1996). Ayrıca, *Bifidobacterium* türlerinin ince bağırsakta laktaz (β -galaktozidaz) aktivitesi düşük olan insanlarda, β -galaktozidaz enzimi üreterek laktozun parçalanmasını sağladığı ve dolayısıyla mide ağrılarını engellediği de bildirilmektedir (Samona ve ark., 1996).

Bağırsaklardaki epitel dokularda kolonize olan *Bifidobacterium*’lar, *Lactobacillus acidophilus* spp.’ye oranla asidik koşullara karşı daha hassastır. *Bifidobacterium*’ların gelişimi pH 5’in altındaki değerlerde yavaşlamakta ve 4’ün altındaki değerlerde ise durmaktadır (Shah ve ark., 1997).

Bu nedenle *Bifidobacterium* spp. içeren ürünler, sınırlı asitlik gelişimi, hafif tad, fizyolojik L(+) laktik asit ve tıropotik fayda gibi pek çok besinsel ve teknolojik avantajlar içermektedir (Samona ve ark., 1996).

Bifidobacterium spp. midede düşük pH'da canlılığını koruyabilmekte ve ince bağırsakta üretilen safra tuzlarına karşı da dayanıklılık göstermektedir (Chung ve ark., 1999).

Bifidobakterium türlerinin bağırsak bölgesinde lactobasilere göre 3-4 log daha yüksek miktarda bulunduğu bildirilmektedir (Oatley ve ark., 2000).

2.2. Küfler Hakkında Genel Bilgi

Küfler, doğada hemen her yerde yayılmış olan, heterotrof, filamentli (uzantılı) ve çok hücreli funguslardır (Temiz, 1994; Arda, 1997). Küflerin sınıflandırılmasında, temel olarak eşeyli sporlar ve bunlarla ilgili organeller dikkate alınmakta ve genel olarak, Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes ve Deuteromycetes olmak üzere 4 sınıfa ayrılmaktadır (Temiz, 1994).

Küf hücreleri ard arda dizilerek, hif adı verilen hücre iplikçiklerini oluştururlar. Hifler çeşitli dallanma ve budaklanmalar yaparak, karmaşık bir hif topluluğu oluşturacak şekilde biraraya gelirler. Bu hif topluluklarına miselyum adı verilmektedir (Temiz, 1994). Aynı koloni içinde bulunan hiflerden bazıları beslenmeyi sağlamak için üzerinde yaşadıkları substratların içine doğru uzanırlar. Genelde beslenmeyi sağladıkları için bunlara beslenme hifi (vegetatif hif) adı verilmektedir. Substratın üzerinde kalan ve genellikle küflerin üreme organelleri olan sporları taşıyan hiflere ise hava hifi (fötil hif) adı verilmektedir (Temiz, 1994; Arda, 1997).

Hifler, ortalama 5-6 µm çapındadırlar. Bazı küfler de septa (bölmeler) bulunmaktadır ve septalar hifleri benzer hücrelerin bulunduğu kompartımanlara ayırmıştır (Dix ve Webster, 1995). Hücre duvarı ancak bölmeli hiflerde söz konusudur ve küf hücrelerinin büyüklüğünü ve şeklini tayin edebilecek derecede kuvvetli bir yapıya sahiptir. Hücre duvarı yapısında yaklaşık % 80 polisakkarid, % 5-15 protein ve %3-10 lipid bulunmaktadır. Polisakkaridler arasında glukan, galaktoz, kitin, kitozan, mannan ve selüloz en fazla bulunanlarıdır (Arda, 1997). Hücre duvarının iç kısmında yarı geçirgen

bir hücre membranı ve bunun da içinde stoplazma bulunmaktadır. Stoplazma içinde bir veya birkaç çekirdek, vakuoller, endoplazmik retikulum, mitokondri, ribozom ve stoplazmik granüller bulunmaktadır (Arda, 1997; Özkaya ve ark., 1999).

Küfler, genellikle sporlanma ile eşeyli (seksüel) ve eşeysiz (aseksüel) olarak üreme yeteneğine sahiptirler. Eşeysiz bir spor şekli olan “sporangiospor” förtıl hiflerin (sporangiofor) uçlarındaki sporangium keseleri içerisinde oluşur ve genellikle Ascomycetes sınıfı küflerde görülmektedir. Ascomycetes ve Deuteromycetes sınıfına ait küflerde rastlanılan diğer bir eşeysiz spor şekli ise “konidium”dur. Konidiumlar konidiofor adı verilen förtıl hifin ucunda ve açıkta oluşurlar. Küflerde görülen diğer eşeysiz spor tipleri ise “arthrospor”, “klamidospor” ve “blastospor” dur (Temiz, 1994; Arda, 1997).

Eşeyli üremede, seksüel sporlar, ayrı cins veya karakterde olan iki gametin çekirdeklerinin redüksiyona uğrayarak haploid hale gelmesi ve bu haploid kromozomların birleşmesi sonucu meydana gelmektedirler. Küflerde görülen seksüel spor tipleri, Ascomycetes sınıfı küflerde görülen “askospor”, Basidiomycetes’lerde görülen “basidiospor”, Phycomycetes sınıfı küflerde görülen “oospor”, Phycomycetes sınıfının zygomycetes alt sınıfına ait küflerde görülen “zigospor” olmak üzere 4 çeşittir (Arda, 1997).

Küf gelişimi için su, oksijen ve makroelementlerin (karbon, nitrojen, fosfor, potasyum) mutlaka bulunması gerekmektedir (Onions ve ark., 1981). Küfler, besinlerini suda erimiş halde ve difüzyon yoluyla sağlarlar. Zengin enzim sistemleri sayesinde çok sayıda besin maddesinden yararlanabilirler. Küfler karbon ve enerji kaynaklarını karşılamak amacıyla genellikle glikozdan yararlanırlar. Bunun yanı sıra, sakkaroz, nişasta, maltoz, sükroz gibi kompleks karbon bileşikleri de küfler tarafından kullanılabilir. Bazı küfler, yağ asitlerini, organik asitleri ve gliserol’u da enerji kaynağı olarak ve ayrıca, hekzos ve pentoz şekerlerinin türevlerini (uronik asit ve şeker alkolleri) de kullanabilmektedir (Arda, 1997; Özkaya ve ark., 1999).

Küfler genellikle aerobiktirler ve oksijenin bulunduğu ortamda gelişirler ve ürerler. Bu nedenle gıdaların depolandıkları atmosferik ortamın bileşimi küf kontrolünde dikkate alınması gereken hususlardan biridir (Topal, 1993; Arda, 1997).

Küflerin neme olan gereksinimleri türler arasında değişiklik göstermekle birlikte, nem miktarı azaldıkça çoğalmaları da sınırlanmaya başlanmaktadır. Küf gelişimi için güvenli nem sınırlarının %14-15 olduğu belirtilmekle birlikte su aktivite değeri 0.70'in altında küflerin üreyemedikleri bildirilmektedir (Özkaya ve ark., 1999).

Küflerin üreme ısısı limitleri, 0-60 °C gibi oldukça geniş sınırlar arasında olmakla birlikte, genellikle mezofiliktirler ve optimum olarak 22-32 °C'de yaşarlar. Küflerin gelişebildikleri pH sınırları ise 2.0-11.2 arasında olmakla birlikte optimum olarak 5.0-6.0 arasında gelişmektedirler (Doyle ve ark., 1997; Özkaya ve ark., 1999).

Küfler gıdalarda oluşturdukları çeşitli olumlu ve olumsuz değişiklikler nedeniyle gerek sağlık, gerekse endüstriyel açıdan önemli yer tutmaktadırlar. Küflerin primer metabolitleri olan enzimlerle protein, yağ ve karbonhidratlar küçük moleküllere parçalanırken, ortamda yeni bileşikler de sentezlenebilmektedir. Ayrıca endüstriyel mikrobiyolojide sitrik asit, glukonik asit, itakonik asit vb. organik asitler, bazı enzimler, pigment ve antibiyotik üretiminde de küflerden yararlanılmaktadır. Küfler çeşitli biyoaktif metabolitleriyle tıp alanında da önem taşıyan mikroorganizmalardandır. Gıdalar üzerindeki olumsuz etkileri ise renk bozulmaları, acılık, istenmeyen kokuların oluşumu gibi dıştan gözlenebilen değişimler ile besin elementleri kaybı ve mikotoksin oluşumudur (Topal ve ark., 1999). Küflerin hepsi mikotoksin sentezleyememekte, mikotoksin üretme yeteneği küfün genetiğine bağlıdır ve kalıtım yoluyla döllere aktarılmaktadır (Arıkan, 1998).

Aspergillus, *Penicillium* ve *Fusarium* spp. başta olmak üzere bazı patojenik ve bozulma etmeni olan küfler, mikotoksin üretmektedirler. Mikotoksinler arasında en iyi bilinenleri ve üzerinde en çok çalışma yapılanları, aflatoksin B₁, okratoksin A, fumonisin B₁, zeralenon, deoksinivanlen, patulin ve trikotesenlerdir. Bunun dışında son yıllarda sitrinin, sterigmatosistin, fusaproliformin, moniliformin ve fusarik asit gibi

Fusarium toksinleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Wang ve Groopman, 1999; Galvano ve ark., 2001).

Mikotoksinler içerisinde, toksik ve kanserojenik aktivitesi en yüksek olan aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* tarafından üretilmektedir (Doyle ve ark., 1997; Jaimez ve ark., 2000).

2.2.1. *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus, Deuteromycetes sınıfının Moniliales takımının Moniliaceae familyasına ait olup, *Aspergillus* cinsi içerisinde yer almaktadır (Samson ve ark., 1981).

Aspergillus flavus, Czapek Agar'da 25 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda 3-5 cm çapında koloniler meydana getirmektedir. Koloniler inkübasyonun başlangıç aşamalarında sarımsı renkte iken, inkübasyonun sonlarına doğru açık yeşilden, koyu yeşile doğru renk değiştirmektedir (Onions ve ark., 1981). *Aspergillus flavus*'un koloni ve mikroskopik görünümü Resim 2.1'de gösterilmiştir (Anonymous, 2002).

Aspergillus flavus'un eşeysiz sporlarını taşıyan konidioforlar, 1-2.5 mm uzunluğunda, 19-20 µm çapında, pürüzlü yapıda olup genellikle bölmesizdir (Onions, 1981; Samson, 1981).

Vesicle globose veya subglobose yapısında ve 25-45 µm çapındadır. Konidiofor başları değişik büyüklükte olup ışınal (radiate) veya sütünsal (columnar) olabilmektedir. *Aspergillus flavus*'a ait bazı suşlarda metula bulunmayabilir ve bu durumda phialide'ler doğrudan vesicle'a bağlıdır. Phialide'lar 7-10 x 2-2.5 µm, metula ise 6.5-10 x 3-5 µm boyutundadır (Onions, 1981; Samson, 1981).

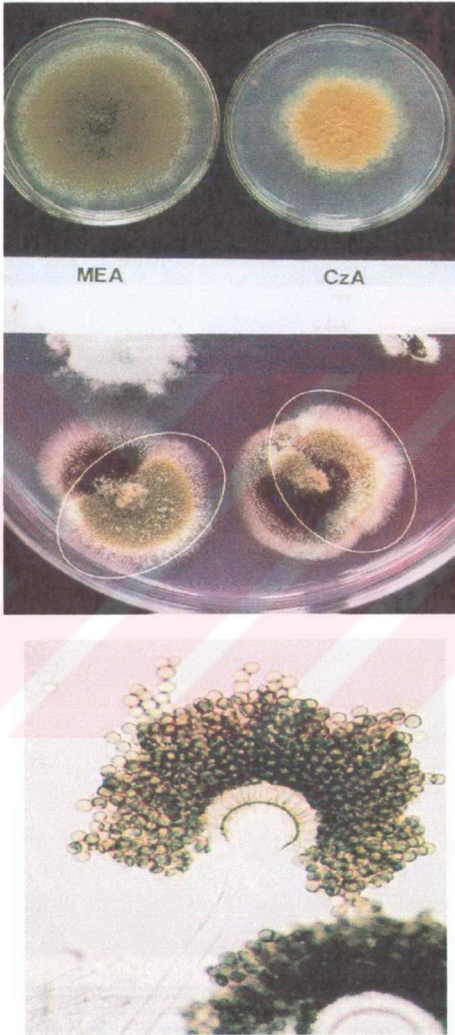
Aspergillus flavus'un eşeysiz sporları olan konidiumlar globose veya subglobose, seyrek olarak eliptik yapıda, 3-6 µm çapında ve pürüzlü yapıdadır. *Aspergillus flavus*'a ait bazı suşlar kahverengi "sclerotia" oluşturmaktadır (Onions, 1981; Samson, 1981).

Mısır, yerfıstığı ve yağlı tohumlar, *Aspergillus flavus* tarafından hasat öncesi saldırıya uğrayan en önemli ürünlerdir. Yerfıstığı, tarlada kuraklık stresine maruz

kaldığında veya diğer sınırlayıcı etkenlerden dolayı *Aspergillus flavus* tarafından kontamine olabilmektedir. Mısır ürünüde de, gelişim sırasında böcek zararları *Aspergillus flavus*'un dane içine nüfuz etmesini sağlamaktadır. Soya fasulyesi, mung fasulyesi, sorgum ve diğer tarım ürünlerinde de yoğun miktarda *Aspergillus flavus*'a rastlanılmaktadır (Doyle ve ark., 1997).

Hububat taneleri ve baharatlar *Aspergillus flavus* kontaminasyonu için uygun substratlar olup, bu tür ürünlerde aflatoksin oluşum riski ürünün yetersiz kurutulması, uygunsuz koşullarda işlenmesi veya depolanması aşamalarında artmaktadır (Doyle ve ark., 1997).

Aspergillus flavus 10-12 °C ile 42-43 °C aralığında gelişebilmekte olmasına karşın, optimum gelişme sıcaklığı 32-33 °C arasındadır. *Aspergillus flavus* 0.98 su aktivitesi değerinde optimum gelişme gösterirken, aw değeri 0.80'e düştüğünde gelişimi durmaktadır. *Aspergillus flavus* 2.0-11.2 gibi geniş bir pH aralığında gelişebilmekte olup, pH 5.0-8.0 aralığı optimumlarıdır (Doyle ve ark., 1997).



Resim 2.1. *Aspergillus flavus*'un koloni ve hücre görünümü (MEA: Malt Ekstrakt Agar, CzA: Czapek Dox Agar), (Anonymous, 2002).

2.3. Aflatoksin

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius*'un bazı suşları tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleridir (Moss, 1992; Doyle ve ark., 1997; Jaimez ve ark., 2000). Bu üç küf cinsi birbirine çok benzemekte olup, tanımlamalarında sayılı karakteristik farklılıklar bulunmaktadır. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* doğada yaygın olarak bulunmakla birlikte, *Aspergillus nomius* daha seyrek bulunmaktadır. *Aspergillus nomius* yaygın olarak bulunmaması nedeniyle, bu küf üzerine az sayıda çalışma yapılmış ve izolatlarının toksijenitesi tam olarak belirlenememiştir (Doyle ve ark., 1997).

Aflatoksinler, üzerinde en fazla çalışılan mikotoksin grubunu oluşturmaktadır. Aflatoksinlerin varlığı, 1960'lı yıllarda, İngiltere'nin güney doğu bölgesinde 100.000'den fazla hindi palazı ve on binlerce ördek ve sülünün ölümü sonucu yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Hayvanlar tarafından tüketilen yerfistiklerinde, yoğun miktarda *Aspergillus flavus* ve bu küf türü tarafından üretilen, toksini izole edilmiştir. Bu nedenle bu toksine aflatoksin (A-fla-toksin) adı verilmiştir. Sonraki yıllarda aflatoksin üzerine yapılan yoğun çalışmalar üzerine, *Aspergillus parasiticus*'unda aflatoksin ürettiği belirlenmiştir (Moss, 1992; Jay, 1992; Mc Lean ve Dutton, 1995; Doyle ve ark., 1997).

Aflatoksinlerin keşfedilmesiyle birlikte, mikotoksinler üzerinde yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda, toksik etki gösteren pek çok küf metaboliti tanımlanmıştır. Bugün küflerin toksik etki gösteren metabolitlerinin sayısı, kaynaklara göre değişiklik gösterebilmektedir. Kesin sayı tam olarak bilinmemekle birlikte son yıllardaki kaynaklara göre, 100'den fazla küf türü ve 432 adet değişik küf toksini tanımlanmış olmakla birlikte bunlardan en az dörtte birinin insanlara ve hayvanlara karşı toksik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Mc Lean ve Dutton, 1995; Wang ve Groopman, 1999).

Ülkemizde aflatoksin sorunu ilk defa 1967 yılında etkili olmuş, Kanada'ya ihraç edilen 10 ton iç fındık aflatoksin içerdiği gerekcesi ile geri çevrilmiştir. 1971 yılında

Amerika'ya ihraç edilen 45 antep fıstığı partisinin, 38'inde aflatoksin bulunduğu tespit edilerek New York'ta bloke edilmiştir. 1972 yılında da Danimarka'ya ihraç edilen kuru incirlerde 938 ppb gibi oldukça yüksek miktarda aflatoksin saptanmış ve bu konuda gerekli önlemler alınmadığı takdirde ihracatın durdurulacağı ilgililere bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda, 1987'de kuru incir ve 1994 yılında kuru kırmızı biber ihracatında aflatoksin nedeniyle büyük sorunlar yaşanmıştır (Özkaya ve ark., 1999).

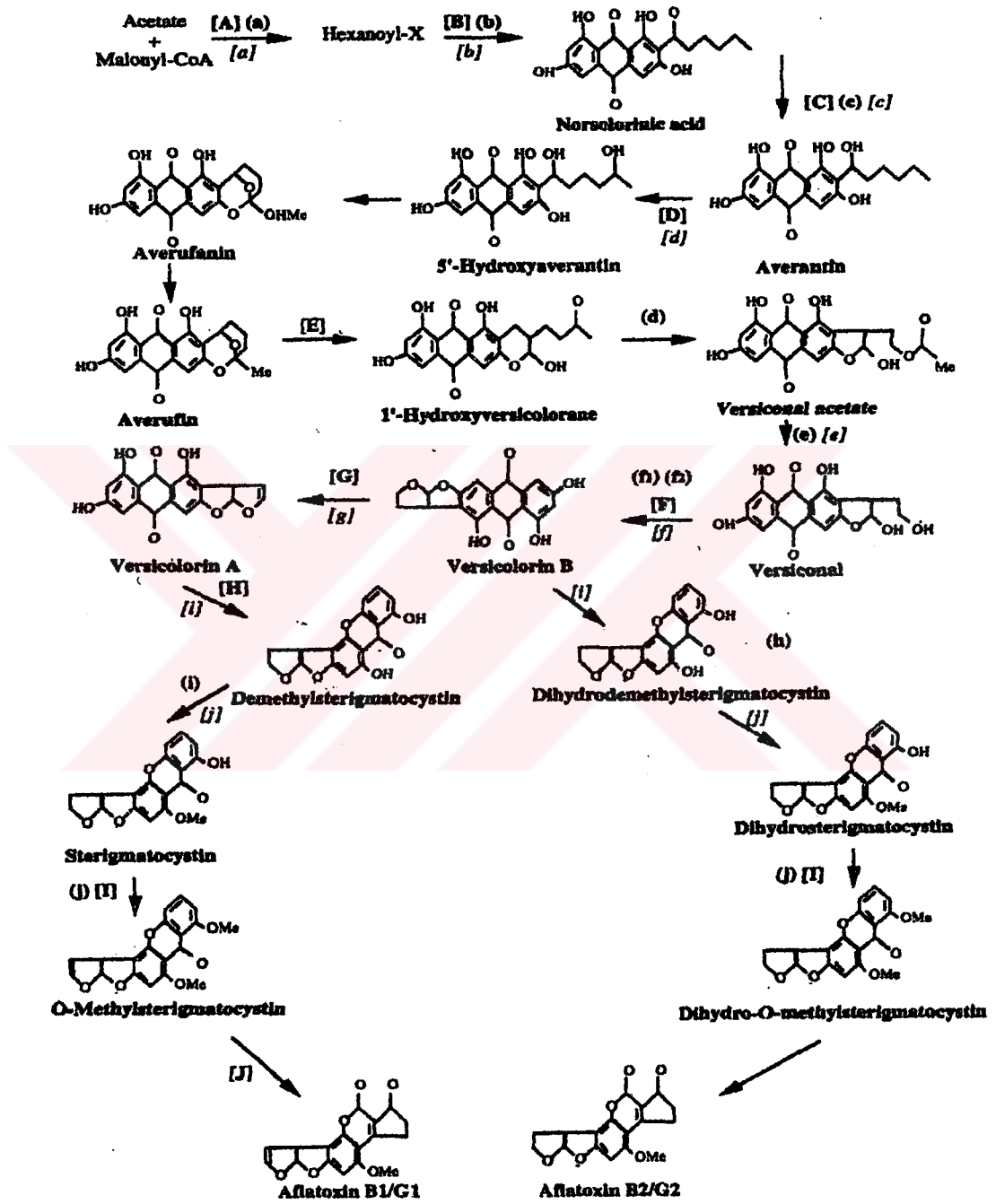
Bu üç küf tarafından üretilen toksinler türlere göre spesiflik taşımaktadır (Doyle ve ark., 1997). *Aspergillus flavus*, aflatoksin B₁, aflatoksin B₂ ve cyclopiazonic asit üretebilme yeteneğine sahipken, toksijenik *Aspergillus parasiticus* türleri aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ üretebilmekte, buna karşın cyclopiazonic asit üretememektedir (Doyle ve ark., 1997; Mello ve Macdonald, 1997). *Aspergillus nomius*'un ise hemen hemen tüm izolatları, morfoolojik olarak *Aspergillus flavus*'a benzemesine karşın, *Aspergillus parasiticus* gibi cyclopiazonic asit üretmemekte, fakat aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ üretebilmektedir (Doyle ve ark., 1997). Aflatoksin B₁ tüm aflatoksin-pozitif türler tarafından üretilmektedir (Jay, 1992).

2.3.1. Aflatoksin Biyosentezi

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, aflatoksinin biyosentez reaksiyonları anlaşılmıştır. Aflatoksin biyosentezinin başlangıç aşamasında, asetat ve malonyl coA, yağ asidi senteaz vasıtasıyla hexanoyl'e dönüşmektedir (Sweeney ve Dobson, 1999). Oluşan hexanoyl, polyketid senteaz vasıtasıyla norsolorinik asite dönüşerek, aflatoksin biyosentezinin ilk stabil metabolitini oluşturmaktadır. Polyketid yaklaşık 12-17 enzimatik dönüşüm reaksiyonu geçirmektedir (Cotty ve Bhatnagar, 1994; Prieto ve ark., 1996; Woloshuk ve Prieto, 1998; Sweeney ve Dobson, 1999). Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan versicolin B sonrasında, biyosentez yolu iki kola ayrılmakta ve bir tarafta dimetilsterigmatosistinden (DMST) enzimatik reaksiyon sonucu dihidrobisfuran halkası içeren aflatoksin B₁/G₁ oluşurken, diğer kolda dihidro-dimetil-sterigmatosistinden (DHDMST), yapısında tetrabisfuran içeren aflatoksin B₂/G₂ oluşmaktadır (Sweeney ve

Dobson, 1999). Aynı zamanda *In Vivo* koşullarda yapılan çalışmalar sonucunda, aflatoksin B₁'in o-methyl-sterigmatocystinin, aflatoksin B₂'nin ise dihydrosterigmatocystin'in türevi olduğu bildirilmektedir (Yu ve ark., 1998; Yabe ve ark., 1999). Aflatoksin biyosentez reaksiyonları Şekil 2.1 'de gösterilmiştir.





Şekil 2.1 Aflatoxin Biyosentez Reaksiyonu (Sweeney ve Dobson, 1999).

2.3.2. Aflatoksin Oluşum Koşulları

Aflatoksinler, genellikle hasat öncesi tarlada meydana gelmektedir. Hasat sonrası kontaminasyon ise ürünün kurutulması geciktirildiğinde ve küf gelişimi için uygun su aktivitesi değerlerinde meydana gelebilmektedir (Saad, 2000).

Toksijenik *Aspergillus* küfleri tarafından oluşturulan aflatoksin miktarının, sıcaklık, oksijen, karbon ve nitrojen kaynağı gibi çevresel ve besinsel faktörlere bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir. Aflatoksin oluşumunu sağlayan en önemli iki faktörün; ürünün nem içeriği ve sıcaklık olduğu vurgulanmaktadır (Jay, 1992; Mello ve Macdonald, 1997).

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus*, 10-12 °C ile 42-43 °C aralığında gelişebilmekte olmasına karşın, optimum gelişme sıcaklıkları 32-33 °C'dir. Aflatoksin üretimi ise 12 ile 40 °C arasında gerçekleşmektedir (Doyle ve ark., 1997). *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksin sentezi için optimum sıcaklık isteğinin 25-30 °C arasında olduğu bildirilmektedir (Mello ve Macdonald, 1997).

Aflatoksin üretimi optimum olarak a_w 0,98-0,99 değerlerinde gerçekleşmektedir. Su aktivitesi değeri 0,85 civarına düştüğünde ise toksin üretimi durmaktadır (Doyle ve ark., 1997). Aflatoksin oluşumu için optimum koşulların belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, optimum sıcaklık derecesinin 30 °C olduğu bildirilmiştir. Aflatoksin oluşumu için optimum su aktivitesi ve inkübasyon süresinin ise sırasıyla 0,99 ve 15 gün olduğu söylenmiştir (Gqaleni ve ark., 1997).

Aspergillus parasiticus pH 2.0-10,5 aralığında gelişebilirken, *Aspergillus flavus* pH 11,2'ye kadar gelişebilmektedir. *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksin üretimi optimum olarak pH 6.0 olmasına karşın, pH 3.0 – 8.0 aralığında aflatoksin üretebildiği söylenmektedir (Doyle ve ark., 1997).

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus*'un gelişme ve aflatoksin oluşturma koşullarını belirlemek amacıyla Sabouraud agar'da yapılan bir çalışmada, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un gelişimi için optimum sıcaklığın 33 °C, pH'nın 5.0 ve su aktivitesi değerinin ise 0,99 olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada 15 °C'de a_w

0,95 değerinde küf gelişmesi görülmesine karşın, a_w 0,90 değerinde küf gelişimi görülememiştir. Toksin üretimi için optimum gelişme sıcaklıklarının 24–28 °C arasında olduğu vurgulanmıştır (Jay, 1992).

2.3.3. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Aflatoksinler difuranokumarin yapısında bileşikler olup doğada 18 farklı türevi bulunmaktadır (Jay, 1992; Doyle ve ark., 1997; Sweeney ve Dobson, 1999). Bu metabolitlerden aflatoksin M_1 ve M_2 , aflatoksin B_1 ve B_2 'nin hidroksillenmiş metaboliti olup, süt, idrar ve dışkıda metabolizma ürünü olarak bulunabilmektedir (Jay, 1992; Sweeney ve Dobson, 1999). Aflatoksin B_2 , 2,3-dihidro aflatoksin B_1 , aflatoksin G_2 ise 2,3-dihidro aflatoksin G_1 olarak tanımlanmaktadır. Bazı önemli aflatoksin metabolitlerinin ultraviyole (UV) ışığı altında verdikleri floresans renkleri aşağıda verilmiştir (Jay, 1992). Bazı önemli aflatoksinlerin kimyasal yapıları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

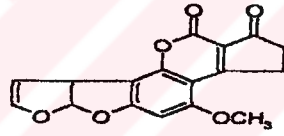
Çizelge 2.1. Bazı Aflatoksin Türlerinin UV Işığında Verdikleri Renkler (Jay, 1992).

Aflatoksin B_1 , B_2	mavi
Aflatoksin G_1	yeşil
Aflatoksin G_2	yeşil-mavi
Aflatoksin M_1	mavi-menekşe
Aflatoksin M_2	menekşe

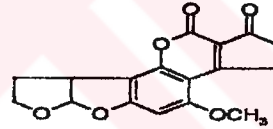
Aflatoksinlerin toksik derecesi bakımından bir sıralama yapıldığında, aflatoksinin toksisitesi B_1 , M_1 , G_1 , B_2 , M_2 , G_2 'ye doğru azalmaktadır (Jay, 1992; Mc Lean ve Dutton, 1995). Aflatoksin B_{2a} ve aflatoksin G_{2a} ise sırasıyla aflatoksin B_1 ve aflatoksin G_1 'in 8,9-hydrate formlarıdır ve daha düşük toksisiteye sahiptirler (Mc Lean ve Dutton, 1995). Bazı aflatoksinlerin kimyasal formülleri aşağıda verilmiştir (Jay, 1992)



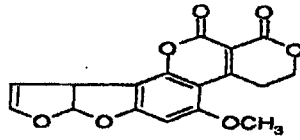
Aflatoksinler kloroform ve metanol gibi polar çözücülerde az çok çözünmekte ve özellikle dimetilsülfoksit gibi çözücüde çözünebilmektedir. Aflatoksinler yüksek sıcaklıklara karşı oldukça dayanıklı olup, normal pişirme sıcaklıklarında ve pastörizasyon sıcaklıklarına karşı oldukça dayanıklıdır (Mc Lean ve Dutton, 1995). Aflatoksinlerin sıcaklık etkisiyle inaktivasyonunu belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, mısırlarda 145-165 °C'lerde kavurma işleminden sonra aflatoksin B₁ konsantrasyonunun %40-80 oranında azaldığını bildirmişlerdir (Altuğ ve ark., 1998). Aflatoksinin yapısında bulunan lakton halkasının bu molekülün alkali hidrolizine karşı hassas olmasını sağladığını belirtmişlerdir (Mc Lean ve Dutton, 1995).



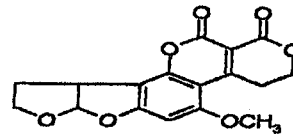
Aflatoksin B1



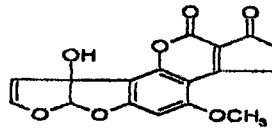
Aflatoksin B2



Aflatoksin G1



Aflatoksin G2



Aflatoksin M1

Şekil 2.2. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları (Biçici, 1980; Sweeney ve Dobson, 1999).

2.3.4. Aflatoksinlerin Toksik Etkileri

Aflatoksinler toksik, kanserojenik, mutajenik ve teratojenik aktivite göstermektedirler (İç ve Yavaş, 1993; Galvano ve ark., 1996; Fan ve Chen, 1999). Aflatoksinler içerisinde aflatoksin B₁ grubun en toksik, hepatoksik ve kanserojenik aktiviteye sahip olanıdır (İç ve Yavaş, 1993; Martins ve Martins, 1999; Leszczynska ve ark., 2000). Uluslararası Kanser Araştırması Enstitüsü tarafından yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda, aflatoksinle kontamine olmuş gıda tüketimiyle karaciğer kanseri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüş ve aflatoksinler 1993 yılında kanserojenik madde olarak sınıflandırılmıştır (Taylor ve ark., 1997; Martins ve Martins, 1999; El Nezami ve ark., 2000; Saad, 2000). Bu sınıflandırmada, aflatoksin B₁ birinci sınıf kanserojenik madde olarak gösterilirken, aflatoksin M₁ ikinci sınıf kanserojenik madde olarak sınıflandırılmıştır (Bakırcı, 2001).

Aflatoksinler potansiyel karaciğer kanseri olup, alınan doza, toksine maruz kalma süresine, toksinin türüne, beslenme durumuna bağlı olarak insan ve hayvanlarda çeşitli etkilere neden olmaktadır. Aflatoksinler yüksek dozda alındığında öldürücü etkiye sahiptir, diğer yandan subletal olarak kronik toksik etkiye neden olabilir (Wang ve Groopman, 1999). Buna ek olarak aflatoksin B₁, DNA sentezini, DNA'ya bağlı RNA polimeraz aktivitesini, mRNA sentezini ve protein sentezini inhibe edebilir (Wang ve Groopman, 1999).

İnsanlarda karaciğer kanseri yoğun olarak orta Afrika ve Asya'nın güneydoğu bölgelerinde görülmektedir. Bu nedenle çeşitli Afrika ülkelerinde ve Tayland'da yapılan çalışmalara göre karaciğer kanseri ile aflatoksin tüketimi arasında korelasyon görülmüştür. 1967 yılında Tayvan'da iki tarım ürününün tüketimi sonucu, 26 kişide gıda zehirlenmesi meydana gelmiş ve 19 çocuktan 3 tanesi ölmüştür. Tüketilen pirinçte yapılan incelemeler sonucunda 200 µg/kg aflatoksine rastlanılmıştır. 1974 yılında da 400 kişi hepatit hastalığından etkilenmiş ve bunlardan 100 tanesi ölmüştür. Ölümünden ise aflatoksinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Doyle ve ark., 1997).

Bu konuda yapılan bir çalışmada, 100 000 kişilik popülasyonda, tüketilen aflatoksin miktarı günde 3 ng/kg vücut ağırlığından, 222 ng/kg vücut ağırlığına artması durumunda karaciğer kanseri vakası sayısı 2.0 dan 35.0'a çıktığı saptanmıştır (Wang ve Groopman, 1999).

2.3.5. Aflatoksin B₁

Aflatoksin B₁ karaciğerde biyotransformasyona uğrayarak, kanserojenik ve mutajenik bir özellik kazanmaktadır (Vidyasagar ve ark., 1997; Lee ve ark., 2001). Aflatoksin B₁, karaciğerde mikrozomal-oksidad enzim sistemi ile metabolize edilmekte, DNA ve proteinlere kovalent bağlarla bağlanarak, oldukça reaktif 8-9 epoksi aflatoksin B₁ oluşmaktadır (Galvano ve ark., 1996; Vidyasagar ve ark., 1997; Özkaya ve ark., 1999; Peltonen ve ark., 2000a). Bu reaktif grup, transkripsiyon prosesini bozmakta, mutajenik veya kanserojenik bir etkiye neden olmaktadır (Doyle ve ark., 1997). Bu konuda, balık ve kuşlarda yapılan çalışmalarda aflatoksin B₁'in karaciğerde aflatoksin B₁-8,9-epoksite dönüşümünde sitokrom p450 enziminin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Lee ve ark., 2001).

Bu epoksi form, DNA ile birleşerek aflatoksin B₁-N₇-Guanine kompleksini oluşturmaktadır. Aflatoksin B₁-nükleik asit kompleksinin, karaciğer kanserine yakalanma riskini 2-3 kat artırdığı söylenmektedir (Wang ve Groopman, 1999). Yapılan bir çalışmada, idrarda aflatoksin B₁-N₇-Guanine bulunma oranı ile aflatoksin B₁ tüketimi arasında dikkate değer bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bu kompleks, Kenya'nın aflatoksin B₁ alımı ile karaciğer kanseri arasında pozitif ilişki bulunan bir bölgesinde toplanan idrarlarda saptanmıştır (Vidyasagar ve ark., 1997; Özkaya ve ark., 1999). Aflatoksin B₁'in ayrıca çeşitli enzimleri inhibe ederek ATP üretimini azalttıkları bildirilmiştir (Doyle ve ark., 1997).

Aflatoksin B₁'in mutajenik aktivitesini belirlemek amacıyla, *Bacillus subtilis*, *Neurospora crossa*, *Salmonella typhimurium*'u kapsayan çeşitli model sistemleri uygulanmıştır. aflatoksin B₁'in başlıca hedef organı karaciğer olmasına rağmen, akciğer,

böbrek ve kolon bölgelerinde önemli sayıda tümörler meydana getirmektedir (Wang ve Groopman, 1999).

2.3.6. Aflatoksin M₁

Aflatoksin B₁'in karaciğerde mikrozomal enzim ve sitoplazmik redüktaz enzim sistemi ile çeşitli metabolitlere dönüştüğü bildirilmektedir. Bu metabolitlerden aflatoksin M₁, aflatoksin B₁'in hidroksillenmiş metabolitlerinden biridir ve süt toksini olarak bilinmektedir (Özkaya ve ark., 1999; Pierides ve ark., 2000; Bakırcı, 2001). Aflatoksin M₁ üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, hayvanların tükettikleri yemde bulunan aflatoksin B₁ miktarı ile, bu hayvanların sütünde bulunan aflatoksin M₁ miktarı arasında yakın bir ilişki olduğu bulunmuştur (Bakırcı, 2001).

Aflatoksin B₁'in süt veren hayvanlarda, metabolizma faaliyeti sonucu, %1-3 oranında hidroksillenmiş metaboliti olan aflatoksin M₁'e dönüştüğü bildirilmektedir (Barbieri ve ark., 1994; Doyle ve ark., 1997).

Choudhary ve ark. (1998), aflatoksin B₁'in süt veren hayvanlarda metabolizma faaliyeti sonucu aflatoksin M₁'e dönüşme oranını araştırmışlardır. 10 Hindistan ineği ile yaptıkları çalışmada, 12.50 ve 108.45 µg/kg arasında değişen miktarda, aflatoksin B₁ içeren yemle beslenen hayvanların sütüne, toksinin 0.15-1.31 µg/kg aflatoksin M₁ olarak kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Frobish ve ark. (1986), benzer konuda 42 süt sığırları ile yaptıkları çalışmada, aflatoksin B₁'in 24 saat süre sonunda süte % 1.74 oranında aflatoksin M₁ olarak kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Aflatoksin M₁'in toksik aktivitesini belirlemek amacıyla ördeklerde ve farelerde yapılan çalışmalarda, aflatoksin M₁'in toksik aktivitesinin aflatoksin B₁'e yakın olduğu belirtilmektedir (Barbieri ve ark., 1994; Galvano ve ark., 1996; Mello ve Macdonald, 1997; Neal ve ark., 1998). Bu konuda farelerde yapılan çalışmalarda, aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁ için LD₅₀ değeri sırasıyla 0.32 mg/kg ve 0.24 mg/kg oranında bulunmuştur. Aflatoksin M₁'in mutajenik aktivitesinin ise aflatoksin B₁'den daha düşük olduğu söylenmektedir (Galvano ve ark., 1996).

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin M₁ ile kontamine olması, önemli bir sağlık riskini oluşturmaktadır. Sütün yeni doğmuş ve gelişme çağındaki çocuklar gibi zayıf immunolojik sisteme sahip olan kişiler tarafından yoğun miktarda tüketildiği gözönüne alındığında tehlikenin boyutları büyümektedir (Neal ve ark., 1998; Pierdes ve ark., 2000). Ayrıca, sütün kabul edilebilir sınır değerleri üzerinde aflatoksin M₁ ile kontamine olması ve kontamine sütün de peynir, yoğurt gibi başka ürünlere işlenmesi yasal açıdan yasak olduğundan, önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Pierdes ve ark., 2000).

Quintavalla ve Casolori (1985), İtalya'da ticari olarak satılan 8 yoğurt örneğinden 6'sında 36-334 ng/kg arasında değişen miktarlarda aflatoksin M₁'e rastlamışlardır.

Jordano ve ark. (1989), İspanya'da yoğurtlarda küf kontaminasyonu düzeyini ve aflatoksin tehlikesini tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, 20 yoğurt örneğinden 7 tanesinde aflatoksin üretme yeteneğine sahip olan *Aspergillus flavus* küfünü tespit etmişlerdir.

Barrios ve ark. (1997), İspanya'da ticari olarak satışa sunulan 52 peynir örneğinde yaptıkları çalışmada 4 peynir örneğinde aflatoksin üretme yeteneğine sahip olan *Aspergillus flavus* küfö ile karşılaşmışlardır.

Galvano ve ark. (1998), İtalya'da satışa sunulan 159 süt, 97 farklı süt tozu ve 114 yoğurt örneğinde yaptıkları çalışmada, immunoaffinity kolon ekstraksiyonu ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemiyle yapılan analizler sonucunda, 2 süt, 2 yoğurt ve 1 süt tozu örneğinde kabul edilebilir sınır değerlerin üzerinde aflatoksin M₁'e rastlamışlardır.

Bakırcı (2001), Van bölgesinde yaptığı çalışmada, çiğ sütlerde bulunan aflatoksin M₁ miktarını ince tabaka kromatografisi yöntemini kullanarak araştırmıştır. Analiz edilen 90 çiğ süt örneğinden 79 tanesinde aflatoksin M₁'e rastlamış ve bunlardan 35 tanesinin Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen maksimum limitin (0.05 ppb.) üzerinde olduğu bildirmiştir. Ayrıca, sütlerde bulunan aflatoksin M₁ miktarının mevsime göre değişiklik gösterdiğini de vurgulamıştır.

Aflatoksin riskini minimuma indirmek amacıyla pek çok gelişmiş ülkede, gıda ve yem maddelerinde kabul edilebilir maksimum aflatoksin B_1 miktarı ile süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek maksimum aflatoksin M_1 düzeyini gösteren düzenleyici limitler Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. Bu düzenleyici limitler oldukça değişken olmakla birlikte, ülkelerin gelişmişlik düzeyine ve ekonomik durumlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Galvano ve ark., 1996).

Çizelge 2.2. Af M_1 için Düzenleyici Limitler (Galvano ve ark., 1996).

Ülke	Süt (ng/kg)	Bebek Maması (ng/kg)	Peynir (ng/kg)
Arjantin	500 ^a	100	-
Avusturya	50	10	250
Brezilya	500	10	-
Fransa	200	-	-
Almanya	50	10	-
İtalya	50	50	-
Hollanda	50	50	-
İsviçre	50	10 ^b	200
US FDA	500	-	250

^a : Af $B_1+B_2+G_1+G_2+M_1$

^b : Af B_1+M_1

Avrupa Birliği Komisyonu çiğ sütte ve teknolojik işlem uygulanmış sütlerde bulunabilecek maksimum aflatoksin M_1 limitini $0,05\mu\text{g/kg}$ olarak belirlemiştir. Food and Drug Administration (FDA) ise maksimum limiti $0,5\text{ ppb}$. olarak bildirmiştir Aynı zamanda, bu kurumlar kontamine olmuş ürünle iyi kalitede ürünün karıştırılarak kabul edilebilir limitlerin altına düşürülmesi girişimlerini de yasaklamıştır Bu nedenle kontamine olmuş süt örneğinden, aflatoksin M_1 ’in detoksifikasyonu için pratik, geniş ölçekli, ucuz ve etkili detoksifikasyon yöntemlerin oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Pierides ve ark., 2000).

Aflatoksin M₁'in süt içerisinde heterojenik bir şekilde dağılım gösterdiği ve süte uygulanan seperasyon (ayırma) işleminin aflatoksin M₁'in süt içerisindeki dağılımını etkilediği söylenmektedir. Bununla birlikte, aflatoksin M₁'in kazein proteinine bağlanmasından dolayı süt içerisindeki aflatoksin M₁'in, % 80'ninin yağsız kısımda kaldığı öne sürülmektedir (Galvano ve ark., 1996).

2.4. Aflatoksinlerin Detoksifikasyonu

Aflatoksinler toksik ve kanserojenik özellikte olmaları nedeniyle, aflatoksinle kontamine olmuş ürünlerin, insan ve hayvanlar tarafından tüketilmesi önemli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir ve bu nedenle aflatoksin kontrol programlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Aflatoksinlerin sağlık üzerine olumsuz etkilerinin yanısıra, ürün kayıplarına da neden olduklarından ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Dorner ve ark., 1999).

Aflatoksinlerin gerek sağlık ve gerekse ekonomik yönden yarattığı problemler, araştırmacıları gıdalarda aflatoksinlerin azaltılması veya tamamen yok edilmesine yönelik çalışmalara yöneltmiş ve “detoksifikasyon” olarak tanımlanan uygulamalar geliştirilmiştir. Gıda ve yemlerde aflatoksinlerin oluşumunun ve sağlık üzerine olumsuz etkisinin önlenmesi için prensip olarak üç seçenek mevcuttur:

1. Kontaminasyonun engellenmesi,
2. Gıda ve yem maddelerinde mikotoksinlerin detoksifikasyonu ve
3. Sindirim kanalında mikotoksinlerin absorpsiyonunun inhibisyonudur. (Yılmaz ve Özyay, 2001).

Aflatoksin detoksifikasyon işleminin teknik ve ekonomik olarak uygulanabilir ve pratik olması gerekmektedir. FAO'ya göre detoksifikasyon işleminin kabul edilebilmesi için;

1. Toksin oluşumunu engelleyebilmeli, toksine zarar verebilmeli, inaktive edebilmeli veya ortamdaki uzaklaştırabilmeli,
2. Son üründe toksik ve /veya kanserojenik/mutajenik bir kalıntı bırakmamalı,

3. Gıda veya yem maddesinin teknolojik ve/veya besinsel özelliklerinde önemli bir değişikliğe neden olmamalı,
4. Küf sporlarını ve miselyum gelişimini engelleyebilmeli ve
5. Teknolojik ve ekonomik yönden uygulanabilir olmalıdır (Piva ve ark., 1995; Galvano ve ark., 2001).

Aflatoksinle kontamine olmuş gıda maddesinden toksini uzaklaştırmaya ve etkisiz hale getirmeye yönelik fiziksel ve kimyasal detoksifikasyon çalışmaları uzun bir süredir yapılmaktadır. Gıda maddelerinden aflatoksini uzaklaştırmak için uygulanan sıcaklık, UV ışını, adsorbsiyon, iyonize radyasyon gibi fiziksel uygulamalar besin kalitesi üzerine olumsuz etkide bulunmakta ve bütünüyle sonuç vermemekte, klorlama, okside ve hidrolitik ajanların kullanımı şeklinde olan kimyasal uygulamalar ise besin kaybı ve insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle uygulanamamaktadır (Piva ve ark., 1995; Doyle ve ark., 1997; Bata ve Lasztity, 1999; Peltonen ve ark., 2000a). Bu nedenle aflatoksinlerin detoksifikasyonu için pratik, ucuz ve insan sağlığı üzerine olumsuz herhangi bir etkisi bulunmayan güvenilir yöntemlerin oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Peltonen ve ark., 2000a).

2.4.1. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin Detoksifikasyonu

Son yıllarda aflatoksin detoksifikasyonunda, laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan metabolik detoksifikasyonun yanısıra, aflatoksinin bağırsak florasında doğal olarak bulunan laktik asit bakterisine bağlanması ve aflatoksinin gastrointestinal bölgede absorbsiyonunun azaltılarak bakteri-aflatoksin kompleksi şeklinde vücut dışına salgılanması üzerinde durulmaktadır (Kankaanpa ve ark., 2000; El Nezami ve ark., 2000; Peltonen ve ark., 2000a).

Aflatoksin gibi hidrofobik karakterdeki mutajenik ve kanserojenik maddelerin probiyotik özellik gösteren spesifik laktik asit bakterilerinin hücre duvarındaki hidrofobik kısımlara (membran tabakası) nonkovalent bağlarla bağlanarak, bu maddelerin incebağırsakta birikmesinin engellendiği ve vücut dışına salgılandığı ileri

sürülmektedir (Shah ve ark., 1999; Yabe ve ark., 1999; Haskard ve ark., 2000; Peltonen ve ark., 2000a; Yılsay ve Kurdal, 2000).

Bağlanma mekanizmasında, probiyotik laktik asit bakterisinin hücre duvarındaki peptidoglukan ve polisakkaritlerin önemli bir rol oynadıkları bildirilmektedir (Haskard ve ark., 2000; Yılsay ve Kurdal, 2000). Bu amaçla, *Streptococcus faecalis* ile yapılan bir çalışmada antimutajenik aktivitenin, hücre duvarındaki protein yapısında olmayan, karbonhidrat-karbonhidrat kompleksi veya lipid-karbonhidrat kompleksinden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Haskard ve ark., 2000).

Aflatoksin ve heterosiklik aminlerin vücutta, incebağırsak ve kolon bölgelerinde hızlı bir şekilde absorbe oldukları ve buradan da serum albuminlerine non-kovalent bağlarla bağlanarak, karaciğere taşındıkları bildirilmektedir. Karaciğere taşınan aflatoksinlerin safraya ve üriner sisteme salgılanmadan önce biyotransformasyona uğradığı söylenmektedir (Peltonen ve ark., 2000a; Haskard ve ark., 2000). Mutajenik ve kanserojenik maddelerin, doğal florada yer alan probiyotik bakterilerle bağırsak bölgesinde interaksyona girdiği ve bu bakterilerin mutajenik ve kanserojenik maddeleri bağladığı bildirilmektedir (Kankaanpa ve ark., 2000).

Bazı probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksini bağlama yeteneği çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmeye çalışılmıştır. İnsan bağırsak florasının önemli bir kısmını oluşturan, pek çok probiyotik etki gösteren ve fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanımı gittikçe yaygınlaşan *Bifidobacterium* spp. ve bazı *Lactobacillus* türlerinin aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e etkili bir şekilde bağlanma yeteneğinde olduğu bildirilmektedir (El Nezami ve ark., 1996; Anonymous, 1999; Oatley ve ark., 2000; Peltonen ve ark., 2000a; Haskard ve ark., 2000).

2.4.2. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B₁ ve Aflatoksin M₁'e Bağlanma Aktivitesi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

El Nezami ve ark. (1996), *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 'ün *In Vitro* ortamda aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂'ye bağlanma yeteneğini araştırmışlardır.

Araştırmacılar, söz konusu probiyotik laktik asit bakterisinin aflatoksin B₁'e etkili bir şekilde (%95 bağlanma) bağlanma yeteneğinde olduğunu, aflatoksin B₂ ve G₂'ye karşı ise düşük bağlanma aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca, bakterinin aflatoksine bağlanma yeteneğinde, bakteri-aflatoksin inkübasyon süresinin önemli olduğunu vurgulamışlardır.

El Nezami ve ark. (1998), *In Vitro* ortamda yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* LBGG ve *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 suşlarının aflatoksin B₁'e bağlanmasında, bakterinin canlı olmasının, bağlanma aktivitesinde bir önkoşul olmadığını saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, bakteri hücrelerinin sıcaklık uygulaması ile aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinin geliştirildiğini belirtmişlerdir. *Lactobacillus rhamnosus* LBGG, 37°C'de 4 saat inkübasyon sonucunda %51,5, *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 % 53,9 oranında bağlanma aktivitesi gösterirken, ısı işlem uygulanmış bakteri hücreleri (100 °C, pH 7) sırasıyla %79,4 ve %82,5 oranında aflatoksin B₁'i bağlama yeteneği göstermişlerdir.

Anonymous (1999), 6 probiyotik laktik asit bakterisinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneği ve toksini ortamdaki uzaklaştırma yeteneği araştırmış, kullanılan bakteri kültürlerinin aflatoksin B₁'i ortamdaki uzaklaştırma oranını %20-50 arasında bulmuşlardır. Çalışılan probiyotik kültürler arasında, *Bifidobacterium infantis* 1912'in aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinin en yüksek, *Bifidobacterium pseudolongum* 20099'un ise en düşük olduğu açıklanmıştır.

El Nezami ve ark. (2000), *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 ve *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS bakterilerinin *In Vivo* ve *In Vitro* ortamlarda aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinin araştırmışlardır. *Lactobacillus rhamnosus* GG varlığında 1 dk. içerisinde aflatoksin B₁'in bağırsak dokularında absorpsiyonun (0,07 µg /g doku) kontrole göre önemli miktarda azaldığını bildirmişlerdir (0,27 µg /g doku). Aflatoksin B₁'in *Lactobacillus rhamnosus* GG varlığında oniki parmak dokularına taşınmasında % 70 oranında bir azalma meydana geldiğini bu oranın *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 ve *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* JS bakterisinde ise sırasıyla % 37 ve % 63 oranlarında

olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, test edilen bakterilerin *In Vivo* ortamda aflatoksin B₁'e bağlanma aktivitelerinde inkübasyon süresinin önemli farklılıklar meydana getirdiğini saptamışlardır. *Lactobacillus rhamnosus* GG bakterisi ile 1 haftalık civcivlerde yaptıkları çalışmada, 10¹⁰ kob/g konsantrasyonunda bakteri hücresinin 1,5 µg /g aflatoksin B₁'i 1 dakikalık inkübasyon sonucunda %51 oranında bağlama yeteneği gösterirken, inkübasyon süresinin 60 dakikaya çıkarılması durumunda ise bu oranın %92'ye çıktığını belirtmişlerdir. Aynı şekilde *Lactobacillus rhamnosus* LC 705, inkübasyon süresi 1 dakika olduğunda % 36 aflatoksin B₁ bağlama yeteneğinde iken, 60 dakika sonunda % 71 oranında aflatoksin B₁'i bağlama yeteneği gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, probiyotik laktik asit bakterilerinin *In Vivo* ve *In Vitro* ortamda aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneklerinde de önemli farklılıklar olduğunu saptamışlar ve bunu *In Vivo* ortamda, bağlanma olayında ortam koşullarının farklılığından kaynaklanan girişim faktörlerinin fazlalığına bağlamışlardır. *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin *In Vitro* ortamda 60 dakika inkübasyon sonunda % 92 oranında aflatoksin B₁'i bağlama aktivitesi gösterdiğini, *In Vitro* ortamda ise aynı sürede bu oranın % 80 olduğunu belirtmişlerdir. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* JS suşunun *In Vivo* ortamda % 82, *In Vitro* ortamda ise % 22 oranında aflatoksin B₁'i bağlama yeteneğinde olduğunu saptamışlardır.

Pierides ve ark. (2000), bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksin M₁'i ortamdan uzaklaştırma yeteneğini fosfat-buffered-saline (PBS), yağsız süt ve yağlı süt örneklerinde araştırmışlardır. Araştırmacılar ayrıca, probiyotik laktik asit bakterilerinin canlı olmasının aflatoksin M₁'i ortamdan uzaklaştırılmasında bir önşart olup olmadığını da araştırmışlardır. Test edilen probiyotik laktik asit bakterilerinin PBS çözeltisinde 15-16 saat inkübasyon sonucunda aflatoksin M₁'i ortamdan uzaklaştırma yeteneğinin *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 bakterilerinin sırasıyla % 50 ve %45 oranında olduğunu, *Lactobacillus acidophilus* LA1 ve *Lactobacillus rhamnosus* 1/3'un % 18 oranında aflatoksin M₁'i ortamdan uzaklaştırdığını saptamışlardır. Araştırmacılar, test edilen bakteriler arasında, aflatoksin M₁ detoksifikasyonunda en yüksek aktiviteyi *Lactobacillus rhamnosus* GG ve

Lactobacillus rhamnosus LC-705'un gösterdiğini, genetik olarak *Lactobacillus rhamnosus* GG'ye çok benzeyen *Lactobacillus rhamnosus* 1/3'ün ise en zayıf aktiviteyi gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *Lactobacillus acidophilus* LA1 hücrelerinin sıcaklık uygulaması sonucu öldürülmesiyle, PBS çözeltisinde aflatoksin M₁'i ortamdaki uzaklaştırma yeteneğinin %18,8'den % 25,5'e yükseldiğini bildirmişlerdir. *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 ve *Lactobacillus rhamnosus* 1/3'ün aflatoksin M₁'i ortamdaki uzaklaştırma kabiliyetinin ise, hücrelerin sıcaklık uygulaması sonucu öldürülmesiyle, iki katına çıktığını bildirmişlerdir.

Kankaanpa ve ark. (2000), bağırsaktaki epitel dokulara tutunma özelliğinde olan *Lactobacillus rhamnosus* GG ile yaptıkları çalışmada, 4 saat inkübasyon sonucunda bakteri-aflatoksin kompleksi oluşturarak, aflatoksin B₁'i %78,5 oranında ortamdaki uzaklaştırdığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda bakteri yüzeyine tutunan aflatoksinin bu bakterinin bağırsaktaki epitel dokulara tutunma yeteneğini engellediğini saptamışlardır.

Oatley ve ark. (2000), insan bağırsak florasının önemli bir kısmını oluşturan pek çok probiyotik etki gösteren ve fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanımı gittikçe yaygınlaşan *Bifidobacterium* türlerinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinin belirlemişlerdir. Çalışılan bakteriler arasında *Bifidobacterium bifidum* BGN4 suşunun %46 oranında aflatoksin B₁'e bağlanarak en yüksek aktiviteyi gösterdiğini saptamışlardır. *Bifidobacterium* spp. JO3'ün %41, *Bifidobacterium longum* JR20 ve *Bifidobacterium* spp. CH4'ün % 37, *Bifidobacterium adolescentis* 14'ün %31, *Bifidobacterium* spp. Bf6'nın ise %25 oranında bağlanma aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Araştırmacılar, yapılan çalışmalar sonucunda, aflatoksin B₁'e en yüksek bağlanma aktivitesi gösteren *Bifidobacterium bifidum* BGN4 suşunun hücre duvarının diğer suşlara göre, daha hidrofobik bir karektere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar buradan yola çıkarak, bağlanma aktivitesi ile hücre yüzeyinin hidrofobik karakterde olması arasında bir bağlantı bulunabileceğini öne sürmüşlerdir.

Haskard ve ark. (2000), *Lactobacillus rhamnosus* GG ile yaptıkları çalışma sonucunda, bakterinin aflatoksine bağlanmasında canlı olması ile cansız olması (sıcaklıkla ve asitle inaktivasyon) arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır. Sıcaklık ve

asit uygulaması ile proteinlerin denatürasyonu sonucunda daha hidrofobik yüzeylerin açığa çıkmasına neden olduğu bildirilmektedir. Araştırmacılar, laktik asit bakterilerinin hücre duvarlarında yer alan peptidoglukan ve polisakkarit tabakasının, aflatoksinle bağlanma aktivitesinde rol oynayan en önemli yapılar olduğunu belirtmişlerdir. Bu bakterilerin hücre duvarında polisakkarit yapısı temel olarak, hücre duvarı polisakkariti, peptidoglukan ve teikoik/lipoteikoik asit olmak üzere 3 temel formda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Peltonen ve ark. (2000a), probiyotik kültürlerin üretiminde kullanılan 6 farklı bakteri kültürünün, karaciğer kanserine neden olduğu bildirilen aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneği üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırma sonucunda laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneği %5,8-31,3 arasında bulunmakla birlikte, bağlanma yeteneğinin kullanılan probiyotik bakterinin türüne bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışılan kültürler arasında en yüksek bağlanma aktivitesini, *Lactobacillus johnsonii* LJ-1 ve *Lactobacillus paracasei* F19'un gösterdiğini belirtmişlerdir.

Peltonen ve ark. (2000b), insan veya hayvansal orijinli çeşitli *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, 1×10^{10} kob/g bakteri hücrelerinin PBS çözeltisinde 24 saat inkübasyon sonucunda 5 µg/ml aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda *Bifidobacterium* türlerinin yanısıra birkaç *Lactobacillus* türünün etkili bir şekilde aflatoksin B₁'i ortamdan uzaklaştırdığını saptamışlar ve bu bakteri türlerinin ticari uygulamalarda kullanılabilirliği üzerinde araştırmalara gereksinim duyulduğunu bildirmişlerdir.

2.4.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin Oluşumu Üzerine Etkileri

Laktik asit bakterilerinin gıda patojenleri ve gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmalara karşı inhibitör ve öldürücü etkileri bulunmaktadır. Bunun yanısıra,

sınırlı sayıda yapılan çalışmalar sonucunda, bazı laktik asit bakterilerinin antifungal ve antiaflatoksijenik aktivite gösterdikleri de bildirilmektedir (Batish ve ark., 1990; Jay, 1992; Gourama ve Bullerman, 1995; Batish ve ark., 1997; Stiles ve ark., 1999; El Nezami ve ark., 2000).

Laktik asit bakterilerinin antifungal ve antiaflatoksijenik aktiviteleri tam olarak açıklanamamasına rağmen, yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, laktik asit bakterileri tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklarına sahip, sıcaklığa karşı dayanıklı metabolitlerin ve besin maddeleri için mikrobiyal yarışın rol oynayabileceği üzerinde durulmaktadır (Batish ve ark., 1997; Rees, 1997).

Son yıllarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen, antifungal ve antiaflatoksijenik aktivitede rol oynadığı düşünülen metabolitlerin belirlenmesi üzerinde durulmaktadır. Bu amaçla, *Fusarium* spp. ve *Aspergillus niger*'e karşı antifungal aktiviteye sahip olan *Lactobacillus plantarum*'un ürettiği düşük molekül ağırlığına sahip metabolitler, GC/MC ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda pH 4'ün altında aktif olan bu metabolitlerden, benzoik asit, cyclo (glycl-l-leucyl), methylhydantoin ve mevalonolactone'un antifungal aktiviteden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Rees, 1997). Bu konuda yapılan başka bir çalışmada ise, zorunlu heterofermantatif *Lactobacillus plantarum* 21B tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan metabolitler, GC/MC kullanarak tespit edilmeye çalışılmış ve bu metabolitlerden phenilactic acid ve bunun 4-hidroksi türevi olan 4-hydroxyphenyllactic asidin çeşitli küf türlerine karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Lavermicocca ve ark., 2000).

Bazı araştırmacılar, aflatoksin inhibisyonunun düşük pH, besin maddesi tükenmesi ve mikrobiyal yarıştan kaynaklandığını savunmakla birlikte, bir kısım araştırmacı da, laktik asit ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolitlerden kaynaklanabileceğini ve bu metabolitlerin de düşük molekül ağırlığına sahip, sıcaklığa dayanıklı bileşikler olduğunu vurgulamışlardır (Gourama ve Bullerman, 1995).

Laktik asit bakterilerinin aflatoksin oluşturan küfler ve aflatoksin oluşumu üzerine etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından tespit edilmeye çalışılmıştır ve özellikle

Lactococcus lactis subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leucunostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus* ve bunun gibi sınırlı sayıda bazı bakterilerin antifungal aktivite gösterdikleri bildirilmektedir (Stiles ve ark., 1999).

2.4.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin Oluşumuna Etkisi Konusunda Yapılan Çalışmalar

Wiseman ve Marth (1980), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in bulunduğu ortamda, aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus parasiticus* gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Üç günlük *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* kültürüne, küf sporlarının inoküle edilmesi durumunda küf gelişiminin ve aflatoksin oluşumunun engellendiği görülmüştür ve bu durumun muhtemelen ortamda oluşan laktik asitten kaynaklanabileceği vurgulanmıştır.

El Gendy ve Marth (1981), *Lactobacillus casei*'nin aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus parasiticus* gelişimi ve aflatoksin oluşturmaya üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. *Lactobacillus casei* ve *Aspergillus parasiticus* sporlarının sıvı kültüre aynı anda aşılması durumunda 28 °C'de 10 gün inkübasyon sonucunda ortam koşullarının küf gelişimini teşvik ettiğini, buna karşın *Lactobacillus casei* varlığında kontrole göre daha az aflatoksin üretildiğini bildirmişlerdir. 3 günlük *Lactobacillus casei* kültürüne *Aspergillus parasiticus* sporları aşılması durumunda ise bakteri tarafından üretilen metabolitlerin, küf gelişimini ve aflatoksin oluşumunu azalttığını bildirmişlerdir.

Coallier-Ascah ve Idziak (1985), tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus flavus*'un bulunduğu Lablemco Tripton Broth (LTB) besiyerinde hiç aflatoksin oluşmadığını veya çok az aflatoksin oluştuğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar, bu azalmada *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* gelişimi sonucu pH'daki düşüşün ve besin maddelerindeki azalmanın rol oynamadığını, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in gelişimi

sırasında ürettiği düşük molekül ağırlıklarına sahip, sıcaklığa karşı dayanıklı metabolitlerin rol oynadığını vurgulamışlardır.

Karunaretne ve ark. (1990), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus plantarum*'un *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerine etkisini, 3 farklı substrat kullanarak (sıvı broth, pirinç, mısır) incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışılan laktik asit bakterileri hücrelerinin ve bunlar tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan metabolitlerin, aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 gelişimi ve aflatoksin oluşturması üzerine etkisini ayrı ayrı araştırmışlardır. Araştırmacılar test ettikleri bakterilerin küf gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerine etkisinin substratlara göre değişiklik gösterdiklerini bildirmekle birlikte, küf gelişimini engellemede laktik asit bakterisi hücrelerinin, bu hücreler tarafından üretilen ve düşük molekül ağırlığına sahip olan metabolitlere göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç, rekabetçi gelişimin küf gelişimini engellemede etkili olan faktörlerden biri olabileceği sonucunu ortaya çıkarmakla birlikte, besin maddeleri için mikrobiyal yarış ve pH'da meydana gelen düşüşün kombine bir etkisinin var olduğu vurgulanmıştır. Laktik asit bakterilerinin varlığında inkübasyon süresi boyunca aflatoksin oluşumu tespit edilememiştir. Çalışılan 3 laktik asit bakterisi arasında küf gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerine en yüksek inhibitör etkiyi *Lactobacillus acidophilus* göstermiştir.

Lunchese ve ark. (1992), yaptıkları çalışmada *Pediococcus* ve *Lactobacillus*'un aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksin oluşturması üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu bakterilerin *In Vitro* ortamda yapılan çalışma sonucunda, küf gelişimini engelleyememelerine rağmen, aflatoksin oluşumunu engellendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, laktik asit bakterisinin küf gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerine inhibitör etkisinin rekabetçi ortamdan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Gourama ve Bullerman (1995), *Lactobacillus* spp.'nin, *Aspergillus flavus* sporlarının canlılığını, çimlenmesini, gelişimini ve aflatoksin biyosentezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu bakteriler tarafından üretilen düşük molekül

ağırlığına sahip olan metabolitlerin ise sporların canlılığını ve çimlenmesini etkilemeksizin aflatoksin oluşumunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Croci ve ark. (1995), gıda üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan laktik asit bakterilerinin sentetik bir besiyerinde, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999'un aflatoksin oluşturma üzerine etkisini incelemişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda, *Lactobacillus casei* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen aflatoksin miktarını azaltırken, aynı zamanda aflatoksini metabolize ettiğini ve hidroksillenmiş türevlerine dönüştürerek toksisitesini düşürdüğünü saptamışlardır. *Lactobacillus cremoris*'in ise aflatoksin oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Gourama ve Bullerman (1997), yılında yaptıkları çalışmada ise, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* 371 nolu suş tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan metabolitlerin, *In Vitro* koşullarda, *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ ve G₁ sentezleme yeteneğini inhibe ettiğini, buna karşın *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* 371 ile *Aspergillus flavus*'un bulunduğu karışık kültürde, bu bakterinin küf gelişimini ve aflatoksin oluşumunu engileyemediğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Aflatoksin B₁ ve Aflatoksin M₁ Standartları

Bu araştırmada kullanılan aflatoksin B₁ standart çözeltisi 11,6 µg/ml konsantrasyonunda, aflatoksin M₁ standart çözeltisi ise 1 µg/ml konsantrasyonunda Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.2. Probiyotik Laktik Asit Bakteri Kültürleri

Nestle-İsviçre'den temin edilen, *Lactobacillus acidophilus* NCC 12, *Lactobacillus acidophilus* NCC 36, *Lactobacillus acidophilus* NCC 68, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 ve *Bifidobacterium bifidum* NCC 381 suşları kullanılmıştır.

3.1.3. Küf Kültürü

TÜBİTAK-MAM'den sağlanan aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus flavus* küfü kullanılmıştır.

3.1.4. İnce Tabaka Plakaları

Araştırmada, 20x20 cm boyutlarında silica jel 60 kaplı Merck 5553 ince tabaka plakaları kullanılmıştır.

3.1.5. Süt Tozu

Bu çalışmada, PINAR Süt Mamülleri San. A.Ş.'den sağlanan TS. 1329 süt tozu standartına uygun olarak, yağsız inek sütünün kurutulmasıyla üretilmiş, A sınıfı süt tozu kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Liyofilize Bakteri Kültürünün Aktivasyonu

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* liyofilize kültürleri içeren cam ampüller etil alkol ile dezenfeksiyon sonrasında, alevde kırılma noktalarından kırılmışlardır. Liyofilize kültürleri içeren cam ampüller içerisine, kültürleri çözündürmek amacıyla 1 ml MRS+Sistein (%0.05) ilave edilmiş ve bir iki dakika çözünmesi beklenmiştir. Bakteri kültürleri çözündükten sonra, 10 ml MRS+Sistein içeren tüpe aktarılmıştır. Bu tüpten 1'er ml alınarak 10 ml'lik MRS+Sistein içeren tüplere inokülasyon yapılarak anaerobik koşullarda 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültürlerini aktive etmek amacıyla bu işlem bir defa daha tekrarlanmıştır.

3.2.2. Bakteri Kültürünün Hazırlanması

Çalışılacak bakteri kültürünü hazırlamak amacıyla, 10 ml MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) Broth içerisine aktive edilmiş bakteri kültürlerinden 1 ml inoküle edilmiş ve anaerobik koşullarda 37 °C'de 2 gece inkübasyona bırakılmıştır. Çalışılacak bakteri konsantrasyonu yayma kültürel ekim yöntemiyle 10^8 kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (Shin ve ark., 2000).

3.2.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B₁'e Bağlanma Yeteneğinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Aflatoksin B₁ Standart Çözeltisinin Hazırlanması ve Saklanması

Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinin belirlenmesinde 1 µg/ml (ppm) aflatoksin B₁ standart çözeltisi kullanılmıştır. Bu amaçla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünden satın alınan stok çözeltisi (11,6 µg/ml), toluen-asetonitril (98+2) ile seyreltilmiştir ve çalışma konsantrasyonu 1 µg/ml olarak ayarlanmıştır. Aflatoksin B₁ stok standart çözeltileri ağzları iyice kapatılmış ve alüminyum folyo ile sarılı şişeler içerisinde derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Aflatoksin B₁'in PBS (fosfat-buffered-saline) Çözeltisine Aşılması

1 µg/ml konsantrasyonunda, toluen-asetonitril (98+2) ile hazırlanmış aflatoksin B₁ standart çözeltisi, 1.5 ml PBS (% 0.8 NaCl, %0.12 K₂HPO₄, % 0.03 KH₂PO₄) çözeltisine aşılardan önce, toluen-asetonitril karışımı N₂ gazı altında kurutularak ortamdaki uzaklaştırılmış ve daha sonra PBS ile çözündürülerek aşılama gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3. Aflatoksin B₁'in Yağsız Süte Aşılması

Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneklerinin belirlenmesinde model olarak yağsız süt örneğinden yararlanılmıştır. Bu amaçla yağsız inek sütünün kurutulmasıyla üretilmiş süt tozu (0.2gr/ml) steril saf su ile sulandırılmıştır.

1 µg/ml konsantrasyonunda, toluen-asetonitril (98+2) ile hazırlanmış aflatoksin B₁ standart çözeltisi, 1.5 ml yağsız süt çözeltisine aşılardan önce, toluen-asetonitril

karişımı N₂ gazı altında kurutularak ortamdan uzaklaştırılmış ve daha sonra 1.5 ml yağsız süt ile çözündürülerek aşılama gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B₁'e Bağlanma Yeteneğinin Belirlenmesi

MRS sıvı besiyeri içerisinde 37 °C'de 48 saat gelişen, 10⁸ kob/ml konsantrasyonundaki *Lactobacillus acidophilus* NCC 12, *Lactobacillus acidophilus* NCC 36, *Lactobacillus acidophilus* NCC 68, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 ve *Bifidobacterium bifidum* NCC 381 suşları, 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmişlerdir. Santrifüjleme işleminden sonra supernatant bir enjektör yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakteri hücreleri 1µg/ml aflatoksin B₁ içeren 1.5 ml PBS ve 1.5 ml yağsız süt ile ayrı ayrı çözündürülmüştür ve 37 °C'de 24 saat aerobik inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra bakteri-aflatoksin kompleksi içeren PBS ve yağsız süt çözeltilerine 5000 rpm'de 10 dk santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Bu şekilde, bakterilerin aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri belirlenmeye çalışılmıştır. Santrifüjleme işleminden sonra supernatant kısmı bir enjektör yardımıyla alınarak bağlanmamış aflatoksin B₁ miktarı ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bakterilerin aflatoksin B₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla aynı işlemler kontrol olarak laktik asit bakterilerinin bulunmadığı ortamda da uygulanmıştır. Bu şekilde analiz yönteminden kaynaklanabilecek yalancı pozitif sonuçlar engellenmeye çalışılmıştır.

3.2.3.5. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi

Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'e bağlanıp bağlanmadığının belirlenmesi amacıyla ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla santrifüjleme işlemi sonucunda enjektör vasıtasıyla toplanan supernatant kısmı plakalara

kenardan 1 cm ve aşağıdan 3 cm olacak şekilde 1'er cm aralıklarla mikroenjektör yardımıyla 10 µl hemen yanına 15 µl ve 20 µl supernatant, pozitif kontrol supernatantları (5,10,15 µl) ve aflatoksin standart çözeltisinden (1 µg/ml) 3 µl, 5 µl, 6.5 µl, 8µl, 9µl ve 10 µl olarak uygulanmıştır. Aflatoksin B₁ standart çözeltileri kullanılmadan önce kapağı açılmadan oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir

Uygulanan tüm örnek ve standartların aynı büyüklükte ve en fazla 0.5 cm çapında olmasına ve damlatıcı enjektörün plakadaki adsorbantı (silikajel) çizip parçalamamasına dikkat edilmiştir. Her yeni çalışmada mikroenjektör kloroform ve aseton ile yıkanmıştır (Banoğlu, 1985; Çoksöyler, 1997).

Bu işlemler aflatoksinin ışıktan zarar görmemesi amacıyla yarı aydınlık bir ortamda ve çözgenin kolay uçması, benek çaplarının mümkün olduğu kadar küçük olmasını sağlamak amacıyla sıcak hava akımı altında yapılmıştır (Banoğlu, 1985;Var, 1987).

3.2.3.6. İnce Tabaka Plakalarının Geliştirilmesi

Örnekler ince tabaka plakasına uygulandıktan sonra, plakalar geliştirme tankına alınmıştır. Plakaların geliştirilmesi sırasında AOAC'deki uygulamalarda bazı değişiklikler yapılmıştır. Örnek içerisinde analiz sonuçlarını etkileyebilecek kirlilik maddeleri bulunmadığından (lipit, renk maddeleri vb) aflatoksin B₁ analizinde, tek yönlü ince tabaka kromatografisi uygulanmıştır. Bu amaçla ince tabaka plakaları, 100 ml kloroform-aseton (90+10) geliştirme çözeltilerinin bulunduğu tanka, örneklerin tatbik edildiği noktalar geliştirme çözeltisinin üzerinde kalacak şekilde yerleştirilmişlerdir.

Plakalar karanlık bir yerde, oda sıcaklığında yürütücü çözeltiler geliştirme çizgisine erişinceye kadar, yaklaşık 40-45 dakika gelişmeye bırakılmışlardır. Geliştirme sırasında, plakayı ışıktan korumak amacıyla bu uygulamalar karanlık bir yerde yapılmıştır. Süre sonunda plaka geliştirme tankından çıkartılıp karanlık bir yerde kurumaya bırakılmıştır.

3.2.3.7. Plakaların Değerlendirilmesi

İnce tabaka plakaları 366 nm dalga boylu UV ışığı altında değerlendirilmiştir. Supernatant kısımda bulunan bağlanmamış aflatoksin B₁ beneği ve 1 µg/ml'lik aflatoksin B₁ standartına ait aynı Rf değerindeki beneklerin renk şiddetleri karşılaştırılmış ve supernatanta ait benek şiddetinin, aflatoksin B₁ standartının hangi miktarına uyduğu belirlenmiştir. Supernatanta ait beneğinin aflatoksin B₁ standart miktarlarının hangisine uyduğunu saptamayı kolaylaştırmak amacıyla, plaka UV lambasından yavaş yavaş uzaklaştırılıp yaklaştırılmıştır. Böylece gözden kaybolma ve yeniden görülme anlarında belirlenen benek çiftleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

Kloroform-aseton geliştirme çözeltisinde aflatoksin B₁'in Rf değeri 0.50 olarak belirlenmiştir. Rf değeri çözeltinin aldığı yolun (aflatoksin B₁) çözücünün aldığı yola oranı olarak ifade edilmektedir. Sonuçta aflatoksin B₁ miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Var, 1987).

$$\text{Aflatoksin B}_1 (\mu\text{g/kg}) = S \times Y \times V / E \times M$$

S : Bilinmeyene eşdeğer olan aflatoksin B₁ (µl)

Y: Aflatoksin B₁ standartının konsantrasyonu (µg/kg)

V: Numune ekstraktının son seyreltildiği hacim (µl)

E: "S" ye eşdeğer miktarda floresans yoğunluk gösteren örnek beneği için uygulanan örnek miktarı (µl)

M: Vialdeki ekstrakta eşdeğer olan numune (gr)

3.2.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁'e Bağlanma Yeteneklerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Aflatoksin M₁ Standart Çözeltisinin Hazırlanması ve Saklanması

Bakteri kültürlerinin aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde 0,1 µg/ml konsantrasyonunda aflatoksin M₁ standart çözeltisi kullanılmıştır. Bu amaçla 1 µg/ml aflatoksin M₁ stok çözeltisinden 100 µl alınarak, benzen-asetonitril (98+2) ile 1000 µl'ye tamamlanmıştır. Stok standart çözeltileri kullanılmadan önce kapağı açılmadan oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Stok aflatoksin M₁ standart çözeltisi derin dondurucuda alüminyum folyoya sarılmış şişelerde muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2. Aflatoksin M₁'in PBS Çözeltisine Aşılması

0,1 µg/ml olarak hazırlanan çalışma çözeltisinden benzen-asetonitril karışımı, N₂ gazı vasıtasıyla kuruluğa kadar uzaklaştırıldıktan sonra viallerdeki aflatoksin M₁ kalıntısı 1.5 ml PBS çözeltisi ile çözündürülerek aşılama gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. Aflatoksin M₁'in Yağsız Süte Aşılması

Test edilen bakterilerin aflatoksin M₁'e bağlanma yeteneklerinin belirlenmesinde gıda modeli olarak yağsız süt örneğinden yararlanılmıştır. 0.1 µg/ml konsantrasyonundaki aflatoksin M₁ standart çözeltisindeki benzen-asetonitril (98+2) karışımı, N₂ gazı altında uzaklaştırılmış ve aflatoksin M₁, 1.5 ml yağsız süt ile çözündürülerek aşılama yapılmıştır.

3.2.4.4. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁'e Bağlanma Yeteneğinin Belirlenmesi

Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin M₁'e bağlanma yeteneğinin belirlenmesinde, diğerlerine göre aflatoksin B₁'e daha yüksek bağlanma aktivitesi gösteren, *Lactobacillus acidophilus* NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 suşları ile çalışılmıştır. 10 ml MRS Broth içerisinde bulunan bakteri hücreleri 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işleminden sonra supernatant kısmı bir enjektör yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakteri hücreleri, 1 µg/ml aflatoksin M₁ içeren 1.5 ml PBS ve gıda modeli olarak çalışılan yağsız süt örneği ile ayrı ayrı çözündürülmüş, 37 °C'de 24 saat aerobik inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra bakteri-aflatoksin kompleksi içeren PBS ve yağsız süt örneklerine 5000 rpm'de 10 dk santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Santrifüjleme işleminden sonra supernatant kısmı bir enjektör yardımıyla alınarak bağlanmamış aflatoksin miktarı tespit edilmiştir. Bu şekilde bakterilerin aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bakterilerin aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla aynı işlemler kontrol olarak bakterilerinin bulunmadığı ortamda da uygulanmıştır. Bu şekilde yalancı pozitif sonuçlar engellenmeye çalışılmıştır.

3.2.4.5. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi

Lactobacillus acidophilus NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 suşlarının aflatoksin M₁'e bağlanma yeteneklerinin belirlenmesinde kantitatif ince tabaka kromatografi yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, santrifüjleme işlemi sonucunda enjektör vasıtasıyla toplanan supernatant kısmı plakalara kenardan 1 cm ve aşağıdan 3 cm olacak şekilde 1.5 cm aralıklarla mikroyektör yardımıyla 50 µl, 100 µl ve 150 µl örnek supernatantı, pozitif kontrol supernatantları ve aflatoksin M₁ standart çözeltisinden (1 µg/ml) 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl ve 50 µl olarak uygulanır. Aflatoksin M₁ standart

çözeltisi kapağı açılmadan oda sıcaklığında bekletildikten sonra ince tabaka plakasına tatbik edilmiştir.

Bu işlemler aflatoksinin ışıktan zarar görmemesi amacıyla yarı aydınlık bir ortamda ve çözgenin kolay uçması, benek çaplarının mümkün olduğu kadar küçük olmasını sağlamak amacıyla sıcak hava akımı altında yapılmıştır (Banoğlu, 1985; Var, 1987; Erkahveci ve Karaali, 1997).

3.2.4.6. İnce Tabaka Plakalarının Geliştirilmesi

İnce tabaka plakaları, 100 ml kloroform-aseton-metanol (87+10+3) geliştirme çözeltilerinin bulunduğu tankta, tek aşamalı olarak geliştirilmiştir. İnce tabaka plakalarının geliştirilmesi işlemi 3.2.3.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.4.7. Plakaların Değerlendirilmesi

İnce tabaka plakalarının değerlendirilmesi ve bu şekilde bakteri hücrelerine bağlanmamış aflatoksin M₁ konsantrasyonunun belirlenmesi işlemi 3.2.3.7'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.4.8. Geri Alma Çalışması

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum*'un PBS ve yağsız süt ortamlarında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde, analiz yönteminden kaynaklanabilecek hataları belirlemek amacıyla geri alma çalışması yapılmıştır. Bu amaçla test edilen probiyotik bakterilerin bulunmadığı durumda, 1.5 ml'lik PBS ve yağsız süt ortamlarına 1 µg/ml ve 0.1 µg/ml'lik konsantrasyonlarındaki aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁ çözeltileri ayrı ayrı aşılanmıştır. Probiyotik laktik asit bakterilerinin yokluğundaki işlemler, 3.2.3.4 ve 3.2.4.4'de belirtildiği şekilde

tekrarlanmıştır. Geri alma çalışmasında, ilave edilen aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'in geri kazanım oranları 3.2.3.7'de belirtilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.4.9. İstatistiksel Değerlendirme

Test edilen probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde elde edilen bulgular SPSS istatistik paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Ayrıca *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerini karşılaştırmak amacıyla Student's T Testi uygulanmıştır.

3.2.5. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin, *Aspergillus flavus* Gelişimi ve Aflatoksin B₁ Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Araştırılması

3.2.5.1. Küf Kültürünün Hazırlanması

Aflatoksijenik özellikte olan *Aspergillus flavus* yatık PDA (Potato Dextrose Agar) besiyerinde 25 °C'de 7-10gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra yatık agar %0.05 oranında tween-80 ile kuvvetlendirilmiş fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmıştır. Steril öze yardımıyla sporların çözeltiye geçmesi kolaylaştırılmıştır. Daha sonraki aşamada küf sporu içeren çözelti tek katlı steril peynir bezi ile filtre edilerek misellerin ortamdan ayrılması sağlanmıştır. Çalışılacak küf sporu konsantrasyonu PDA besiyerinde yayma kültürel ekim yöntemi uygulanarak ml'de 10⁴ spor olacak şekilde ayarlanmıştır (Karunaratne ve ark., 1990).

3.2.5.2. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri ve Küf Sporlarının İnokülasyonu

250 ml'lik erlenler içerisinde bulunan, 100 ml MRS sıvı besiyeri ve yağsız süt örneği içerisine 1 ml, 10⁸ kob/ml oranında *Lactobacillus acidophilus* NCC 12,

Lactobacillus acidophilus NCC 36, *Lactobacillus acidophilus* NCC 68, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 ve *Bifidobacterium bifidum* NCC 381 suşları ayrı ayrı inoküle edildikten sonra aynı anda 1 ml 10^4 spor/ml *Aspergillus flavus* inoküle edilmiştir. Probiyotik laktik asit bakterilerinin antiaflatoksijenik aktivitesini tespit etmek amacıyla aynı işlemler laktik asit bakterilerinin yokluğunda da yapılmıştır. Örnekler 30 °C’de 10 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda aflatoxin B₁ analizi yapılmıştır (El Gendy ve Marth, 1981; Coallier-Ascah ve Idziak, 1985).

3.2.5.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin *Aspergillus flavus* Gelişimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Probiyotik laktik asit bakterilerinin *Aspergillus flavus* gelişimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, bakteri ve küf sporlarının bulunduğu karışık kültürde aerobik koşullarda 30 °C’de 10 gün inkübasyon sonunda *Aspergillus flavus* sayımı yapılmıştır. Aynı işlem kontrol olması amacıyla test edilen probiyotik bakterilerin olmadığı ortamda da tekrarlanmıştır. Bu amaçla PDA besiyerinde yayma kültürel ekim yöntemi kullanılarak *Aspergillus flavus* sayımı yapılmıştır.

3.2.5.4. pH Tayini

Probiyotik laktik asit bakterileri ve *Aspergillus flavus*’un birlikte bulunduğu MRS broth ve süt örneklerine 28-30 °C’de 10 gün inkübasyon süresi sonunda cam elektrotlu “WTW” marka pH metre kullanılarak pH analizi yapılmıştır. Örnekler pH analizine tabi tutulmadan önce iyice homojenize edilmiştir.

3.2.5.5. *Aspergillus flavus* Aşılanmış MRS Broth ve Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin B₁ Aranması

3.2.5.5.1. Aflatoksin B₁'in Ekstrakte Edilmesi

Homojenize edilerek alınan 80 ml MRS broth ve 80 ml yağsız süt ortamları ayrı ayrı 500 ml'lik ağzı tıraşlı cam erlene konulmuş ve üzerine 200 ml metanol (Merck), 20 ml saf su ilave edildikten sonra, erlenin ağzı sıkıca kapatılıp, 15 dakika süreyle çalkalanmıştır. Bu süre sonunda 60 ml saf su ilave edilmiş ve 15 dakika daha çalkalanmıştır. Karışım daha sonra Whatman 4 nolu kaba filtre kağıdından süzümüştür (Çoksöyler, 1997).

Süzüntünün 70 ml'si 250 ml'lik ayırma hunisine aktarılmış ve üzerine 50 ml hegzan (Merck), 5 ml saf su ve 5 gr tuz (NaCl-Merck) ilave edilerek karışım 3dk çalkalanmıştır. Bekleme sonunda iki fazın iyice ayrılması sağlanmış ve alttaki metanol-su fazı alınmış, hegzan içeren üst faz ise atılmıştır (Banoğlu, 1985; Çoksöyler, 1997; Özkaya ve ark., 1999).

Ayırma hunisine 90 ml diklorometan (Merck) ve 20 ml saf su ilave edilerek 3 dakika süreyle çalkalanmış ve ikinci ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon sonunda, alttaki olası aflatoksin B₁ içeren diklorometan fazı, içinde 10 gr susuz sodyum sülfat (Merck) bulunan filtre kağıdından süzümüştür (Çoksöyler, 1997).

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda, MRS broth ve süt ortamında bulunabilecek ve analiz sonucunu etkileyebilecek lipid, protein ve renk maddelerinin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır (Özkaya ve ark., 1999).

Elde edilen süzöntü, 45 °C'de döner buharlaştırıcıda, diklorometan fazı tamamen uçuncaya kadar kurutulmuştur. Bu işlem sonunda ekstraksiyon balonunda kalan kısım 0.5-1 ml kloroform (Merck) ile 2-3 defa yıkanarak vial alınmış ve daha sonraki aşamada vial içerisindeki kloroform, toksinin oksidasyonla kaybına meydan vermemek amacıyla azot (N₂) gazı altında kurutulmuştur. Elde edilen ekstraktlar aflatoksin B₁ tayininde kullanılmıştır (Var, 1987).

3.2.5.5.2. Kalitatif İnce Tabaka Kromatografisi

Kalitatif İnce Tabaka Kromatografisi analizi, test edilen probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁ oluşumunu engelleyip engellemediğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Steiner ve ark. (1988)'nın geliştirdikleri tek boyutlu iki aşamalı ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

Örnek ekstraktaları 0,2 ml toluen-asetonitril ile çözündürülmüş ve ince tabaka plakasına tatbik işlemine hazır hale getirilmiştir. Plakalara kenardan 1 cm ve aşağıdan 8,5 cm olacak şekilde 1,5'ar cm aralıklarla 20 µl örnek hemen yanına 10 µl örnek+10 µl standart ve bunun da yanına 20 µl aflatoksin B₁ standardı aktarılmıştır (Çoksöyler, 1997).

Örnek ekstraktları ve standartlar, azaltılmış ışık altında, mümkün olduğu kadar çabuk bir şekilde ve sıcak hava akımı altında adsorbanta (silikajel) aktarılmıştır.

3.2.5.5.3. İnce Tabaka Plakalarının Geliştirilmesi

Kromatografi tankında geliştirme işlemi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, standartlarla aynı R_f değerindeki yabancı beneklerin analiz sonuçlarını etkilemesini önlemek amacıyla susuz dietil eter (Merck)'de geri yürütme işlemi uygulanmıştır. Plakaların geliştirilmesi tamamlandıktan sonra, karanlık bir yerde kuruması beklenmiştir ve daha sonra 100 ml kloroform-aseton (90+10) bulunan geliştirme tankında ikinci plaka geliştirme işlemi yapılmıştır.

3.2.5.5.4. Kromatografi Plakalarının Değerlendirilmesi

Kromatografi plakaları 366 nm dalga boylu UV ışığı altında değerlendirilmiştir. Örnek ve standartlara ait kromatogramların aynı R_f değerinde ve aynı renkte olup olmadığı belirlenmiştir.

Aflatoksin B₁'e ait benek ile aynı Rf değerinde ve aynı renkte beneğin bulunması durumunda, kromatogramdaki beneğin aflatoksin B₁'e ait olduğu ve analiz edilen ortamda aflatoksin B₁ bulunduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

3.2.5.5.5. Doğrulama Deneyi

İnce tabaka plakası üzerinde aflatoksin B₁ olduğu sanılan benekler ve aflatoksin standartları üzerine %25'lik H₂SO₄ ince zerrelere halinde püskürtücü ile püskürtülerek şüpheli beneklerin standarta ait olduğu UV (366 nm dalga boyunda) ışığı altında sarı bir renk alıp almadığı incelenmiştir (Çoksöyler, 1997).

3.2.5.5.6. Kantitatif İnce Tabaka Kromatografisi

Tek boyutlu iki aşamalı TLC yöntemi AOAC, 1990'a göre yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un Aflatoksin B₁'i Bağlama Yeteneği

Araştırmada kullanılan 10⁸ konsantrasyonundaki *Lactobacillus acidophilus* NCC 12, *Lactobacillus acidophilus* NCC 36 ve *Lactobacillus acidophilus* NCC 68, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 ve *Bifidobacterium bifidum* NCC 381 nolu suşların, PBS (fosfat-buffered saline) çözeltilisinde aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

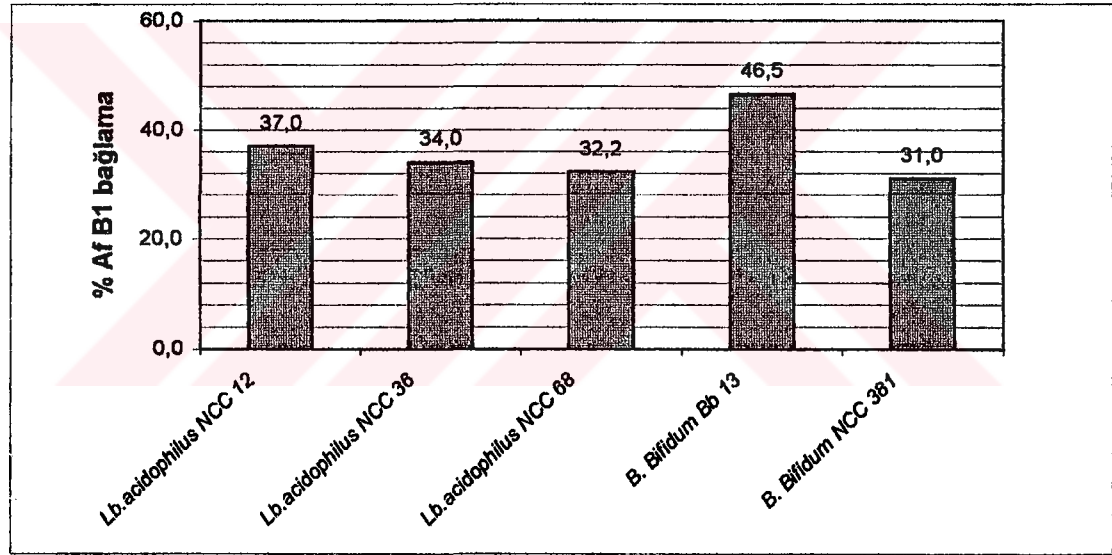
Çizelge 4.1'in incelenmesiyle de görülebileceği gibi *Lactobacillus acidophilus* suşlarının aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri ortalama olarak %32.2-37.0 arasında bulunmuştur. Çalışılan suşlar arasında *Lactobacillus acidophilus* NCC 12'nin PBS çözeltilisinde 24 saat inkübasyon sonucunda aflatoksin B₁'e % 37 oranı ile en yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiği, *Lactobacillus acidophilus* NCC 68'in ise %32.2 ile en düşük aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur.

Çizelge 4.1. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un PBS Çözeltilisinde Aflatoksin B₁'i Bağlama Yeteneği

Bakteri	Af B ₁ bağlama yeteneği (%)				
	1.Deneme	2.Deneme	3.Deneme	4.Deneme	Ortalama
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 12	40	34	38	36	37,0
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 36	37	32	33	34	34,0
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 68	34	31	32	32	32,2
<i>B. bifidum</i> Bb 13	48	44	46	48	46,5
<i>B. bifidum</i> NCC 381	30	32	30	31	31,0
Geri Alma (%)	98	97	94	95	96,0

Bifidobacterium bifidum suşlarının, PBS çözeltisindeki aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri ise % 46.5-31.0 arasında bulunmuştur.

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneklerinin belirlenmesinde varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 4.3). Sonuçlardan da görülebileceği gibi *Bifidobacterium bifidum* suşlarının, *In Vitro* ortamda aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Çalışılan probiyotik laktik asit bakterileri arasında *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün PBS çözeltisinde aflatoksin B₁'e etkili bir şekilde (%46.5) bağlandığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un PBS çözeltisinde Aflatoksin B₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması

Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksine bağlanmasının fiziksel bir olay olduğu ve bakterinin hücre duvarı yapısı ile yakından ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Bakteri-aflatoksin bağlanmasında, bakterinin hücre duvarında yer alan peptidoglukan tabakasının önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (El Nezami ve ark., 1998).

Aflatoksin gibi mutajenik özellik gösteren maddelerin laktik asit bakterisine bağlanmasının ise katyonik bağlarla olduğu bildirilmektedir (Morotomi ve Mutai, 1986).

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının, aflatoksin B₁'e bağlanma yetenekleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak ($p < 0.05$) önemli bulunmuştur. Bunun, bağlanma mekanizmasında etkili olduğu bildirilen hücre duvarı bileşiminin farklılığından kaynaklanabileceği ve bu nedenle, aynı türün farklı suşlarının arasında da önemli farklılıkların olabileceği düşünülmektedir. Pierides ve ark. (2000), bu konuda yaptıkları çalışma sonucunda, genetik olarak birbirlerine oldukça benzer olan suşların farklı bağlanma yetenekleri gösterebileceklerini bildirmişlerdir.

Çalışılan probiyotik laktik asit bakterilerinin PBS çözeltisinde aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinin belirlenmesi amacıyla farklı zamanlarda 4'er deneme yapılmıştır. Test edilen bakterilerin PBS çözeltisinde aflatoksin B₁'i bağlama yeteneği ile ilgili yapılan deneme sonuçları ve bunların ortalamaları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Araştırmada, analiz yönteminin güvenilirliğini ve hassasiyetini belirlemek amacıyla, her denemede aflatoksin B₁'i PBS çözeltisinden geri alma çalışması yapılmıştır. Bu şekilde analiz yönteminden meydana gelebilecek olası kayıpların belirlenmesi sağlanmıştır.

PBS çözeltisinde yapılan geri alma çalışmaları sonucunda, aflatoksin B₁'in %94-98 oranında geri alındığı belirlenmiştir. Analiz yönteminin uygulanması sırasında meydana gelen %2 ile %6 arasındaki kaybın, kromatogramın 366 nm dalga boylu UV ışığı altında okunması sırasında meydana gelebilecek hatalardan ve aflatoksin B₁ ile kontamine edilmiş PBS çözeltisinin, bakteri kültürüne aktarılması sırasında meydana gelebilecek kayıplardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Lactobacillus acidophilus suşlarının yağsız süt ortamındaki aflatoksin B₁'i bağlama yeteneklerinin %29.5-34.5 arasında, *Bifidobacterium bifidum* suşlarının ise %30-38.5 arasında olduğu belirlenmiştir.

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının model olarak kullanılan yağsız süt örneği (0.2 g yağsız süt tozu /ml) içerisindeki aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2'nin incelenmesiyle de görülebileceği gibi, çalışılan bakteri suşları arasında *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün yağsız süt örneğinde ortalama % 38.5 oranı ile en yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. En düşük bakteri aktivitesini ise ortalama %29.5 oranı ile *Lactobacillus acidophilus* NCC 68 göstermiştir.

Çalışılan probiyotik bakterilerin, süt örneği içerisindeki aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri 4 kez tekrarlanmıştır. ve tekrar edilen sonuçlar arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır.

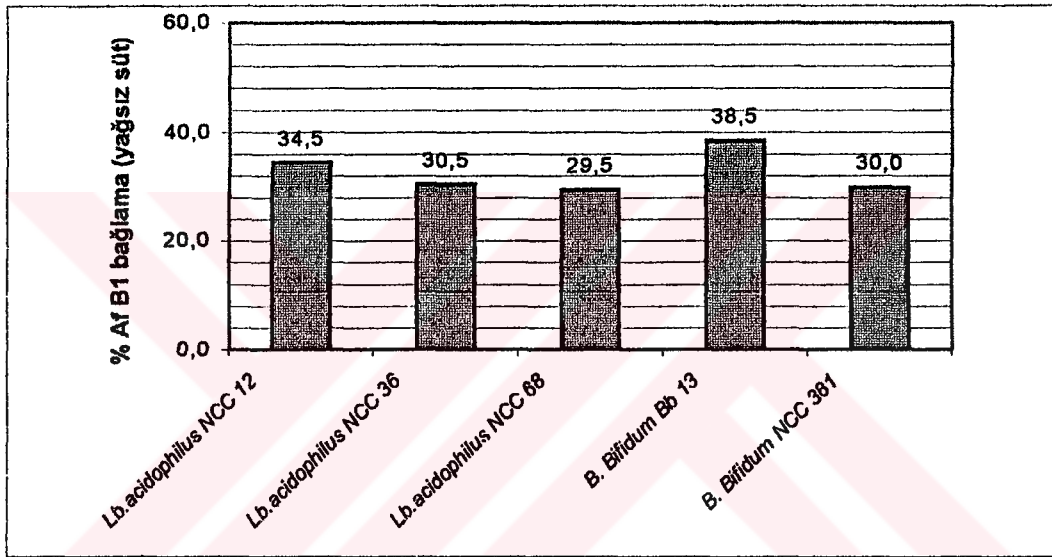
Çizelge 4.2. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin B₁'i Bağlama Yeteneği

Bakteri	Af B ₁ bağlama yeteneği (%)				
	1.Deneme	2.Deneme	3.Deneme	4.Deneme	Ortalama
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 12	36	35	34	33	34.5
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 36	30	29	31	32	30.5
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 68	28	30	31	29	29.5
<i>B. bifidum</i> Bb 13	40	39	37	38	38.5
<i>B. bifidum</i> NCC 381	31	30	31	28	30.0
Geri Alma (%)	59	60	62	62	60.8

Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneklerinin belirlenmesinde ortam koşulları, istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda tüm bakteri suşlarının PBS çözeltisinde, yağsız süte oranla daha yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiği görülmüştür. Her iki ortamda da aflatoksin B₁'e en yüksek bağlanma aktivitesi gösteren *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün, PBS

çözeltisinde aflatoksin B₁'in % 46.5'ni bağlayabilirken, yağsız süt örneğinde ise %38.5'ni bağlayabildiği saptanmıştır.

Çalışılan bakteri suşlarının, yağsız süt ortamında aflatoksin B₁'e, nispeten düşük bağlanma yeteneği göstermesinin, model olarak kullanılan yağsız sütteki girişim faktörlerinin (protein, karbonhidrat, mineral madde) farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.2. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un yağsız süt ortamında aflatoksin B₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması

Aflatoksin B₁-bakteri kompleksinin *In Vivo* ortamda yani bağırsak bölgesinde, *In Vitro* ortamda meydana gelen aflatoksin B₁-bakteri kompleksine göre daha stabil olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bakterilerle yapılan çalışmalar sonucunda bağırsak bölgesinde 60 dakika inkübasyon sonucunda aflatoksin B₁-bakteri kompleksinin stabilitesini koruduğunu, *In Vitro* ortamda ise, aynı süre içerisinde aflatoksin B₁-bakteri kompleksinin stabilitesini kaybederek önemli miktarda aflatoksin B₁'in tekrar sıvı içerisinde serbest kaldığını söylemişlerdir (El Nezami ve ark., 2000).

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının yağsız süt ortamında aflatoksin B₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesi çalışmasında, analiz yönteminden kaynaklanabilecek kayıpları belirlemek amacıyla yağsız süt ortamında aflatoksin B₁'i geri alma çalışması yapılmıştır. Farklı zamanlarda yapılan denemeler sonucunda analiz yönteminden kayanaklanan kaybın %38-41 arasında olduğu belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarından da görülebileceği gibi, çalışılan bakterilerin PBS ve yağsız süt ortamında aflatoksin B₁'i geri alma çalışmalarının sonuçları arasında önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur. Geri alma çalışmaları sonucunda PBS çözeltisinde aflatoksin B₁'in ortalama % 96'sı geri alınırken, yağsız süt ortamında ortalama %60.8'i geri alınabilmiştir. Aflatoksin B₁'in yağsız süt ortamında, süt proteinlerine veya süt içerisindeki karbonhidratlara bağlanabileceği ve bu nedenle santrifüjleme işlemi sonucunda, molekül ağırlığının düşük olmasına karşın, protein ve/veya karbonhidrat tabakası tarafından bağlanan aflatoksin B₁'in, çökelti kısmında kalmış olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmada kullanılan *Lactobacillus acidophilus* *Bifidobacterium bifidum* suşlarının *In Vitro* ve model olarak uygulanan yağsız süt ortamında, aflatoksin B₁'i bağlama ve ortamdan uzaklaştırma çalışmalarında, bakteri-aflatoksin B₁ inkübasyonu sırasında aflatoksin B₁'in stabilitesini koruduğu ve bakteri hücreleri tarafından herhangi bir biyotransformasyona uğratılmadığı görülmüştür. Bu konuda yapılan bir çalışmada, *Bacillus megaterium* NRRLB-1368'in aflatoksin B₁'i metabolik bir degradasyona uğratmadığı, aflatoksin B₁'in bakterinin membran tabakasında yer alan proteinlere bağlandığı bildirilmiştir (Lillehoj ve Ciegler, 1968).

Probiyotik özellik gösteren laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar 1996 yılında başlatılmış ve bu konuda sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bu konuda Anonymous (1999), yapılan bir çalışmada test edilen probiyotik bakterilerin aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri % 20-50 arasında bulunmuştur.

Oatley ve ark. (2000), *In Vitro* koşullarda *Bifidobacterium* spp.'nin aflatoksin B₁'i bağlama yeteneklerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar çalışılan bakteri türleri arasında *Bifidobacterium bifidum* BGN 4'ün aflatoksin B₁'e %46 oranında bağlanarak, en yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, en yüksek bağlanma aktivitesi gösteren *Bifidobacterium bifidum* BGN4'ün hücre duvarının, diğer suşlara göre daha hidrofobik bir karektere sahip olduğunu ve bağlanma aktivitesi ile bakteri hücre duvarı yüzeyinin hidrofobik karakterde olması arasında bir bağlantının kurulabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bolognani ve ark. (1997), bazı fermente süt ürünlerinin tüketimiyle vücuda alınan probiyotik laktik asit bakterilerinin benzo(a)pryne, aflatoksin B₁ ve bunun dışında 5 farklı gıda kanserojenine bağlanma yeteneğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar *In Vitro* koşullarda yapılan çalışmalar sonucunda bu bakterilerin aflatoksin B₁ ve diğer kanserojenik özellikteki maddeleri bağlayabilme yeteneğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.3. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin PBS ve Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin B₁'i Bağlanma Yetenekleri^a

BAKTERİ	% aflatoksin B ₁ Bağlama Yeteneği (ortalama±standart sapma, n=4)	
	PBS	Yağsız Süt
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	37.0 ± 2.5	34.5 ± 1.3
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 36	34.0 ± 2.1	30.5 ± 1.3
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 68	32.2 ± 1.2	29.5 ± 1.3
<i>B. bifidum</i> Bb 13	46.5 ± 1.9	38.5 ± 1.3
<i>B. bifidum</i> NCC 381	31.0 ± 0.9	30.0 ± 1.1

^a: Test edilen bakterilerin aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri için verilen değerler, 4 tekerrürlü olarak yapılan çalışmanın ortalama ± standart sapma'sını göstermektedir.

4.2. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un Aflatoksin M₁'i Bağlama Yeteneği

Probiyotik bakterilerin aflatoksin M₁'e bağlanma yeteneğinin belirlenmesinde aflatoksin B₁'e karşı yüksek bağlanma aktivitesi gösteren *Lactobacillus acidophilus* NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 suşları ile çalışılmıştır.

10⁸ konsantrasyonundaki *Lactobacillus acidophilus* NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün PBS çözeltisinde aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.4 ve grafiksel olarak Şekil 4.3' de gösterilmiştir.

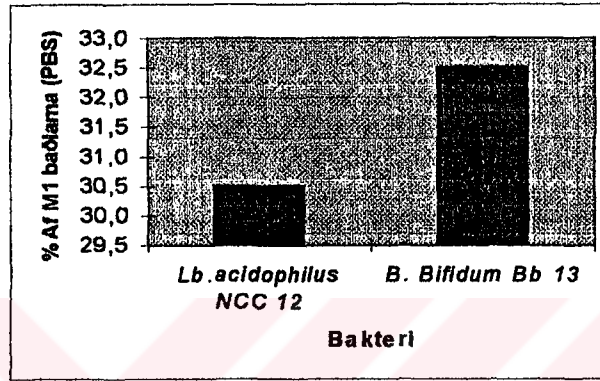
Çizelge 4.4. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un PBS Çözeltisinde Aflatoksin M₁'i Bağlama Yeteneği

Bakteri	Af M ₁ bağlama yeteneği (%)				
	1.Deneme	2.Deneme	3.Deneme	4.Deneme	Ortalama
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 12	30	34	30	28	30.5
<i>B. bifidum</i> Bb 13	35	34	32	29	32.5
Geri Alma (%)	90	92	92	91	91.3

Çizelge 4.4'de de görülebileceği gibi *Lactobacillus acidophilus* NCC 12'nin PBS çözeltisinde aflatoksin M₁'i bağlama yeteneği ortalama %30.5 iken, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 suşunun aflatoksin M₁'i bağlama yeteneği ortalama %32.5 oranında bulunmuştur. Her iki bakterinin PBS ortamında aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur.

Araştırmada kullanılan bakterilerin *In Vitro* ortamda aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri 4 kez tekrarlanmıştır. *Lactobacillus acidophilus* NCC 12'nin aflatoksin M₁'i bağlama yeteneği %28-34 arasında, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün ise % 29-35 arasında bulunmuştur. Test edilen bakterilerin aflatoksin M₁'i bağlama yeteneğinin, denemeler arasında önemli farklar göstermediği görülmüştür.

Lactobacillus acidophilus NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün *In Vitro* ortamda, aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin araştırılmasında, analiz yönteminin güvenilirliğini belirlemek amacıyla her denemede PBS ortamından aflatoksin M₁'i geri alma çalışması yapılmıştır. *In Vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda, aflatoksin M₁'in %90-92 arasında, ortalama %91.3 oranında geri alındığı belirlenmiştir.



Şekil 4.3. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un PBS çözeltisinde aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması

PBS ortamından aflatoksin M₁'i geri alma çalışmaları sonucunda meydana gelen ortalama % 8,7'lik kaybın, santrifüjleme işlemi sonrası supernatant kısmının kromatograma, yüksek miktarda (100-150 µl) aktarılması sırasında olabilecek hatalardan, kromatogramın UV ışığı altında okunması sırasında veya aflatoksin M₁ ile kontamine edilmiş PBS çözeltisinin bakteri kültürüne aktarılması sırasında meydana gelebilecek hatalardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Test edilen bakterilerin, PBS ortamında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur.

Bifidobacterium bifidum Bb 13'ün PBS ortamında hem aflatoksin B₁ hem de aflatoksin M₁'e, diğer bakterilere oranla daha yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, aflatoksin B₁'e karşı daha yüksek bağlanma aktivitesi göstermiştir. *Bifidobacterium bifidum* Bb 13, PBS ortamında bulunan aflatoksin B₁'in ortalama % 46,5'ni bağlayabilirken, aflatoksin M₁'in % 32,5'ni bağlayabilmiştir. Aynı

şekilde *Lactobacillus acidophilus* NCC 12 *In Vitro* ortamda aflatoksin B₁'in % 37'sini, aflatoksin M₁'in ise ortalama % 30.5'ni bağlayabilmiştir.

Bifidobacterium bifidum Bb 13 ve *Lactobacillus acidophilus* NCC 12'nin aflatoksin M₁'e karşı nispeten zayıf bağlanma aktivitesi göstermesinin, aflatoksin M₁'in aflatoksin B₁'e göre farklı kimyasal yapıda olmasından ve daha polar bir karakterde olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, santrifüjleme işlemi sonrasında oluşan bakteri-aflatoksin kompleksinin stabilitesini kaybederek, aflatoksin M₁'in aflatoksin B₁'e göre daha polar bir yapıda olması nedeniyle tekrar sıvı solüsyona geçme eğilimi göstermiş olabileceği de düşünülmektedir.

Pierides ve ark. (2000a), bu konuda yaptıkları çalışmada, test ettikleri probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'e, aflatoksin M₁'e oranla daha yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiğini ve bu durumun aflatoksinin kimyasal yapısıyla ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Aflatoksin M₁'in aflatoksin B₁'in hidroksillenmiş (-OH) bir formu olması sonucu polaritesinin arttığı ve daha hidrofilik bir karaktere dönüşmesi nedeniyle sulu solüsyonda alıkonma eğilimi gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Bu konuda Haskard ve ark. (2000) tarafından yapılan başka bir çalışmada, laktik asit bakterilerinin değişik aflatoksin türlerine bağlanma aktivitelerinin, aflatoksinin polaritesiyle ilgili olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar test edilen bakterilerin aflatoksin türlerini bağlama yeteneklerinin sırasıyla aflatoksin B₁, aflatoksin B₂, aflatoksin G₁, aflatoksin G₂ olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından elde edilen bu sonuçlar da, bağlanma mekanizmasında hidrofobik reaksiyonların önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Lactobacillus acidophilus NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün gıda modeli olarak kullanılan yağsız süt ortamında aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.5'in incelenmesiyle de görülebileceği gibi, *Lactobacillus acidophilus* NCC 12'nin aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri % 27-30 arasında bulunmuştur. *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün aflatoksin M₁'i bağlama yeteneği ise % 27-32 arasında bulunmuştur. Gıda modeli olarak kullanılan yağsız süt ortamında test edilen

bakterilerin aflatoksin M_1 'i bağlama yetenekleri istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

Test edilen bakterilerin yağsız süt ortamında aflatoksin M_1 'i bağlama yetenekleri farklı zamanlarda 4 kez tekrarlanmıştır. Bakterilerin yağsız süt ortamında aflatoksin M_1 'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneme sonuçları ve bu sonuçların ortalamaları verilmiştir. (Çizelge 4.5). *Lactobacillus acidophilus* NCC 12 gıda modeli olarak kullanılan yağsız süt içerisindeki aflatoksin M_1 'in ortalama % 28.8'ini bağlayabilirken, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 ortalama % 29.3'ünü bağlama yeteneği göstermiştir.

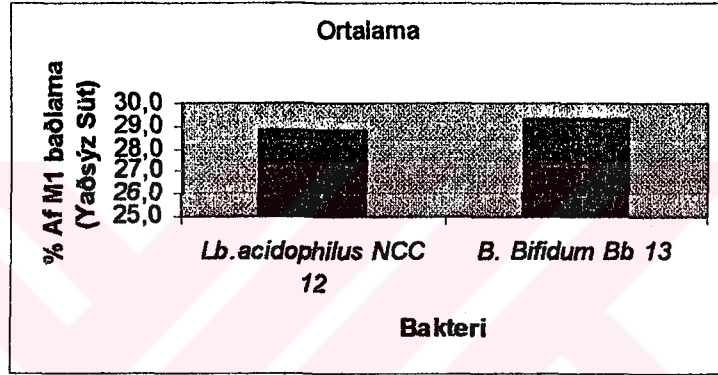
Çizelge 4.5. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin M_1 'i Bağlama Yeteneği

Bakteri	Af M_1 Bağlama yeteneği (%)				
	1.Deneme	2.Deneme	3.Deneme	4.Deneme	Ortalama
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 12	30	27	28	28	28.8
<i>B. bifidum</i> Bb 13	32	27	30	30	29.3
Geri Alma (%)	70	72	75	70	71.8

Analiz yönteminin güvenilirliğini tespit etmek amacıyla, denemelerde gıda modeli olarak kullanılan süt ortamından aflatoksin M_1 'i geri alma çalışması yapılmıştır. Denemeler sonucunda aflatoksin M_1 'in % 70-75 oranında geri alınabildiği görülmüştür.

Analiz yönteminin uygulanması sırasında meydana gelen ortalama % 28.2'lik kaybın, santrifüjleme aşaması sonrasında bir kısım aflatoksin M_1 'in süt proteinlerine ve/veya diğer komponentlere bağlanmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Test edilen bakterilerin yağsız süt ortamında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'i geri alma çalışmalarının karşılaştırılması durumunda ise, aflatoksin B₁'in ortalama % 60.8'i geri alınabilmişken, aflatoksin M₁'in % 71.8'i geri alınabilmiştir. Bunun, Pierides ve ark. (2000) tarafından da belirtildiği gibi, aflatoksin M₁'in daha hidrofilik bir karakterde olması nedeniyle sulu solüsyonda alıkonma eğilimi göstermesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.4 *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*' un yağsız süt ortamında aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması

Lactobacillus acidophilus NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün PBS ortamında ve gıda modeli olarak kullanılan yağsız süt ortamında bağladıkları aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁ miktarı karşılaştırmalı olarak grafiksel görünümü Şekil 4.5'de verilmiştir.

Lactobacillus acidophilus NCC 12'nin PBS ve süt ortamlarında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e bağlanma yetenekleri arasındaki farklılık Student's T Testi uygulanarak belirlenmiştir. *Lactobacillus acidophilus* NCC 12'nin PBS ve süt ortamlarında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e bağlanma yetenekleri arasındaki farklılık önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur.

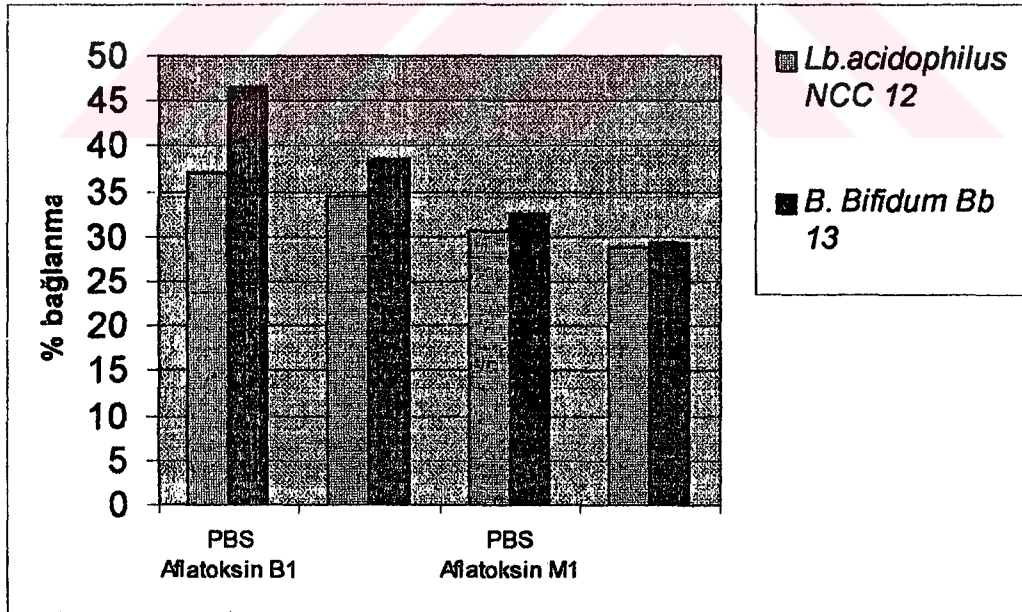
Bifidobacterium bifidum Bb 13'ün PBS ortamında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e bağlanma yetenekleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$)

bulunmuştur. *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün süt ortamında aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e bağlanma yetenekleri arasındaki farklılık da önemli ($p<0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.6. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un PBS ve Yağsız Süt Ortamında Aflatoksin M₁'i Bağlama Yetenekleri^b

BAKTERİ	% Aflatoksin M ₁ Bağlama Yeteneği (ortalama±standart sapma, n=4)	
	PBS	Süt
<i>Lb. acidophilus</i> NCC 12	30.5± 2.5	28.8 ± 1.2
<i>B. bifidum</i> Bb 13	32.5 ± 2.6	29.3 ± 2.0

^b: Test edilen bakterilerin aflatoksin M₁'i bağlama yetenekleri için verilen değerler, 4 tekerrürlü olarak yapılan çalışmanın ortalama ± standart sapma'sını göstermektedir.



Şekil 4.5. *Lactobacillus acidophilus* NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁ bağlama yeteneklerinin karşılaştırılması

4.3. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un *Aspergillus flavus* Gelişimi ve Aflatoksin B₁ Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkisi

4.3.1. pH Değerleri

Probiyotik laktik asit bakterilerinin (10^8 kob/ml) ve *Aspergillus flavus* sporlarının (10^4 kob/ml) bulunduğu MRS broth ve yağsız süt ortamında 30 °C'de 10 gün inkübasyon sonucunda saptanan pH değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri ve *Aspergillus flavus* Sporlarının Bulunduğu Karışık Kültürde Saptanan pH Değerleri

Mikroorganizma	pH Değerleri	
	MRS	Yağsız Süt
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 12+A. <i>flavus</i>	6,43	5,3
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 36+A. <i>flavus</i>	6,2	5,18
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 68+A. <i>flavus</i>	6,05	4,95
<i>Bifidobacterium</i> Bb 13+A. <i>flavus</i>	6,58	5,35
<i>Bifidobacterium</i> NCC 381+A. <i>flavus</i>	6,15	5,18
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 12 Kontrol	3,73	3,7
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 36 Kontrol	3,75	3,77
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 68 Kontrol	3,72	3,75
<i>Bifidobacterium</i> Bb 13 Kontrol	3,83	3,8
<i>Bifidobacterium</i> NCC 381 Kontrol	3,77	3,8
<i>A.flavus</i> Kontrol	5,4	5,24
MRS Kontrol	6,5	-
Yağsız Süt Kontrol	-	6,45

Çizelge 4.7'nin incelenmesiyle de görülebileceği gibi, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının substrat olarak kullanılan ortamlarda tek başlarına gelişmeleri durumunda, ortamda bulunan besin maddelerini parçalayarak organik asitler oluşturmakta ve pH önemli miktarda düşmektedir. Bununla birlikte *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının organik asit oluşturma güçleri arasında önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür.

Test edilen bakterilerin, MRS ve yağsız süt ortamında kontrol olarak tek başlarına gelişmeleri durumunda pH değerleri açısından substratlar arasında önemli bir fark görülmezken, test edilen probiyotik bakteri ve *Aspergillus flavus*'un birlikte bulunduğu karışık kültürlerde substratlar arasında pH değerleri açısından farklılıklar görülmüştür.

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının, substrat olarak kullanılan ortamlara, *Aspergillus flavus* sporları ile birlikte inoküle edilmesi durumunda, 30 °C'de 10 gün inkübasyon sonucunda pH'da kontrole göre önemli miktarda artış meydana gelmiştir.

Test edilen probiyotik laktik asit bakterilerinin inkübasyonun başlangıç aşamasında, eksponansiyel (logaritmik) büyüme evresinde ortamda bulunan besin maddelerini kullanarak organik asit oluşumu ile pH'yı düşürdüğü ve sonraki aşamada, ortamda bulunan glikozun tükenmesi sonucunda *Aspergillus flavus*'un, laktik asit bakterileri tarafından üretilen organik asitleri karbon kaynağı olarak kullandığı düşünülmüştür. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* tarafından üretilen organik asitler disosiye olmamış formda küfün hücre membranına penetre olduğu ve hücre içerisinde disosiye olması sonucunda H⁺ iyonlarının hücre içerisinden dış ortama taşındığı ve pH'nın yükselmesine neden olduğu düşünülmüştür (Arda, 1997; Doyle ve ark., 1997).

Bu konuda El Gendy ve Marth (1981) tarafından yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus casei* ve *Aspergillus flavus*'un bulunduğu karışık kültürde başlangıç pH'sının 7.10'dan inkübasyonun 3. gününde 3.70'e düştüğünü inkübasyon süresinin artmasıyla, pH'nın yükselmeye başladığını ve 10. günde pH'nın 7.20'ye çıktığını

bildirmişlerdir. Coallier-Ascah ve Idziak (1985), yaptıkları benzer bir çalışmada ise, *Streptococcus lactis*'in sıvı kültürde 16 saat inkübasyon sonucunda pH'yı 6.8'den 4.3'e düşürdüğünü ve bundan sonraki aşamada ortama *Aspergillus flavus* sporlarının inoküle edilmesi durumunda ise pH'nın 8.0'a yükseldiğini bildirmişlerdir.

4.3.2. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un *Aspergillus flavus* Gelişimi Üzerine Etkisi

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının MRS broth ve yağsız süt ortamında *Aspergillus flavus* gelişimi üzerine etkisi Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Probiyotik bakterilerin antifungal aktivitesini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada, Çizelge 4.8'in icelenmesiyle de görülebileceği gibi *Aspergillus flavus* sayısında kontrole göre önemli bir değişme olmamıştır. Bu konuda Lunchese ve ark. (1992), tarafından yapılan bir çalışmada , test edilen *Pediococcus* ve *Lactobacillus* türlerinin *Aspergillus flavus* gelişimini engelleyemedikleri belirlenmiştir.

Yapılan denemelerde *Lactobacillus acidophilus* NCC 68 ve *Aspergillus flavus* sporlarının bulunduğu karışık kültürde *Lactobacillus acidophilus* NCC 68'in *Aspergillus flavus*'un çimlenme yeteneğini ve misel oluşumunu geciktirdiği belirlenmiştir.

El Gendy ve Marth (1981), yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus casei* ve *Aspergillus paraciticus*'un sıvı kültüre aynı anda aşılması durumunda 28 °C'de 10 gün inkübasyon sonunda ortam koşullarının küf gelişimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Gourama ve Bullerman (1997) ise *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* 371 ile *Aspergillus flavus*'un bulunduğu karışık kültürde bu bakterinin küf gelişimini ve aflatoksin oluşumunu engelleyemediğini bildirmişlerdir.

Buna karşın bazı araştırmacılar da test ettikleri laktik asit bakterilerinin antifungal aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Karunaretne ve ark.(1990), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus plantarum*'un *Aspergillus flavus* gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Corsetti ve

ark. (1998), zorunlu heterofermantatif olan *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 suşunun *Aspergillus* spp.'ye karşı antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* tarafından üretilen laktik asitin *Aspergillus flavus* gelişimi üzerine olumsuz herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu konuda El Gazzar ve ark. (1987) tarafından yapılan bir çalışmada, %0.5-2 arasında laktik asit konsantrasyonunun *Aspergillus flavus* gelişimini inhibe etmediğini ve hatta aflatoksin biyosentezini teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

4.3.3. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un Aflatoksin B₁ Oluşumu Üzerine Etkisi

Test edilen probiyotik bakterilerin aflatoksijenik özellikteki *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ oluşturma yeteneği üzerine etkisi Çizelge 4.8 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Probiyotik Laktik Asit Bakterilerinin *Aspergillus flavus* Gelişimi ve Aflatoksin B₁ Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkisi

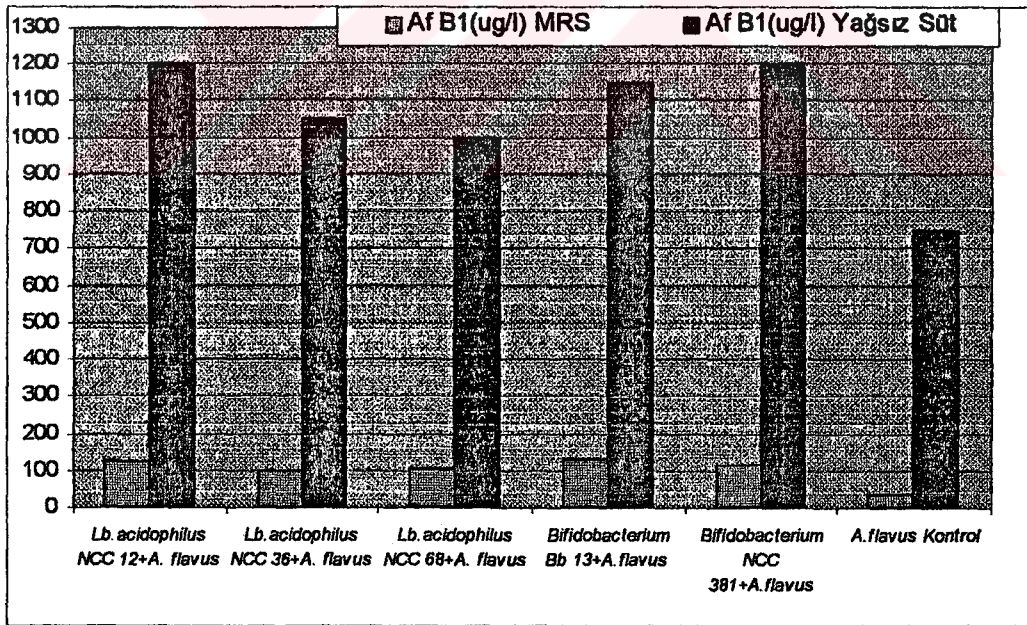
MİKROORGANİZMA	MRS		Yağsız Süt	
	<i>A.flavus</i> (kob/ml)	Af B1(ug/l)	<i>A.flavus</i> (kob/ml)	Af B1(ug/l)
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 12+A. <i>flavus</i>	1,2 x 10 ⁵	125	1 x 10 ⁵	1200
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 36+A. <i>flavus</i>	6,2 x 10 ⁴	100	7,1 x 10 ⁴	1050
<i>Lb.acidophilus</i> NCC 68+A. <i>flavus</i>	3,8 x 10 ⁴	106	2,7 x 10 ⁴	1000
<i>B. bifidum</i> Bb 13+A. <i>flavus</i>	1,9 x 10 ⁵	130	5 x 10 ⁴	1150
<i>B. bifidum</i> NCC 381+A. <i>flavus</i>	2 x 10 ⁵	115	6 x 10 ⁴	1200
<i>A.flavus</i> Kontrol	3,2 x 10 ⁴	37	6 x 10 ⁴	750

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının, *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ oluşturma yeteneğini teşvik ettiği ve kontrole göre daha yüksek miktarda aflatoksin B₁ oluştuğu görülmüştür. *Aspergillus flavus*'un bulunduğu MRS broth besiyerinde 37 µg/l afltoksin B₁ oluşurken, *Bifidobacterium bifidum* ve *Aspergillus flavus*'un birlikte bulunduğu karışık kültürde 130 µg/l aflatoksin B₁ oluşmuştur. Test edilen bakterilerin aflatoksin B₁ oluşumunu teşvik etmesinde, bakteriler tarafından

üretilen laktik asit ve diğer metabolitlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir (El Gazzar ve ark., 1986).

Çizelge 4.8'in incelenmesiyle de görülebileceği gibi, test edilen probiyotik bakteriler yağsız süt ortamında daha yüksek miktarda aflatoksin B₁ oluşturmuştur. *Aspergillus flavus*'un kontrol olarak bulunduğu MRS broth besiyerinde 37µg/l aflatoksin B₁ oluşurken, süt içerisinde yaklaşık 20 kat (750 µg/l) fazla miktarda aflatoksin B₁ oluşmuştur. Bunun, sütün bileşiminde bulunan mineral madde ve vitaminlerin *Aspergillus flavus* gelişimini ve aflatoksin B₁ oluşumunu teşvik etmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Özkaya ve ark.(1999), çinko ve mangan'nın aflatoksin oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Ortamda çinko düzeyinin 0'dan 10 mg/ml'ye artırılması durumunda diğer koşullar sabit olmakla birlikte aflatoksin miktarının 1000 katına çıktığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.6. Probiyotik laktik asit bakterilerinin *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ oluşturma yeteneği üzerine etkisi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Lactobacillus acidophilus suşlarının *In Vitro* koşullarda aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri % 32.2-37.0, *Bifidobacterium bifidum* suşlarının *In Vitro* koşullarda aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri ise ortalama %31.0-46.5 arasında bulunmuştur. *In Vitro* ortamda aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinde en yüksek bağlanma aktivitesini %46.5 oranı ile *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 göstermiştir. Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin B₁'e bağlanma yeteneğinin araştırılmasında, kontrol olarak ilave edilen aflatoksin B₁'in %96'sı geri alınmıştır.

Lactobacillus acidophilus suşlarının gıda modeli olarak kullanılan yağsız süt ortamında aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri %29.5-34.5, *Bifidobacterium bifidum* suşlarının yağsız süt ortamında aflatoksin B₁'i bağlama yetenekleri ise %30.0-38.5 arasında bulunmuştur. Gıda modeli olarak kullanılan yağsız süt ortamında, aflatoksin B₁'e en yüksek bağlanma aktivitesini (%38.5) *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 göstermiştir. Analiz yönteminin güvenilirliğini ve hassasiyetini belirlemek amacıyla, aflatoksin B₁'i geri alma çalışmaları sonucunda, gıda modeline kontamine edilen aflatoksin B₁'in %60.8'i geri alınmıştır.

In Vitro ortamda ve gıda modelinde aflatoksin B₁'i geri alma çalışmalarında, her iki ortam arasındaki fark, istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Gıda modelinde yapılan geri alma çalışmalarında aflatoksin B₁'in %39.2'sinin geri alınamadığı görülmüştür.

Lactobacillus acidophilus NCC 12 ve *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün *In Vitro* ortamda aflatoksin M₁'e bağlanma yetenekleri arasındaki fark, istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. *Lactobacillus acidophilus* NCC 12'nin *In Vitro* ortamda aflatoksin M₁'i bağlama yeteneği ortalama % 30.5, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün ise ortalama % 32.5 bulunmuştur. Probiyotik laktik asit bakterilerinin aflatoksin M₁'e bağlama yeteneğinin araştırılmasında, ortama ilave edilen aflatoksin M₁'in % 91.3'ü geri alınmıştır.

Lactobacillus acidophilus NCC 12'nin gıda modeli olarak kullanılan yağsız süt ortamında aflatoksin M₁'i bağlama yeteneği % 28.8, *Bifidobacterium bifidum* Bb 13'ün aflatoksin M₁'i bağlama yeteneği ise % 29.3 bulunmuştur. Analiz yönteminin hassasiyetini belirlemek amacıyla, gıda modelinden aflatoksin M₁'i geri alma çalışmaları sonucunda, gıda modeline ilave edilen aflatoksin M₁'in %71.8'i geri alınmıştır.

Probiyotik laktik asit bakterilerinin *Aspergillus flavus* gelişimini inhibe etmediğini yalnızca *Lactobacillus acidophilus* NCC 68'in *Aspergillus flavus*'un çimlenme yeteneğini ve misel oluşumunu geciktirdiği görülmüştür.

Probiyotik bakterilerin MRS broth ve yağsız süte tek başına inoküle edilmesi durumunda pH'nın 6.50 seviyesinden 3.70 seviyelerine düştüğü görülmüştür. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının substrat olarak kullanılan besin ortamlarına birlikte inoküle edilmesi durumunda ise pH'nın kontrole göre önemli miktarda yükseldiği görülmüştür.

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ oluşturma yeteneğini teşvik ettiği ve kontrole göre yüksek miktarda aflatoksin B₁ oluştuğu görülmüştür. *Aspergillus flavus*'un aflatoksin B₁ oluşturma yeteneğinde besin ortamının da önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. *Aspergillus flavus* MRS broth besiyerinde 32 µg/l aflatoksin B₁, yağsız süt ortamında ise 750 µg/l aflatoksin B₁ oluşturmuştur.

Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre;

Probiyotik bakterilerin, aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'e bağlanma yeteneği göstermesinden dolayı, bu yöntemin gıda ve yem maddelerinde, tek başına aflatoksinin olduğu durumlarda uygulanabileceği görülmüştür. Buna karşın, ortamda aflatoksijenik özellikteki küflerin bulunması durumunda ise probiyotik laktik asit bakterilerinin küf gelişimi ve toksin oluşumunu artırıcı yönde rol oynadığı görülmüştür.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, probiyotik bakterilerin aflatoksin B₁ ve aflatoksin M₁'i bağlama yeteneklerinin *In Vivo* koşullarda araştırılması gerektiği,

Probiyotik bakterilerin aflatoksin gibi mutajenik ve kanserojenik aktivite gösteren diğer mikotoksinlere bağlanma ve bunları ortamdaki uzaklaştırma yeteneğinin de araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Probiyotik özellik gösteren laktik asit bakterilerinin aflatoksin ve diğer toksik, kanserojenik özellikteki mikotoksinleri etkili bir şekilde detoksifiye etme yeteneğinin bulunması durumunda, insan sağlığı üzerinde olumsuz herhangi bir etkisi bulunmayan biyolojik detoksifikasyon yöntemi kullanılmış olacaktır.



KAYNAKLAR

- ADAMS, M.R., 1999. Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria. Journal of Biotechnology, 68:171-178.
- ALTUĞ, G.; ÜLGER, A.C.; ÇOLAK, A.K., 1998. Teknolojik İşlem Görmüş Bazı Mısır Ürünlerinde Aflatoksin Araştırılması. Kukem Dergisi. 21 (1): 45-52.
- ANONYMOUS, 1999. Japan Bifidus Foundation. Bioscience and Microflora Number 1, April. 43- 48.
- ANONYMOUS, 2002. <http://www.ecopart.org/EP.exe>. Ecopart Picture Databank Colony and Detection Example From Rice Grains. Image ID 2441.
- AOAC, 1990. Official methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Ed. by Kenneth Helrich, 15th Edition , Vol. 2, 968.22-F.c, p: 1189-1190.
- ARDA, M., 1997. Temel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Isparta, 490 s.
- ARIKAN, S., 1998. Mikotoksinler. Kukem Dergisi. 21(1) : 35-43.
- BAKIRCI, I., 2001. A Study on the Occurance of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products Produced in Van Province of Turkey. Food Control 12: 47-51.
- BANOĞLU, N., 1985. Karma Yemlerde Mikotoksin Varlığı. İhtisas Tezi, 45 s.

- BARBIERI, G.; BERGAMINI, C.; ORI, E.; RESCA, P., 1994. Aflatoxin M₁ in Parmesan Cheese: HPLC Determination. *Journal of food Science*. 59(6):1313-1331.
- BARRIOS, M. J.; MEDINA, L. M.; CORDOBA, M. G.; JORDANO, R., 1997. Aflatoxin Producing Strains of *Aspergillus flavus* Isolated from Cheese. *Journal of Food Protection*. Vol. 60(2). p: 192-194.
- BATA, A.; LASZTITY, R., 1999. Detoxification of Mycotoxin-Contaminated Food and Feed by Microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*. 10: 223-228.
- BATISH, V.K.; LAL, R.; CHANDER, H., 1990. Effect of Nutritional Factors on the Production of Antifungal Substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Australian Journal of Dairy Technology*, November.
- BATISH, V.K.; ROY, U.; GROVER, S., 1997. Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria –A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 17(3), p: 209-225.
- BİÇİCİ, M., 1980. Yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.) Ürünüde Tarla Hasat Kurutma ve Depo Dönemlerinde *Aspergillus niger* Van Tieghem ve *Aspergillus flavus* Link Tarafından Oluşturulan Hastalık ve Aflatoksin Üzerinde Araştırmalar. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Doktora Tezi, Adana, 92 s.
- BIROLLO, G.A.; REINHEIMER, J.A.; VINDEROLA, C.G., 2000. Viability of Lactic Acid Microflora in Different Types of Yoghurt. *Food Research International* 33(799-805).
- BOLOGNANI, F.; RUMNEY, J.C.; ROWLAND, I.R., 1997. Influence of Carcinogen Binding by Lactic Acid-Producing Bacteria on Tissue Distribution and *In Vivo*

Mutagenity of Dietary Carcinogens. Food and Chemical Toxicology. 35(6): 535-545.

CHOUDHARY, P.L.; SHARMA, R.S.; BORKHATERIA, V.N., 1998. Carry-Over of Aflatoxin B₁ from Feed as Aflatoxin M₁ in Milk of Indian Cows. Milchwissenschaft 53(9):513-515.

CHUNG, H.S.; KIM, Y.B.; CHUN, S.L.; JI, G.E., 1999. Screening and Selection of Acid and Bile Resistant *Bifidobacteria*. International Journal of Food Microbiology 47(25-32).

COALLIER-ASCAH, J.; IDZIAK, E.S., 1985. Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on Production of Aflatoxin. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 49(1). p: 163-167.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J.; DAMIANI, P., 1998. Antimould Activity of Sourdough Lactic Acid Bacteria : Identification of a Mixture of Organic Acids Produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Appl Microbiol Biotechnol. 50 : 253-256.

COTTY, P.J.; BHATNAGAR, D., 1994. Viability Among Atoxigenic *Aspergillus flavus* Strains in Ability to Prevent Aflatoxin Contamination and Production of Aflatoxin Biosynthetic Pathway Enzymes. Applied and Environmental Microbiology, July, 2248-2251.

CROCI, L.; TOTI, L.; PASQUALLE, S. D.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C., 1995. Lactic Acid Bacteria Influence in Variability of Production and Biotransformation of Aflatoxins from *Aspergillus paraciticus*. Rivista di Scienza Dell Alimentazione. Vol. 24(1): 59-66.

- ÇOKSÖYLER, N., 1997. Ekstraksiyon ve Ekstrakt Temizleme. Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Seminer Notları, Mersin, 41s.
- DIX, N.J.; WEBSTER, J., 1995. Fungal Ecology. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, 548 p.
- DORNER, J.W.; COLE, R.J.; WICKLOW, D.T., 1999. Aflatoxin Reduction in Corn Through Field Application of Competitive Fungi. Journal of Food Protection. 62(6): 650-656.
- DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J., 1997. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 768 p.
- EL GAZZAR, F.E.; RUSUL, G.; MARTH, E.H., 1987. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the Presence of Lactic Acid and at Different Initial pH Values (alınmıştır: ELTEM, R., 1993. Fungal Gelişmeyi Engelleyici Çeşitli Maddelerin Aflatoksin Üreten Küfler Üzerine Etkileri. Doğa Tr. J. of Biology 17: 285-291.)
- EL GENDY, S. M.; MARTH, E. H., 1981. Growth of Aflatoxin Production by *Aspergillus paraciticus* in the Presence of *Lactobacillus casei*. Journal of Food Protection. 44(3): 211-212.
- EL NEZAMI, H.; SALMINEN, S. J.; AHOKAS, S. J., 1996. Biologic Control of Feed Carcinogens with use of *Lactobacillus*. Nutrition- Today. 31(6): 41-42.

- EL NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J., 1998. Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Remove Aflatoxin from Contaminated Media. *Journal of Food Protection*. 61(4): 466-468.
- EL NEZAMI, H.; MYKKANEN, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J., 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* Strains to Remove Aflatoxin B₁ from the Chicken Duodenum. *Journal of Food Protection*. Vol. 63(4). p: 549-552.
- ERKAHVECİ, A.; KARAALI, A., 1997. Kırmızı Toz Biberde Kullanılabilecek Üç Farklı Analiz Metodunun Karşılaştırılması. Gıda Mühendisliği III. Ulusal Sempozyumu. 22-23 Eylül. ODTÜ Kampüsü. Ankara.
- FAN, J. J.; CHEN, J. H., 1999. Inhibition of Aflatoxin-Producing Fungi by Welsh Onion Extracts. *Journal of Food Protection*. 62(4). p: 414-417.
- FROBISH, R. A.; BRADLEY, B. D.; WAGNER, D. D.; LONG-BRADLERY, P. E.; HAIRSTON, H., 1986. Aflatoxin Residues in Milk of Dairy Cows after Ingestion of Naturally Contaminated Grain. *Journal of Food Protection*. 49(10), p: 781-785.
- GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G., 1996. Occurance and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worlwid Review. *Journal of Food Protection*. 59(10), p: 1079-1090.
- GALVANO, F.; GALOFARO, V.; ANGELIS, A. D.; GALVANO, M.; BOGNANNO, M.; GALVANO, G., 1998. Survey of the Occurance of Aflatoxin M₁ in Dairy Products Marketed in Italy. *Journal of Food Protection*. 61(6), p: 738-741.

- GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A.; GALVANO, G., 2001. Dietary Strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins: A Review. *Journal of Food Protection*. 64(1): 120-131.
- GERMAN, B.; SCHIFFRIN, E.J.; RENIERO, R.; MOLLET, B.; PREIFER, A.; NEESSER, J., 1999. The Development of Functional Foods: Lessons from the Gut. *Tibtech* 17(492-499).
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B., 1995. Antimycotic and Antiaflatoxigenic Effect of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection*. V.58(11). p: 1275-1280.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B., 1997. Anti-Aflatoxigenic Activity of *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 34(2). p: 131-143.
- GQALENI, N.; SMITH, J.E.; LACEY, J.; GETTINBY, G., 1997. Effects of Temperature, Water activity, and Incubation Time on production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(3): 1048-1053.
- HASKARD, C.; BINNION, C.; AHOKAS, J., 2000. Factors Affecting the Sequestration of Aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG. *Chemico-Biological Interactions*. 128: 39-49.
- HAYALOĞLU, A.A.; ERGİNKAYA, Z., 2001. Gıda endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri. *Gıda Teknolojisi Deneği Yayın No: 23*.
- IBRAHİM, S.A.; BEZKOROVAINY, A., 1993. Inhibition of *Escherichia coli* by *Bifidobacteria*. *Journal of Food Production* 56(8): 713-745.

İÇ, E.; YAVAŞ, İ., 1993. Şaraplarda aflatoksin Miktarı Üzerine Bir araştırma. Gıda 18(5):283-287.

JAIMEZ, J.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P., 2000. Application of the Assay of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Floroscence Detection in Food Analysis. Journal of Chromatography A. 882: 1-10.

JAY, J. M., 1992. Modern Food Microbiology. Chapman and Hall, London. 675. p

JORDANO, R.; JODRAL, M.; MARTINEZ, P.; SALMERONT, J.; POZO, R., 1989. Aflatoxin-Producing Strains of *Aspergillus flavus* in Yogurt. Journal of Food Protection. Vol. 52(11). p: 823-824.

KAPTAN, H., 2000. Bifidobakteriler. Gıda, 25(6):459-465.

KARAHAN, A.G.; ÇAKMAKCI, M.L., 1996. Probiyotikler. Gıda 21(4): 297-302.

KANKAANPAA, P.; TUOMALA, E.; EL-NEZAMI, H.; AHOKAS, J.; SALMINEN, S. J., 2000. Binding of Aflatoxin B₁ Alters the Adhesion Properties of *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG in a Caco-2 Model. Journal of Food Protection. 63(3): 412-414.

KARUNARATNE, A.; WEZENBERG, E.; BULLERMAN, L.B., 1990. Inhibition of Mold Growth and Aflatoxin Production by *Lactobacillus* spp. Journal of Food Protection. Vol. 53(3). p: 230-236.

- KIRDAR, S., 2000. Süt teknolojisinde *Lactobacillus acidophilus* Yeri ve Önemi (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s: 287-295.
- KIRJAVAINEN, P.V.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S., 1998. The Ability of Probiotic Bacteria to Bind to Human Intestinal Mucus. *Fems Microbiology Letters* 167(185-189).
- LAVERMIVOCCA, P.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; LAZZARONI, S.; CORSETTI, A.; GOBBETTI, M., 2000. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus Plantarum* Strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4): 4084-4090.
- LEE, S.E.; CAMPBELL, B.C.; MOLYNEUX, R.J.; HASEGAWA, S.; LEE, H.S., 2001. Inhibitory Effects of Naturally Occuring Compounds on Aflatoxin B₁ Biotransformation. *J. Agric. Food Chem.* 49:5171-5177.
- LILLEHOJ, E.B.; CIEGLER, A., 1968. Aflatoxin B₁ Binding and Toxic Effects on *Bacillus megaterium*. (PIERIDES, M.; EL NEZAMI, H.; PELTONEN, K.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J., 2000. Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind Aflatoxin M₁ in a Food Model. *Journal of Food Protection*. 63(5): 645-650.
- LESZCZYNSKA J.; KUCHARSKA, U.; ZEGOTA, H., 2000. Aflatoxins in Nuts Assayed by Immunological Methods. *Eur Food Res Technol* 210: 213-215.
- LUNCHESE, R. H.; MARTINS, J. F. P.; HARRIGAN, W. P., 1992. Aflatoxin Production in a Meat Mix Model System in the Presence of *Pediococcus* and *Lactobacillus*. *Journal of Food Protection*. Vol. 55(8). p:583-587.

- MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M., 1999. Natural and In Vitro Co-production of Cyclopiazonic Acid and Aflatoxins. *Journal of Food Protection*. Vol. 62(3). p: 292-294.
- MCLEAN, M.; DUTTON, M.F., 1995. Cellular Interactions and Metabolism of Aflatoxins: An Update. (Ed. K.D. BHOOLA). Department of Physiology, Faculty of Medicine, South Africa, 163-192.
- MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology* 69: 155-166.
- MOROTOMI, M.; MUTAI, M., 1986. *In Vitro* Binding of Potent Mutagenic Pyrolyzates to Intestinal Bacteria. (EL NEZAMI, H.; KANKAANPAA, P.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J., 1998. Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Remove Aflatoxin from Contaminated Media. *Journal of Food Protection*. 61(4): 466-468.
- MOSS, M.O., 1992. Secondary Metabolism and Food Intoxication-Moulds. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 73: 80-88.
- NEAL, G.E.; EATON, D.L.; JUDAH, D.J.; VERMA, A., 1998. Metabolism and Toxicity of Aflatoxins M₁ and B₁ in Human-Derived *In Vitro* Systems. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 151: 152-158.
- OATLEY, J.T.; RARICK, M.D.; JI, G.E.; LINZ, J.E., 2000. Binding of Aflatoxin B₁ to *Bifidobacteria In Vitro*. *Journal of Food Protection*. 63(8): 1133-1136.

OH, S.; KIM, S.H.; WOROBO, R.W., 2000. Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. Journal of Dairy Science 83: 2747-2752.

ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W., 1981. Smith's Introduction to Industrial Mycology. Seventh Edition, Edward Arnold Publishers Ltd., Great Britain, 398 s.

ÖZER, D.; AKIN, M.S., 2000. Probiyotik Fermente Süt Ürünleri ve Prebiyotikler. (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s:273-278.

ÖZKAYA, Ş.; TAYDAŞ, E. E.; BAŞARAN, A.; AVCI, B.; HIZLI, S., 1999. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Aflatoksin Analiz Kurs Notları. 7-14 Ağustos, Ankara.

PELTONEN, K.; EL NEZAMI, H.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J., 2000a. Binding of Aflatoxin B₁ by Probiotic Bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 1942-1945.

PELTONEN, K.D.; EL NEZAMI, H.S.; PIERIDES, M.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J.T., 2000b. Binding of Aflatoxin B₁ by Dairy and Clinical Strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*. Environmental Veterinary Physiological Microbiology. (www.utas.edu.au/does/agsci/asm 98/poster6.html.).

PIERIDES, M.; EL NEZAMI, H.; PELTONEN, K.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J., 2000. Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind Aflatoxin M₁ in a Food Model. Journal of Food Protection. 63(5): 645-650.

- PIVA, G.; GALVANO, F.; PIETRI, A.; PIVA, A., 1995. Detoxification Methods of Aflatoxins. A Review. *Nutrition Research*. 15(5): 767-776.
- PRIETO, R.; YOUSIBOVA, G.L.; WOLOSHUK, C.P., 1996. Identification of Aflatoxin Biosynthesis Genes by Genetic Complementation in an *Aspergillus flavus* Mutant Lacking the Aflatoxin Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(10): 3567-3571.
- QUINTAVALLA, S.; CASOLARI, A., 1985. (Alınmıştır: GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G., 1996. Occurance and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products. *Journal of Food Protection* 59(10) p: 1079-1090).
- REES, T. J., 1997. The Development of a Novel Antifungal Silage Inoculant. Doctoral Research Thesis, Cranfield University Biotechnology Centre, UK, 8-23.
- SAAD, N., 2000. Aflatoxins (Alınmıştır, file: //C:\WIN 95\Desktop\aflatoxin.html.).
- SAMONA, A.; ROBINSON, R.K.; MARAKIS, S., 1996. Acid Production by *Bifidobacteria* and Yoghurt Bacteria During Fermentation and Storage of Milk. *Food microbiology*, 13: 275-280.
- SAMSON, R.; HOEKSTRA, E.S.; VAN OORSCHOT, C.A., 1981. Introduction to Food Borne Fungi. Centraalbureau Voor Schimmecultures, Baarn, 247 p.
- SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V., 1997. Improving Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in Yoghurt. *International Dairy Journal* 7: 349-356.

- SHAH, N.P., 2000. Symposium: Selective Enumeration and survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science* 83: 894-907.
- SHIN, H.S.; LEE, J.H.; PESTKA, J.J.; USTUNOL, Z., 2000. Growth and Viability of Commercial *Bifidobacterium* spp in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. *Food Microbiology and Safety. Journal of Food Science*.65(5): 884-887.
- SHORTT, C., 1999. The Probiotic Century: Historical and Current Perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 411-417.
- SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W., 1999. Molecular biology of Mycotoxin Biosynthesis. *Fems Microbiology Letters* 175: 149-163.
- STILES, J.; PLOCKOVA, V. T.; CHUMCHALOVA, J., 1999. Inhibition of *Fusarium* sp. DMF0101 by *Lactobacillus* Strains Grown in MRS and Elliker Broths. *Adv. Food Science*. Vol. 21(3/4). p:117-121.
- ŞAHİN, İ.; KORUKLUOĞLU, M., 2000. Küf-Gıda-İnsan.Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 155, 122 s.
- TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.E., 1997. Microbiology and Technology of Fermented Milk, (editör: B.A. LAW). *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Blackie Academic & Professional Publ., London, p: 153-192.
- TAYLOR, S. L.; KING, J. W.; GREER, J. I.; RICHARD, J.L., 1997. Supercritical Fluid Extraction of Aflatoxin M₁ from Beef Liver. *Journal of Food Protection*. Vol. 60(6). p: 698-700.

- TEMİZ, A., 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. I. Baskı, Şafak Matbaacılık, Ankara, 266 s.
- TOPAL, Ş., 1993. Gıdalarda Küf Kontaminasyon Riskleri ve Önlemleri. Bölüm 12 TÜBİTAK-MAM Gıda ve Soğutma Teknolojileri Bölüm Yayını, MAM Matbaası, Yayın No: 124, Gebze-Kocaeli, s: 174-187.
- TOPAL, Ş.; ARAN, N.; PEMBEZİ, C., 1999. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Mikotoksin Profilleri. Gıda, 24(2), 129-137.
- TUOMOLA, E.M.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S., 1999. The Effect of Probiotic Bacteria on the adhesion of Pathogens to Human Intestinal Mucus. Fems Immunology and Medical Microbiology 26(137-142).
- VAR, I., 1987. Çerezlik Yerfistiklerinde Aflatoksin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ürünleri Teknolojisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana, 37s.
- VIDYASAGAR, T.; VYJAYANTHI, V.; SUJATHA, N.; RAO, S., 1977. Quantification of Aflatoxin B1-N⁷-Guanine Adduct In Urine by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Coupled with Immunoaffinity Chromatography. Journal of AOAC International. 80(5):1013-1022.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A., 1999. Culture Media for the Enumeration of *Bifidobacterium Bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the Presence of Yoghurt Bacteria. International Dairy Journal 9(497-505).
- VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A., 2000a. Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and

Lactobacillus casei) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. Journal of Dairy Science 83: 1905-1911.

VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A., 2000b. Survival of Probiotic Microflora in Argentinian Yoghurts During Refrigerated Storage. Food Research International 33(97-102).

WANG, J.S.; GROOPMAN, J.D., 1999. DNA Damage by Mycotoxins. Mutation Research 424: 167-181.

WISEMAN, D.; MARTH, E.H., 1980. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus paraciticus* When in the Presence of *Streptococcus lactis* (alınmıştır: EL GENDY, S. M.; MARTH, E. H., 1981. Growth of Aflatoxin Production by *Aspergillus paraciticus* in the Presence of *Lactobacillus casei*. Journal of Food Protection. 44(3), p: 211-212.

WOLOSHUK, C.P.; PRIETO, R., 1998. Genetic Organization and Function of the Aflatoxin B₁ Biosynthetic Genes. Fems Microbiology Letters. 160: 169-176.

YABE, K.; NAKAMURA, M.; HAMASAKI, T., 1999. Enzymatic Formation of G-Group Aflatoxins and Biosynthetic Relationship between G and B Group Aflatoxins. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65(9). p:3867-3872.

YILDIRIM, T.Ö.; KURDAL, E., 2000. Probiyotik Özellik Gösteren Bifidobakteriler (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s: 266-272.

YILDIRIM, Z.; YILDIRIM, M., 2000. Laktik Asit bakterileri Tarafından üretilen Bakteriosinlerin Genel Karakteristikleri (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s: 266-272.

YILMAZ, A.; ÖZAY, G., 2001. Gıda ve Yemlerde Mikotoksinlerin Detoksifikasyonu Gıda Dergisi. Temmuz,80-84.

YILSAI, T.Ö.; KURDAL, 2000. Probiyotik Süt Ürünlerinin Beslenme ve Süt Sağlık Üzerindeki Etkisi. (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s: 279-286.

YU, J.; CHANG,P.K.; EHRLICH, K.C.; CARRY, J.W.; MONTALBANO, B.; DYER, J.M.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E., 1998. Characterization of the Critical Amino acids of an *Aspergillus paraciticus* Cytochrome P-450 Monooxygenase Encoded by OrfA that is Involved in the Biosynthesis of Aflatoxins B₁,G₁,B₂ and G₂. Applied and Environmental Microbiology. 64(12): 4834-4841.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Çorum’da doğdum.İlk ve orta öğrenimimi Çorum’da tamamladıktan sonra 1993 yılında Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünü kazandım ve 1998 yılında mezun oldum.Aynı yıl Çukurova Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü,Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitime başladım ve 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandım.Halen aynı yerde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

