

**MEYVE SULARINDA PATULİN OLUŞUMUNUN
ARAŞTIRILMASI VE PATULİNİN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ İLE DETOKSİFİKASYONU**

Nagihan OSKAY
Yüksek Lisans Tezi
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Kasım-2012

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1005F110

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nagihan OSKAY'ın “**Meyve Sularında Patulin Oluşumunun Araştırılması ve Patulinin Laktik Asit Bakterileri ile Detoksifikasyonu**” başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 19.10.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. KIYMET GÜVEN	
Üye (II. Danışmanı) : Prof. Dr. DİLEK AK	
Üye : Prof. Dr. SEMRA İLHAN	
Üye : Doç. Dr. DİLEK ÜLKÜ UYSAL	
Üye : Doç. Dr. M. BURÇİN MUTLU	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEYVE SULARINDA PATULİN OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI VE PATULİNİN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İLE DETOKSİFİKASYONU

Nagihan OSKAY
Anadolu Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
II. Danışman: Prof. Dr. Dilek AK
2012, 107 sayfa

Bu çalışmada ülkemizde üretilen ve Eskişehir piyasasında tüketime sunulan elma suları ve karışık meyve sularının başlıca kontaminantı olan patulin seviyeleri HPLC-UV yöntemiyle saptanmış ve çeşitli laktik asit bakterileri (LAB) ile patulinin biyolojik detoksifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Geleneksel ve organik 32 tane meyve suyu örneğinin 8'inde 24.16-281.49 µg/l arasında değişen seviyelerde patulin (PAT) saptanmıştır.

Patulinin biyolojik detoksifikasyon çalışmalarında, *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides* (NRLL B-512), *Lactobacillus kefir* (NRLL B-1839), *Lactobacillus hilgardii* (NRLL B-1843), *Leuconostoc lactis* (NRLL B-3468) ve *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560), turşuculardan ve farklı evlerden toplanmış turşulardan izole edilmiş 8 laktik asit bakteri suşu kullanılmıştır. İzole edilen bu suşların, biyokimyasal ve genotipik tanımlama yöntemleri olan VİTEK, yağ asiti metil esterleri (FAME) analizi ve ribotiplendirme ile tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlanan izolatların *Lactobacillus (Lb.) plantarum*, *Lb. coryniformis*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* ve *Leuconostoc (Leu.) mesenteroides* olduğu gözlemlenmiştir. Patulinin biyolojik detoksifikasyonunda bu suşların canlı ve cansız (otoklav ile inaktif hale getirilmiş) hücrelerinin etkileri araştırılmıştır. Canlı suşlardan patulini *Leu. lactis* (NRLL B-3468) suşunun %98.73, *L. plantarum* türüne ait 5 suşun %73-98 ve *Leu. mesenteroides* türüne ait 1 suşun %97.77 oranlarında; cansız suşlardan ise *Leu. mesenteroides* (22.2) suşunun %89.81 ve *Lb. paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560) suşunun ise %92.57 gibi oldukça yüksek oranlarda detoksifiye ettiği gözlenmiştir.

Patulinin biyolojik detoksifikasyonunda bu çalışmada kullanılan LAB suşlarının detoksifikasyon yetenekleri ilk kez araştırılmış ve yüksek oranlarda oldukça etkili oldukları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Patulin, Meyve Suları, Detoksifikasyon, HPLC, Laktik Asit Bakterileri, Turşu

ABSTRACT

Master of Science Thesis

SURVEY OF PATULIN OCCURENCE IN FRUIT JUICES AND DETOXIFICATION OF PATULIN BY LACTIC ACID BACTERIA

Nagihan OSKAY
Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
Co-Supervisor: Prof. Dr. Dilek AK
2012, 107 pages

In this study, patulin levels which are the main contaminants of apple juices and mixed fruit juices produced in Turkey and offered to market of Eskişehir were detected using HPLC-UV method and biological detoxification of patulin was performed by using different lactic acid bacteria. Patulin levels ranging between 24.16-281.49 µg/l in 8 of 32 conventionally and organic fruit juice samples were detected.

Leuconostoc mesenteroides subs. *mesenteroides* (NRLL B-512), *Lactobacillus kefir* (NRLL B-1839), *Lactobacillus hilgardii* (NRLL B-1843), *Leuconostoc lactis* (NRLL B-3468) and *Lactobacillus paracasei* subs. *paracasei* (NRLL B-4560) and 8 lactic acid bacteria strains isolated from pickles which were obtained from seller of pickles and different homes were used for the biological detoxification of patulin. These isolated strains were identified by biochemical and genotypic identification methods VITEC, FAME and ribotyping. The identified isolates were observed as *Lactobacillus* (*Lb.*) *plantarum*, *Lb. coryniformis*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* and *Leuconostoc* (*Leu.*) *mesenteroides*. The effects of viable and nonviable (inactivated by autoclave) cells of these strains were investigated by biological detoxification of patulin. High detoxification rates were observed by viable strains, *Leu. lactis* (NRLL B-3468) with an effect of %98.73, 5 strains of *L. plantarum* with effects of %73-98, 1 strain of *Leu. mesenteroides* with an effect of %97.77; by nonviable strains *Leu. mesenteroides* (22.2) with an effect of %89.81 and *Lb. paracasei* subs. *paracasei* (NRLL B-4560) with an effect of %92.57.

The detoxification capacities of LAB strains used in this study were investigated for the first time for the biological detoxification of patulin and some strains were found to be considerably effective with high rates.

Key words: Patulin, Fruit Juices, Detoxification, HPLC, Lactic Acid Bacteria, Pickle

TEŞEKKÜR

Çalışmamın oluşturulması ve yürütülmesi süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, maddi manevi yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e, analitik kimya laboratuvarında bana her türlü çalışma imkanı sağlayan, çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, hayatıma güzel birçok değer kattığına inandığım her zaman güler yüzlü olan sayın hocam Prof. Dr. Dilek AK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Erol ŞENER ve Yard. Doç. Dr. Arın Gül DAL'a, Arş. Gör. Dr. Rasime DEMİREL'e teşekkür ederim.

Üniversite hayatım boyunca bana her konuda destek olan, yardımlarını hiç esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tanıdığım günden beri her zaman yanımda olduğunu bildiğim, bana hep sabır ve anlayış gösteren, maddi manevi her konuda desteğini hiç esirgemeyen değerli ve sevgili arkadaşım Mert BAĞCI'ya ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nagihan OSKAY

Kasım, 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	<u>Sayfa</u> i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Gıdalarda Küf ve Mikotoksin Sorunu.....	2
1.2. Patulin.....	4
1.2.1. Patulinin Yapısı ve Özellikleri	4
1.2.2. Patulin Üreten Başlıca Mikroorganizmalar.....	6
1.2.3. Patulin Biyosentezi ve Isoepoxydon Dehydrogenase (IDH) Geni	7
1.2.4. Patulinin Bulunduğu Gıda Kaynakları	10
1.2.5. Patulinin Kararlılığı.....	11
1.2.5.1. Patulinin sulu çözeltilerdeki ve elma suyundaki kararlılığı.....	12
1.2.5.2. Patulinin diğer besinlerdeki kararlılığı	12
1.2.6. Patulin Üretim Koşulları.....	13
1.2.7. Elmalarda, Elma Suları ve Elma Suyu İçeren Karışık Meyve Sularında Patulin Kontaminasyonunun Önlenmesi ve Giderilmesi.....	14
1.3. Patulinin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkisi	16
1.3.1. Akut Semptomlar	17
1.3.2. Kronik Sağlık Etkileri.....	17
1.4. Patulin İle İlgili Yasal Düzenlemeler	18
1.5. Patulinin Saptanması	20
1.6. Patulin Detoksifikasyonu	22
1.6.1. Fiziksel Detoksifikasyon	22

1.6.1.1. Depektinizasyon, berraklaştırma ve filtrasyon işlemleri	22
1.6.1.2. Aktif kömür ile muamele	23
1.6.1.3. Gama ışınlaması	24
1.6.1.4. Isı uygulaması/ Pastörizasyon	25
1.6.2. Kimyasal Detoksifikasyon	26
1.6.2.1. Amonyak ile muamele	26
1.6.2.2. Potasyum permanganat oksidasyonu	26
1.6.2.3. Kükürt içeren bileşikler ile muamele	26
1.6.2.4. Askorbik asit ile muamele	27
1.6.2.5. Ozon ile muamele	28
1.6.3. Biyolojik Detoksifikasyon	29
1.6.3.1. Laktik asit bakterileri ve biyolojik detoksifikasyon yetenekleri	30
2. MATERYAL VE METOT	33
2.1. Materyal	31
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	31
2.1.1.1. MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) sıvı besiyeri	31
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Meyve Suları	31
2.1.3. Patulin Detoksifikasyonunda Kullanılan Laktik Asit Bakterileri	34
2.2. Metot	35
2.2.1. Turşu Örneklerinden Laktik Asit Bakterileri İzolasyonu ve İdentifikasyonu	35
2.2.1.1. Turşu suyu örneklerinin toplanması	35
2.2.1.2. Turşu sularının tuzluluk yüzdelerinin ölçülmesi	36
2.2.1.3. Laktik asit bakterileri izolasyonu	36
2.2.1.4. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu	36
2.2.2. Elma Suyu ve Elma İçeren Karışık Meyve Sularında HPLC Yöntemi İle Patulin Tayini	39
2.2.2.1. Meyve sularının ekstraksiyonu	39

2.2.2.2. Patulin stok çözeltisinin hazırlanması.....	40
2.2.2.3. Çalışma çözeltisinin hazırlanması	40
2.2.2.4. Patulin standart çözeltilerinin hazırlanması	40
2.2.2.5. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması	41
2.2.2.6. Patulin ekstraktlarında geri kazanım deneyleri.....	41
2.2.2.7. İstatistik analizleri.....	41
2.2.2.8. HPLC – UV yöntemi ile meyve suyu örneklerinde patulin tayini	41
2.2.3. Patulinin Laktik Asit Bakterileri ile Biyolojik Detoksifikasyonu	42
2.2.3.1. LAB suşlarının canlandırılması	40
2.2.3.2. LAB suşlarının detoksifikasyon analizine hazırlanması.....	42
2.2.3.3. LAB suşlarının HPLC yöntemi ile detoksifikasyon analizi.....	43

3. BULGULAR **44**

3.1. Turşu Örneklerinden Laktik Asit Bakterileri İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	44
3.1.1. Turşu Suyu Örneklerinin Toplanması	44
3.1.2. Turşu Sularının Tuzluluk Yüzdelерinin Ölçülmesi	45
3.1.3. Laktik Asit Bakterileri İzolasyonu	45
3.1.4. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonu.....	46
3.2. Elma Suyu ve Elma İçeren Karışık Meyve Sularında HPLC Yöntemi ile Patulin Tayini.....	51
3.2.1. Patulin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	51
3.2.2. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	52
3.2.3. Patulin Ekstraktlarında Geri Kazanım Deneyleri.....	55
3.2.4. HPLC – UV Yöntemi ile Meyve Suyu Örneklerinde Patulin Tayini.....	57
3.3. Patulinin Laktik Asit Bakterileri ile Biyolojik Detoksifikasyonu	61
3.3.1. LAB Suşlarının HPLC Yöntemi ile Detoksifikasyon Analizi.....	61

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	75
5. KAYNAKLAR	95
Ek: Deney Sonuçları.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Patulinin kimyasal yapısı	5
1.2. Patulinin biyosentetik yolu.....	9
1.3. IDH geni tarafından katalizlenen isoeopoxydonun phyllostine dönüşümü	10
1.4. Patulinin toksik aktivitesinden sorumlu kimyasal bileşenler	12
3.1. LAB izolatlarının gram boyama reaksiyonları (A) 14.1 nolu izolatin Gram boyama reaksiyonu (kok) (X100), (B)1.5.1.1.2 nolu izolatin Gram boyama reaksiyonu (basil) (X100).....	46
3.2. Patulin standart çözeltisine (50 ng/ml) ait kromatogram	51
3.3. 12, 24, 36, 48, 60 ve 84 ng/ml derişim değerlerinde hazırlanan patulin standart çözeltileri ile yapılan çalışmada elde edilen sonuç	52
3.4. Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007)'nin yöntemlerine göre kontrol için ekstrakte edilmiş elma suyu örneğine ait kromatogram	56
3.5. Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007)'nin yöntemlerine göre 50 ng/ml içerecek şekilde patulin eklenmiş elma suyu örneğinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	56
3.6. Patulin içeren örneklerin patulin içeriklerine göre dağılımı.....	58
3.7. (A) 20 nolu kayısı-elma suyu örneğinin patulin ile kontamine olduğunu gösteren kromatogram, patulin 16.294 dakikada pik vermiştir.....	60
(B) Kontrol için 50 ng/ml derişimindeki patulin standardının 16.582 dakikada pik verdiğini gösteren kromatogram.....	58
3.8. (A) 13 nolu organik elma suyu örneğinin patulin ile kontamine olduğunu gösteren kromatogram, patulin 16.687 dakikada pik vermiştir.....	58
(B) Kontrol için 50 ng/ml derişimindeki patulin standardının 16.878 dakikada pik verdiğini gösteren kromatogram.....	59
3.9. Analiz edilen 10^{11} cfu/ml derişimindeki (A) Canlı (B) Cansız LAB suşları tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri	

sonunda azalış miktarları Sarı: <i>Leu.mesenteroides</i> (22.2), Turuncu: <i>Lb. plantarum</i> (22.1), Kırmızı: <i>Leu. lactis</i> (NRLL B-3468), Pembe: <i>Lb. plantarum</i> (24.3), Mor: <i>Lb. plantarum</i> (23.4), Mavi: <i>Lb. kefir</i> (NRLL B-1839), Yeşil: <i>Lb. plantarum</i> (7.8), Siyah: <i>Lb. plantarum</i> (4.2.1).....	65
3.10. 10^{11} cfu/ml derişimindeki canlı ve cansız LAB suşları tarafından patulinin maksimum azalış miktarlarının karşılaştırması	
1. <i>Lb. kefir</i> (NRLL B-1839), 2. <i>Leu. lactis</i> (NRLL B-3468), 3. <i>Lb. plantarum</i> (4.2.1), 4. <i>Lb. plantarum</i> (7.8), 5. <i>Lb. plantarum</i> (22.1), 6. <i>Leu. mesenteroides</i> (22.2), 7. <i>Lb. plantarum</i> (23.4), 8. <i>Lb. plantarum</i> (24.3).....	66
3.11. 10^{10} cfu/ml derişimindeki LAB suşları tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda azalış miktarları	
1. Canlı <i>Lb. paracasei subs.paracasei</i> (NRLL B-4560) hücreleri 2. Cansız <i>Lb. paracasei subs.paracasei</i> (NRLL B-4560) hücreleri 3. Canlı <i>Lb. coryniformis</i> (10.1) hücreleri 4. Cansız <i>Lb. coryniformis</i> (10.1) hücreleri.....	66
3.12. 10^9 cfu/ml derişimindeki LAB suşları tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda azalış miktarları	
1. Canlı <i>Leu. mesenteroides subs. mesenteroides</i> (NRLL B-512) hücreleri 2. Cansız <i>Leu. mesenteroides subs. mesenteroides</i> (NRLL B-512) hücreleri 3. Canlı <i>Lb. hilgardii</i> (NRLL B-1843) hücreleri 4. Cansız <i>Lb. hilgardii</i> (NRLL B-1843) hücreleri.....	67
3.13. Canlı ve cansız <i>Lactobacillus kefir</i> (NRLL B-1839) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	68
3.14. Canlı ve cansız <i>Lactobacillus paracasei subs. paracasei</i> (NRLL B-4560) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	68
3.15. Canlı ve cansız <i>Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides</i> (NRLL B-512) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	69
3.16. Canlı ve cansız <i>Lactobacillus hilgardii</i> (NRLL B-1843) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	69

3.17. Canlı ve cansız <i>Leuconostoc lactis</i> (NRLL B-3468) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	70
3.18. Canlı ve cansız <i>Lb. plantarum</i> (4.2.1) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	70
3.19. Canlı ve cansız <i>Lb. plantarum</i> (7.8) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	71
3.20. Canlı ve cansız <i>Lb. coryniformis</i> (10.1) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	71
3.21. Canlı ve cansız <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (10.2) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	72
3.22. Canlı ve cansız <i>Lb. plantarum</i> (22.1) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	72
3.23. Canlı ve cansız <i>Leu. mesenteroides</i> (22.2) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	73
3.24. Canlı ve cansız <i>Lb. plantarum</i> (23.4) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	73
3.25. Canlı ve cansız <i>Lb. plantarum</i> (24.3) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Bazı mikotoksinler ve fizyolojik etkileri.....	3
1.2. Patulin üreten türler.....	7
1.3. Avrupa Birliği ve Türkiye’de bulunan düzenlemelere göre elma içeren gıda maddelerinde izin verilen maksimum patulin miktarları.....	20
2.1. Çalışmada kullanılan meyve suları (A) Meyve suyu çeşitleri.....	34
(B) Meyve sularının sınıflandırılması.....	33
2.2. Çalışmada kullanılan laktik asit bakteri suşları A) ARS kültür Koleksiyonundan (NRLL) temin edilen <i>Lactobacillus</i> ve <i>Leuconostoc</i> suşları ve elde edildikleri kaynaklar (B) Çeşitli turşulardan izole edilmiş LAB suşları ve elde edildikleri kaynaklar.....	35
2.3. Patulin analizinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizdeki kromatografik koşullar.....	42
3.1. Turşu suyu örnekleri, alındıkları yerler ve tuzluluk yüzdeleri.....	44
3.2. Turşu sularından saflaştırılan LAB izolatları.....	45
3.3. VİTEK testi sonuçları.....	47
3.4. Yağ asiti metil esterleri analizi sonuçları.....	48
3.5. Laktik asit bakterilerinin ribotiplendirme ile identifikasyon sonuçları ve elde edilen profil bantları.....	51
3.6. 12, 24, 36, 48, 60 ve 84 ng/ml derişim değerlerinde hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin doğrusallık özellikleri.....	53
3.7. Patulinin GraphPad Prism versiyon 3.02 programı (Amerika) kullanılarak yapılan istatistik analizleriyle elde edilen kalibrasyon sonuçları.....	53
3.8. 50 ng/ml seviyesinde patulin içeren standart çözeltili ile elde edilen sonuçlar.....	54
3.9. 50 ng/ml derişiminde patulin eklenmiş elma sularının Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007)’nin yöntemlerine göre ekstraksiyonları sonucu elde edilen geri kazanım yüzdeleri.....	55
3.10. HPLC-UV yöntemi ile incelenen elma suları ve elma içeren karışık meyve sularındaki patulin kontaminasyonu.....	57

3.11. Analiz edilen meyve suyu örneklerindeki patulin miktarlarının Türk Gıda Kodeksi tarafından izin verilen maksimum 50 µg/l olan patulin seviyesine göre % dağılımı ($n=32$).....	59
3.12. ARS kültür koleksiyonundan temin edilen ve turşulardan izole edilen, canlı ve cansız LAB suşlarının, patulin içeren ve pH'sı 4 olan tampon ile inkübasyonu sonucu 1., 5., 24. ve 48. saatte ortamdan uzaklaştırdığı patulinin % azalış miktarları	62
4.1. Türkiye'nin yıllar itibariyle meyve suyu ve konsantresi ihracatı, (Miktar: Ton, Değer: 1000 \$).....	77
4.2. FAME ve ribotiplendirme sonuçlarının karşılaştırılması.....	83

1. GİRİŞ

Patulin (PAT) {4-hydroxy-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2(6*H*)-one}, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* cinslerinin çeşitli suşları tarafından üretilen, proteinlerin sülfidril ve amino gruplarına karşı oldukça reaktif olan, suda çözünebilir, β -doymamış, toksik bir laktondur (Hayes ve ark. 1979). 1942 yılında, *P. patulum* ve *P. expansum* kültürlerinden elde edilen patulin, geniş spektrumlu bir antibiyotik bileşiği olarak keşfedilmiştir (Bonerba ve ark. 2010, Moake ve ark. 2005). Daha sonra yapılan çalışmalarla, patulinin insan, hayvan ve bitkilere karşı toksik olduğu kanıtlanmış ve antibiyotik olarak kullanımı yasaklanmıştır (He ve ark. 2009).

Yapılan bazı araştırmalar, çeşitli meyve sularının içerisinde gıda kontaminantı ve mikotoksin çeşidi olan patulinin sıklıkla bulunduğunu göstermektedir. Patulinin insan ve çocuk sağlığını tehdit edici, zararlı ve yaşam kalitesini düşürücü etkileri göz önünde bulundurulduğunda, gıdalarda bu mikotoksinin kontrolü veya uzaklaştırılması için çeşitli tekniklerin geliştirilmesi ve meyve suyu gibi çeşitli gıda ürünlerinde bu metabolit varlığının araştırılması ve detoksifikasyonuna yönelik çalışmalar önem arz etmektedir.

Bu çalışma ile ülkemizde üretilen ve Eskişehir piyasasında tüketime sunulan, elma suları ve elma içeren çeşitli meyve sularında başlıca kontaminant olan patulin seviyelerinin ultraviyole detektörü ile birleştirilmiş Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) yöntemiyle saptanması ve çeşitli laktik asit bakterileri (LAB) ile patulinin biyolojik detoksifikasyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Patulinin biyolojik detoksifikasyon çalışmalarında, hem Amerika'da bulunan ARS (Tarımsal Araştırma Servisi) kültür koleksiyonundan temin edilmiş referans suşlar hem de turşuculardan ve farklı evlerden temin edilmiş ev yapımı turşulardan izolasyonu gerçekleştirilmiş laktik asit bakteri suşları kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri kaynağı olarak çeşitli turşuların seçilmesinin nedeni, patulinin biyolojik detoksifikasyon çalışmalarında turşulardan izole edilmiş suşların daha önce kullanılmamış olması ve orijinal LAB suşlarıyla çalışılmasının istenmesidir.

Gıdaların bileşimi; beslenme fizyolojisi açısından öneminin ortaya konulması, işleme ve depolama sırasında kalite değişiminin saptanması, yasal düzenlemelere ve kalite standartlarına uygunluğunun ya da hileli olup olmadığının belirlenmesi gibi çeşitli nedenlerden dolayı araştırılmaktadır (Karav 2009). Bu çalışma sonunda, ülkemizde üretilen çeşitli meyve sularında patulin derişimlerinin belirlenmesinin bu ürünlerin kalitesi hakkında fikir vermesi, ülkemizde meyve suyu üretiminde uluslararası yasal düzenlemelere ve Türk Gıda Kodeksi'nin belirlemiş olduğu kalite standartlarına uygunluğunun ortaya konulması konusuna katkı sağlanması ve patulin gibi çeşitli mikotoksinlerin ileriki biyolojik detoksifikasyon çalışmalarına ışık tutması beklenmektedir.

1.1. Gıdalarda Küf ve Mikotoksin Sorunu

Çevremizde gün geçtikçe artan kimyasallar nedeniyle günümüzde gıda güvenliği başlıca endişe konusu olmuştur. Gıdalar dioksin, mikotoksin, ağır metal, pestisit, polisiklik aromatik hidrokarbon, ilaç ve hormonlar gibi kontaminantlara maruz kalan önemli kaynaklardır (Barreira ve ark. 2010). Gıdalarda, yemlerde ve meyve suları gibi çeşitli içeceklerde üretim başlangıcından tüketim aşamasına kadar çeşitli küfler gelişebilmektedir. Bu küfler, ürünlerin tat ve bileşimlerinin bozulmasına sebep olabildiği gibi yüksek sıcaklık ve bağıl nem gibi belirli çevresel koşullar altında mikotoksin gibi toksik özellikte çeşitli sekonder metabolitlerin ortama salınmasına da neden olabilmektedir (Barreira ve ark. 2010, Karaca 2005).

Mikotoksinler küfler tarafından üretilen, uçucu olmayan, nispeten düşük moleküler ağırlıklı, oldukça toksik bileşiklerin bir sınıfını oluşturan sekonder metabolitlerdir (Barreira ve ark. 2010, Brase ve ark. 2009). Küflerin gelişimi için gerekli olmadıklarından sekonder metabolit olarak değerlendirilmekte olup basit bir ifadeyle birincil metabolik süreçlerin bir ürününü teşkil etmektedirler (Brase ve ark. 2009). Mikotoksinlerin kimyasal yapıları oldukça karmaşık ve çeşitlidir (Roseanu ve ark. 2010). Literatüre göre küf türleri tarafından üretilen 500'den fazla çeşit mikotoksin olduğu bilinmektedir (Köppen ve ark. 2010). Bu son derece toksik metabolitler, insan ve hayvanlarda hastalık veya ölüm gibi ciddi sağlık

problemlerine neden olabilmektedir (Karaca 2005). Mikotoksinlerin fonksiyonları açıkça belirlenememiştir; fakat bu toksinlerin aynı çevrede bulunan diğer mikroorganizmaları ortadan kaldırmakla ilgili bir rol oynadıkları, ayrıca parazitik küflerin konakçı dokularını istila etmelerine yardımcı oldukları düşünülmektedir (Brase ve ark. 2009).

Hayvanlar, mikotoksinler ile kontamine olmuş besinleri metabolize etmeleri sonucu mikotoksinlerden daha çok etkilenmektedir. Metabolize olmuş mikotoksinlerin etkisi, hayvanların endokrin ve nöroendokrin fonksiyonlarının etkilenmesi veya immün sistemlerinin baskılanması ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, besinlerdeki mikotoksinler zamanla insanların vücudunda birikmekte ve karaciğerde, böbreklerde, sindirim sisteminde veya üreme sisteminde kansere ve immün yetmezliğine neden olmaktadır (Brase ve ark. 2009). Çoğu mikotoksinin teratojenik, kanserojen, östrojenik, nörotoksik ve immün baskılayıcı olduğu bildirilmiştir (Köppen ve ark. 2010). Bazı mikotoksinler ve bunların memeli hücreleri üzerinde oluşturdukları fizyolojik etkiler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir. Mikotoksinler, tümör oluşumunu veya hızlı ölümü tetikleyebileceğinden küflerin insanlarda kanser oluşturma üzerine etkisi, 1960’lardan itibaren yoğun araştırma konusu haline gelmiştir (Brase ve ark. 2009). En çok araştırılan mikotoksinler *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* ve *Myrothecium* cinslerine ait türler tarafından üretilmektedir (Brase ve ark. 2009). Mikotoksinler, bu küflerin hif ve sporlarında oluşmaktadır (Köppen ve ark. 2010).

Çizelge 1.1. Bazı mikotoksinler ve fizyolojik etkileri (Roseanu ve ark. 2010)

Mikotoksinler	Üretici Organizma	Kimyasal Yapısı	Memeli Hücreleri Üzerindeki Etkisi
Aflatoksin (B1, B2, G1, G2, M1, M2)	<i>Aspergillus</i>	Difuranokumarin türevleri	Karsinojenik
Sitrinin	<i>Penicillium</i>	Benzopiran türevi	Nefrotoksik
Fumonisin	<i>Fusarium</i> <i>Alternaria</i>	İzoflavonoid bileşikleri	Karsinojenik Hepatotoksik

Çizelge 1.1. (Devam) Bazı mikotoksinler ve fizyolojik etkileri (Roseanu ve ark. 2010)

Trikotesen	<i>Fusarium</i> <i>Thricoderma</i>	Seskiterpanoid bileşikleri	Sitotoksik İmmün baskılayıcı Karsinojenik
Okratoksin	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Fenilalanine bağlı dihidroizokumarin türevleri	Nefrotoksik Hepatotoksik Teratojenik
Patulin	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	Doymamış heterosiklik laktonlar	Karsinojenik İmmün baskılayıcı Genotoksik
Zearalenon	<i>Fusarium</i>	Fenol resorsiklik asit lakton	Östrojenik aktivite Potansiyel Karsinojenik ve teratojenik

1961 yılında, İngiltere’de bir tavuk çiftliğinde hindi-X hastalığı sebebiyle meydana gelen 100.000 hindinin ölümü, fungal metabolitlerin potansiyel sağlık tehlikesi olarak tanımlanmasına sebep olan kritik olay olmuştur. Çok sayıda hindinin ölümüne neden olan bu olayın yemlere ilave edilen, aflatoksinle kontamine olmuş yer fıstıklarıyla ilgili olduğu açığa çıkarılmıştır (Köppen ve ark. 2010).

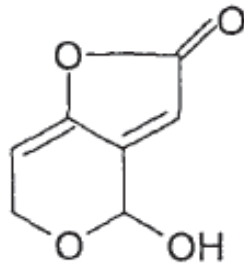
Mikotoksin üreten küfler toksijenik olarak adlandırılmıştır ve çoğu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* cinslerine ait türlerdir (Karaca 2005, Karaca ve ark. 2010, Köppen ve ark. 2010). Bu toksijenik türlerden bazıları, çok yaygın olarak bulunmakta ve çok ciddi sağlık ve ekonomik problemlere sebep olmaktadır (Karaca ve ark. 2010). Küf ve mikotoksin kontaminasyonu, hasat öncesi, hasat ve kurutma zamanları arası ve depolama gibi gıda üretim zincirinin herhangi bir basamağı süresince oluşabilmektedir (Köppen ve ark. 2010).

Yüzlerce çeşit sekonder metabolit bilinmektedir; fakat bunlardan sadece birkaçı gıda kontaminantı olarak rol oynamaktadır (Horvath ve ark. 2010). Gıda kontaminantlarının başında aflatoksinler, okratoksinler, patulin, fumonisinler ve trikotesen gelmektedir (Karaca ve ark. 2010, Topçu ve ark. 2010).

1.2. Patulin

1.2.1. Patulinin yapısı ve özellikleri

Patulinin kimyasal yapısı, {4-hydroxy-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2(6*H*)-one} olup 1950 yılında Woodward ve Sing tarafından aydınlatılmıştır (Acar ve ark. 1998a, Artık ve ark. 2001). Şekil 1.1’de bu yapı gösterilmiştir. Patulinin kapalı formülü ise C₇H₆O₄ şeklinde gösterilir.



Şekil 1.1. Patulinin kimyasal yapısı

Moleküler ağırlığı 154.12 g/mol olan patulinin erime noktası 110-112 °C’dir. Patulin, suda oldukça iyi çözünen renksiz kristal bir bileşik olup (Karaca 2005, Murillo-Arbizu ve ark. 2010) antibiyotik özellikler gösteren doymamış, toksik bir laktondur (Artık ve ark. 2001, Hayes ve ark. 1979).

Patulin, 276 nm’de UV absorbans özelliği gösterir (Baert ve ark. 2007). Su, etanol, aseton, etil asetat ve kloroformda çok iyi çözünebilirken etil eter ve benzende çok az çözünür, petrol eterinde ise hiç çözünmez (Karaca 2005). Proteinlerin sülfidril ve amino gruplarına karşı oldukça reaktiftir (Horvath ve ark. 2010). Yüksek proteinli gıdalarda patulinin düşük seviyelerde bulunması veya hiç bulunmaması, toksinin bu gıdalarda bulunan sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmesine atfedilmektedir (Karaca 2005).

1942 yılında antibiyotik bileşiği olarak keşfedilen patuline claviformin, penicidin, clavatin, clavacin, expansine, gigantic acid, myocin C gibi isimler verilmiştir (Bonerba ve ark. 2010, He ve ark. 2009, Moake ve ark. 2005).

Başlangıçta geniş spektrumlu bir antibiyotik olarak keşfedilmesine karşılık sonraları hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterileri içeren 75'ten fazla farklı türü inhibe ettiği bulunmuş ve hem hayvan hem de salatalık, buğday, bezelye, mısır ve keten gibi yüksek bitki hücrelerine karşı toksik olduğu kanıtlanmıştır (Baert ve ark. 2007, Horvath ve ark. 2010, Moake ve ark. 2005). Paterson ve ark. (2004), patulinin mutajenik özelliklere sahip olarak *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı güçlü bir antibiyotik etki gösterdiğini bildirmiştir.

1.2.2. Patulin Üreten Başlıca Mikroorganizmalar

Patulin, *Penicillium* türleri dışında *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Byssochlamys* cinslerinin çeşitli suşları tarafından üretilmektedir (Bonerba ve ark. 2010). Patulin üreten başlıca *Penicillium* türleri ve diğer türler Çizelge 1.2'de verilmiştir. Patulin üretici mikroorganizmaların başında gelen *Penicillium expansum* izolatlarının tümü %100 patulin üreticisidir (Morales ve ark. 2010).

P. expansum, yüzeyleri hasar görmüş meyvelerle alakalı bir küf olarak tanımlanmakla birlikte elmalarda mavi küf çürümelerinden sorumlu, patulin üretme yeteneğinde olan küfler arasında en önemli ve en çok karşılaşılan türdür (Tangni ve ark. 2003, Welke ve ark. 2010, Lawley ve ark. 2008). Bu tür, psikrofil özellik göstermekte olup 0 °C'de oldukça iyi gelişmekte; fakat aynı zamanda -2 ila -3 °C'de de gelişme göstermektedir. Bu tür için optimum gelişme sıcaklığı 25 °C, maksimum gelişme sıcaklığı ise 35 °C'dir (Morales ve ark. 2010). Patulin üretimi, en yüksek 21 °C'de olmak üzere *P. expansum* gelişimine izin veren 0-30 °C'yi kapsayan her sıcaklıkta gözlenmiştir (Moake ve ark. 2005).

Çizelge 1.2. Patulin üreten türler

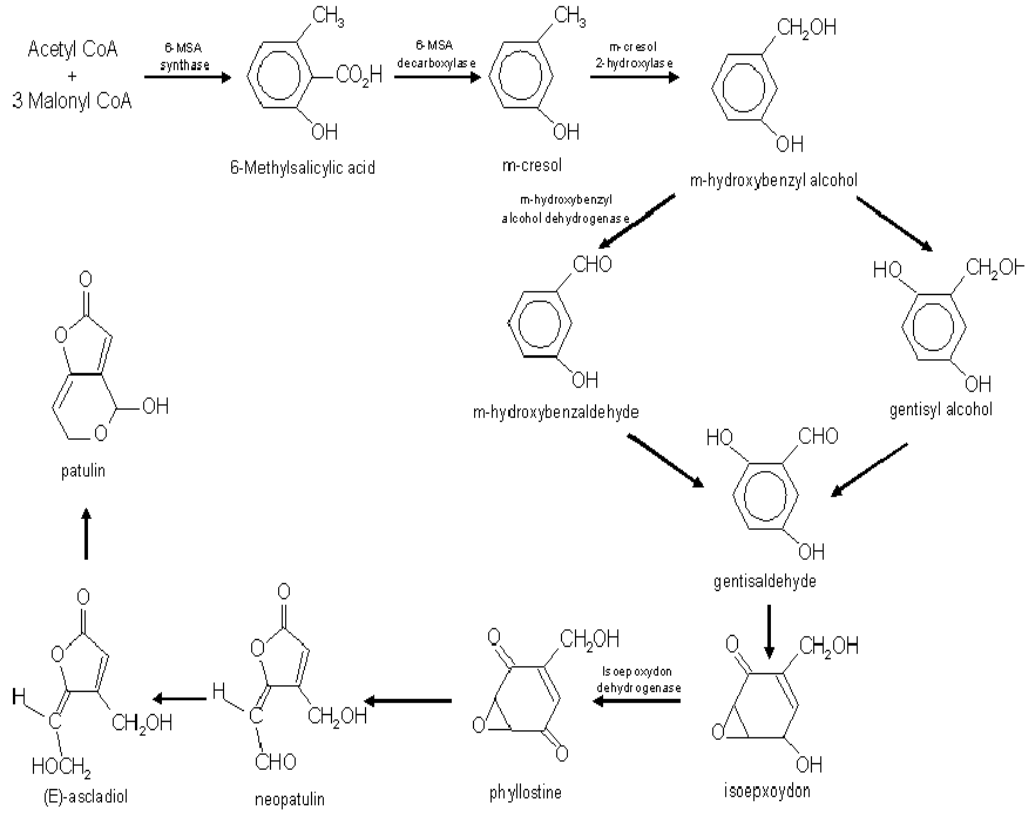
Patulin Üreten Başlıca <i>Penicillium</i> Türleri	Kaynak
<i>P. roquefortii</i>	Gökmen ve ark.1998
<i>P. equinum</i>	Gökmen ve ark.1998
<i>P. brevicompactum</i>	Paterson ve ark. 2003
<i>P. paxilli</i>	Paterson ve ark. 2003
<i>P. expansum</i>	Karaca 2005
<i>P. claviforme</i>	Karaca 2005
<i>P. chrysogenum</i>	Karaca 2005
<i>P. melinii</i>	Karaca 2005
<i>P. griseofulvum (P. patulum, P.urticae)</i>	Dombrink-Kurtzman 2006
<i>P. carneum</i>	Dombrink-Kurtzman 2006
<i>P. paneum</i>	Dombrink-Kurtzman 2006
<i>P. sclerotigenum</i>	Dombrink-Kurtzman 2006
<i>P. crustosum</i>	Moake ve ark. 2005
Diğer Türler	Kaynak
<i>A. clavatus</i>	Karaca 2005
<i>A. terreus</i>	Karaca 2005
<i>A. giganteus</i>	Gökmen ve ark.1998
<i>Al. alternata</i>	Moake ve ark. 2005
<i>S. vesicarium</i>	Moake ve ark. 2005
<i>B. fulva</i>	Karaca 2005
<i>B. nivea</i>	Karaca 2005

1.2.3. Patulin Biyosentezi ve Isoepoxydon dehydrogenase (IDH) Geni

Patulin biyosentezi iyi anlaşılmıştır ve hepsi olmasa da enzimle katalizlenen bir dizi yoğunlaşma ve redoks reaksiyonlarını içermektedir. Biyosentez, CoA (koenzim A) ve bu molekülü tetraketid yapan malonil-CoA'nın 3 birimi ile başlamaktadır. CoA ve 3 malonil-CoA, 6-MSA (metilsalisilik asit) sentetaz olarak bilinen 760.000-Dalton'luk homotetramer enzim ile 6-MSA'ya yoğunlaşmaktadır. Patulin biyosentezindeki sonraki basamak, 6-MSA'nın 6-MSA dekarboksilaz aktivitesi vasıtasıyla m-krezole dönüşümünü içermektedir. m-krezol

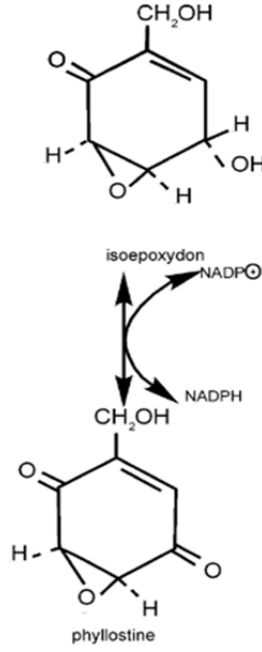
daha sonra, *m*-krezol 2-hidroksilaz tarafından *m*-hidroksibenzil alkole dönüşmektedir.

Sonraki basamak, başlıca iki mekanizma arasında tartışılmaktadır. Bu iki mekanizmanın her ikisi de, *m*-hidroksilbenzil alkolün sonunda gentizaldehide dönüşümünde anlaşılmaktadır, bununla birlikte bu iki bileşiğin arasındaki aracının ya gentizil alkol ya da *m*-hidroksibenzaldehit olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalar, *m*-hidroksibenzaldehidin uygun olmasıyla birlikte her ikisinin de mümkün olabileceğini ileri sürmüştür. Bazıları ise *m*-hidroksibenzaldehidin gentizaldehitten ziyade *m*-hidroksibenzoikasite dönüştüğüne inanmaktadır. İkinci durumda, *m*-hidroksibenzil alkol dehidrogenaz, *m*-hidroksibenzil alkolü *m*-hidroksibenzaldehide dönüştürmektedir. Bu enzim ve *m*-krezol 2-hidroksilazın her ikisinin de çalışması için oksijen ve NADPH'ya (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) ihtiyaç duydukları gösterilmiştir. Gentizaldehit oluşur oluşmaz sırasıyla isoepoxydon, phyllostine, neopatulin, E-ascladiol ve son olarak da patuline dönüşmektedir. Isoepoxydonun phyllostine'e dönüşümü, NADP'ye bağlı IDH vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Neopatulinin E-ascladiol'e dönüşümü ise NADPH sayesinde gerçekleştirilen indirgenme ile olmaktadır. Bu reaksiyonun ürünü olan E-ascladiol daha sonra ya patuline okside olmaktadır ya da enzimatik olmayan bir yolla izomeri olan Z-ascladiol'e dönüşmektedir. Patulinin biyosentetik yolu Şekil 1.2'de özetlenmiştir (Moake ve ark. 2005).



Şekil 1.2. Patulinin biyosentetik yolu (Moake ve ark. 2005).

Patulin biyosentezi, en az 10 biyosentetik basamağı içermektedir. Biyokimyasal seviyede oldukça iyi karakterize edilmesine karşın patulin biyosentezini kapsayan genlerin organizasyonu bilinmemektedir. Buna rağmen, *Penicillium expansum*'un patulin biyosentez basamaklarında görevli olan IDH geni için bir polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) deneyi tasarlanmıştır. IDH geni, isoeopoxydonun phyllostine'e dönüşümünü katalizlemektedir (Paterson ve ark. 2003). Şekil 1.3'te bu dönüşüm gösterilmiştir. IDH geninin 600 baz çifti hedeflenerek tasarlanan ileri ve geri primerlerin dizisi, 5'- CAA TGT GTC GTA CTG TGC CC ve 5'- ACC TTC AGT CGC TGT TCC TC' dir (Paterson ve ark. 2000).



Şekil 1.3. IDH geni tarafından katalizlenen isoeopoxydonun phyllostine dönüşümü
(Paterson ve ark. 2003).

İngiltere'deki Tarım, Balıkçılık ve Gıda Bakanlığı (MAFF), patulin üreticisi patojenin ayrıca elma ağaçları ile endofit olarak yaşadığına dikkat çekmiştir. Ağaçlardan yapılan örneklemelerde, patulin sentezleyici IDH geni varlığının endofitik ilişkiye bir kanıt olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, enfekte belirtisi göstermeyen sağlam meyvelerden üretilmiş meyve suları ve diğer işlenmiş ürünlerin patulin içermesi ihtimali bulunabilmektedir (Paterson ve ark. 2000).

1.2.4. Patulinin Bulunduğu Gıda Kaynakları

Patulin, çeşitli meyvelerde özellikle de elmalarda ve elmadan yapılmış ürünlerde bulunmaktadır (Koçkaya ve ark. 2009). Patulin, çoğunlukla *P. expansum*'un etkisiyle çürüyen, özellikle de toprağa düşmüş elmalarda bulunmuştur (Paterson ve ark. 2000).

Bu mikotoksin, doğal olarak elma, elma suyu ve işlem görmüş veya görmemiş kayısı, üzüm, greyfurt, şeftali, armut, muz, ananas, çilek, erik, domates,

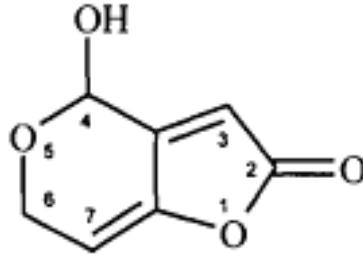
frenk üzümü, çay üzümü, ahududu, nektarin, beyaz ve karadut, portakal, kavun, karpuz, kiraz gibi çeşitli meyvelerde, biber, salatalık, havuç, yer elması gibi sebzelerde, sert kabuklu yemişler, bira, şarap, ekmek, yem, peynir, zeytin, et ürünleri ve tahıllarda bulunmuştur (Dombrink-Kurtzman 2006, Gökmen ve Acar 1998, Karaca 2005, Li ve ark. 2007, Moake ve ark. 2005, Silva ve ark. 2007). Elma şırası gibi ürünlerin genellikle patulin içermediği ileri sürülmesine rağmen patulinin elma şırasında bulunduğunu gösteren bazı çalışmaların mevcut olduğu belirtilmiştir (Speijers 2004).

Patulin üretiminde en etkili şekerin fruktoz, sonra da glikoz olduğu belirtilmiştir. Patulinin daha çok meyve ve ürünlerinde üretilmesinin nedeni bu gıdalarda meyve şekeri olarak bilinen fruktozun daha çok bulunması ile açıklanabilir (Karaca 2005).

Gıda endüstrisinde birçok hammaddede patulin saptanabilmesine karşın, patulin birikimi açısından en çok ilgiyi elma ve elma ürünleri çekmektedir (Morales ve ark. 2010). Ticari olarak mevcut meyve sularında patulin oluşumuna sıklıkla rastlanıldığı çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur ve başlıca ilgi, özellikle çocuklar tarafından fazla tüketilen elma sularında toplanmıştır (Speijers 2004, Topçu ve ark. 2010).

1.2.5. Patulinin Kararlılığı

Patulin, sistein veya glutatyon gibi sülfidril bileşikleriyle birleşme eğilimindedir. Sistein ile birleşme sayesinde patulin kararlılığı ve toksisitesi güçlü bir şekilde azalmaktadır. Şekil 1.4'te patulinin toksik aktivitesinden sorumlu kimyasal bileşenler olan lakton grubu ve 6 pozisyonundaki C atomu gösterilmiştir (Hayashi 2002).



Şekil 1.4. Patulinin toksik aktivitesinden sorumlu kimyasal bileşenler (Hayashi 2002).

1.2.5.1. Patulinin sulu çözeltilerdeki ve elma suyundaki kararlılığı

Patulin, asidik sulu çözeltilerde oldukça karardır ve 3.5-5.5 pH aralığında 125 °C'deki sıcaklıklara karşı dirençlilik gösterir (Collin ve ark. 2008). Alkali ortamlarda ise bu mikotoksin, kimyasal değışikliğe uğrayarak aktivitesini kaybetmektedir (Karaca 2005).

Berraklaştırma işlemlerinden geçmemiş bulanık elma sularıyla yapılan analizler, meyve sularında bulunan ve sıvı faza göre daha çok protein içeren katı parçacıklarla etkileşime girmesi sonucu zamanla patulin miktarlarının azaldığını göstermiştir (Silva ve ark. 2007).

Bazı çalışmalarla, üretimin son aşaması olan depolamanın patulin içeriğı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalardan birkaçı, elma suyunun soğukta muhafaza edilmesinin patulin seviyelerinde azalmaya neden olduğunu ileri sürerken diğeri bazıları ise hiçbir değışikliğin olmadığını belirtmiştir (Baert ve ark. 2007, Iha ve Sabino 2008, Moake ve ark. 2005, Murillo-Arbizu ve ark. 2010).

1.2.5.2. Patulinin diğeri besinlerdeki kararlılığı

Ortamin pH değeri, patulin kararlılığını önemli düzeyde etkilemektedir (Morales ve ark. 2010). Patulin, ısıya karşı oldukça dirençlidir ve 90 °C'de 10 saniyelik pastörizasyon işlemi sırasında parçalanmamaktadır. Ancak meyve suyu ve başka gıdalarda koruyucu olarak kullanılan kükürt dioksit varlığında patulin parçalanabilmektedir (Lawley ve ark. 2008). Patulinin portakal sularında kararlılığını yitirdiğı, bunun nedeninin ise bu mikotoksinin portakal sularında

bulunan sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmesi ile açıklanabileceği belirtilmiştir (Hayashi 2002, Lawley ve ark. 2008). Peynir ve et gibi karbonhidratça fakir ve proteince zengin gıdalarda küf gelişimi yaygın olmasına rağmen belirgin bir patulin miktarına rastlanmamıştır. Yüksek proteinli gıdalarda patulin bulunmayışı veya miktarının düşük oluşu, toksinin bu gıdalardaki sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmesiyle açıklanmaktadır (Karaca 2005).

Patulin, fermentasyon işlemlerine dayanıklı değildir ve alkol fermentasyonu sırasında mayalar tarafından hemen hemen tamamen parçalanmaktadır (Arıcı 2005). Genelde elma şırası örneklerinde, fermentasyon sırasında patulinin parçalanması nedeniyle düşük patulin derişimleri belirtilmesine rağmen ara sıra 160 µg/l'ye kadar çıkan yüksek seviyeler tayin edilmiştir. Bu şıralardaki patulin varlığı, muhtemelen tatlı elma şırası elde etmek için şıraya elma suyunun ilave edilmesine bağlanmaktadır (Speijers 2004, Tangni ve ark. 2003). Patulin, fermentasyon işlemi süresince *Saccharomyces cerevisiae* tarafından metabolize olduğundan elma suyu ilave edilmemiş alkolic şırada bir problem olarak görülmemektedir (Paterson ve ark. 2004). Moss ve Long (2002), elma suyunun *S. cerevisiae* ile alkolic fermentasyon süresince, C₁₄-etiketli patulinin kararlılığını yitirdiğini göstermiştir. Fermentasyonların HPLC analizi, muhtemelen E- ve Z-ascladiol olduğu düşünülen iki önemli metabolitin varlığını göstermiştir (Speijers 2004). Moake ve ark. (2005), E-ascladiolun kendisinin de bir mikotoksin olduğunu ve patulin ile karşılaştırıldığında daha az bir toksisiteye sahip olmakla birlikte bu mikotoksinin de sülfidril içeren bileşiklerle reaksiyona girdiğini belirtirken Lawley ve ark. (2008), parçalanma ürünlerinin toksisitesi konusunda kesin bir bilginin mevcut olmadığını belirtmiştir.

1.2.6. Patulin Üretim Koşulları

P. expansum'un patulin üretimi için, elma ve elma ürünleri mükemmel substratlardır (Barreira ve ark. 2010). Meyvelerde, sebzelerde ve bunlardan elde edilmiş ürünlerde patulin üretimi su aktivitesi, sıcaklık, pH ve meyvelere özgü diğer kimyasal özellikler gibi faktörlere bağlıdır (Moake ve ark. 2005). Elmalar arasındaki çeşit farkı bile *P. expansum*'un patulin üretimini etkilemektedir

(Moake ve ark. 2005). *P. expansum* tarafından patulin üretimi için sıcaklık değerleri 0-25 °C, minimum su aktivitesi (a_w) değeri ise 0.95, elma sularındaki pH değerleri 3.2-3.8 olarak belirtilmiştir (Lawley ve ark. 2008, Morales ve ark. 2010).

1.2.7. Elmalarda, Elma Suları ve Elma Suyu İçeren Karışık Meyve Sularında Patulin Kontaminasyonunun Önlenmesi ve Giderilmesi

Mikotoksinleri önlemek için gösterilen çabalara rağmen bu toksinler, gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde insan sağlığıyla ilgili hala önemli bir problem teşkil etmektedir (Barreira ve ark. 2010). Gıda endüstrisinde, elma ve elma ürünlerinin patulin ile kontaminasyonu endişe konusu olmuştur (Welke ve ark. 2010). Patulinin neden olduğu sağlık riskleri, bu mikotoksinin kontrolünü ve elma ürünlerinden uzaklaştırılmasını gerektirmektedir (Welke ve ark. 2010).

Elmaların patulin ile kontaminasyonu, normal olarak meyvelerdeki çürümüş doku alanlarıyla alakalıdır; fakat patulin ayrıca sağlıklı dokularda da bulunabilmektedir. Meyveden çürümüş dokunun uzaklaştırılması patulin seviyelerini düşürse de bu toksin bozulmuş dokuyu çevreleyen sağlıklı dokunun yaklaşık 1 cm kadar içine doğru nüfuz edebilmektedir (Gökmen ve ark. 2005, Welke ve ark. 2010).

Elma ürünlerinin patulin ile kontaminasyonunun kontrolü için gösterilen çabalar üç alanda yoğunlaşmıştır: 1) Patulin kontaminasyonunun hasat zamanı ve depolama basamaklarında önlenmesi; 2) Üretim süresince patulinin uzaklaştırılması; 3) Üretim sonrası muamelelerde patulinin uzaklaştırılması veya detoksifikasyonu (Moake ve ark. 2005).

Meyve suyu fabrikaları, hasat edilen elmaların bir kısmını direk meyve suyu olarak işlerken, bir kısmını da açıkta yığınlar halinde depolamaktadır (Kadalkal ve ark. 2003a). Elmalar hasat edilmeden önce, elmaların gelişimi süresince böcek ve kuşların elmalara verdiği zararların azaltılması için önlemler alınmalıdır. Bu sayede hasat öncesinde elmalarda küf enfeksiyonlarının ve patulin üretiminin önüne geçilebilir. Hasat zamanında ise, patulin içermesi daha çok

muhtemel olan çürümüş ve zarar görmüş elmalar atılmalıdır (Lawley ve ark. 2008).

Elmaların hasat sonrasında depolanmaları sonucunda tüketicileri etkileyen bazı kalite problemleri görülmektedir (Batu ve Demirdöven 2010). Hasat sonrası sağlıklı görünen ya da doğal yollarla veya çeşitli nedenlerle zedelenmiş elmalarda, taşınma ve uzun süre açıkta depolanma süreçlerinde patulin üretebilen küfler gelişebilmektedir (Kadalkal ve ark. 2003a). Elmalar hasat edildikten sonra, depolarda hijyenik şartlar altında korunmalı ve fungal bir enfeksiyonu ya da çürümeyi teşvik eden fiziksel hasarların en aza indirgenmesi sağlanmalıdır. 10 °C'nin altındaki sıcaklıklarda ve kontrollü atmosferde (%0.04'ten %1.5-5'e kadar yükseltilmiş karbondioksit ve %21'den %1-3'e kadar düşürülmüş oksijen seviyelerini içeren çevre, genellikle $O_2/CO_2 = \%3/3$ 'tür) depolama da patulin üretimini kontrol altına almak için alınan yararlı önlemler arasındadır (Lawley ve ark. 2008, Morales ve ark. 2010). Hasat sonrasında, ayrıca soğuk depolama süresince elma küflerini kontrol altına almak için yaygın bir şekilde thiabendazole, imazalil ve son yıllarda çevreye daha az risk teşkil eden fludioxonil gibi fungusitler kullanılmaktadır. Bu uygulama, elmaların mavi küf hastalığının kontrol altına alınmasında önemli bir stratejidir (Morales ve ark. 2010). Fakat hasat öncesi ve sonrası fungusit muamelesi *P. expansum*'un neden olduğu enfeksiyonu tamamen önleyememektedir. Ayrıca, endüstriyel ölçekte sağlam meyvelerin seçilmesindeki güçlük, son ürünün patulin içermemesini garanti etmemektedir (Castoria ve ark. 2005). Depolama odalarında kontrollü atmosfer altında tutulan veya tutulmayan hasar görmüş, düşük kaliteli elmaların meyve suyu ve elma şırası üretiminde kullanılması son ürünlerin oldukça yüksek seviyelerde patulin kontaminasyonu ile sonuçlanmaktadır (Moukas ve ark. 2008, Tangni ve ark. 2003).

Küflü, çürümüş ve zarar görmüş elmaların üretimden önce yıkanması ve ayıklanıp atılması işlemleri elma suları ve elmalardan üretilen diğer ürünlerde patulin seviyesinin düşürülmesine önemli ölçüde yardımcı olabilmektedir (Iha ve ark. 2008, Lawley ve ark. 2008, Spadaro ve ark. 2007). Bu işlemler elle, su kanallarıyla veya yüksek basınçlı su püskürtme ile yapılabilmektedir (Lawley ve

ark. 2008). Elmaların küflü ve çürümüş kısımların kesilip uzaklaştırılması, patulin kontaminasyonunun %99'a kadar ortadan kaldırıldığını göstermiştir; fakat bu işlem hem pahalıdır hem de yoğun iş gücüne ihtiyaç duymaktadır (Moake ve ark. 2005, Spadaro ve ark. 2007).

İşlenmiş elma ürünlerinde çoğu zaman direk pazar satışlarına uygun olmayan düşük kaliteli meyveler kullanıldığından (Moake ve ark. 2005) üretimden sonra meyve suları ve konsantrelerinde saptanabilir derişimlerde patulin kalmaktadır (Gökmen ve Acar 1998). Bu nedenle patulin, elma suyu ve elma suyu konsantrelerinin önemli bir kalite parametresi haline gelmekle birlikte bunların ihracatında problem oluşturmaktadır (Kadalkal ve ark. 2003a). Şüpheli ürünlerden örnek alınıp analizinin yapılması faydalı olmaktadır. HPLC yöntemi ile UV saptama yapılarak, elma sularındaki patulin seviyeleri düzenli olarak görüntülenebilmektedir (Lawley ve ark. 2008).

1.3. Patulinin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkisi

Yaşamın ilk yılı süresince bebek ve çocuklar tarafından elma ürünlerinin oldukça fazla tüketilmesi nedeniyle, daha düşük vücut ağırlığı, daha yüksek metabolit oranları, daha düşük detoksifikasyon yetenekleri ve bazı organ ve dokularının tamamlanmamış gelişimi nedeniyle yetişkinlere nazaran onların çeşitli toksinlere daha çok maruz kaldıkları düşünülmektedir. Elma içeren gıdaları en çok tüketenler bebek ve çocuklar olduğu için onların nüfusun incinebilir bölümüne dahil olması ve risk grubu olarak düşünülmesi kaçınılmazdır (Barreira ve ark. 2010, Cano-Sancho ve ark. 2009).

Patulin ile bağlantılı ilk hastalık, Japonya'da bir mandıra sığırının *P. urticae* ile kontamine olmuş hayvan yemi ile beslenmesinin ardından ölmesi ile ortaya çıkmıştır. Ayrıca Almanya ve Fransa'daki sığırlarda da patulin ile alakalı ölümler rapor edilmiştir (Hayes ve ark. 1979).

1.3.1. Akut Semptomlar

Patulinin sebep olduğu akut semptomlar ajitasyon (gerginlik), havale, ödem, ülser, kan toplanması, bağırsak iltihabı, kusma ve kanamayla ilgili lezyonlar (yaralar) olarak bildirilmiştir (Paterson ve ark. 2004, Spadaro ve ark. 2007).

1.3.2. Kronik Sağlık Etkileri

Patulinin sitotoksik, genotoksik, mutajenik (Horvath ve ark. 2010), kemirgenlerde ve hayvanlarda immunotoksik ve nörotoksik (Spadaro ve ark. 2007) ve tavuk embriyolarına karşı teratojenik olduğu kanıtlanmıştır (Ciegler ve ark. 1977); fakat insan ve hayvan deneklerinde patulinin karsinojenik olup olmadığı konusunda yeterli kanıt bulunmadığı bildirilmiştir (Barreira ve ark. 2010, Valle-Algarra ve ark. 2009). Buna karşılık patulin alımı sonucunda etkilenen hayvan organları, böbrekler, karaciğer ve bağırsaklar olduğundan bu toksinin belirli hayvan modellerinde karsinojen olduğu düşünülmektedir (Wu ve ark. 2009). Kanser araştırmaları için bir uluslararası temsilci olan IARC (1993)’a göre patulin karsinojenite açısından insanlarda kanıtın bulunmaması nedeniyle Grup 3 – ‘insanlara karşı karsinojen olmamak’ sınıfına dahil edilmiştir (Silva ve ark. 2007, Tangni ve ark. 2003, Cano-Sancho ve ark. 2009). Buna rağmen, potansiyel karsinojenik özelliğinden dolayı patulin, halk sağlığı açısından bir tehdit oluşturmaktadır (Topçu ve ark. 2010).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, patulinin insan hücrelerinde oksidatif DNA hasarına yol açma yeteneğine sahip potansiyel bir genotoksik olduğuna dikkat çekmiştir. Oksidatif DNA hasarının, mutagenез ve kanser başlangıcında rol oynadığı düşünülmektedir (Wu ve ark. 2009).

Patulinin ayrıca protozoa, virüsler, fungi, bitkiler ve memelileri içeren diğer birçok organizmalara karşı toksik olduğuy bildirilmiştir (He ve ark. 2009). Patulin toksisitesi, enzim alkilasyonu ve DNA translasyonu/transkripsiyonu ile ilgilidir (Paterson ve ark. 2004). Sülfidril gruplarıyla güçlü birleşme eğilimi

nedeniyle patulin, birçok enzimin aktivitesini inhibe etmektedir. Ayrıca bu mikotoksinin mitokondriyal ve plazma membran fonksiyonlarına zarar verme yeteneğinin olduğu bildirilmiştir (Tangni ve ark. 2003).

1.4. Patulin İle İlgili Yasal Düzenlemeler

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), insanların patuline bazı seviyelerde maruz kalmasının risk teşkil ettiğini belirtmiştir (Paterson ve ark. 2003). Elma sularının doğal kontaminantı olarak patulin ve diğer mikotoksinlerin oluşumunu önlemeye yönelik gösterilen çeşitli çabalara rağmen, mikotoksinler gelişmiş ülkeler de dahil dünyanın birçok yerinde insan ve hayvan sağlığını tehdit eden ciddi bir problem teşkil etmektedir (Barreira ve ark. 2010, Topçu ve ark. 2010).

Patulin molekülünün kararlılığı yüzünden, üretimden sonra elma ürünlerinde hala önemli miktarlarda patulin kalmaktadır (Silva ve ark. 2007). Avrupa Birliği, bu nedenle tüketiciye sunulan ve elma içeren ürünlerde, izin verilen en yüksek patulin miktarlarının belirlenmesi için uluslararası yasal düzenlemeler ortaya koymuştur (Barreira ve ark. 2010, Topçu ve ark. 2010). Elma sularında, patulin derişimine sınırlandırma konulmasının sebebi, bu ürünün başlıca tüketicilerinin bebekler ve çocuklardan oluşması ve patuline uzun süreli maruz kalmanın insanlarda yaratacağı etkilerinin henüz bilinmiyor olmasıdır (Dombrink-Kurtzman 2006).

1975-1995 yılları arasında patulinin hem oluşumu hem de toksikolojisi üzerine Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler'in Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) Birleşmiş Milletler'e bağlı besin katkı maddeleri üzerine kurulmuş ortak uzmanlık kurulu olan JECFA tarafından oluşturulan güvenlik değerlendirmelerini içeren birçok araştırma yapılmıştır. Patuline olan ilginin nedeni ise, 1961 yılında Dickens ve Jones'ın geçersiz ve yetersiz çalışmalarına dayanan, patulinin karsinojenik olduğunu ileri süren yanlış bir varsayımın bulunmasıydı. Son yıllarda yapılan güvenlikle ilgili düzenlemeler, patulinin karsinojenik olmadığı ve tolere edilebilir günlük alımın belirlendiği konularına

açıklık getirmiştir. O zamandan beri, patulin üzerine yapılan çalışmaların sayısı azalmıştır (Hayashi 2002, Lawley ve ark. 2008, Speijers 2004). Birleşik Krallık hükümeti ve JECFA, daha önce patulin için öngörülen maksimum tolere edilebilir günlük alımı (PMTDI) 1.0'dan 0.4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ vücut ağırlığı.gün⁻¹'e düşürmüştür (Gökmen ve ark. 2005, Leggott ve ark. 2001).

2003'te Avrupa Birliği'nin koyduğu yasal düzenlemelere göre, izin verilen en yüksek patulin miktarlarına meyve suları, meyve nektarları ve konsantre meyve sularında 50 $\mu\text{g/kg}$, elmalardan üretilen enerji içecekleri, şıralar ve diğer fermente içeceklerde veya elma sularında 50 $\mu\text{g/kg}$, elma kompostosu veya elma püresi gibi katı elma ürünlerinde 25 $\mu\text{g/kg}$ olacak şekilde sınırlandırmalar getirilmiştir (Valle-Algarra ve ark. 2009, Wu ve ark. 2009).

Bebek ve küçük çocukların patulin toksisitesinden korunması için Avrupa Birliği yönetmeliğinde, elma suları ve elma kompostosu, elma püresi ve bebek ürünlerini içeren katı elma ürünlerinde patulin için 10 $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde ayrı bir sınırlandırma getirilmiştir (Barreira ve ark. 2010). JECFA da elma sularında bulunmasına izin verilen en yüksek patulin miktarına 50 $\mu\text{g/kg}$ 'lık bir sınırlandırma getirmiştir (He ve ark. 2009). Çizelge 1.3'te Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2008/26)'de yer alan EK-2 Mikotoksinler kısmında, izin verilen en yüksek patulin seviyelerinin Avrupa Birliği'nin koymuş olduğu düzenlemelerdeki gibi olduğu görülmektedir.

Çizelge 1.3. Avrupa Birliği ve Türkiye’de bulunan düzenlemelere göre elma içeren gıda maddelerinde izin verilen maksimum patulin miktarları (Barreira ve ark. 2010, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/kodeks_yonetmelik/bulasanlar_yonetmelik.html)

	Gıda Maddesi	İzin Verilen Maksimum Patulin Miktarı (µg/kg)
Avrupa Birliği	Meyve suları, konsantre meyve suları, meyve nektarları, enerji içecekleri, elma şırası ve diğer fermente elma suları	50
	Elma püresi ve kompostosu gibi katı elma ürünleri	25
	Çocuklara yönelik üretilen elma püresi ve elma kompostosu gibi belirli bazı ürünler	10
Türk Gıda Kodeksi	Meyve suları, meyve suyu konsantresi ve meyve nektarları	50
	Distile alkollü içkiler, elma şarabı ile elmadan üretilen veya elma suyu içeren diğer fermente içkiler	50
	Katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve doğrudan tüketime sunulan elma püresi dahil)	25
	Bebek ve küçük çocuklar için üretilen ve bu amaçla satışa sunulan elma suyu ve katı haldeki elma ürünleri (elma kompostosu ve elma püresi dahil)	10

1.5. Patulinin Saptanması

Patulinin toksikoloji, saptanması ve detoksifikasyon çalışmaları hem gıda endüstrisi hem de yasal düzenlemeler yapan kurumlar için öncelikli bir öneme sahiptir (He ve ark. 2009). Mutajenik ve karsinojenik doğası ve tüketicilere sağlık riski oluşturması nedeniyle elma ürünlerinde patulinin tayin edilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle, örnekten patulinin ekstrakte edilebilmesi için güvenilir ve hassas yöntemler gerekmektedir (Wu ve ark. 2009).

Gıda ürünlerinde ve elma sularında patulin tayini için İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Kütle Spektrometri (MS), Kolorimetri, Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometri (GC-MS), Yüksek Performanslı Sıvı

Kromatografisi (HPLC), Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometri (LC-MS) gibi birçok yöntem geliştirilmiştir (Moukas ve ark. 2008, Barreira ve ark. 2010).

HPLC yöntemi, toksinlerin saptanmasında resmi bir yöntem olarak geniş bir kabul görmüştür ve UV, floresans, amperometrik veya spektrofotometrik saptama ile birlikte uygulanmaktadır. Ayırma ve saflaştırma için hem normal hem de ters faz HPLC (RP-HPLC) kullanılabilir. Analitik bir araç olarak HPLC, birçok otomatize saptama sistemleriyle birlikte kullanılabilme imkanlarıyla yüksek rezolüsyon ve algılama sınırı (LOD) avantajı sunmaktadır (Roseanu ve ark. 2010). Patulinin oldukça polar bir yapıya sahip olması ve 276 nm dalga boyunda özgül absorpsiyon göstermesi nedeniyle günümüzde ters faz kromatografisi, patulin analizinde en uygun ve en yaygın kullanılan yöntem olmuştur (Baert ve ark. 2007, Barreira ve ark. 2010, Moukas ve ark. 2008). Düşük molekül ağırlığına sahip oldukça polar bir madde olması nedeniyle patulin, ters faz kolonlarından yüksek yüzdelerde su içeren hareketli faz ile sürüklenebilmektedir. Analizlerde başlıca kullanılan hareketli fazlar, değişik oranlarda kullanılan asetonitril ve su karışımlarıdır. Ayrıca su-etanol, su-metanol-asetik asit karışımları da hareketli faz olarak kullanılmaktadır (Silva ve ark. 2007).

HPLC-UV yöntemi, elma ürünlerinde patulin miktar tayininde rutin olarak kullanılmaktadır; fakat patulin varlığını doğrulamak için kullanılan yöntemler, genellikle sıvı veya gaz kromatografisi ile ayırma sonrasında kütle spektrometrisi gibi daha özgül saptama tekniklerini içermektedir. GC-MS analizi için patulin, trimetilsilil türevi (TMS-patulin) olarak elektron iyonizasyonu ile saptanmaktadır. Ayrıca, negatif iyon kimyasal iyonizasyonu ile GC-MS, elma suyu ekstraksiyonlarında türevlendirilmemiş patulinin saptanmasına izin vermektedir. Elma sularında, patulinin 68-3700 µg/l arasında değişen seviyelerde bulunması halinde varlığının doğrulanması için kuadropol, iyon tuzağı ve manyetik sektör cihazlarında çeşitli kapiller kolonları kullanılabilir (Moake ve ark. 2005)

1.6. Patulin Detoksifikasyonu

Gıdalarda patulinin sağığa zararlı etkilerinin getirdiğı endişe, araştırmacıları patulin seviyelerini veya fungal üreticisini azaltmaya yönelik yaklaşımlar bulmaya yöneltmiştir. İdeal mikotoksin detoksifikasyon yöntemleri, ana bileşiklerin karbon dioksit ve suya kadar tamamen parçalanmasını başarmalıdır. Halbuki bu tam parçalanma, her zaman mümkün olmayabilir ve çeşitli parçalanma ürünlerinin veya yan ürünlerin oluşumu gözlenebilir. Bu yeni oluşan ürünler, toksinin kendisine benzer hatta belki de ondan daha yüksek toksikolojik özelliklere sahip olabilmektedir. Patulin gibi basit bir kimyasal yapıya sahip mikotoksinler, aflatoksin gibi karmaşık olanlara nazaran tamamen parçalanmaya daha çok eğilim göstermektedir (Karaca ve ark. 2010).

Üretim süresince ve üretim sonrasında patulinin uzaklaştırılması için etkili dekontaminasyon veya detoksifikasyon yöntemleri; 1) Toksini etkisiz hale getirmeli, parçalamalı veya uzaklaştırmalı, 2) Ortama yeni toksik maddeler bırakmamalı, 3) Ürünün besin değerini korumalı, 4) Ürünle ilgili teknolojik işlemleri önemli ölçüde değiştirmemeli, 5) Eğer mümkünse fungal sporları ortadan kaldırmalıdır (Moake ve ark. 2005).

Patulin seviyelerinin düşürülmesi için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bunlar patulinin kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanlarla parçalanması, patulin üreticisi olan küfün sterilizasyonu ve/veya kontrolüdür (İha ve ark. 2008, Yun ve ark. 2008).

1.6.1. Fiziksel detoksifikasyon

1.6.1.1. Depektinizasyon, berraklaştırma ve filtrasyon işlemleri

Patulin seviyelerini kısmi olarak düşürme kapasitesine sahip standart elma suyu üretiminde meyve suyu berraklaştırma işlemleri uygulanmaktadır.

Bissessur ve ark. (2001)'nin yapmış olduğu bir çalışmanın esası, pektinaz enzimlerinin kullanımı ile protein partiküllerini saran pektin örtüsünün parçalanması ve bu sayede protein partiküllerinin toplanıp çökelmesi sonucu proteinlerin patulin ile bağlanan kısımlarının patulini etkisiz hale getirmesine dayanmaktadır. Bu yöntem ile meyve suyundaki patulin içeriği %73 azaltılabildiği bildirilmiştir.

Acar ve ark. (1998b) tarafından yapılan bir çalışmada; depektinizasyon, berraklaştırma ve rotari vakum  n kaplama filtresinden geçirme şeklindeki filtrasyon işlemlerini kapsayan geleneksel elma suyu üretim işlemlerinin patulin seviyelerini %39 oranında azaltabildiği gösterilmiştir. Kullanılan bu yöntemlerin, filtrasyon sonucu uzaklaştırılan meyve artıklarını ve filtrenin kendisini, potansiyel olarak oldukça toksik olduğu ve hayvan yemlerine posa olarak katılma gibi ileriki kullanımlara uygun olmayan bir hale soktuğu, bunun da birçok meyve suyu üreticisinin kazanç kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, jelatin/bentonit karıştırılarak yapılan depektinizasyon, berraklaştırma ve ultrafiltrasyon yöntemlerinin kullanımının ise patulinin %25 azalması ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Moake ve ark. 2005).

1.6.1.2. Aktif kömür ile muamele

Aktif kömür muamelesi ile elma sularının berraklığında artışın, rengine, fumarik asit miktarında, Briks (suda çözünen kuru madde miktarı) ve pH değerlerinde azalmanın gözlendiği, karbon absorpsiyon muamelesinin oluşturduğu bu gibi negatif etkilerin, meyve suyunun tat ve kalitesini olumsuz olarak değiştirebildiği bildirilmiştir. Ayrıca aktif karbon kullanımının, hem zaman alıcı hem de pahalı olmakla birlikte meyve suyu endüstrisinin maliyetini oldukça yükselttiği; karbon materyalinin maliyeti dışında, aktif kömür muamelesinin ayrıca ekolojik olarak üstesinden gelinmesi gereken aşırı miktarda atık madde oluşturduğu bildirilmiştir.

Artık ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada aktif kömür kullanımının elma suyunun rengi, berraklığı, fenolik, organik asit ve patulin

içerikleri üzerindeki etkileri araştırılmış, aktif kömür muamelesi ile patulinin en yüksek %40.9 oranında azaltıldığı; fakat meyve suyu güvenirliliğinin iki özelliği olan renk ve fenolik içeriğinin ise önemli derecede azaldığı, organik içeriğinin ise önemli ölçüde değişmediği bildirilmiştir (Moake ve ark. 2005).

1.6.1.3. Gama ışınlaması

Gıda ışınlaması, gıdaların muhafazası ve sterilizasyonunda güçlü bir işlem olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, fungal suşlar ışınlamaya bakterilerden daha duyarlıdır ve meyvelerde fungal giderilme için yaklaşık 1 kGy (kilogray) radyasyon dozunun yeterli olduğu genellikle kabul edilmiştir. Ayrıca, gama ışınlamasının elma suyundaki patulin seviyesini düşürebildiği bildirilmiştir. Bu etki, iyonlaştırıcı ışınlama sonucunda su moleküllerinden oluşan serbest radikallerin güçlü aktivitesi nedeniyle meydana gelmektedir. Bu nedenle, gama ışınlaması hem kontamine patulin seviyesinin düşürülmesi hem de elmadaki patulin üretici küfün kontrolünde oldukça etkili olabilmektedir (Yun ve ark. 2008).

Daha önce yapılan çalışmalarda elektromanyetik ışınlamanın, meyve suyunda bulunan patulin ve diğer mikotoksinlerin içeriğini azalttığı gösterilmiştir (Moake ve ark. 2005). Zegota ve ark. (1988) tarafından yapılan bir çalışmada, meyve suyunun 0.35 kGy iyonlaştırıcı ışınlamaya tabi tutulması işleminin, meyve suyunun enzimatik olmayan esmerleşmesinde hızlanmaya neden olmadan patulin içeriğini %50 azalttığı gösterilmiştir.

Yun ve ark. (2008), gama ışınlamasının bir elma model sistemindeki patulin üreticisi *Penicillium griseofulvum*'un gelişimi ve patulin üretimi üzerine etkilerini araştırmıştır. Bu suş, elmalara yapay olarak inoküle edilmiş ve elmalara 1 kGy'lik gama ışınlaması uygulanmıştır. Işınlama sonrasında uygulanan 4 °C'deki 10 haftalık depolama periyodu süresince sağlam kalan konidiosporların gelişiminin önlenemediği, ışınlamaya tabi tutulmayan elmalarda patulin derişiminin 25 °C'de yaklaşık 950 ppm ve 4 °C'de ise 410 ppm'e ulaşmasıyla

giderek arttığı; fakat 1 kGy'lık gama ışınlaması sonrasında uygulanan depolama süresince patulin üretiminin gözlenmediği bildirilmiştir.

1.6.1.4. Isı uygulaması/Pastörizasyon

Pastörizasyon, gıda sanayisinde besin maddelerini hastalık yapıcı mikroorganizmalardan arındırmak amacıyla uygulanan ısıtma yöntemidir. Bu yöntem, içinde enzim ve bakteri bulunan, besleyici özelliği olan maddenin 60 °C'den 100 °C'ye kadar ısıtılması işlemiyle mikroorganizmaların tahrip edilmesi veya etkisiz hale getirilmesi işlemidir (Anonim, 2012a).

Isı uygulaması ile patulin detoksifikasyonuna ilişkin birbirini desteklemeyen sonuçlar mevcuttur. Genellikle patulin, ısıya dirençli bir molekül olduğundan elma suları ve elma suyu konsantrelerinde pastörizasyon ve depolama gibi endüstriyel proseslerle etkisiz hale getirilememektedir. Çünkü patulin, asidik ortamda kararlı kalmaktadır (Bonerba ve ark. 2010, Kadakal ve Nas, 2003b).

Patulin seviyelerini düşürme etkisine sahip yöntemlere göre en az etkili olan bu yöntemde patulin, 3.5-5.5 gibi düşük pH'larda ısı parçalanmaya karşı nispeten kararlılık göstermektedir. 60–90 °C'de 10 saniyelik pastörizasyon işlemleri, patulin seviyelerini sadece %18.8 azaltabilmiştir (Moake ve ark. 2005).

Woller ve Majerus (1982), elma suyuna 1 mg/l patulin ilave edilmesinin ardından 72 ve 90 °C'de 5-20 dakika ısı uygulamasının kayda değer bir azalmaya neden olmadığını bildirmiştir.

Kadakal ve Nas (2003b), 5, 10, 15 ve 20 dakikalık periyotlarla uygulanan 90 ve 100 °C'lik ısı uygulaması ile 70 ve 80 °C'lik evaporasyon işlemlerinin patulin ve elma suyunun diğer özellikleri üzerindeki etkisini araştırmıştır. Isıtma ve evaporasyon süresi arttıkça, elma suyu örneklerindeki patulin derişimlerinin düştüğü gözlenmiştir. 20 dakika, 90 ve 100 °C'lik ısı uygulaması sonunda patulinin sırasıyla %18.81 ve %25.99 oranında; 70 ve 80 °C'lik evaporasyon sonucunda ise sırasıyla %9.40 ve % 14.06 oranında azaltılabildiği gösterilmiştir.

1.6.2. Kimyasal detoksifikasyon

Kimyasal detoksifikasyon uygulamaları iki gruba ayrılabilir: Elma ve diğer yüzeylerdeki *P. expansum* sporlarının parçalanmasına yönelik uygulamalar ve toksik olmayan ürünler oluşturmak için patulin molekülü ile reaksiyona giren uygulamalar (Kokkinidou 2008). Patulini detoksifiye etmede oksitleme, patulini daha az toksik bileşiklere indirgeme ve patulini bağlamak için daha az toksik olan sülfidril temelli eklentiler formunda tasarlanmış birçok sayıda kimyasal kullanılmıştır. Laboratuvar artıklarında patulinin kimyasal detoksifikasyonunda en etkili iki yol, amonyak ile muamele ve potasyum permanganat oksidasyonudur (Freymy ve ark. 1995).

1.6.2.1. Amonyak ile muamele

Amonyak ile muamelede, patulin seviyelerinin laboratuvar artığında %99.9, meyve suyunda ise %99.8'e kadar indirgendiği; fakat meydana gelen ürünün kullanıma uygun olmadığı bildirilmiştir (Freymy ve ark. 1995).

1.6.2.2. Potasyum permanganat oksidasyonu

Potasyum permanganat ile asidik veya alkali koşullarda oksidasyon, laboratuvar artığındaki patulinin %99.99'dan daha iyi indirgenmesiyle sonuçlanmıştır (Freymy ve ark. 1995).

1.6.2.3. Kükürt içeren bileşikler ile muamele

Kükürt içeren çeşitli indirgeyici ajanlar, gıdalarda patulin seviyelerini düşürme etkisine sahip olduklarından bunlar yoğun olarak araştırma konusu olmuştur. Kükürt dioksitin kullanımını içeren çalışmalar çeşitli sonuçlar doğurmuştur. Çalışmaların çoğu, kükürt dioksit varlığında patulinin kararsız olduğu konusunda hemfikir; fakat etkisi konusunda değişik görüşler sunmaktadır (Freymy ve ark. 1995, Kokkinidou 2008).

Aytaç ve Acar (1994) tarafından yapılan benzer bir deneyde, 1 kg elma suyuna 100 mg kükürt dioksit katılmasıyla patulin %42 azaltılabilmektedir. Burroughs (1977)'in deneyinde ise gıda endüstrisinde izin verilen maksimum sınır olan 200 ppm kükürt dioksitin patulini 24 saat içerisinde %12 azalttığı, 2000 ppm kükürt dioksitin ise patulini 48 saat sonunda %90 azalttığı gözlenmiştir.

Steiner ve ark. (1999) asidik pH değerlerinde kükürdün patuline geri dönüşümlü olarak bağlandığı; sonuçta oluşan hidroksi sülfonatin ise hala toksik yapıyla alakalı olan birleşik lakton halkasını içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca sıklıkla bebek ve çocuklar tarafından tüketilen elma suyunda alerjenik potansiyeli nedeniyle kükürt dioksinin kullanımı tavsiye edilmemektedir.

1.6.2.4. Askorbik asit ile muamele

Brackett ve Marth (1979), elma suyunun detoksifikasyonunda askorbik asitinin verimli bir katkı maddesi olabileceğini önermiştir.

Steiner ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, 1 litre elma suyundaki 50 µg patulinin, 500 mg askorbik asit/l ilave edilmesi sayesinde 14 gün içerisinde %64 oranında azaltıldığı bildirilmiştir. Buna karşılık, Aytaç ve Acar (1994) ise 500 mg askorbik asit/l ile 5000 mg patulinin 15 gün içerisinde tamamen parçalandığını ileri sürmüştür. İki çalışma arasındaki büyük farkın, muhtemelen örneklerdeki mevcut oksijenden kaynaklandığı, Steiner ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada oksijenin hesaba katılmadığı ileri sürülmüştür (Drusch ve ark. 2007).

Drusch ve ark. (2007), askorbik asit ile patulinin hızlı bir şekilde parçalanması için oksijen ve serbest radikallerin gerektiğini bildirmiştir. Askorbik asitin tamamen oksitlenmesi sonucunda patulinin parçalanması duracağından askorbik asitin başlangıç derişimi ve parçalanma oranı önem arz etmektedir. Kapalı ambalajın üst kısmındaki düşük oksijen varlığı nedeniyle ambalaja doldurulmadan önce elma suyuna askorbik asit ilave edilmesinin bu nedenle verimli bir dekontaminasyon stratejisi olmadığı; ayrıca, patulin parçalanması

sonucunda oluşan ürünlerin toksikolojik potansiyellerinin açıklığa kavuşturulması gerektiği bildirilmiştir (Drusch ve ark. 2007).

1.6.2.5. Ozon ile muamele

Gıda endüstrisi için yeni onaylanmış bir dezenfektan olan ozonun, çeşitli türlerdeki mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bulunmuştur. Sanitasyon ve birçok ürünün çürüme kontrolleri için ozon kullanımı, ticari uygulamalar için araştırılmıştır. Kendiliğinden oksijene parçalanması nedeniyle ozonizasyonun, muamele gören ürünlerde zararlı kalıntılar oluşturmadığı için güvenli bir uygulama olduğu düşünülmektedir (Karaca ve ark. 2010).

İnsan sağlığı açısından bir dekontaminasyon işleminden sonra, muamele gören ürünün potansiyel toksisitesinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Ozonizasyon bu anlamda umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. Çünkü embriyo ve çeşitli türlerdeki hayvanlarla yapılan besleme deneylerinin sonuçları, ozon muamelesi ile toksinlerin birçok zararlı etkisinin ortadan kaldırıldığını göstermiştir (Karaca ve ark. 2010).

Karaca ve Velioğlu (2009) tarafından yapılan bir çalışma ile model sistemlerde patulinin ozona karşı zayıf bir dirençlilik gösterdiği bulunmuştur. Başlangıçtaki patulin derişimi, 1 dakikalık ozon muamelesi sonucunda %98'e kadar parçalanmış ve deneyin sonunda uygulanan HPLC veya GC-MS spektrometrisi yöntemleri ile yeni herhangi bir ürünün oluşumu gözlenmemiştir.

Ozon gazı, depolanamamaktadır ve tesis içerisinde üretilme zorunluluğu vardır. Bu faktör, ozon uygulamaları için diğer oksidasyon/dezenfeksiyon tekniklerine nazaran yüksek bir yatırım maliyetine neden olmaktadır. Ozon üretiminin başlıca işletim maliyeti elektrik enerjisidir (Karaca ve Velioğlu 2009).

Aktif kömür muamelesi, filtrasyon, askorbik asit muamelesi, gama ışınlanması, ısı uygulama, ozon gibi çeşitli yöntemler, elma ve elma suyunda patulin seviyelerinin düşürülmesi için kısmi olarak uygulanmıştır (Iha ve ark. 2008, Yun ve ark. 2008). Yine de bu yaklaşımların çoğu, yüksek maliyet, imalat

süresince oluşan kimyasal tehlike, çevreye etki veya detoksifikasyon işlemindeki uygulanabilir zorluklar, zaman alıcı ve verimsiz olması nedeniyle büyük ölçüde elde edilebilir değildir (Hatab ve ark. 2012, Iha ve ark. 2008, Yun ve ark. 2008).

1.6.3. Biyolojik detoksifikasyon

Geleneksel ve organik olarak yetiştirilmiş ve çürümüş elma örneklerinde, oldukça yüksek miktarlarda patulin bulunmaktadır. Bu çürümüş elmaların işlenmesiyle üretilen elma sularındaki patulin derişimi, 2500 µg/kg seviyesine kadar ulaşabilmektedir (Horvath ve ark. 2010). Bu nedenle, patulinin güvenilir ve verimli detoksifikasyon proseslerinin bulunmasına yönelik ilgi her geçen gün daha da artmaktadır (Ricelli ve ark. 2007).

Mikotoksin ile kontamine olmuş tarımsal hammaddelerin detoksifikasyonu için bir çok yöntem, kapsamlı bir şekilde araştırılmasına rağmen bunların çoğu uygun bulunmamış veya özgül dezavantajlarından dolayı elverişsiz olarak değerlendirilmiştir (Karaca ve ark. 2010). FAO, fiziksel ve kimyasal adsorbanlar kullanılarak mikotoksinlerin detoksifikasyonunda büyük çabaların harcandığını; fakat elde edilen başarıların sınırlı kaldığını belirtmiştir (Fuchs ve ark. 2008). Biyolojik detoksifikasyon çalışmalarında, mikotoksinleri parçalama veya azaltma potansiyellerinden dolayı mikroorganizmalar arasında özellikle maya ve laktik asit bakterileri araştırma konusu olmuştur (Reddy ve ark. 2011, Topçu ve ark. 2010).

Elma suyundaki patulinin kurutulmuş *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile detoksifikasyon çalışması, patulinin sabit koşullar altında, 25 °C’de 143 saatlik inkübasyon sonucunda %96 oranında parçalandığını göstermiştir (Coelho ve ark. 2008). Yue ve ark. (2011), inaktif hale getirilmiş 10 tane maya suşunu incelemiş ve bunlardan 8’inin elma suyu içerisindeki patulin seviyelerini 24 saat içerisinde %50’ye düşürdüğünü, diğer 2 suşun ise patulini %72 oranında azalttığını bulmuştur.

1.6.3.1. Laktik asit bakterileri ve biyolojik detoksifikasyon yetenekleri

Laktik asit bakterileri, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactosphaera*, *Lactobacillus* (Lb.), *Lactococcus*, *Leuconostoc* (Leu.), *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (W.) ve *Bifidobacterium* cinslerine ait Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, kok, kokobasil veya çubuk şekilli, hareketsiz ve katalazdan yoksun çeşitli bakteri gruplarını içermektedir (Anonim 2004, Tangüler 2010, Yıldırım 2007).

Laktik asit bakterilerine ait tüm cinsler, düşük G+C (guanin ve sitozin) oranına sahip olmakla birlikte genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Yıldırım 2007). *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerinin üyeleri, oldukça benzer DNA baz oranlarına sahiptir; buna ek olarak suştan suşa oldukça az değişkenlik gözlenir. Öte yandan *Lactobacillus* cinsi, DNA bileşimi bakımından birbirinden oldukça farklı üyeler içerir; dolayısıyla homojen bir grup oluşturmaz (Anonim, 2004).

LAB, süt ürünleri, fermente et, ekşi hamur, fermente sebze, ekşi hayvan yemi, meşrubat gibi gıdalarda, bitkilerde, kanalizasyonda, insan ve hayvanların normal florasını oluşturdıkları ve yararlı bir rol oynadıkları genital, intestinal ve solunum yollarında bulunmaktadır (Cai 1996, Anonim, 2004). Çoğu serbest yaşar veya bazıları fırsatçı patojen olmasına rağmen hayvanlarla yararlı ya da zararsız ilişkiler içerisinde yaşarlar (Anonim, 2004).

Tüm LAB, anaerobik olarak gelişir; fakat diğer anaeroplardan farklı olarak çoğu oksijene duyarlı değildir ve aerotolerant anaerop olarak oksijen varlığında gelişebilirler (Madigan ve ark. 2006 Anonim, 2004). LAB, yalnızca şekerlerin metabolizmasından enerji elde ettikleri için genellikle şeker içeren habitatlarda bulunur (Madigan ve ark. 2006). Amino asit, vitamin, pürin ve pirimidinlerce zengin çevrelerde yavaş geliştikleri için sınırlı biyosentez yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle, tüm besinsel gereksinimlerini karşılayacak kompleks ortamda geliştirilmelidirler (Anonim, 2004).

LAB, şekerlerin fermentasyonu sonucunda oluşan ürünlere bağlı olarak homofermentatif ya da heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılır. Homofermentatif grubun ürettiği tek fermentasyon ürünü laktik asittir. Heterofermentatif grup ise laktatın yanı sıra ikincil ürün olarak etil alkol, asetik asit, CO₂, diasetil, asetoin gibi bileşikler üretir (Cai 1996, Madigan ve ark. 2006). Zorunlu heterofermentatif LAB *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* ve bazı laktobasilleri; tipik homofermentatif LAB cinsleri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Pediococcus* türlerini içermektedir (Anonim, 2004).

Laktik asit bakterileri, yüzyıllardır fermentasyon süreçlerinden sorumlu olmuştur ve gıda teknolojisi açısından büyük bir öneme sahiptir (Swetwathana ve ark. 2009, Yıldırım 2007). Fermente ürünlerin tat, koku, nem içeriği ve yapısı gibi organoleptik özelliklerine katkıda bulunurken aynı zamanda bazıları bakteriyosin gibi gelişimi inhibe edici maddeler ve bol miktarlarda laktik asit üreterek gıdaları bozan bakterileri inhibe eder ve gıdaların korunmasında önemli bir rol oynar (Anonim, 2004, Yıldırım 2007). LAB, yoğurt, peynir, kefir gibi süt ürünleri, sucuk, balık sosu gibi balık ve et ürünleri, şarap, lahana ve salatalık turşusu gibi sebze ürünleri, ekmek ve boza gibi tahıl-pastane ürünleri gibi birçok gıdada doğal olarak bulunur veya sonradan starter kültür olarak ilave edilerek gıdaların olgunlaştırılmasında, üretiminde, dayanıklılığının sağlanmasında ve korunmasında önemli rol oynar (Tangüler 2010, Swetwathana ve ark. 2009, Yıldırım 2007). Ayrıca, laktik asit bakterilerinin özellikle *Lactobacilli* üyeleri, insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde önemli bir alanı işgal etmektedir ve bunların sağlık açısından birkaç probiyotik yararı olduğu düşünülmektedir. Bu yararlar arasında, normal mikrofloraya olumlu etki etme, patojenleri yok etme ve mukozal bağışıklığın uyarılması yer almaktadır (Yıldırım 2007). Bu nedenlerden dolayı LAB, gıda fermentasyonlarında en çok kullanılan mikroorganizma grupları arasında yer almaktadır (Anonim, 2004).

Bu bakterilerin asit üretme özelliğinin yanında gıda maddelerinin bileşiminde bulunan, insanlar tarafından kullanılması mümkün olmayan ve toksik etkisi bulunan bileşenleri, daha küçük moleküllü, toksik etkisi olmayan veya

insanlar tarafından sindirilebilen moleküllere parçalama özelliği de önem arz etmektedir (Arıcı 2005). Çok sayıda elde edilen bulgular, süt ürünlerinde bulunan laktik basillerin, nitrozamin, aflatoksin, polisiklik aromatik hidrokarbon, azo-bileşik ve glikozitler gibi DNA-reaktif karsinojenlerin çeşitli sınıflarının detoksifikasyonunda rol oynadığını göstermiştir (Knasmüller ve ark. 2001).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) sıvı besiyeri (Fluka, İsviçre)

İçerik	Miktar
Pepton	10.0 g
Et özütü	8.0 g
Maya özütü	4.0 g
D (+) -Glukoz	20.0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.0 g
Sodyum asetat trihidrat	5.0 g
Triamonyum sitrat	2.0 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0.2 g
Manganez sülfat tetrahidrat	0.05 g
Distile su	1000 ml

Besiyerine 1 ml Tween 80 ilave edilmiş, pH 6.2'ye ayarlanmış ve besiyeri 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. MRS agar da MRS sıvı besiyeri gibi hazırlanmış, 1000 ml'ye 15 g agar ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir (de Man ve ark. 1960).

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Meyve Suları

Araştırmada, Eskişehir piyasasında tüketime sunulan farklı çeşit ve markalarda olmak üzere toplamda 32 adet meyve suyu temin edilerek kullanılmıştır. Bunlar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan meyve suları (A) Meyve suyu çeşitleri (B) Meyve sularının sınıflandırılması

(A)

Örnek No	Meyve Suyu Çeşitleri	Örnek No	Meyve Suyu Çeşitleri
1	Elma suyu	17	Elma suyu
2	Elma suyu	18	Çocuklar için üretilmiş karışık meyve suyu
3	Elma suyu	19	Şeftali-elma suyu
4	Elma suyu	20	Kayısı-elma suyu
5	Çocuklar için üretilmiş organik elma suyu	21	Çocuklar için üretilmiş organik kayısı-elma suyu
6	Çocuklar için elma suyu	22	Elma suyu
7	Elma suyu	23	Karışık meyve suyu
8	Elma suyu	24	Karışık meyve suyu
9	Çocuklar için üretilmiş organik elma suyu	25	Karışık meyve suyu
10	Elma suyu	26	Üzüm-elma suyu
11	Elma suyu	27	Vişne-elma suyu
12	Elma suyu	28	Elma suyu
13	Organik elma suyu	29	Sarı meyvelerden oluşan karışık meyve suyu
14	Organik incir-elma suyu	30	Elma-nar suyu
15	Elma suyu	31	Vişne-elma suyu
16	Elma suyu	32	Kırmızı meyvelerden oluşan karışık meyve suyu

(B)

Meyve suyu tipi	Organik	Geleneksel	Çocuk ürünü	Organik ve çocuk ürünü
Elma suyu (Adet)	3	15	3	2
Elma içeren karışık meyve suyu (Adet)	2	12	2	1

2.1.3. Patulin Detoksifikasyonunda Kullanılan Laktik Asit Bakterileri

Amerika’da bulunan ARS kültür koleksiyonundan (NRLL) temin edilen *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* suşları ve turşulardan izole edilen LAB suşları

kullanılmıştır. Çizelge 2.2’de çalışmada kullanılan laktik asit bakteri suşları ve elde edildikleri kaynaklar gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan laktik asit bakteri suşları **(A)** ARS kültür koleksiyonundan (NRLL) temin edilen *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* suşları ve elde edildikleri kaynaklar **(B)** Çeşitli turşulardan izole edilmiş LAB suşları ve elde edildikleri kaynaklar

(A)

NRLL	Suş	Kaynak
B-512	<i>Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides</i>	Kök bira, çamurlu
B-1839	<i>Lactobacillus kefir</i>	Kefir tahılı
B-1843	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Şarap
B-3468	<i>Leuconostoc lactis</i>	Kefir
B-4560	<i>Lactobacillus paracasei subs. paracasei</i>	Süt makinesi

(B)

Örnek No	Kaynak	Örnek No	Kaynak
4.2.1	Ev yapımı salatalık turşusu	22.1	Ev yapımı lahana turşusu
7.8	Ev yapımı salatalık turşusu	22.2	Ev yapımı lahana turşusu
10.1	Turşucudan temin edilmiş acur turşusu	23.4	Ev yapımı karışık turşu
10.2	Turşucudan temin edilmiş acur turşusu	24.3	Ev yapımı karışık turşu

2.2. Metot

2.2.1. Turşu Örneklerinden Laktik Asit Bakterileri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

2.2.1.1. Turşu suyu örneklerinin toplanması

Eskişehir’de bulunan turşuculardan ve evlerden 24 tane turşu suyu örneği LAB suşlarının izolasyonu için temin edilmiştir.

2.2.1.2. Turşu sularının tuzluluk yüzdelerinin ölçülmesi

Turşu sularının tuzluluk yüzdelerinin ölçümünde refraktometre (Bellingham+Stanley Ltd., Eclipse Handheld Refractometer) kullanılmıştır. Refraktometre haznesi üzerine birkaç damla turşu suyu damlatılarak turşu sularının tuzluluk yüzdeleri ölçülmüştür.

2.2.1.3. Laktik asit bakterileri izolasyonu

Turşu suyu örneklerinden aseptik koşullarda 0.5'er ml alınıp, 4.5 ml fizyolojik tuzlu su (FTS, 0.85 g/100 ml) içeren tüplere aktarılmış ve 10^{-7} 'ye kadar bir seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Koloni izolasyonu için her bir dilüsyondan 0.1 ml alınmış, %0.01 sodyum azid ilave edilmiş MRS agar petrilere drigalski spatülü ile yayılarak yayma plak hazırlanmıştır. Her bir örnekten, katı besiyerlerine iki kere inokülasyon yapılmıştır (paralel çalışma). Petriler, 30-37 °C'de, 2-3 gün anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra saf kültür elde etmek için koloniler, MRS agar petrilere çizgi ekim yapılarak saflaştırılmıştır. Kolonilerin saflığı, koloni morfolojisi ve MRS agarda 24-48 saatlik inkübasyon sonunda Gram boyamaya tabi tutulan hücrelerin mikroskopik gözlemlerine dayanılarak kontrol edilmiştir. Elde edilen saf LAB izolatları, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %15 (h/h) gliserol içerisinde, -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.1.4. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu

Çeşitli turşulardan izole edilen LAB suşlarının identifikasyonu biyokimyasal VİTEK testi, Yağ Asiti Metil Esterleri Analizi (FAME) ve ribotiplendirme ile yapılmıştır.

VİTEK testi

VİTEK testinde, Gram-pozitif bakterilerinin identifikasyonuna yarayan GPI kartları (bioMe´rieux) kullanılmıştır. GPI kartı için VİTEK veritabanı, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium* ve *Erysipelothrix*, *Rhusiopathiae*, *Actinomycespyogenes* ve *Arcanobacterium haemolyticum* gibi klinik açıdan önem arz eden bakterileri içerir (Cai 1996).

Turşulardan izole edilen bakterilerin Gram-pozitif olduğunun doğrulanması ve VİTEK testine tabi tutulması için izolatların Gram boyama reaksiyonlarına bakılmıştır. GPI kartları bir defada toplam 20 tane bakteri identifikasyonu yapmaya olanak sağladığı için stok izolatlar arasından rastgele 20 adet seçilmiştir. 30-37 °C’de, 24-48 saat anaerobik koşullarda inkübe edildikten sonra bu kültürlerin preparatları hazırlanarak Gram boyama yöntemiyle morfolojiye dayalı ışık mikroskobunda saflık kontrolleri yapılmıştır. Saf olduğu gözlemlenen kültürler çalışmada kullanılmıştır.

MRS agar petrilere ekim yapılarak canlandırılan stok kültürler, 2-3 gün 30-37 °C’de anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Türbidimetrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra, yaklaşık olarak 1.8 ml steril FTS içeren 20 adet küvete, steril kürdan yardımıyla petri yüzeylerinden alınan bir miktar bakteri kolonileri aktarılmıştır. Küvetler iyice vortekslenmiş ve sonra türbidimetreye yerleştirilmiştir. Kültürlerin yoğunluğu, 0.5 McFarland bulanıklığına denk gelecek şekilde hazırlanmıştır. Küvetlerden kapillerler yardımıyla bakteri süspansiyonları, kitlere aktarılmıştır ve kitler BiomerieuxVitec cihazına yerleştirilmiştir. Analiz yaklaşık olarak 15 saat sürmüştür.

Yağ asiti metil esterleri (FAME) analizi

Laktik asit bakterilerinin kemotaksonomisinde (biyokimyasal) selüler yağ asitlerinin gaz kromatografisi analizi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Randhawa ve ark. 2010). Selüler yağ asitleri, Sasser (1990) tarafından önerilen

yönteme göre ekstrakte edilip (Anonim, 2009) yağ asiti metil esterlerine (FAMES) türevlendirilmiştir. Bu yönteme göre önce kültürlerin toplanması işlemi gerçekleştirilmiştir. MRS agar petrilere çizgi ekim yapılarak, 30-37 °C’de geliştirilen 24-48 saatlik taze kültürlerden steril bir öze yardımıyla 40-70 mg toplanmış ve steril tüplere aktarılmıştır. Hücrelerin parçalanması aşaması olan saponifikasyon basamağında önce içerisinde kültür bulunan her bir tüpe 1 ml Reagent 1 (metanolik baz) eklenmiştir. Daha sonra tüpler, 95-100 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler soğuk su içerisinde hızlıca soğutulmuştur. Tüpler tekrar su banyosunda 25 dakika bekletilmiştir. Son olarak soğuk suda tekrar soğutulmuştur. Metilleştirme basamağında, her bir tüpe 2 ml Reagent 2 (metilleştirme reagenti) eklenmiş ve tüpler 80 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler, hızlıca soğutulmuştur. Saflaştırma/ekstraksiyon basamağında, soğutulan tüplere, 1.25 ml Reagent 3 (ekstraksiyon çözücüsü) eklenmiş ve tüpler 10 dakika rotatorda ters-düz edilmiştir. Tüpün alt kısmında kalan sulu faz pastör pipeti ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son basamak olan bazik yıkama basamağında ise her bir tüpe 3 ml Reagent 4 (bazik yıkama) eklenmiştir. Tüpler, rotatorda 5 dakika ters-düz edilmiştir. Sonra tüplerdeki üstte kalan organik fazların 2/3’ü pastör pipeti ile temiz viallere aktarılmıştır. Hazırlanan örnekler, Yağ Asiti Analiz Sistemi’ne (Agilent, 6890N) verilmiş, elde edilen pikler ‘MIDI Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi’ tarafından analiz edilmiştir.

Ribotiplendirme

Turşulardan izole edilen laktik asit bakterileri, ‘RIBOPRINTER Mikrobiyal Karakterizasyon Sistemi’ (DUPONT) kullanılarak identifiye edilmiştir. Örnek hazırlama yöntemi, DUPONT firmasının önerdiği gibi gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama bloğuna 8 adet mikrosantrifüj tüpü yerleştirilmiş, her bir tüpe 40 µl ticari olarak hazır bulunan örnek tamponundan ilave edilmiştir. Her bir örnek için steril plastik kürdan ile 4-5 koloni toplanarak tampon içeren tüpe aktarılmış, tüpler 5 saniye vorteks işlemine tabi tutulmuştur. Kapakları kapatılan tüpler, bloğun orta kısmına doğru kaydırılmıştır. Örnek

hazırlama bloğuna kuyucuklar içeren bir örnek taşıyıcı tabla yerleştirilmiş, her bir tüpten 30 µl örnek alınmış ve kuyucuklara aktarılmıştır. Daha sonra örnek taşıyıcı tabla yerinden çıkarılarak bir ısıtıcı istasyonuna yerleştirilmiş ve burada yaklaşık 25 dakika kadar bekletilmiştir. Sonra, her bir kuyucuğa 5 µl kesim ajanı A, daha sonra da 5 µl kesim ajanı B ilave edilmiştir. 90 dakikalık ısıtma işleminin tamamlanmasından sonra RiboPrinter sistemi ile analize geçilmiştir.

2.2.2. Elma Suyu ve Elma İçeren Karışık Meyve Sularında HPLC Yöntemi ile Patulin Tayini

2.2.2.1. Meyve sularının ekstraksiyonu

Meyve sularının ekstraksiyonları, önce Valle-Algarra ve ark. (2009) tarafından önerilen sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi, sonra da ekstraktların temizlenmesi için Spadaro ve ark. (2007) tarafından önerilen katı faz ekstraksiyonu yöntemi olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Bulanık meyve suları, ön işlem olarak *Aspergillus aculeatus* türünden elde edilen pektinaz enzimi (≥ 3.800 U/ml)(Sigma-Aldrich, Danimarka) ile 40 °C’de, 2 saat muamele edilmiştir. Daha sonra örnekler, 4.500 rpm’de, 5 dakika santrifüj edilmiştir (Spadaro ve ark. 2007). Bu işlemlerden sonra, örneklerin ekstraksiyon işlemlerine geçilmiştir. 5 ml berrak meyve suyu, 1 g NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Almanya) 5 g susuz Na₂SO₄(Carlo Erba Reagents, Rodano MI) ve 5 ml etil asetat:hekzan (96:4, h/h) (Merck, Almanya), 50 ml’lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve 5 dakika vorteks işleminden sonra 3000 rpm’de, 25 °C’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Organik fazın 3 ml’si, 30 µl, %100 glasiyel asetik asit (Merck, Almanya) içeren temiz bir tüpe aktarılmış ve kısa bir vorteks işleminden sonra 40 °C’ye ayarlanmış su banyosunda, hafif azot gazı altında tamamen kuruyana kadar buharlaştırılmıştır (Valle-Algarra ve ark. 2009). Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen kalıntı, derhal 5 ml toluen (Merck, Almanya) ile 1 dakika vorteks işlemi ile çözündürülmüştür. C₁₈ katı faz kolonundan (SUPELCO, Discovery DSC-18 kolonları (100 mg/1 ml), önce 5 ml toluen, arkasından ekstraktın tamamı geçirilmiştir. Kartuş, 2 ml toluen ile yıkanmış sonra hafif azot

gazı ile kurutulmuştur. Patulin elüsyonu için kolondan 4 ml etil asetat:toluen (1:1, h/h) geçirilmiştir. Elüat hafif azot gazı altında, 40 °C'lik su banyosunda kurutulmuştur. Derhal, 1.5 ml % 0.1'lik asetik asitli su ile kalıntı 1 dakika vorteks işlemiyle çözündürülmüş ve 0.45 µm por çaplı selüloz asetat filtreden (Macherey-Nagel, Düren) geçirilerek analiz edilene kadar -20 °C'ye kaldırılarak muhafaza edilmiştir (Spadaro ve ark. 2007).

2.2.2.2. Patulin stok çözeltisinin hazırlanması

Patulin stok çözeltisi, Arranz ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntemle göre 1 ml'si 0.2 mg (0.2 mg/ml) patulin içerecek şekilde hazırlanmıştır. 5 mg patulin (Merck, Almanya), 25 ml etil asetat ile balon jodede çözündürülmüştür. Çözelti, iyice çalkalanmış ve -20 °C'de daha sonra kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

2.2.2.3. Çalışma çözeltisinin hazırlanması

Çalışma çözeltisi, Vural Gökmen (1999) tarafından önerilen yöntemle göre 1.3×10^{-5} M derişiminde hazırlanmıştır. Bunun için stok çözeltisinden 100 µl alınmış ve oda sıcaklığında hafif N₂ gazı altında uçurulmuştur. Kalıntı, pH 4'e ayarlanmış 10 ml, % 0.1'lik asetik asitli su ile çözündürülmüştür.

2.2.2.4. Patulin standart çözeltilerinin hazırlanması

Patulin standart çözeltileri, Arranz ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntemle göre hazırlanmıştır. 15 ml'lik santrifüj tüplerine, çalışma çözeltisinden sırasıyla 60, 120, 180, 240, 300, 360 ve 420 µl aktarılmıştır. pH 4 asitli su ile son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece HPLC sistemine verilen patulin derişimleri sırasıyla, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 84 ng/ml olmuştur.

2.2.2.5. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması

12, 24, 36, 48, 60 ve 84 ng/ml derişim değerlerinde hazırlanan patulin standart çözeltileri Çizelge 2.3'te verilen HPLC koşullarında çalışılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Verilen kalibrasyon noktaları ile günlük kontroller yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi elde edildikten sonra meyve sularında patulin tayini çalışmasına geçilmiştir.

2.2.2.6. Patulin ekstraktlarında geri kazanım deneyleri

Ekstraksiyon verimini kontrol etmek için yapılan geri kazanım deneyleri, patulin içermediği saptanan elma sularının 50 ng/ml patulin derişiminde kontamine edilip bunların Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007) tarafından önerilen ekstraksiyon yöntemlerine aynı şekilde tabi tutulması ile yapılmıştır.

2.2.2.7. İstatistik analizleri

Meyve sularında patulin seviyelerinin istatistiksel değerlendirmeleri için GraphPad Prism versiyon 3.02 programı (Amerika) kullanılmıştır.

2.2.2.8. HPLC-UV yöntemi ile meyve suyu örneklerinde patulin tayini

-20 °C'de muhafaza edilen elma suyu ve elma içeren karışık meyve sularından ekstrakte edilmiş ve temizlenmiş örneklerin kantitatif analizleri HPLC cihazı (Shimadzu, Japonya) ve buna bağlı pompa (Shimadzu, LC-10AT) ve dedektöründe (Shimadzu, Photodiode Array Detector, SPD-M10A) yapılmıştır. Analiz HPLC sistemine 20 µl hacminde ekstraktlar enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Meyve sularında patulin analizinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizdeki kromatografik koşullar Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Patulin analizinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizdeki kromatografik koşullar

HPLC	Shimadzu, Japonya
Kolon	Phenomenex, Synergi, 4 µ Hydro-RP 80 A, 250 x 4.60 mm C ₁₈
Pompa	Shimadzu LC-10AT
Dedektör	Shimadzu Photo DiodeArrayDetector (SPD-M10A)
Hareketli faz	İzokratik, su:ACN (95:5, h/h) bileşimi.
Akış hızı	0.9 ml/dak.
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Analizin yapıldığı dalga boyu	276 nm

2.2.3. Patulinin Laktik Asit Bakterileri ile Biyolojik Detoksifikasyonu

2.2.3.1. LAB suşlarının canlandırılması

Amerika'daki ARS kültür koleksiyonundan temin edilen *Lactobacillus kefir* (NRLL B-1839), *Lactobacillus hilgardii* (NRLL B-1843), *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560), *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides* (NRLL B-512) ve *Leuconostoc lactis* (NRLL B-3468) suşları ve turşulardan izole edilen 4.2.1, 7.8, 10.1, 10.2, 22.1, 22.2, 23.4 ve 24.3 nolu izolatlar, MRS broth (pH 6.2) (LAB M Limited, U.K., Fluka analytical Sigma-Aldrich, İsviçre) besiyerine inoküle edilmiş, 30-37 °C'de 24-48 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir (Fuchs ve ark. 2008).

2.2.3.2. LAB suşlarının detoksifikasyon analizine hazırlanması

Bu çalışma, Topçu ve ark. (2010) tarafından önerilen yönteme birkaç modifikasyon uygulanarak gerçekleştirilmiştir. MRS brotha geliştirilen 24-48 saatlik taze kültürler, canlı ve cansız hücrelerin etkilerinin araştırılması için iki eşit hacimde bölüştürülmüştür. Canlı hücreler, 8.000 rpm'de, 5 °C'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Cansız hücreler ise, 121 °C'de 15 dakika otoklav işleminden sonra aynı santrifüj koşullarında santrifüj edilmiştir. Yıkama için süpernatantlar

atılmış, her bir tüpe bir miktar distile su ilave edilerek peletler resüspanse edilmiş ve tekrar aynı koşullarda santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatantlar atılmış ve adsorpsiyon deneyi için 10^8 , 10^9 , 10^{10} ve 10^{11} cfu/ml bakteri içeren peletlerin üzerine, 1 mg/l patulin ihtiva eden 50 mM, pH 4 olan sodyum fosfat tamponundan (Sigma-Aldrich, Almanya) 2'şer ml aktarılmıştır. Hücre içermeyen mikotoksin solüsyonları kontrol olarak kullanılmıştır. Kısa bir vorteks işleminden sonra tüpler 150 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı etüvde, 37 °C'de, 1, 5, 24 ve 48 saat inkübe edilmiş, bu inkübasyon süreleri sonunda tüpler, 8.000 rpm'de, 5 °C'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. 500 µL süpernatantlar, steril endorf tüplere aktarılmış ve HPLC analizi yapılana kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.3. LAB suşlarının HPLC yöntemi ile detoksifikasyon analizi

4 °C'de muhafaza edilen örneklerden 20 µL süpernatantlar, HPLC sistemine enjekte edilmiş, 0.9 mL/dak akış hızında, hareketli faz olarak su:ACN (95:5, h/h) (Merck, LiChrosolv) bileşimi kullanılarak izokratik elüsyon yapılmıştır. 276 nm'de Photodiode array detektörü ile örneklerdeki patulin miktarları saptanmıştır. Denklem (2.1) kullanılarak patulinin azalış miktarı % olarak hesaplanmıştır.

Bakteriler tarafından ortamdan uzaklaştırılan patulinin % azalış miktarı, aşağıdaki ifade ile verilir.

$$\% \text{ azalış} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{örneğin patulin pik alanı}}{\text{kontrol örneğin pik alanı}} \right) \quad (2.1)$$

3. BULGULAR

3.1. Turşu Örneklerinden Laktik Asit Bakterileri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

3.1.1. Turşu Suyu Örneklerinin Toplanması

Eskişehir turşucularından ve evlerden temin edilen 24 adet turşu suyu örneği Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Turşu suyu örnekleri, alındıkları yerler ve tuzluluk yüzdeleri

Örnek No	Turşu Çeşidi	Tuzluluk Yüzdeleri	Alındığı Yer	LAB Üremesi
1.	Salatalık		Ev yapımı	+
2.	Biber	%5	Ev yapımı	+
3.	Karışık	-	Ev yapımı	+
4.	Salatalık	-	Ev yapımı	+
5.	Karışık	-	Ev yapımı	+
6.	Biber	-	Ev yapımı	-
7.	Salatalık	%4,8	Ev yapımı	+
8.	Erik	%3,6	Turşucu	+
9.	Sarımsak	%3,6	Turşucu	+
10.	Acur	%4,4	Turşucu	+
11.	Lahana	%4	Turşucu	+
12.	Domates	%3	Turşucu	+
13.	Patlıcan	%5,6	Turşucu	+
14.	Kırmızı pancar	%6,8	Turşucu	+
15.	Biber	-	Ev yapımı	-
16.	Karışık	%4,8	Ev yapımı	+
17.	Fasulye	%7	Ev yapımı	+
18.	Salatalık	%8	Ev yapımı	-
19.	Karışık	-	Ev yapımı	-
20.	Biber	-	Ev yapımı	-
21.	Karışık	%5,8	Ev yapımı	-
22.	Lahana	%3	Ev yapımı	+
23.	Karışık	%7	Ev yapımı	+
24.	Karışık	%5	Ev yapımı	+

Bunlardan bazılarında MRS agar petrilere yapılan ekim sonucunda LAB suşları izole edilirken bazılarında LAB üremesi görülmemiştir.

3.1.2. Turşu Sularının Tuzluluk Yüzdelерinin Ölçülmesi

Tuzluluk yüzdeleri, refraktometre haznesi üzerine birkaç damla turşu suyu damlatılarak ölçülmüştür. Turşu örneklerinin tuzluluk yüzdelерinin Çizelge 3.1’de görüldüğü gibi %3-8 arasında değıştiğı gözlenmiştir.

3.1.3. Laktik Asit Bakterileri İzolasyonu

Turşu sularından laktik asit bakterileri izole edildikten sonra her bir turşu suyu örneğini temsilen petrilерden alınan 4-5 adet koloni, steril MRS agar petrilere çizgi ekim yapılarak saflaştırılmıştır. Toplamda 73 adet saf izolat elde edilmiştir. Çizelge 3.2’de elde edilen laktik asit bakteri izolatları verilmiştir. Saflaştırılan LAB kültürleri, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %15’lik (h/h) gliserol içerisinde, -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

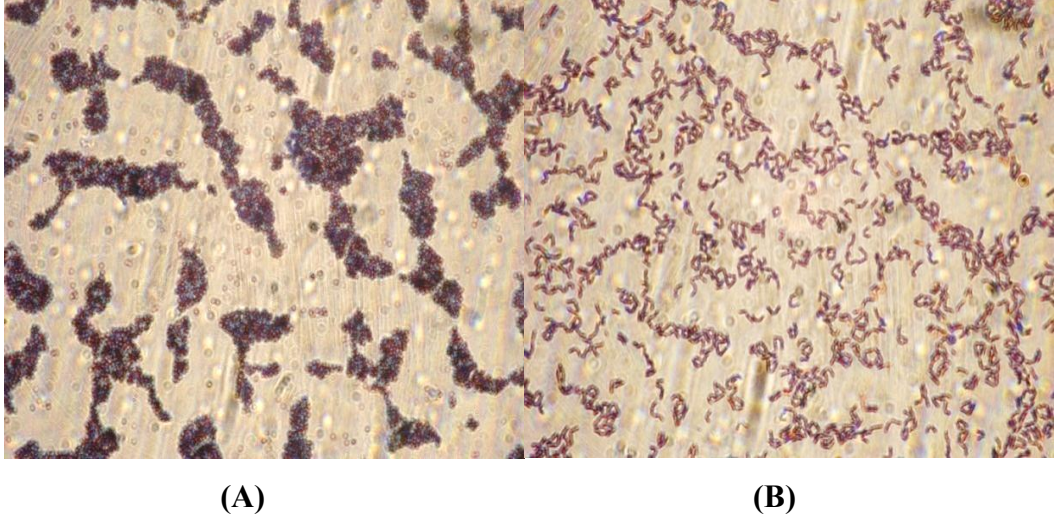
Çizelge 3.2. Turşu sularından saflaştırılan LAB izolatları

Örnek No	İzolat No	Örnek No	İzolat No	Örnek No	İzolat No	Örnek No	İzolat No
1.	1.5.1.1.2	20.	5.7.1	39.	10.2	58.	14.3
2.	1.7	21.	5.7.2	40.	10.3	59.	14.4
3.	1.8	22.	5.9	41.	10.4	60.	16.1
4.	2.2.4	23.	5.10	42.	10.5	61.	17.2
5.	2.8	24.	6.1	43.	11.1	62.	17.3
6.	3.1	25.	6.2	44.	11.2	63.	17.5
7.	3.2	26.	7.2	45.	11.3	64.	22.1
8.	3.3	27.	7.4	46.	12.1	65.	22.2
9.	4.1.1	28.	7.7	47.	12.2	66.	22.4
10.	4.2.1	29.	7.8	48.	12.3	67.	23.1
11.	4.2.2	30.	8.1	49.	12.4	68.	23.2
12.	4.2.2.1	31.	8.2	50.	12.5	69.	23.4
13.	4.7.1	32.	8.3	51.	13.1	70.	24.1
14.	5.1.1	33.	8.4	52.	13.2	71.	24.2
15.	5.1.2	34.	9.1	53.	13.3	72.	24.3
16.	5.3.1	35.	9.2	54.	13.4	73.	24.4
17.	5.3.2	36.	9.3	55.	13.5		
18.	5.5	37.	9.4	56.	14.1		
19.	5.6	38.	10.1	57.	14.2		

3.1.4. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonu

VİTEK testi

Gram boyama reaksiyonlarına göre izolatların tümü ışık mikroskopunda mor renkli, Gram-pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir. Boyama sonucunda hücreler basil, kokobasil ve kok şeklinde gözlenmiştir. Şekil 3.1’de, 14.1 ve 1.5.1.1.2 nolu izolatlara ait Gram boyama reaksiyonları gösterilmiştir. Çizelge 3.3’te ise VİTEK testi sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.1. LAB izolatlarının Gram boyama reaksiyonları (A) 14.1 nolu izolatın Gram boyama reaksiyonu (kok) (X100), (B) 1.5.1.1.2 nolu izolatın Gram boyama reaksiyonu (basil) (X100)

Çizelge 3.3. VİTEK testi sonuçları

İzolat No	Benzerlik İndeksi	Tanımlanan Tür
14.4	%96	<i>Streptococcus acidominimus</i> / <i>S. pneumoniae</i> / <i>Gemella morbillorum</i>
	%3	<i>Streptococcus constellatus</i> (viridans strep)
9.4	-	Yetersiz gelişme
11.3	-	Yetersiz gelişme
2.2.4	-	Tanımlanamamış organizma
17.3	%90	<i>Gemella morbillorum</i> / <i>S. agalactiae</i> (Group B) / <i>S. acidominimus</i>
	%6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5.10	-	Tanımlanamamış organizma
9.2	%76	<i>Gemella morbillorum</i> / <i>S. agalactiae</i> (Group B) / <i>S. acidominimus</i>
	%22	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13.4	%97	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
	%1	<i>Gemella morbillorum</i> / <i>S. agalactiae</i> (Group B) / <i>S. acidominimus</i>
14.1	%57	<i>Gemella morbillorum</i> / <i>S. agalactiae</i> (Group B) / <i>S. acidominimus</i>
	%25	<i>Streptococcus acidominimus</i> / <i>S. pneumoniae</i> / <i>G. morbillorum</i>
1.5.1.1.3	-	Tanımlanamamış organizma
2.8	% 96	<i>Enterococcus avium</i> / <i>E. faecium</i> (Group D)
11.2	%82	<i>Streptococcus constellatus</i> (viridans strep)
	%14	<i>Streptococcus acidominimus</i> / <i>S. pneumoniae</i> / <i>G. morbillorum</i>
1.5.1.1.2	-	Tanımlanamamış organizma
4.1.2	-	Tanımlanamamış organizma
12.4	%96	<i>Gemella morbillorum</i> / <i>S. agalactiae</i> (Group B) / <i>S. acidominimus</i>
	%3	<i>S. acidominimus</i> / <i>S. pneumoniae</i> / <i>G. morbillorum</i>
12.2	%76	<i>Gemella morbillorum</i> / <i>S. agalactiae</i> (Group B) / <i>S. acidominimus</i>
	%22	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
10.4	%83	<i>Streptococcus acidominimus</i> / <i>S. pneumoniae</i> / <i>G. morbillorum</i>
	%14	<i>Streptococcus constellatus</i> (viridans strep)
14.2	%97	<i>Streptococcus equinus</i> (Group D, nonenterococci)
	% <1	<i>Streptococcus salivarius</i> (viridans strep)
13.5	%70	<i>Streptococcus acidominimus</i> / <i>S. pneumoniae</i> / <i>G. morbillorum</i>
	%29	<i>Streptococcus constellatus</i> (viridans strep)
14.3	%76	<i>Gemella morbillorum</i> / <i>S. agalactiae</i> (Group B) / <i>S. acidominimus</i>
	%22	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Yağ Asiti Metil Esterleri Analizi (FAME)

Hazırlanan örnekler, ‘Yağ Asiti Analiz Sistemi’ne (Agilent, 6890N) verilerek elde edilen pikler ‘MIDI Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi’ tarafından analiz edilmiştir. Çizelge 3.4’te analiz sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Yağ asiti metil esterleri analizi sonuçları

İzolat No	Benzerlik İndeksi	Tanımlanan Tür
23.2	0.603	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.420	<i>Weisella confusa</i> GC subgroup B (<i>Lactobacillus confusus</i>)
22.2	0.659	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.602	<i>Lactobacillus fermentum</i> GC subgroup A
	0.461	<i>Weisella confusa</i> GC subgroup B (<i>Lactobacillus confusus</i>)
5.6	0.344	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
6.1	0.146	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>
13.3	0.460	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
	0.425	<i>Pediococcus dextrinicus</i>
	0.337	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
	0.291	<i>Lactobacillus gasseri</i>
7.8	0.267	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	0.256	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	0.243	<i>Enterococcus cecorum</i>
	0.223	<i>Streptococcus mitis</i>
22.4	0.092	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>
	0.062	<i>Lactobacillus plantarum</i>
24.1	0.190	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	0.171	<i>Lactobacillus fermentum</i> GC subgroup A
	0.164	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
22.1	0.570	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
8.3	-	Kütüphane eşleştirmesi yapılamamıştır.
24.3	0.455	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
	0.375	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.327	<i>Lactobacillus sakei</i> GC subgroup A
24.4	0.558	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
23.4	0.787	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
24.2	0.674	<i>Pediococcus damnosus</i>
	0.539	<i>Lactobacillus vacciniostrecus</i>
23.1	0.516	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
2.2.4	0.017	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>
12.2	0.114	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>
13.5	0.208	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
	0.147	<i>Corynebacterium matruchotii</i>
14.2	0.029	<i>Pediococcus damnosus</i>
17.3	0.160	<i>Pediococcus parvulus</i>
12.4	0.064	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
	0.049	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
11.2	0.139	<i>Mycobacterium agri</i>
	0.128	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
	0.122	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
	0.092	<i>Mycobacterium chelonae</i>
	0.088	<i>Rhodococcus erythropolis/R.globerulus/N.globerula</i>
	0.086	<i>Mycobacterium chubuense</i>

Çizelge 3.4. (Devam) Yağ asiti metil esterleri analizi sonuçları

9.4	0.099	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
	0.092	<i>Corynebacterium diphtheriae intermedius</i>
	0.086	<i>Mycobacterium agri</i>
4.2.2	0.106	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>
1.5.1.1.2	0.278	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
14.4	0.245	<i>Pediococcus damnosus</i>
	0.174	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
10.4	0.160	<i>Corynebacterium diphtheriae intermedius</i>
	0.115	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
14.3	0.183	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
5.3.2	0.659	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.414	<i>Weisella confusa</i> GC subgroup B (<i>Lactobacillus confusus</i>)
9.2	0.039	<i>Pediococcus damnosus</i>
13.4	0.257	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
	0.220	<i>Corynebacterium diphtheriae intermedius</i>
14.1	0.089	<i>Pediococcus damnosus</i>
	0.057	<i>Lactobacillus brevis</i>
4.2.2.1	0.137	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>
	0.125	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
3.2	0.629	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.393	<i>Weisella confusa</i> GC subgroup B (<i>Lactobacillus confusus</i>)
5.10	0.131	<i>Lactobacillus casei</i> GC subgroup A
11.3	0.238	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
9.3	0.264	<i>Pediococcus damnosus</i>
	0.166	<i>Lactobacillus sakei</i> GC subgroup A
10.5	0.108	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
6.2	0.253	<i>Weisella confusa</i> GC subgroup B (<i>Lactobacillus confusus</i>)
	0.225	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.209	<i>Lactobacillus fermentum</i> GC subgroup A
17.5	0.298	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
16.1	0.147	<i>Rhodococcus coprophilus</i>
7.4	0.372	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
2.8	-	Eşleşme yapılamamıştır.
17.2	0.231	<i>Pediococcus parvulus</i>
	0.208	<i>Lactobacillus brevis</i>
	0.164	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>
7.2	0.353	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
8.2	-	Kütüphane eşleştirmesi yapılamamıştır
5.3.1	0.019	<i>Streptococcus mitis</i>
	0.013	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	0.012	<i>Streptococcus uberis</i>
5.1.2	-	Eşleştirme yapılamamıştır.
4.7.1	0.397	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
5.7.2	0.074	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.054	<i>Lactobacillus bifementans</i>

Çizelge 3.4. (Devam) Yağ asiti metil esterleri analizi sonuçları

10.2	0.376	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	0.269	<i>Pediococcus damnosus</i>
	0.240	<i>Lactobacillus casei</i> GC subgroup A
	0.233	<i>Lactobacillus fermentum</i> GC subgroup A
	0.230	<i>Lactobacillus oris</i> GC subgroup A
11.1	0.082	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
4.2.1	0.430	<i>Lactobacillus buchneri</i>
5.7.1	0.151	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
12.1	0.285	<i>Pediococcus parvulus</i>
	0.247	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	0.195	<i>Lactobacillus sakei</i> GC subgroup A
8.4	0.089	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.088	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>
13.1	0.032	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.027	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5.1.1	0.051	<i>Lactobacillus plantarum</i>
10.3	0.235	<i>Pediococcus parvulus</i>
	0.189	<i>Pediococcus damnosus</i>
	0.154	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
	0.144	<i>Lactobacillus salivarius salivarius</i>
13.2	0.225	<i>Pediococcus parvulus</i>
5.5	0.188	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
9.1	0.137	<i>Lactobacillus buchneri</i>
	0.093	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
	0.088	<i>Mycobacterium agri</i>
10.1	0.577	<i>Lactobacillus buchneri</i>
3.3	0.125	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
	0.081	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>
12.5	-	Eşleştirme yapılamamıştır

Ribotiplendirme

Ribotiplendirme ile tanımlanan laktik asit bakterileri Çizelge 3.5’te verilmiştir.

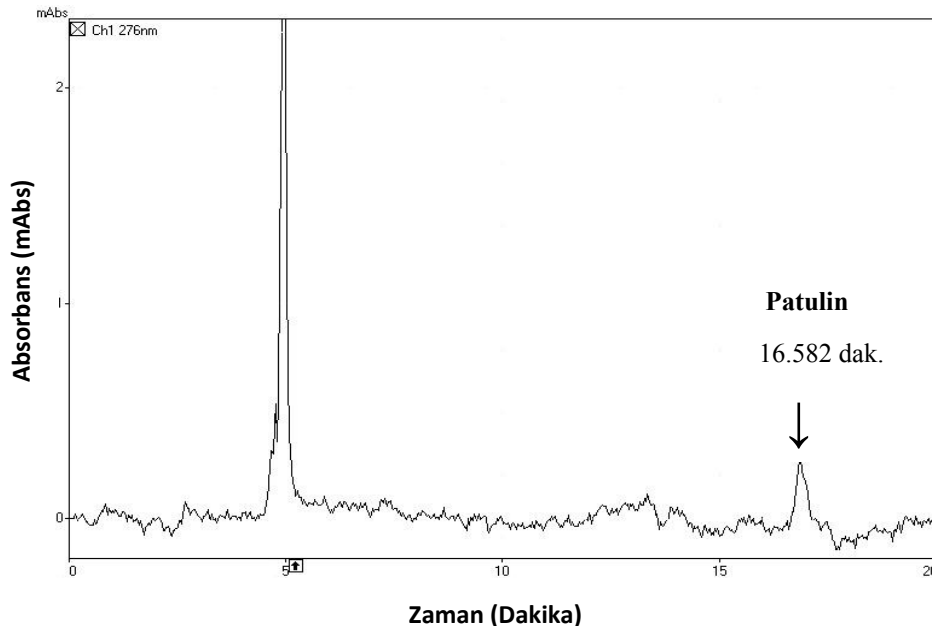
Çizelge 3.5. Laktik asit bakterilerinin Ribotiplendirme ile identifikasyon sonuçları ve elde edilen profil bantları

	Örnek No	İzolatlar	Tanımlanan Tür	DuPont Benzerlik	Ribo No	RiboPrint™ Profilleri
						1 kbp 5 10 15 50
1	425-173-S-1	4.2.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.97	ECORI 425-59-S-4	
2	425-173-S-2	7.8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.97	ECORI 425-12-S-5	
3	425-173-S-3	10.1	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	0.66	ECORI 425-173-S-3	
4	425-173-S-4	10.2	<i>Allycyclobacillus acidocaldarius</i>	0.81	ECORI 425-173-S-4	
5	425-173-S-5	22.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.97	ECORI 425-59-S-4	
6	425-173-S-6	22.2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.92	ECORI 425-173-S-6	
7	425-173-S-7	23.4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.81	ECORI 425-173-S-7	
8	425-173-S-8	24.3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.65	ECORI 425-173-S-8	

3.2. Elma Suyu ve Elma İçeren Karışık Meyve Sularında HPLC Yöntemi ile Patulin Tayini

3.2.1. Patulin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Şekil 3.2’de 50 ng/ml derişiminde hazırlanan patulin standart çözeltisinin oluşturduğu kromatogram görülmektedir. Belirtilen kromatografik koşullarda patulin, 16-17 dakikalar arasında pik vermektedir.

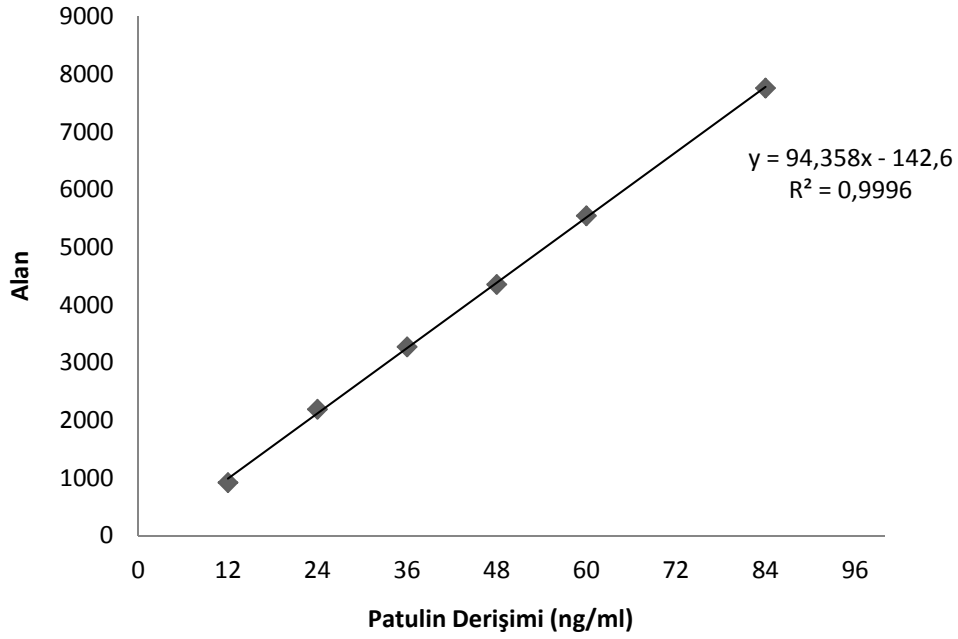


Şekil 3.2. Patulin standart çözeltisine (50 ng/ml) ait kromatogram

3.2.2. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Doğrusallık

12, 24, 36, 48, 60 ve 84 ng/ml derişim değerlerinde hazırlanan patulin standart çözeltileri Çizelge 2.2’de verilen HPLC koşullarında çalışılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır ($R^2=0,9996$). Belirtilen koşullarda elde edilen bir kalibrasyon eğrisi Şekil 3.3’te verilmiştir. Verilen kalibrasyon noktaları ile günlük kontroller yapılmıştır. Çizelge 3.6’da 12, 24, 36, 48, 60 ve 84 ng/ml derişim değerlerinde hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin doğrusallık verileri verilmiştir.



Şekil 3.3. 12, 24, 36, 48, 60 ve 84 ng/ml derişim değerlerinde hazırlanan patulin standart çözeltileri ile yapılan çalışmada elde edilen sonuç

Çizelge 3.6. 12, 24, 36, 48, 60 ve 84 ng/ml derişim değerlerinde hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin doğrusallık verileri

Patulin Derişimi (ng/ml)	Patulin Derişimi (M)	Pik Alanı	Pik Yüksekliği
12	7.78×10^{-8}	923	101
24	1.55×10^{-7}	2193	132
36	2.33×10^{-7}	3274	195
48	3.11×10^{-7}	4356	269
60	3.89×10^{-7}	5548	338
84	5.45×10^{-7}	7761	454
Eğim	94,35833333		
Kesim	-142,6		
R ²	0,9996		

Farklı günlerde elde edilen kalibrasyon grafikleri ile ilgili değerlendirme sonuçları Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Patulinin GraphPad Prism versiyon 3.02 programı (Amerika) kullanılarak yapılan istatistik analizleriyle elde edilen kalibrasyon sonuçları

Değişkenler	1.gün	2.gün	3.gün
Eğim	1607000000 ± 1227000000	1581000000 ± 1940000000	1563000000 ± 441800000
Y-kesim	-210.5 ± 457.7	9.867 ± 724.0	205.5 ± 164.9
X-kesim	0,00000001310	0,000000000624	0,00000001314
%95 Güven Aralığı			
Eğim	484900000 - 3165000000	-8836000000 - 4047000000	1002000000 - 2125000000
Y-kesim	-6026 - 5605	-9189 - 9209	-1889 - 2300
r ²	0,9942	0,9852	0,9992

Doğruluk ve kesinlik

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluk derişim başına kör hariç en az beş tayin ile belirlenir. Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir (Ertaş ve Kayalı 2005). Yapılan yedi tayin sonucunda elde edilen veriler Çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. 50 ng/ml seviyesinde patulin içeren standart çözelti ile elde edilen sonuçlar

Patulin Seviyesi (ng/ml)	Alıkonma Zamanı	Pik Yüksekliği	Pik Alanı
50	16.855	298	4733
50	16.973	305	5225
50	16.878	330	5317
50	16.686	305	5378
50	16.381	340	5089
50	16.582	288	4783
50	16.688	342	5067
Ortalama Alan		5084.571	
Standart Sapma (SD) ^a		249.9066	
Bağıl Standart Sapma (%RSD) ^b		4.914997	

$$a. \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$b. \quad \% RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

S: Standart sapma,

Σ: Toplam,

x: Deneydeki tek bir ölçüm değeri,

$\bar{x}$: Deneydeki tüm ölçümlerin aritmetik ortalaması,

n: Deney sayısı

3.2.3. Patulin Ekstraktlarında Geri Kazanım Deneyleri

Geri kazanım deneyleri sonucunda elde edilen % patulin değerleri ve istatistiksel veriler Çizelge 3.9’da gösterilmiştir. 50 ng/ml derişiminde patulin eklenerek Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007)’nin yöntemlerine göre ekstrakte edilmiş elma suyu örneğine ve kontrol grubuna ait kromatogramlar Şekil 3.4-3.5’te verilmiştir. Ortalama geri kazanım oranı %97,5 bulunmuştur.

Çizelge 3.9. 50 ng/ml derişiminde patulin eklenmiş elma sularının Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007)’nin yöntemlerine göre ekstraksiyonları sonucu elde edilen geri kazanım yüzdeleri

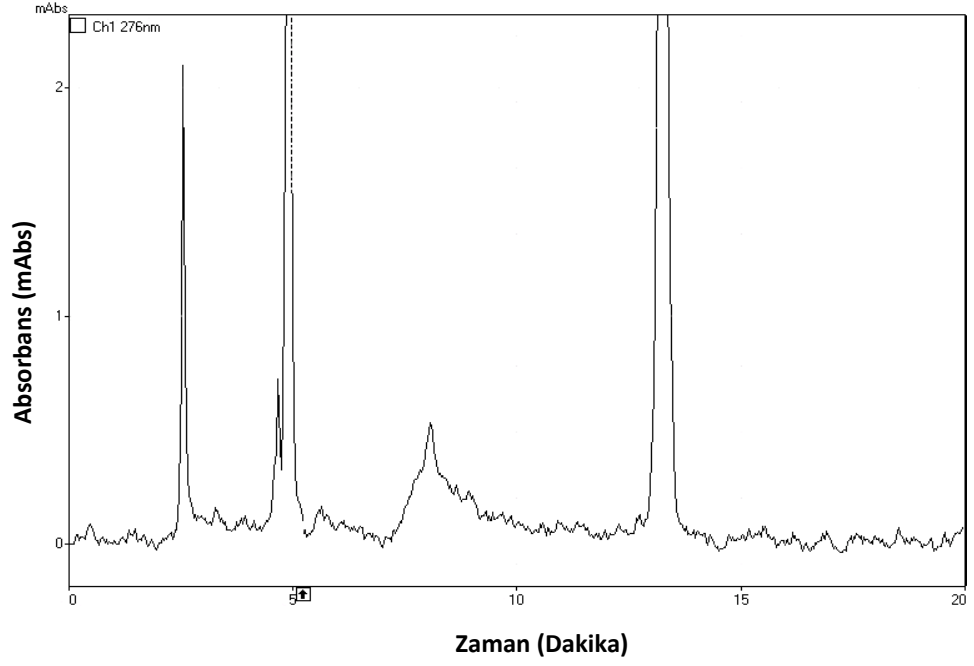
Eklenen Patulin (ng/ml)	Alıkonma Zamanı	Pik Alanı	Bulunan Patulin (M)	Bulunan Patulin (ng/ml)	Patulinin geri kazanım yüzdeleri (%) ^a
50	16.860	1875	1.07x10 ⁻⁷	41.11	82.22
50	16.843	2386	1.39x10 ⁻⁷	53.71	107.42
50	16.790	1856	1.06x10 ⁻⁷	40.65	81.30
50	16.824	2614	1.54x10 ⁻⁷	59.34	118.68
50	16.572	2138	1.37x10 ⁻⁷	52.81	105.62
50	17.460	1175	1.16x10 ⁻⁷	44.98	89.877
Standart Sapma (SS)		Bağıl Standart Sapma (RSD%)		Standart Hata (S _x) ^b	Ortalama (%)
15,2772		15,6658		6,2369	97,5195

$$\text{a. \% Geri Kazanım} = \frac{a}{b} \times 100$$

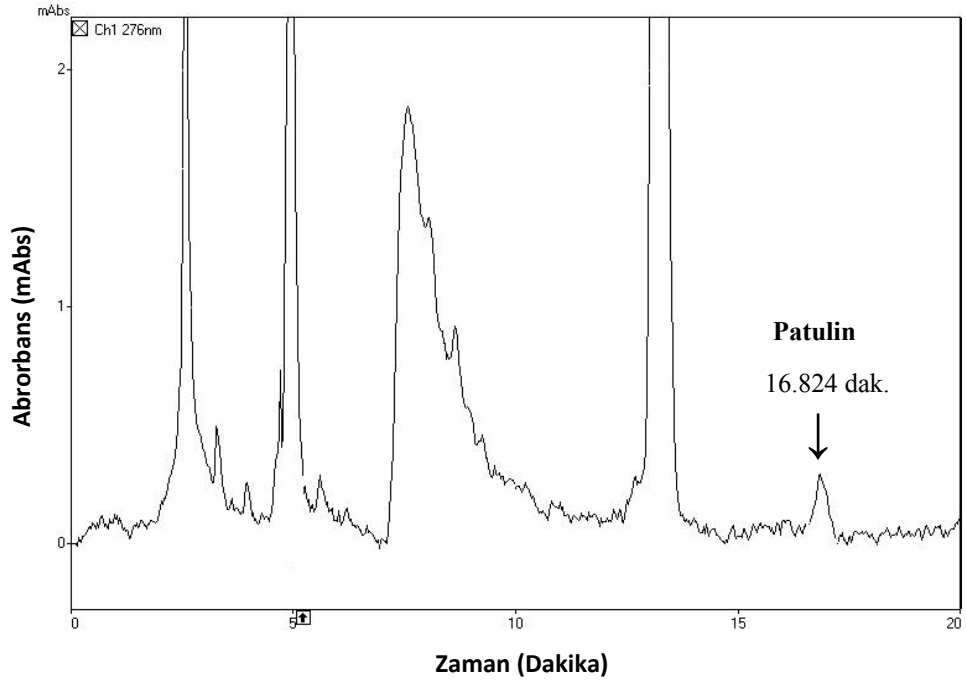
a: Cihazda okunan patulin konsantrasyonu değeri

b: Örneğe ilave edilen patulin konsantrasyonu

$$\text{b. } S_x = \frac{S}{\sqrt{n}}$$



Şekil 3.4. Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007)'nin yöntemlerine göre kontrol için ekstrakte edilmiş elma suyu örneğine ait kromatogram



Şekil 3.5. Valle-Algarra ve ark. (2009) ile Spadaro ve ark. (2007)'nin yöntemlerine göre 50 ng/ml eklenmiş elma suyu örneğinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen kromatogram

3.2.4. HPLC-UV Yöntemi ile Meyve Suyu Örneklerinde Patulin Tayini

32 tane sade elma suyu ve elma içeren karışık meyve sularındaki patulin kontaminasyonu Çizelge 3.10’da verilmiştir. Patulin içeren örneklerin patulin içeriklerine göre dağılımı Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. HPLC-UV yöntemi ile incelenen elma suları ve elma içeren karışık meyve sularındaki patulin kontaminasyonu

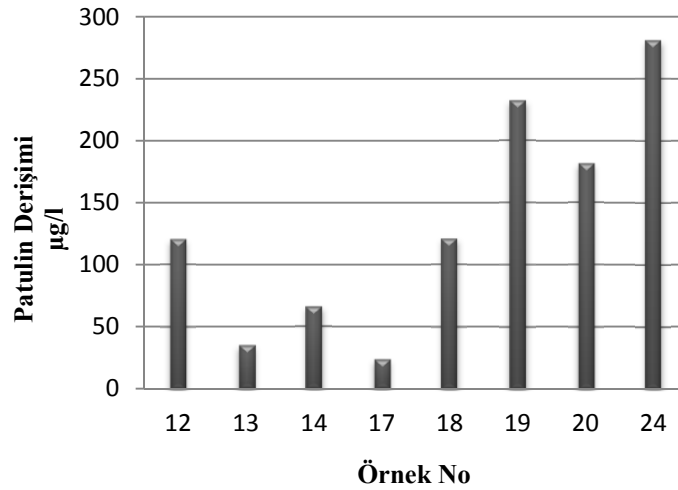
Örnek No	Meyve Suyu Çeşitleri	Patulin Miktarı (ng/ml)
1	Elma suyu	-
2	Elma suyu	-
3	Elma suyu	-
4	Elma suyu	-
5	Çocuklar için üretilmiş organik elma suyu	-
6	Çocuklar için elma suyu	-
7	Elma suyu	-
8	Elma suyu	-
9	Çocuklar için üretilmiş organik elma suyu	-
10	Elma suyu	-
11	Elma suyu	-
12	Elma suyu	*120.69
13	Organik elma suyu	35.53
14	Organik incir-elma suyu	*66.20
15	Elma suyu	-
16	Elma suyu	-
17	Elma suyu	24.16
18	Çocuklar için üretilmiş karışık meyve suyu	*121.12
19	Şeftali-elma suyu	*232.46
20	Kayısı-elma suyu	*181.70
21	Çocuklar için üretilmiş organik kayısı-elma suyu	**T.E.

- : Patulin içermediği saptanan örnekler, *: Türk Gıda Kodeksi tarafından izin verilen maksimum miktar olan 50 µg/l’nin üzerinde patulin bulunan örnekler ****T.E.** : Matriks girişimi nedeniyle patulin tayini yapılamayan örnekler.

Çizelge 3.10. (Devam) HPLC-UV yöntemi ile incelenen elma suları ve elma içeren karışık meyve sularındaki patulin kontaminasyonu

22	Elma suyu	-
23	Karışık meyve suyu	-
24	Karışık meyve suyu	*281.49
25	Karışık meyve suyu	-
26	Üzüm-elma suyu	-
27	Vişne-elma suyu	**T.E.
28	Elma suyu	-
29	Sarı meyvelerden oluşan karışık meyve suyu	-
30	Elma-nar suyu	-
31	Vişne-elma suyu	-
32	Kırmızı meyvelerden oluşan karışık meyve suyu	-

- : Patulin içermediği saptanan örnekler, *: Türk Gıda Kodeksi tarafından izin verilen maksimum miktar olan 50 µg/l'nin üzerinde patulin bulunan örnekler ****T.E.** : Matriks girişimi nedeniyle patulin tayini yapılamayan örnekler.



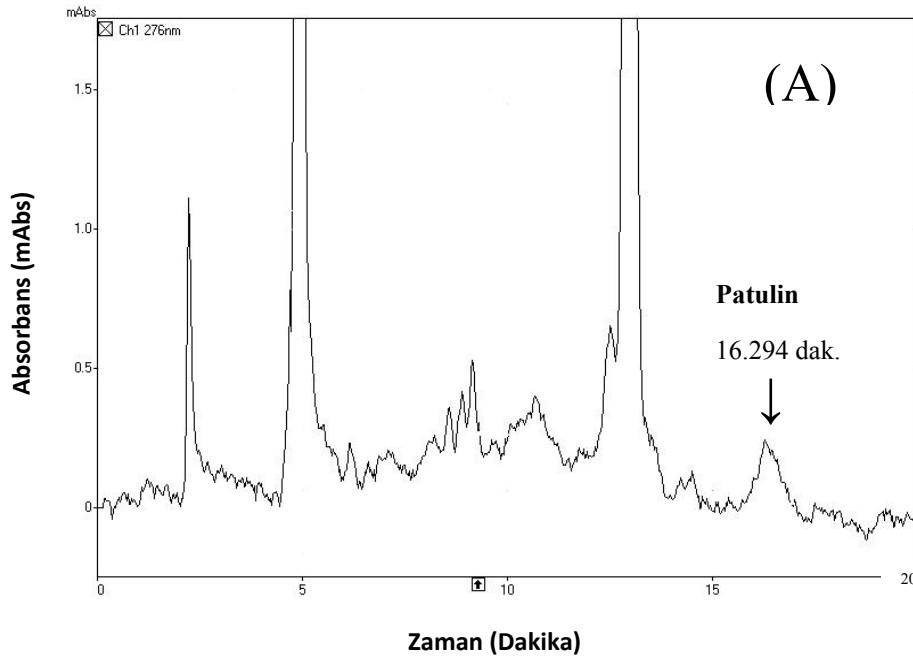
Şekil 3.6. Patulin içeren örneklerin patulin içeriklerine göre dağılımı

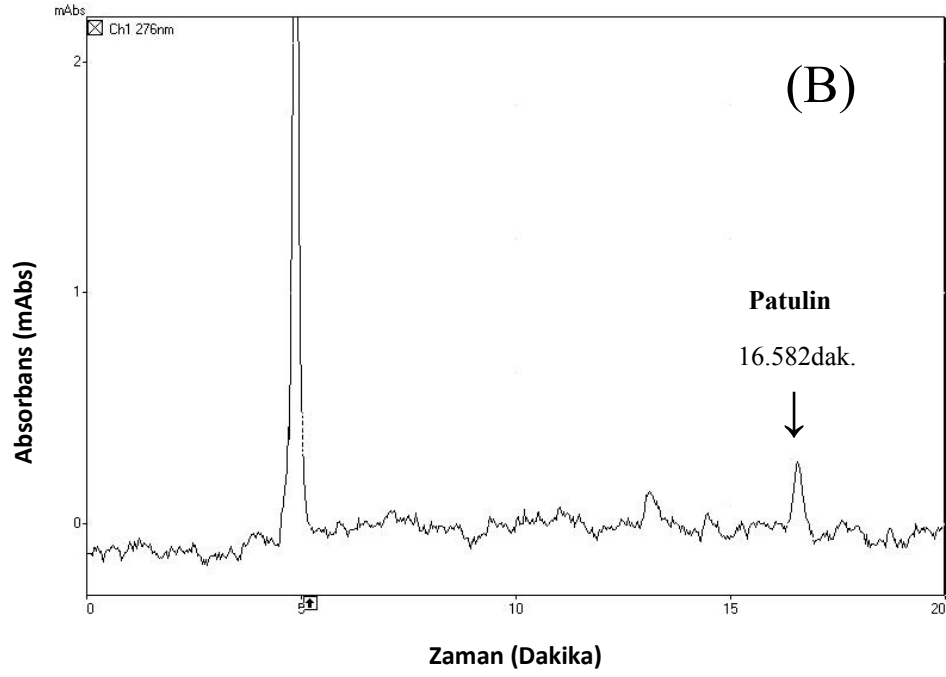
Meyve suyu örneklerindeki patulin miktarlarının Türk Gıda Kodeksi tarafından izin verilen maksimum 50 µg/l olan patulin seviyesine göre % dağılımı Çizelge 3.11'de verilmiştir

Çizelge 3.11. Analiz edilen meyve suyu örneklerindeki patulin miktarlarının Türk Gıda Kodeksi tarafından izin verilen maksimum 50 µg/l olan patulin seviyesine göre % dağılımı (n=32)

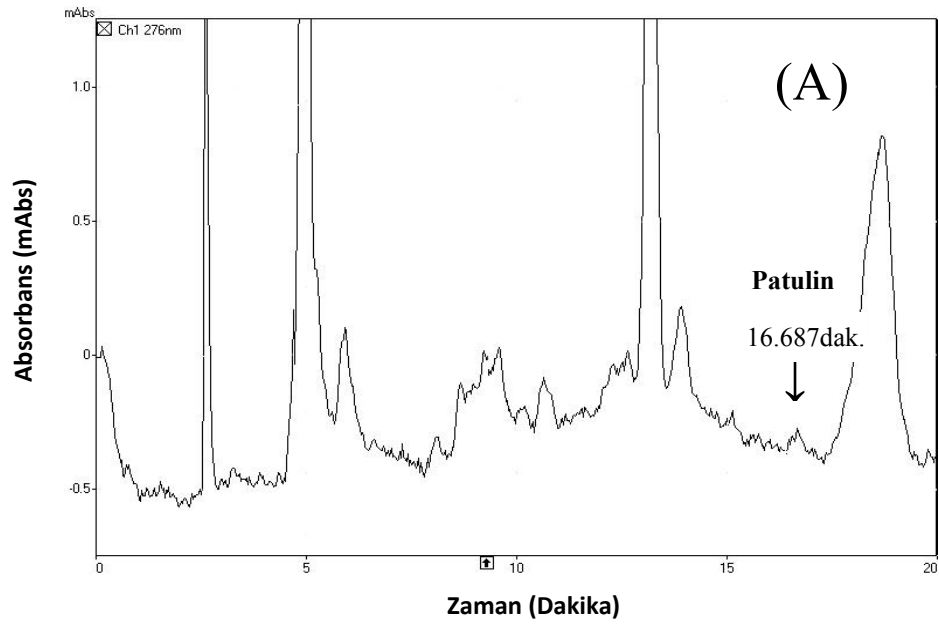
Patulin Seviyesi (µg/l)	Örnek Sayısı	(%)
≤ 50	2	(% 6,25)
>50	6	(%18,75)
-	22	(%68,75)

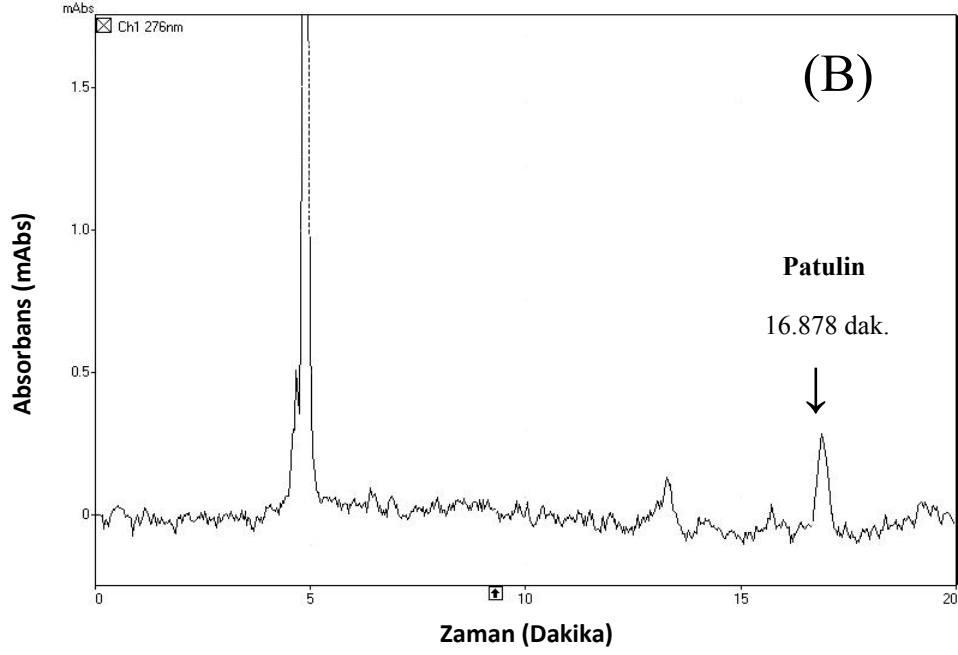
HPLC analizi sonucunda 20 nolu kayısı-elma suyu ve 13 nolu organik elma suyu örneklerinin patulinle kontamine olduğunu gösteren kromatogramlar, kontrol için 50 ng/ml derişimindeki patulin standartlarının kromatogramları ile birlikte Şekil 3.7-3.8’de verilmiştir. 20 nolu kayısı-elma suyu örneğinde patulin 16.294 dakikada, kontroldeki patulin 16.582 dakikada, 13 nolu organik elma suyu örneğinde patulin 16.687 dakikada, kontroldeki patulin ise 16.878 dakikada pik vermiştir.





Şekil 3.7. (A) 20 nolu kayısı-elma suyu örneğinin patulin ile kontamine olduğunu gösteren kromatogram (patulin 16.294 dakikada pik vermiştir) (B) Kontrol için 50 ng/ml derişimindeki patulin standardının 16.582 dakikada pik verdiğini gösteren kromatogram





Şekil 3.8. (A) 13 nolu organik elma suyu örneğinin patulin ile kontamine olduğunu gösteren kromatogram, patulin 16.687 dakikada pik vermiştir **(B)** Kontrol için 50 ng/ml derişimindeki patulin standardının 16.878 dakikada pik verdiğini gösteren kromatogram

3.3. Patulinin Laktik Asit Bakterileri ile Biyolojik Detoksifikasyonu

3.3.1. LAB Suşlarının HPLC Yöntemi ile Detoksifikasyon Analizi

Canlı ve cansız, farklı sayıda LAB hücresi içeren 13 örnek, patulin içeren tampon içerisinde 48 saat boyunca, 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde inkübe edilmiş ve patulinin azalış miktarları 1., 5., 24. ve 48. saatlerde alınan örnekler sonucunda % olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.12. ARS kültür koleksiyonundan temin edilen ve turşulardan izole edilen, canlı ve cansız LAB suşlarının, patulin içeren ve pH'sı 4 olan tampon ile inkübasyonu sonucu 1., 5., 24. ve 48. saatte ortamdan uzaklaştırdığı patulinin % azalış miktarları

Mikroorganizma Türü	Hücre Sayısı (cfu/ml)	İnkübasyon Süresi (Saat)	Patulinin Azalışı (%)	
			Canlı Hücre	Cansız Hücre
<i>Lactobacillus kefir</i> (NRLL B-1839)	5,3 x 10 ¹¹	1	19.30	12.02
		5	46.12	15.48
		24	70.84	31.77
		48	86.48	50.46
<i>Lactobacillus paracasei subs. paracasei</i> (NRLL B-4560)	4,25 x 10 ¹⁰	1	51.90	38.07
		5	64.59	37.60
		24	85.10	68.15
		48	89.52	92.57
<i>Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides</i> (NRLL B-512)	2,5 x 10 ⁹	1	2.84	0.49
		5	3.14	4.00
		24	9.38	6.39
		48	11.02	13.76
<i>Lactobacillus hilgardii</i> (NRLL B-1843)	5,19 x 10 ⁹	1	5.17	3.58
		5	21.08	8.07
		24	30.55	5.99
		48	27.38	4.59
<i>Leuconostoc lactis</i> (NRLL B-3468)	2,5 x 10 ¹¹	1	87.69	25.39
		5	88.53	16,34
		24	98.73	30.17
		48	98.05	31.08
<i>Lactobacillus plantarum</i> (4.2.1)	6,11 x 10 ¹¹	1	87.44	14.83
		5	98.14	19.45
		24	95.35	12.90
		48	93.82	36.92

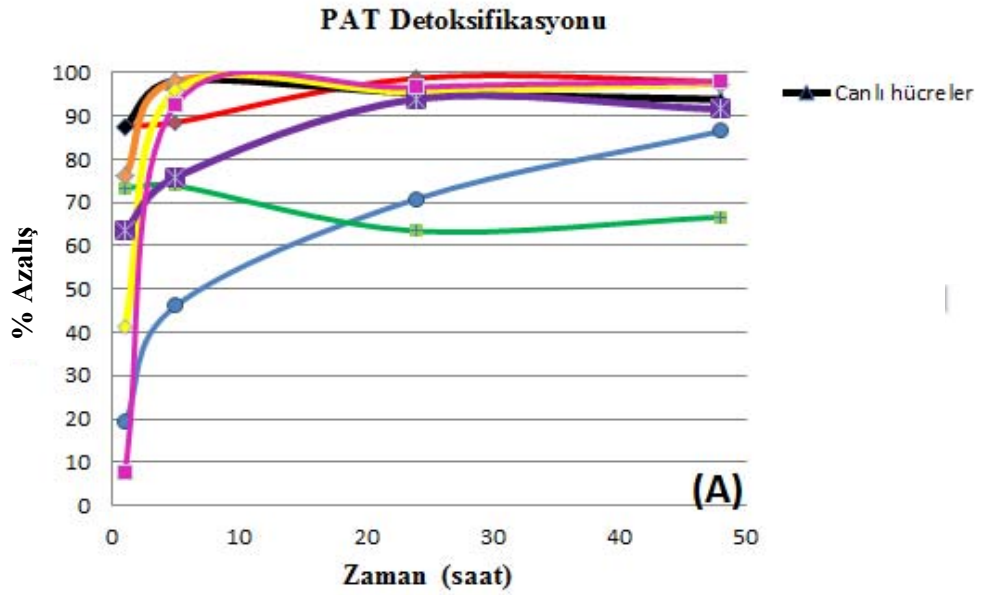
Çizelge 3.12. (Devam) ARS kültür koleksiyonundan temin edilen ve turşulardan izole edilen, canlı ve cansız LAB suşlarının, patulin içeren ve pH'sı 4 olan tampon ile inkübasyonu sonucu 1., 5., 24. ve 48. saatte ortamdan uzaklaştırdığı patulinin % azalış miktarları

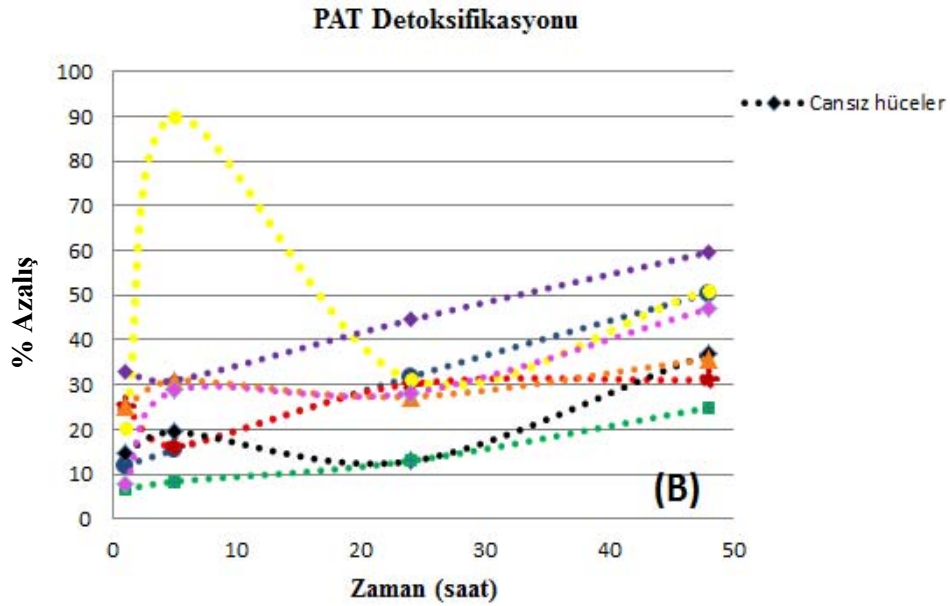
<i>Lactobacillus plantarum</i> (7.8)	1,38 x 10 ¹¹	1	73.27	6.61
		5	73.89	8.35
		24	63.40	12.97
		48	66.63	24.84
<i>Lactobacillus coryniformis ss.</i> (10.1)	3,04 x 10 ¹⁰	1	17.54	1.74
		5	25.80	5.46
		24	8.95	5.01
		48	34.25	16.11
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (10.2)	3,75 x 10 ⁸	1	6.63	4.69
		5	9.07	3.25
		24	19.00	8.94
		48	64.18	57.44
<i>Lactobacillus plantarum</i> (22.1)	2 x 10 ¹¹	1	76.09	25.05
		5	98.20	30.96
		24	96.40	27.32
		48	97.28	35.75
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (22.2)	3,3 x 10 ¹¹	1	41.39	20.22
		5	95.77	89.81
		24	95.58	31.15
		48	97.77	51.13

Çizelge 3.12. (Devam) ARS kültür koleksiyonundan temin edilen ve turşulardan izole edilen, canlı ve cansız LAB suşlarının, patulin içeren ve pH'sı 4 olan tampon ile inkübasyonu sonucu 1., 5., 24. ve 48. saatte ortamdan uzaklaştırdığı patulinin % azalış miktarları

<i>Lactobacillus plantarum</i> (23.4)	$1,5 \times 10^{11}$	1	68.38	32.76
		5	75.86	30.99
		24	93.89	44.52
		48	91.51	59.62
<i>Lactobacillus plantarum</i> (24.3)	$5,3 \times 10^{11}$	1	7.82	7.64
		5	92.65	28.69
		24	96.60	28.15
		48	97.91	46.97

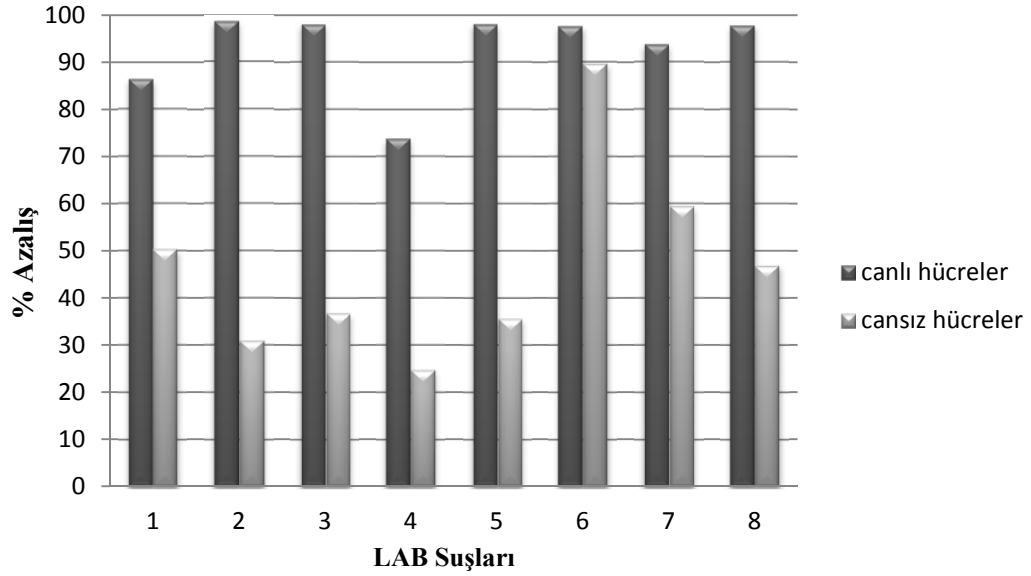
Analiz edilen 10^{11} cfu/ml derişimindeki canlı ve cansız tüm LAB suşları tarafından patulinin 1., 5., 24. ve 48. saatler sonunda azalan miktarları Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



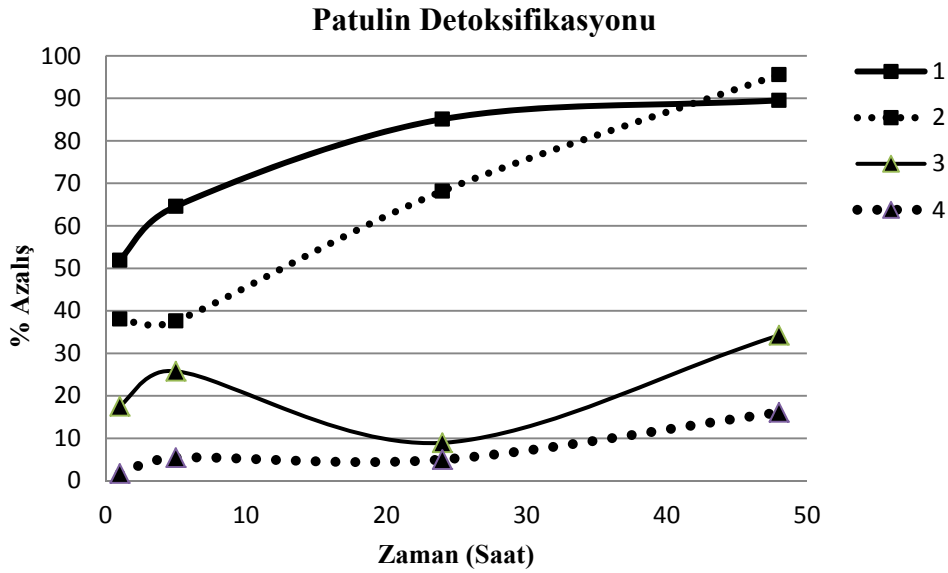


Şekil 3.9. Analiz edilen 10^{11} cfu/ml derişimindeki (A) Canlı (B) Cansız LAB suşları tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda azalış miktarları **Sarı:** *Leu. mesenteroides* (22.2), **Turuncu:** *Lb. plantarum* (22.1), **Kırmızı:** *Leu. lactis* (NRLL B-3468), **Pembe:** *Lb. plantarum* (24.3), **Mor:** *Lb. plantarum* (23.4), **Mavi:** *Lb. kefir* (NRLL B-1839), **Yeşil:** *Lb. plantarum* (7.8), **Siyah:** *Lb. plantarum* (4.2.1)

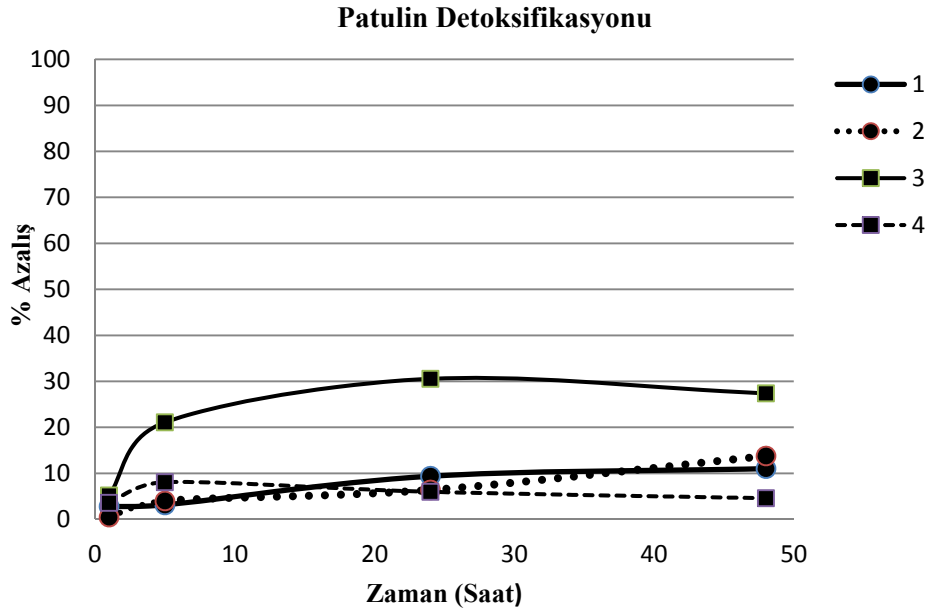
10^{11} cfu/ml derişimindeki canlı ve cansız 8 LAB suşu tarafından patulinin maksimum azalış miktarları karşılaştırmalı olarak Şekil 3.10'da verilmiştir. 10^{10} cfu/ml derişimindeki *Lb. paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560) ve *Lb. coryniformis* (10.1) suşlarının canlı ve cansız hücreleri tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda azalış miktarları Şekil 3.11'de, 10^9 cfu/ml derişimindeki *Leu. mesenteroides subs. mesenteroides* (NRLL B-512) ve *Lb. hilgardii* (NRLL B-1843) suşlarının canlı ve cansız hücreleri tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda azalış miktarları ise Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



Şekil 3.10. 10^{11} cfu/ml derişimindeki canlı ve cansız LAB suşları tarafından patulinin maksimum azalış miktarlarının karşılaştırması **1.** *Lb. kefir* (NRLL B-1839), **2.** *Leu. lactis* (NRLL B-3468), **3.** *Lb. plantarum* (4.2.1), **4.** *Lb. plantarum* (7.8), **5.** *Lb. plantarum* (22.1), **6.** *Leu. mesenteroides* (22.2), **7.** *Lb. plantarum* (23.4), **8.** *Lb. plantarum* (24.3)

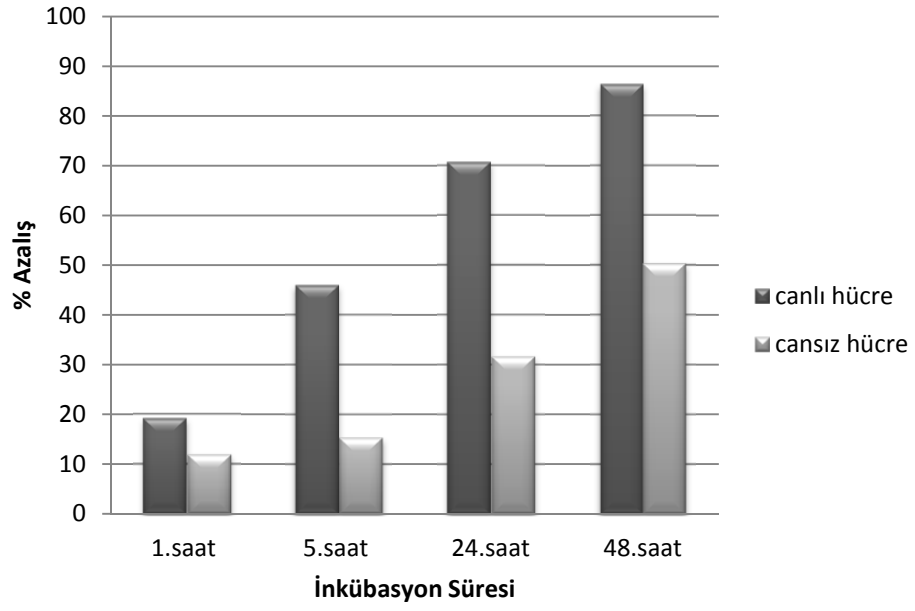


Şekil 3.11. 10^{10} cfu/ml derişimindeki LAB suşları tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda azalış miktarları **1.** Canlı *Lb. paracasei* subs. *paracasei* (NRLL B-4560) hücreleri **2.** Cansız *Lb. paracasei* subs. *paracasei* (NRLL B-4560) hücreleri **3.** Canlı *Lb. coryniformis* (10.1) hücreleri **4.** Cansız *Lb. coryniformis* (10.1) hücreleri

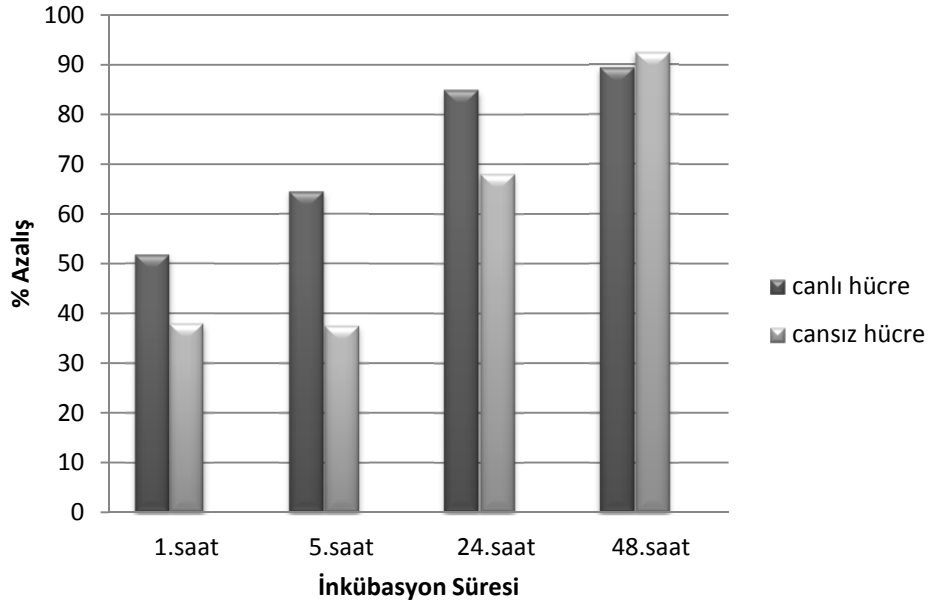


Şekil 3.12. 10^9 cfu/ml derişimindeki LAB suşları tarafından patulinin 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda azalış miktarları **1.** Canlı *Leu. mesenteroides* subs. *mesenteroides* (NRLL B-512) hücreleri **2.** Cansız *Leu. mesenteroides* subs. *mesenteroides* (NRLL B-512) hücreleri **3.** Canlı *Lb. hilgardii* (NRLL B-1843) hücreleri **4.** Cansız *Lb. hilgardii* (NRLL B-1843) hücreleri

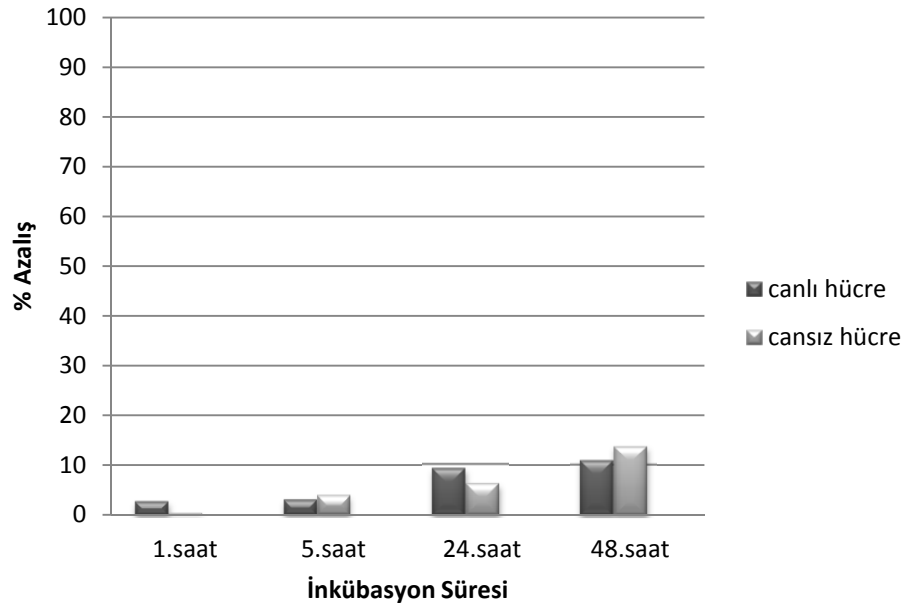
Patulin detoksifikasyon çalışmasında kullanılan tüm canlı ve cansız LAB suşları tarafından patulinin zamana bağlı azalış miktarları Şekil 3.13-3.25’de verilmiştir. *Lb. kefir* (NRLL B-1839) suşunun canlı hücreleri ve *Lb. paracasei* subs. *paracasei* suşunun cansız hücreleri tarafından patulinin zamana bağlı olarak uzaklaştırıldığını gösteren kromatogramlar Ek’te verilmiştir.



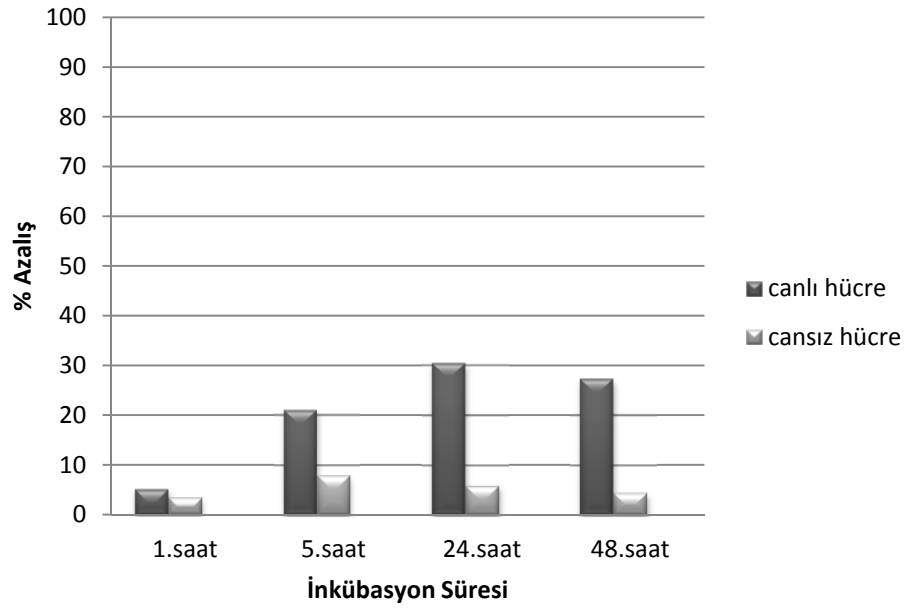
Şekil 3.13. Canlı ve cansız *Lactobacillus kefir* (NRLL B-1839) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



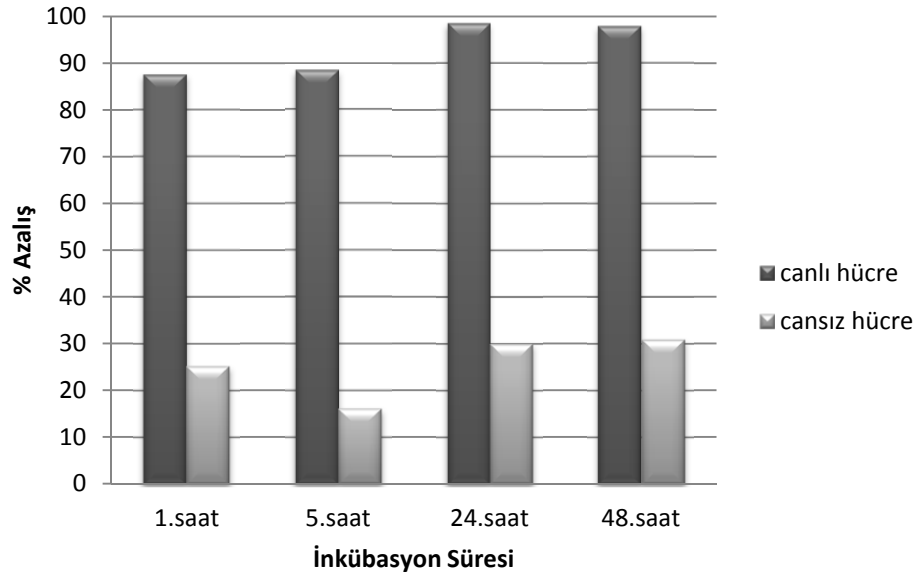
Şekil 3.14. Canlı ve cansız *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



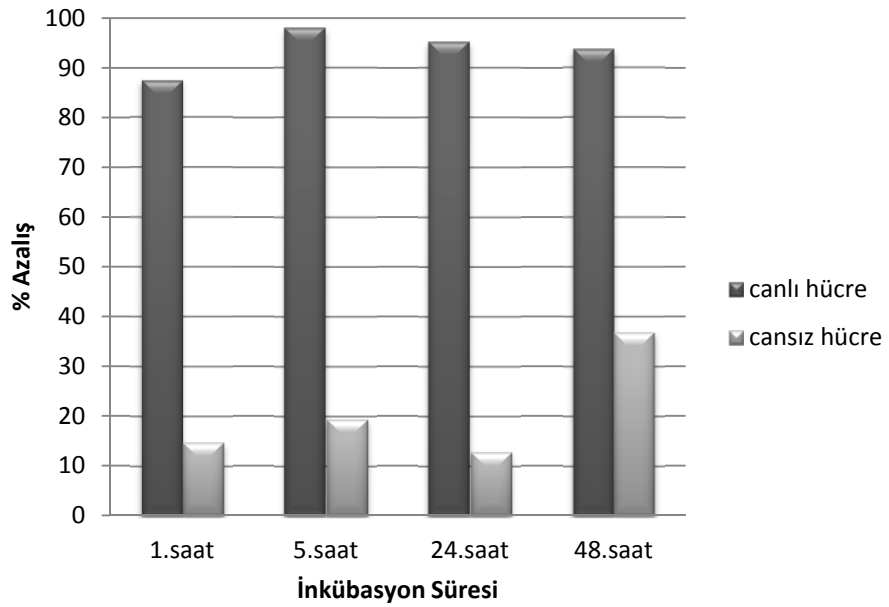
Şekil 3.15. Canlı ve cansız *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides* (NRLL B-512) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



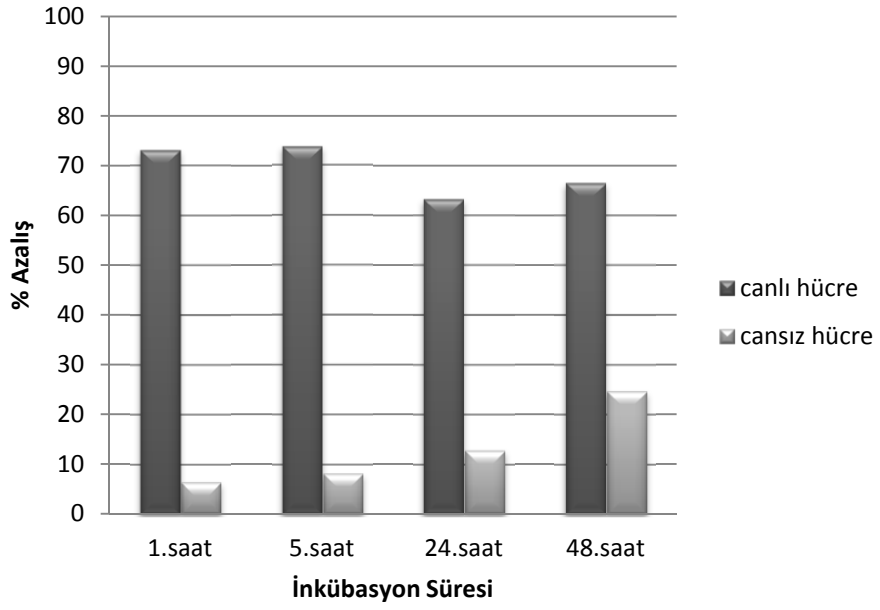
Şekil 3.16. Canlı ve cansız *Lactobacillus hilgardii* (NRLL B-1843) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



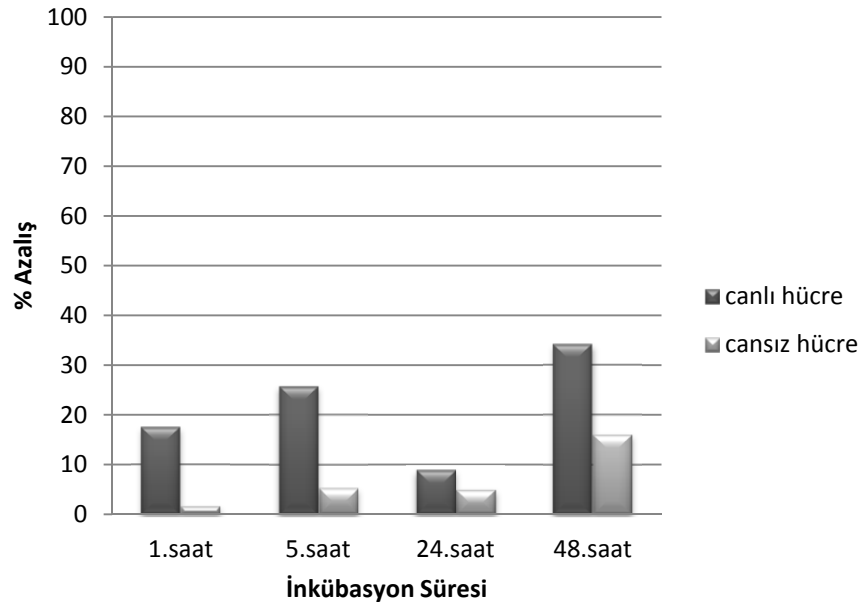
Şekil 3.17. Canlı ve cansız *Leuconostoc lactis* (NRL B-3468) suşu tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



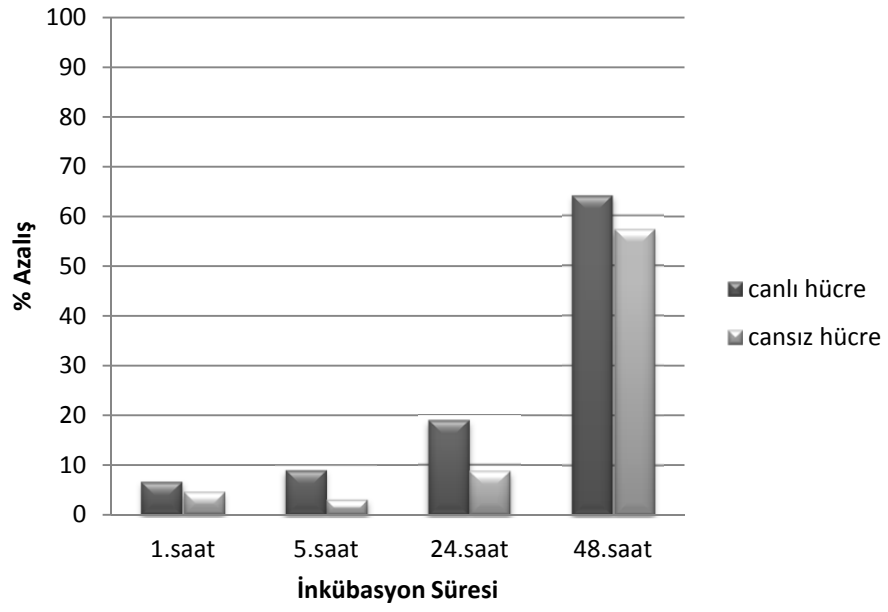
Şekil 3.18. Canlı ve cansız *Lb. plantarum* (4.2.1) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



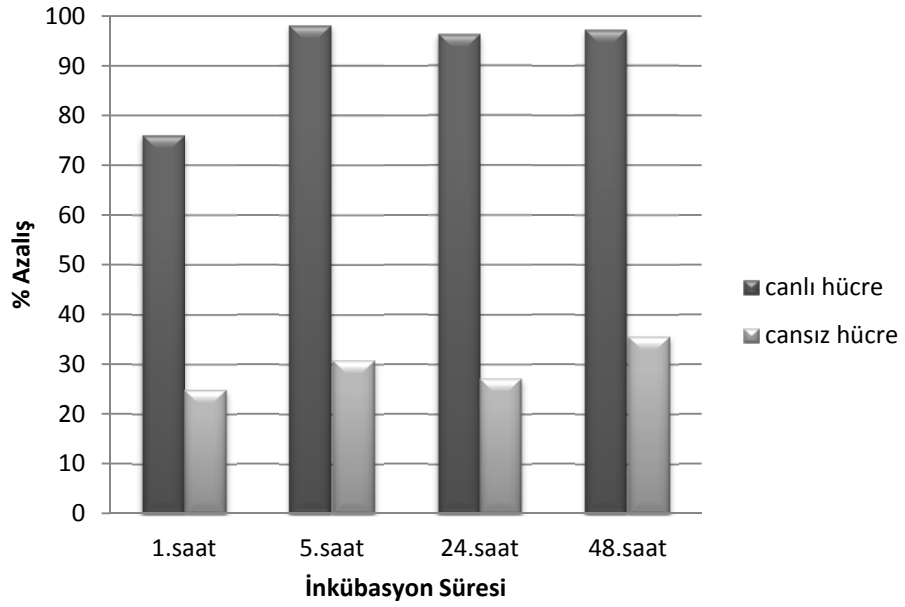
Şekil 3.19. Canlı ve cansız *Lb. plantarum* (7.8) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



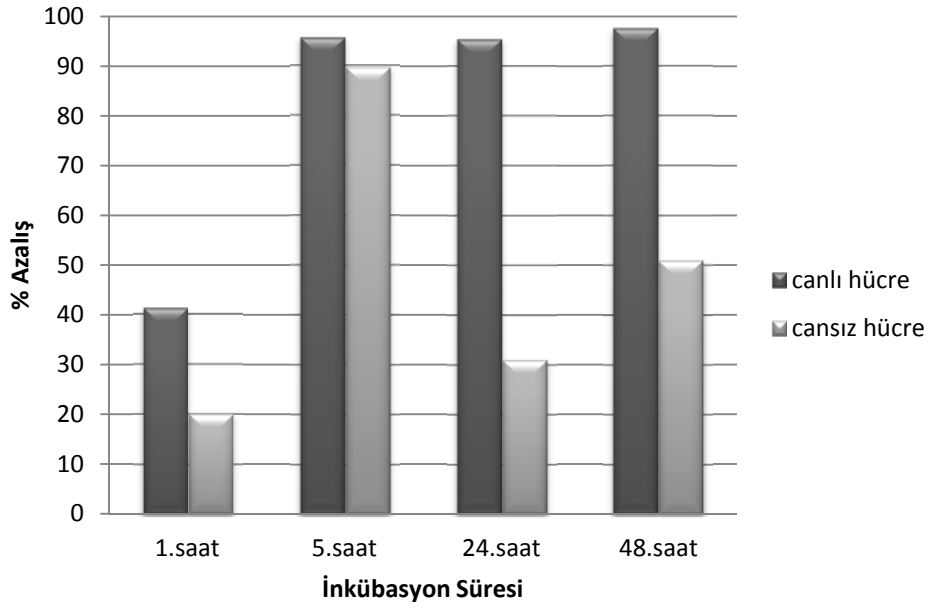
Şekil 3.20. Canlı ve cansız *Lb. coryniformis* (10.1) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



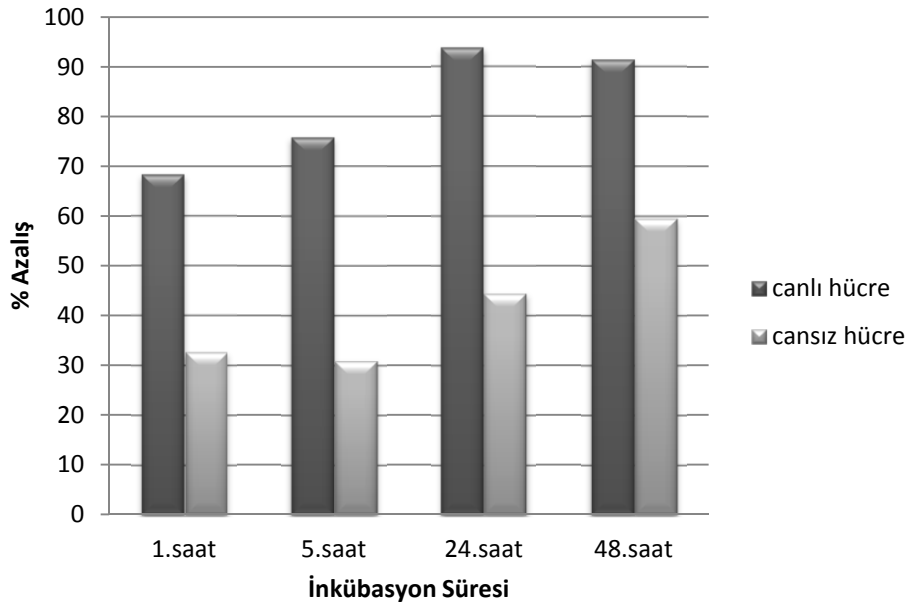
Şekil 3.21. Canlı ve cansız *Alicyclobacillus acidocaldarius* (10.2) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



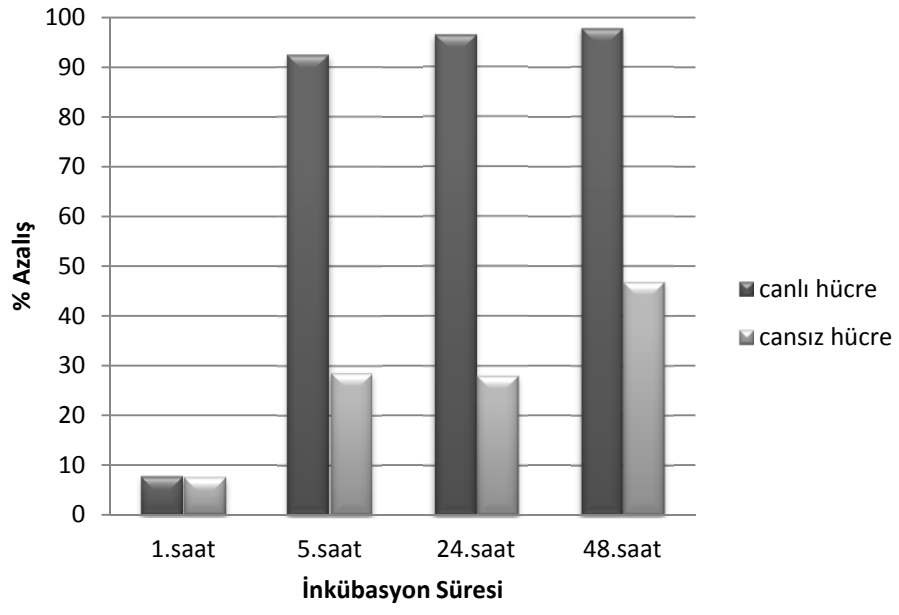
Şekil 3.22. Canlı ve cansız *Lb. plantarum* (22.1) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



Şeki 3.23. Canlı ve cansız *Leu. mesenteroides* (22.2) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



Şekil 3.24. Canlı ve cansız *Lb. plantarum* (23.4) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı



Şekil 3.25. Canlı ve cansız *Lb. plantarum* (24.3) tarafından patulinin zamana bağlı azalışı

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada ve ülkemizde artan nüfus ile birlikte, taze ya da işlenmiş meyve ve sebze gibi gıdaların tüketimi de sürekli artmaktadır. Türkiye, sahip olduğu ekolojik yapısı ve üretim alanları nedeni ile meyve ve sebze üretim potansiyeli açısından dünyanın önemli ülkeleri arasında yer almaktadır. Ülkemizde üretilen meyve ve sebzeler, taze olarak doğrudan tüketildiği gibi meyve suyu sanayisine işlenmek üzere hammadde de sağlamaktadır. Meyve suyu sanayisi, ülke ekonomisine katma değer sağlaması yanında tüketicilerin de sağlıklı beslenme şansını artıran bir sektördür (Anonim, 2010a). WHO, FAO, EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu) gibi çeşitli kuruluşlar kanser ve kardiyovasküler hastalık riskinin azaltılması için sebze ve meyve tüketiminin artırılmasını önermektedir (Allende ve ark. 2006).

Meyve ve sebzeler, E, C, B₂ gibi vitaminler ve vücuda dışarıdan alınması zorunlu kalsiyum, demir, magnezyum gibi mineral maddeler açısından zengindirler. Ayrıca, içerdikleri organik asitler ve selüloz sayesinde doğal laksatif etki göstererek bağırsak faaliyetlerine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda, ülkemiz de dahil olmak üzere tüm dünyada meyveye en yakın içecek olan meyve suyuna duyulan ilgi sürekli bir artış göstermektedir (Karav 2009, Anonim, 2007).

Birçok meyve türünün anavatanı olan Türkiye, üretim miktarı ve çeşitliliği bakımından hem meyve hem de meyve suyu açısından önemli bir ülkedir (Karav 2009). Anavatanının Anadolu ve Kuzey Kafkasya olduğu düşünülen, ılıman iklim meyvelerin başında gelen elmanın dünyada 6.500, ülkemizde ise 460 çeşidi bulunmaktadır (Durmuş ve Yiğit 2003). Dünyada elma üretiminin en fazla yapıldığı ülkeler Çin, Fransa, A.B.D., İtalya, Almanya, Kanada, İngiltere, Yeni Zelanda, Japonya, Güney Afrika, Polonya, İran ve Türkiye'dir (Durmuş ve Yiğit 2003, Edizer ve Bekar 2007, Keleş 1979). FAO'ya (2006) göre, 2005 yılı sezonunda dünya genelinde 62 milyon tondan fazla elma üretimi gerçekleşmiştir (Silva ve ark. 2007).

Ülkemizde ağırlıklı olarak yetiştirilen elma çeşitleri, Granny Smith ve Golden Delicious elmalarıdır (Batu ve Demirdöven 2010). Ülkemizde elma üretiminin en çok yapıldığı yer, Türkiye toplam üretiminin %35'ini karşılayan Karaman'dan Kayseri'ye doğru uzanan, Akdeniz ile İç Anadolu arasındaki geçiş kuşağıdır. Üretimin yoğun olduğu ikinci bölge, Batı Toroslar'ın kuzey yamaçlarıdır. Büyük ölçüde Göller yöresine karşılık gelen bu bölge, Türkiye toplam üretiminin %27'sini karşılamaktadır (Durmuş ve Yiğit 2003). 2003 yılı verilerine göre ülkemiz, 2.600.000 ton elma üretimiyle dünya sıralamasında üçüncü sırada yer almıştır. Yine 2003 yılı verilerine göre Isparta ili, 514.221 ton elma üretimiyle Türkiye'de birinci sırada yer almıştır (Ekinci ve ark. 2012). 2009 yılı verilerine göre, ülkemizde 2.782.365 ton, 2010 verilerine göre ise 2.600.000 ton elma üretimi yapılmıştır (Anonim, 2010b).

Ülkemizde meyve suyu üretimi, 1960'lı yıllarda başlamıştır (Karav 2009, Anonim, 2008). Zamanla gelişen teknoloji ile birlikte ürünlerin çeşitlendirilmesinde artış gerçekleşirken ihracatta ağırlıklı olarak elma suları önem kazanmıştır. 1970 yılında Türkiye'nin meyve suyu ihracatı 6 ton iken, büyüme hızlanarak 2007 yılına gelindiğinde bu miktar 81.000 tona ulaşmıştır. Türkiye'nin 2005-2007 yılları arasındaki meyve suyu ve konsantresi ihracatı ile ilgili değerlendirmeler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Toplam meyve suyu ve konsantreleri ihracatında en önemli kalem elma suyu olmakla birlikte değer olarak payı %52'yi bulmuştur (Anonim, 2008).

Çizelge 4.1. Türkiye'nin Yıllar İtibariyle Meyve Suyu ve Konsantresi İhracatı, (Miktar: Ton, Değer: 1000 \$) (Anonim, 2008)

ÜRÜN	2005		2006		2007	
	Miktar	Değer	Miktar	Değer	Miktar	Değer
Elma suyu	57.462	47.643	43.318	44.079	42.619	83.620
Diğer Meyve/Sebze Suları	24.386	36.002	21.433	49.275	23.677	61.291
Karışık Meyve/Sebze Suları	3.387	2.337	3.526	3.030	5.546	8.130
Diğer Portakal Suları	8.909	4.179	4.051	2.355	4.199	3.127
Diğer Turunçgil Suları	1.247	859	1.964	1.631	2.147	1.766
Domates Suyu	862	596	949	654	1.116	995
Üzüm Suyu	549	367	920	635	993	815
Ananas Suyu	357	199	291	169	689	435
Greyfurt Suyu	2	1	785	1.507	19	54
Portakal Suyu (Dond.)	231	226	553	272	57	37
Toplam	97.393	92.410	77.790	103.607	81.063	160.269

Çeşitli meyvelerden üretilen meyve suları, insanlar ve özellikle de çocuklar tarafından yaygın bir şekilde tüketilen bir gıda çeşitidir. Yapılan bazı araştırmalar, çeşitli meyve sularının içerisinde patulinin sıklıkla bulunduğunu göstermektedir. Çeşitli meyve sularında patulin varlığının araştırılmasının önemi, patulin üreticisi patojenle kontamine olmuş meyve sularının, insan ve özellikle de çocuk sağlığını tehdit edici özelliğinden ve meyve sularının başlıca tüketicilerini çocukların oluşturmasından ileri gelmektedir. Patulinin insan ve çocuk sağlığını tehdit edici, zararlı ve yaşam kalitesini düşürücü etkileri göz önünde bulundurulduğunda, gıdalarda bu mikotoksinin kontrolü veya uzaklaştırılması için çeşitli tekniklerin geliştirilmesi ve meyve suyu gibi çeşitli gıda ürünlerinde bu metabolitin varlığının araştırılması ve detoksifikasyonuna yönelik çalışmalar önem arz etmektedir.

Mikotoksinleri önlemek için gösterilen çabalara rağmen, bu toksinler gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde insan sağlığıyla ilgili hala önemli bir problem teşkil etmektedir (Barreira ve ark. 2010). Geleneksel ve organik olarak yetiştirilmiş ve çürümüş elma örneklerinde oldukça yüksek miktarlarda patulin bulunmaktadır (Horvath ve ark. 2010). Bu çürümüş elmaların işlenmesiyle üretilen elma sularındaki patulin derişimi, 2500 µg/kg seviyesine

kadar ulaşabilmektedir. FDA, patuline bazı seviyelerde maruz kalmanın insanlara risk teşkil ettiğini belirtmiştir. Avrupa Birliği, bu nedenle tüketiciye sunulan elma içeren ürünlerde izin verilen en yüksek patulin miktarlarının belirlenmesi için uluslararası yasal düzenlemeler ortaya koymuştur. WHO ve birçok ülke, elma suyunda bulunmasına izin verilen patulin miktarını 50 µg/kg olarak sınırlandırmıştır (Kadalkal ve ark. 2003a). Patulinin, sitotoksik, genotoksik, mutajenik (Horvath ve ark. 2010) ve tavuk embriyolarına karşı teratojenik (Ciegler ve ark. 1977), halk sağlığı açısından bir tehdit niteliğindeki potansiyel karsinojenik özelliği gibi insan ve hayvan sağlığına olan zararlı etkilerinin getirdiği endişelerden dolayı bu mikotoksinin kontrolü ve elma ürünlerinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Patulinin güvenilir ve verimli detoksifikasyon yöntemlerinin bulunmasına yönelik ilgi her geçen gün daha da artmaktadır. Özellikle elma sularında yaygın bir şekilde saptanan patulinin ortamdaki uzaklaştırılması veya detoksifiye edilmesine yönelik çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik çalışmalar denenmiştir. Bu denemelerden bazıları askorbik asit, gamma radyasyonu, aktif kömür absorpsiyonu, ısı uygulaması, ozon, *P. expansum* 'a karşı bazı mikroorganizmaların antifungal aktivitesi vb. içermektedir. FAO, fiziksel ve kimyasal adsorbanlar kullanılarak mikotoksinlerin detoksifikasyonunda büyük çabaların harcandığını; fakat elde edilen başarıların sınırlı kaldığını belirtmiştir (Fuchs ve ark. 2008). Patulini uzaklaştırmak için ışınlama, ozon veya aktif kömür ile muamele etme gibi alternatif yöntemlerden bazılarının verimi yüksek olsa da maliyeti yüksektir, bazılarının çevreye verdiği zararlar büyük, verimi düşüktür ve zaman alıcıdır; ayrıca elma sularında meydana getirdikleri birtakım fiziksel/kimyasal değişiklikler nedeniyle de detoksifikasyon işlemlerinde zor uygulanabilir olmaları nedeniyle büyük ölçüde elde edilebilir değildir ve tüketicilerin kabulünü azaltmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, patulinin biyolojik detoksifikasyon çalışmaları umut verici görülmektedir.

Patulinin biyolojik detoksifikasyon mekanizmasında, gıda endüstrisinde probiyotik kültür olarak yaygın bir şekilde kullanılan çeşitli laktik asit bakterileri ve mayalar önemli rol oynamaktadır. Literatürde patulinin mayalar ile detoksifikasyonuna yönelik birçok çalışma mevcuttur; fakat günümüze kadar LAB suşları kullanılarak yalnızca 3 tane detoksifikasyon çalışması yapılmıştır.

Yapılan bu çalışma ile patulinin biyolojik detoksifikasyon deneylerinde bu nedenle çeşitli LAB suşları kullanılmıştır. Bu suşlardan bazıları referans suş olarak Amerika'daki ARS kültür koleksiyonundan temin edilmiş, diğer bazıları da farklı evler ve yerel işletmelerden temin edilmiş turşu örneklerinden izole edilmiştir.

Turşu, sebze ve meyvelerin belli derişimlerde tuz içeren salamura veya kendi öz suları içinde laktik asit bakterilerince fermente edilmesiyle oluşan laktik asidin ve ortamdaki tuzun koruyucu etkisi sonucu dayanıklılık kazanan bir ürün olarak tanımlanmaktadır. Turşu yapımı, insanların gıda maddelerini uzun süre saklayabilmek ve az ya da hiç bulunmadıkları yer ve dönemlerde, bu ürünlerden yararlanabilmek için geliştirdikleri dayandırma yöntemleri içinde en eskilerinden biridir (Şahin 1982).

Çalışmada kullanılan ve analiz edilen turşu örnekleri; salatalık, biber, karışık, erik, sarımsak, acur, lahana, domates, patlıcan, kırmızı pancar ve fasulye turşularından alınmıştır. Ev yapımı ve turşuculardan temin edilen 24 adet çeşitli turşu örneklerinden MRS agar petrilere yapılan ekimler sonucunda çoğunda LAB üremesi gözlenirken 6 tanesinde ise hiçbir üreme gözlenmemiştir. LAB üremesi gözlenmeyen turşu örneklerinin, tabi tutuldukları fermentasyon süreçleriyle yakından ilişkisi vardır. Daeschel ve Fleming (1984), sebzelerin doğal fermentasyonu süresince meydana gelen mikrobiyal gelişimini, birbirini izleyen 4 basamağa ayırmıştır: başlangıç basamağı olan 1. basamakta sebzelerin üzerinde mevcut olan çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin gelişiminin, birincil fermentasyon olan 2. basamakta, laktik asit bakterilerinin fermentatif mayalarla birlikte veya mayasız gelişiminin, ikincil fermentasyon basamağı olan 3. basamakta ise düşük pH nedeniyle inhibe olan laktik asit bakterilerinin gelişiminin ardından fermentatif mayaların gelişiminin gözleendiği belirtilmiştir. Bu basamakta mayaların gelişiminin gözlenmesi, ortamda hala fermente olmamış karbonhidratların kaldığını göstermektedir. Post-fermentasyon denilen son basamak ise, ortamdaki fermentatif karbonhidratların tükenmesi sonucunda anaerobik koşullar altında hiçbir mikrobiyal gelişimin olmaması ile karakterize edilmiştir. Bu durumda 6 tane turşu örneğinde LAB gelişiminin görülmemesi, ya ikincil fermentasyon basamağı olan 3. basamakta ortamın iyice düşmüş pH'sı

nedeniyle laktik asit bakterilerinin inhibe olmuş olabileceğine ya da turşuların post-fermentasyon sürecinde olabileceğine işaret etmektedir.

Sebzeler, uygun derişimlerde tuz içeren solüsyonlara konulduklarında, yapılarında doğal olarak bulunan mikroorganizmalar tarafından fermentasyona maruz kalırlar. Turşuların tuzluluk yüzdeleri, turşuların fermentasyon süresince aktif olan mikroorganizma tipi ve sayısını büyük ölçüde etkilemekte dolayısıyla da turşuların kalitesi açısından önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında analiz edilen 16 tane turşu örneğiyle yapılan ölçümler sonucunda, turşulardaki tuz derişimlerinin %3-8 arasında değiştii gözlenmiştir. Bu veriler, Daeschel ve Fleming (1984) tarafından belirtilen, çeşitli turşu örneklerinin sahip oldukları yaklaşık %1-8 arasında değişiklik gösteren tuzluluk oranlarıyla benzerlik göstermektedir. Daeschel ve Fleming (1984), lahana turşusunun tuzluluk oranının, zeytin ve salatalık turşusununkine göre daha düşük olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada analizi yapılan 11 ve 22 örnek nolu lahana turşularının tuzluluk yüzdelerinin sırasıyla %4 ve %3 gibi düşük gözlenmiş olması araştırmacıların tespitlerini doğrulamaktadır.

Çalışma kapsamında ev yapımı ve turşuculardan temin edilen 24 tane turşu örneğinden MRS agar petrilere yapılan ekimler sonucunda, her bir turşu suyu örneğini temsilen petrilere alınan 4-5 adet koloni, steril MRS agar petrilere çizgi ekim yapılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda elde edilen toplamda 73 izolatın Gram boyamaları sonucunda tüm izolatların Gram-pozitif olduğu, hücre morfolojilerinin kok, kokobasil ve basil şeklinde olduğu, kolonilerin düzgün, küçük, parlak ve opak, pigmentasyonlarının ise krem/beyaz/sarı olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen laktik asit bakteri suşlarının tanımlanmasında biyokimyasal Vitek testi ve FAME (Yağ Asiti Metil Esterleri) analizi, 16 S ve 23 S rRNA'yı temel alan moleküler tanımlama yöntemi olan ribotiplendirme analizi gerçekleştirilmiştir.

Vitek testi sonucunda elde edilen veriler, çeşitli turşu örneklerinde *Erysipelothrix*, *Streptococcus*, *Gemella* ve *Enterococcus* gibi turşuların doğal florasında bulunmayan ve patojen özelliğe sahip bazı türlerin bulunduğunu göstermiştir. Cai (1996) nisin üreten bir *Lactococcus* suşunun tanımlanmasına

yönelik yapmış olduğu bir çalışmada, Vitek testi ile identifikasyonda doğru sonuçların elde edilemediği; bu nedenle identifiye edilmeye çalışılan organizmalar için veritabanı sınırlı olan veya veritabanı olmayan bunun gibi sistemler kullanılırken dikkatli olunması gerektiği bildirmiştir. Biyokimyasal özelliklere dayalı Vitek testinin kesin doğrulukta sonuç vermediği doğrulanmış, identifikasyon için sadece bu testin yeterli olamayacağı görülerek yapılan identifikasyonun doğrulanması için yağ asiti metil esterleri analizi gerçekleştirilmiştir.

Yağ asitlerinin bakterilerde hücre zarının seçiciliğine etki ettikleri bilinmektedir (Dunnick ve O'Leary 1970). Yağ asiti metil esterleri analizi, hücre duvarının özgül yağ asit kompozisyonuna dayanan bakteriyel ve maya identifikasyonuna izin veren bir fenotipik tanımlama yöntemidir (Sutton 2004). Bu yöntemde, kültüre edilen örneklerin yağ asitleri ekstrakte edilir ve gaz kromatografisi ile ayırma sağlanır. Yağ asiti profillerindeki farklılıklar, genetiksel akrabalıkların dolaylı bir göstergesi olup; bu profiller kullanılarak bakterilerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar 40 yılı aşkın bir süredir yürütülmektedir (Miller and Berger 1985). Bu çalışmada gerçekleştirilen yağ asiti metil esterleri analizi sonuçlarının, Vitek testi sonucunda identifiye edilen suşlarla örtüşmediği gözlenmiştir. İdentifikasyon, turşuların doğal florasında bulunan *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* gibi laktik asit bakterilerinin varlığını göstermiştir. Bu durumda, FAME analizi ile Vitek testi sonuçlarının birbirlerini doğrulamadığı; Vitek testi sonuçlarıyla karşılaştırılacak olursa FAME analizi sonuçlarının daha güvenilir olduğu görülmüştür. 26 izolatin, değişen benzerlik indeksleri ile *Lactobacillus parabuchneri* olduğu; ayrıca 16 farklı turşu örneğinin toplamında 16 farklı *Lactobacillus* türünün bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan turşularda, *Lactobacillus* türlerinin diğer türlere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Elde edilen analiz sonuçları, izolatların düşük benzerlik indeksleri nedeniyle bu yöntemin de LAB identifikasyonu için güvenilir ve yeterli olmadığını göstermiş, yapılan biyokimyasal identifikasyonların doğrulanması için bir moleküler tanımlama yöntemi olan ribotiplendirme analizi gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde, LAB identifikasyon çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler (genotipik) yöntemlere doğru kaymıştır (Babalola 2003). Ribotiplendirme, 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin bir kısmını veya hepsini içeren genomik DNA restriksiyon fragmentlerinin parmak izi profillerini kapsamaktadır. Geçmiş yıllarda bu yöntemin *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* türlerinin veya suşlarının taksonomik çalışmalarında kullanıldığı belirtilmiştir (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011).

Çalışmada sınırlı imkanlar nedeniyle sadece 8 örneğin ribotiplendirme ile identifikasyonu yapılabilmektedir. Analiz sonucunda, 4.2.1., 7.8, 22.1, 23.4 ve 24.3 nolu izolatların, sırasıyla %97, %97, %97, %81 ve %65 benzerlik ile *Lb. plantarum*, 22.2 nolu izolatın %92 benzerlik ile *Leu. mesenteroides*, 10.1 nolu izolatın %66 benzerlik ile *Lb. coryniformis*, %65 benzerlik ile *Alicyclobacillus acidocaldarius*, 10.2 nolu izolatın ise %81 benzerlik ile *Alicyclobacillus acidocaldarius*, %70 benzerlik ile *Lb. parabuchneri*, yine %70 benzerlik ile *Lb. lactis* olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlarla yağ asiti metil esterleri analizi sonucunda elde edilen sonuçların çeliştiği açıkça görülmektedir (Çizelge 4.2). Ribotiplendirme profili %97 benzerlik gösteren ve *Lb. plantarum* olarak tanımlanmış 4.2.1. nolu izolat, yağ asiti metil esterleri analizi sonucunda %43 benzerlik oranı ile *Lb. buchneri* olarak tanımlanmıştır. Yine, 7.8 nolu izolat, yağ asiti metil esterleri analizi ile %25 benzerlik ile *Lb. plantarum* olarak tanımlanmış olmasına karşılık, bu oran ribotiplendirme sonucunda %97 olarak tespit edilmiştir. Klein ve ark. (1998)'nin öne sürmüştüğü, yağ asiti metil esterleri analizinin LAB identifikasyonu için güvenilir bir yöntem olmadığı düşüncesi, bu çalışmada kullanılan 2 yöntem arasında görülen büyük farklılıklar nedeniyle doğrulanmış bulunmaktadır.

Çizelge 4.2. FAME ve ribotiplendirme sonuçlarının karşılaştırılması

İzolot No	FAME ile tanımlanan tür	Benzerlik	RİBOTİPLENDİRME ile tanımlanan tür	Benzerlik
4.2.1	<i>Lb. buchneri</i>	%43	<i>Lb. plantarum</i>	%97
7.8	<i>P. pentosaceus</i>	%26	<i>Lb. plantarum</i>	%97
	<i>Lb. plantarum</i>	%25		
10.1	<i>Lb. buchneri</i>	%57	<i>Lb. coryniformis</i>	%66
			<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	%65
10.2	<i>Lb. cellobiosus</i>	%37	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	%81
	<i>P. damnosus</i>	%26	<i>Lb. parabuchneri</i>	%70
22.1	<i>Lb. parabuchneri</i>	%57	<i>Lb. plantarum</i>	%97
22.2	<i>Lb. parabuchneri</i>	%65	<i>Leu. mesenteroides</i>	%92
	<i>Lb. fermentum</i>	%60		
23.4	<i>Lb. parabuchneri</i>	%78	<i>Lb. plantarum</i>	%81
24.3	<i>Lb. bifementans</i>	%45	<i>Lb. plantarum</i>	%65
	<i>Lb. parabuchneri</i>	%37		

Lb. plantarum, *Leu. mesenteroides* ve *Lb. coryniformis* türlerinin turşuların doğal florasında bulunması ve elde edilen sonuçların güvenilir benzerlik düzeyleri, ribotiplendirmenin Vitek ve FAME analizlerine nazaran LAB için daha güvenilir bir identifikasyon yöntemi olduğunu göstermektedir.

Daeschel ve Fleming (1984), laktik asit bakterilerinin 4 türü olan *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* türlerini lahana fermentasyonları ile ilişkilendirmiştir. Bu türlerin, lahana turşularının fermentasyonu süresince yukarıda belirtilen sıra ile oluştuğu bildirilmiştir. Mikroorganizmaların kendi aralarındaki bu sıralamasının,

lahana turşularının tipik tat ve aromalarının elde edilmesi için gerekli olduğu vurgulanmıştır (Harris ve ark. 1992). Yukarıda belirtilen son 3 türün ayrıca salatalık ve zeytin fermentasyonlarında da rol oynadıkları belirtilmiştir (Daeschel ve Fleming 1984, Sanchez ve ark. 2000). Çalışma kapsamında kullanılan 7 nolu turşu örneği, bir turşucudan temin edilmiş erik turşusundan alınmıştır. Literatürde yapılan araştırmalar sonucunda daha önce, erik turşusun yapısında bulunan LAB'ın araştırılmadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada erik turşusundan alınan örnekte, ribotiplendirme analizi sonucunda elde edilen %97 benzerlik ile *Lb. plantarum*'un varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuç ile *Lb. plantarum*'un lahana, salatalık ve zeytin fermentasyonları dışında erik fermentasyonunda da rol oynadığı görülmüştür. Lahana turşusundan elde edilen 22.2 nolu izolatın %92 benzerlik ile *Leu. mesenteroides* olduğu tespit edilmiştir. Bu türün, lahana fermentasyonunun ilk basamağında rol oynadığı bildirilmiştir (Daeschel ve Fleming 1984). Ribotiplendirme sonuçlarına göre 8 turşu izolatından 5'i *Lb. plantarum* olarak tanımlanmıştır. Lu ve ark. (2003), salatalık ve lahana fermentasyonlarında *Lb. plantarum*'un gelişimi ve fermentatif aktivitesinin, son ürünün kalite ve mikrobiyal kararlılığını büyük ölçüde etkilediğini bildirmiştir. Acur turşusundan elde edilen 10.1 ve 10.2 nolu izolatlar sırasıyla %66 benzerlik ile *Lb. coryniformis* ve %81 benzerlik ile *Alicyclobacillus acidocaldarius* olarak tanımlanmıştır. *Lb. coryniformis* yaygın olarak silolarda depolanan yem, inek gübreleri, mandıra havası gibi tarımsal habitatlarda; peynir, salam ve boza gibi çeşitli gıda ürünlerinde bulunmuştur (Schachtsiek ve ark. 2004). Ayrıca turşular ve çeşitli lahana türlerinde bulunduğu da belirtilmiştir (Anonim, 2012b). *Alicyclobacillus acidocaldarius* ise asidik sıcak su kaynaklarında ve asidik topraklarda bulunmuştur (Anonim, 2012c). Düşük benzerlik yüzdeleri gösteren izolatların daha kesin ve hassas bir şekilde suş bazında identifikasyonu için PFGE (atımlı alan jel elektroforezi), DNA-DNA hibridizasyonu, AFLP (çoğaltılan parça boy farklılaşması), PCR-RFLP/ARDRA (kesim parçası boy farklılaşması/ amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi) SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poli akrilamit jel elektroforezi), RAPD-PZR (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), dizi analizi gibi diğer genotipik identifikasyon yöntemleri önerilmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011).

Hasat edilen elmaların bir kısmı, meyve suyu fabrikaları tarafından direk meyve suyu olarak işlenirken, diğer bir kısmı da açıkta yığınlar halinde depolamaktadır. Sağlam görünen veya fiziksel zarar görmüş elmalar, açıkta depolanma süresince küf kontaminasyonuna açık bir hale gelmektedir. Önlemler alınmadığı takdirde, depolanan elmalarda küf gelişimi ile birlikte patulin oluşumu kaçınılmazdır. Patulin oluşumu ile elma ürünlerinde tüketicileri etkileyen bazı kalite problemleri görülmektedir. Patulinin saptanması ve detoksifikasyon çalışmaları hem gıda endüstrisi hem de yasal düzenlemeler yapan kurumlar için öncelikli bir öneme sahiptir (He ve ark. 2009). Patulinin oldukça polar bir yapıya sahip olması ve 276 nm dalga boyunda özgül absorpsiyon göstermesi nedeniyle günümüzde RP-HPLC patulin analizinde en uygun ve en yaygın kullanılan yöntem olmuştur (Baert ve ark. 2007, Barreira ve ark. 2010, Moukas ve ark. 2008). Patulin bazik ortamlarda aktivitesini yitirip kararlı kalamadığından çalışmamızda geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde daha önce bazı çalışmalarda kullanılmış olan sodyum karbonat kullanılmamıştır. Kolon kullanılarak uygulanan katı-faz ekstraksiyon yöntemlerinin daha güvenilir, daha yüksek verimlerle tekrar edilebilir, daha düşük toksin seviyelerini tayin etmeyi mümkün kılan daha hassas yöntemler oldukları belirtilmiştir (Valle-Algarra ve ark. 2009). Bu çalışmada sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi akabinde zaman kaybedilmeden kullanılan C₁₈ katı-faz ekstraksiyonu kolonu kullanılarak yapılan HPLC analizinin validasyon işlemleri sonucunda patulinin geri kazanım oranı ortalama olarak % 97,5 bulunmuş, uygulanan yöntemin birçok çalışmaya göre daha hassas ve verimli olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada test edilen meyve suları, Eskişehir piyasasında tüketime sunulan farklı çeşit ve markalarda olmak üzere elma suyu ve elma içeren karışık meyve sularından oluşmaktadır. Temin edilen toplamda 32 tane meyve suyunun patulin içeriği RP-HPLC yöntemi ile tespit edilmiştir. Analiz edilen bu meyve suları; 3 tanesi (5, 9, 21 nolu örnekler) bebekler ve çocuklar için üretilmiş toplamda 5 tane organik meyve suyu (5, 9, 13, 14 ve 21 nolu örnekler), bebek ve çocuklar için üretilmiş 5 tane meyve suyu (5, 6, 9, 18 ve 21 nolu örnekler) ve geleneksel olarak üretilmiş 27 tane meyve suyunu içermektedir. 32 tane meyve suyu örneğinde yapılan patulin analizleri sonucunda 8 örnekte (12, 13, 14, 17, 18,

19, 20 ve 24 nolu örnekler) 24.16-281.49 µg/l arasında değişen miktarlarda patulin saptanmıştır. Bu örnekler, 1 tanesi organik (13 nolu örnek) olmak üzere 3 tane elma suyunu (12, 13 ve 17 nolu örnekler) ve yine 1 tanesi organik (14 nolu örnek) olmak üzere 5 tane karışık meyve suyunu kapsamıştır. 2001 yılında, Leggott ve Shephard tarafından yürütülen çalışmada analiz edilen 6 farklı karışık meyve sularının 2'sinde 5 µg/l seviyesinde patulin derişimleri saptanmıştır. Bu sonuçlar, patulinin elma suyu dışında elma içeren karışık meyve sularında da bulunabileceğini ortaya koymuştur.

Çalışma kapsamında patulin içerdği saptanan 13 ve 17 nolu iki örnekteki patulin miktarı Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilmiş maksimum limit olan 50 µg/kg'ın altında iken diğer altı örnekteki (12, 14, 18, 19, 20 ve 24 nolu örnekler) patulin miktarı bu limitin üzerinde çıkmıştır. 1998 yılında, Gökmen ve Acar tarafından Türkiye'de üretilen 215 elma suyu konsantresinde patulin varlığının ilk kez HPLC yöntemi ile araştırılması sonucunda tüm örneklerin 7-376 µg/l derişimlerinde patulin içerdği, örneklerin %43.5'inde patulin derişimlerinin 50 µg/l sınırını aştığı bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular, patulin kontrolünde hala sıkıntıların yaşandığını göstermektedir. En düşük patulin kontaminasyonu 17 nolu elma suyu örneğinde 24.16 µg/l, en yüksek ise 24 nolu karışık meyve suyu örneğinde 281.49 µg/l olarak saptanmıştır. Geleneksel ve organik olarak yetiştirilmiş ve çürümüş elma örneklerinde, oldukça yüksek miktarlarda patulinin bulunduğu, bu çürümüş elmaların işlenmesiyle üretilen elma sularındaki patulin derişiminin bazen 2500 µg/kg seviyesine kadar ulaşabildiği bildirilmiştir (Horvath ve ark. 2010).

Bu çalışmada analiz edilen organik olarak üretilmiş 13 nolu elma suyu ve 14 nolu elma-incir suyu örneklerinde patulin seviyesi sırasıyla 35.53 µg/l ve 66.20 µg/l olarak saptanmıştır. Bu seviyeler, Horvath ve ark. (2010)'nın belirttiği 2500 µg/kg seviyesi kadar çok yüksek olmasa da 14 nolu organik incir-elma suyu örneği, Türk Gıda Kodeksi tarafından izin verilen maksimum 50 µg/kg'lık sınırı aşmaktadır. Barreira ve ark. (2010) tarafından yapılan ve organik elma ürünlerinin araştırıldığı bir çalışmada, incelenen 35 tane organik elma ürünlerin 7'sinin patulin ile kontamine olduğu; fakat bunların gösterdiği en yüksek seviyenin 9.2 µg/l olduğu bildirilmiştir. Spadaro ve ark., (2007) tarafından yapılan başka bir

Çalışmada analiz edilen 21 tane organik elma sularının 6'sında patulin derişimleri, 50 µg/kg'lık sınırının altında saptanmıştır. 2010 yılında, Bonerba ve ark. tarafından İtalya'da yapılan çalışmada analiz edilen 31 tane elma suyunun, 6-30 µg/l arasında değişen seviyelerde patulin içerdiği tespit edilmiştir.

Yaşamanın ilk yılı boyunca bebek ve çocuklar tarafından elma ürünlerinin oldukça fazla tüketilmesi nedeniyle onların yetişkinlere nazaran patuline çok daha fazla maruz kaldığı bilinmektedir. Analiz edilen çocuklar için üretilmiş 5 tane meyve suyu arasından sadece biri olan 18 nolu karışık meyve suyu örneğinde patulin seviyesi 121.12 µg/l olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, Türk Gıda Kodeksi'nin bebek ve çocuklar için koymuş olduğu ayrı bir sınır olan 10 µg/l seviyesinin oldukça üzerindedir ve bu seviyenin 10 katını bile aşmaktadır. Leggott ve Shephard (2001) tarafından incelenen bebekler için üretilmiş 1 tane karışık elma suyunda 13.75 µg/l seviyesinde patulin bulunmuştur. Bu seviye, elde ettiğimiz 121.12 µg/l seviyesinden oldukça düşüktür; fakat 10 µg/l'lık sınır değeri aşmaktadır. Sağlık üzerine olumsuz etkileri kanıtlanmış patulinin bu çalışmada saptanan yüksek seviyelerine insanların maruz kalmasının, özellikle de bebek ve çocukların daha büyük bir risk altında olduğunu açıkça göstermektedir.

İnsanların tüketimine uygun olduğu nitelendirilerek iç piyasaya sürülen meyve sularında gerçekleştirilen analizler sonucunda, patulinin bazı numunelerde bulunmazken bazılarında değişen seviyelerde bulunduğu saptanmıştır. Elde edilen, bazı meyve sularının yüksek seviyelerde patulinle kontamine olduğu bulgusu, çalışma kapsamında kullanılan bu meyve sularının insan tüketimine uygun olmadığını ve sağlık açısından risk teşkil ettiğini göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar, elma suyu ve konsantreleri üreten işletmelerin patulin kontaminasyonlarını önlemede yetersiz veya muhtemelen duyarsız kaldıkları ve yasal düzenlemelere bağlı kalmadıkları gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Bu hususta Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından patulinin sıkı kontrolü için üretim öncesi ve sonrasında bu mikotoksinin rutin olarak saptanmasına yönelik yönetmelikler oluşturulması gerektiği düşünülmektedir. Türkiye'nin yıllar geçtikçe artış gösteren ve ülke ekonomisine katma değer sağlayan meyve suyu ihracatında en önemli çeşidi oluşturan elma suyu ve konsantreleri açısından

düşünüldüğünde, saptanan bu patulin seviyelerinin ihracattada problem teşkil edeceği ve ülke ekonomisine zarar vereceği açıktır.

Patulinin insan ve hayvan sağlığına; ayrıca ülke ekonomisine verdiği zararlar ele alındığında, bu mikotoksinin güvenilir ve verimli detoksifikasyon yöntemleri ile elma ürünlerinden uzaklaştırılması gereklilik arz etmektedir. Patulinin elma ürünlerinden uzaklaştırılması veya detoksifiye edilmesine yönelik çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik çalışmalar denenmiştir. Drusch ve ark. (2007) elma suyu ve konsantresi gibi patulin ile kontamine olmuş gıdalar için verimli bir dekontaminasyon stratejisinin bulunmadığını bildirmiştir. Patulin seviyeleri, meyve suyu ekstraksiyonunda kullanılan alışılmış teknolojik işlemler süresince yalnızca %20 oranı gibi düşük bir verimle azaltılabilmekte ve bu gibi yöntemler tüketicilerin kabulunu azaltmaktadır (Barreira ve ark. 2010, Silva ve ark. 2007).

Patulinin biyolojik detoksifikasyon mekanizmasında, gıda endüstrisinde probiyotik kültür olarak yaygın bir şekilde kullanılan çeşitli laktik asit bakteri (LAB) suşları önemli rol oynamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar ile laktik asit bakterilerinin aflatoksin, okratoksin ve patulin gibi çeşitli mikotoksinleri yapılarına bağlama yeteneğine sahip oldukları bildirilmiştir (El-Nezami ve ark. 1998, Fuchs ve ark. 2008, Topçu ve ark. 2010). Peltonen ve ark. (2001), tarafından yapılan çalışmada LAB suşları kullanılarak aflatoksin B₁ (AFB₁)'in detoksifikasyonu araştırılmış ve AFB₁'in bu suşlar ile değişik oranlarda uzaklaştırılabildiği belirtilmiştir.

Topçu ve ark. (2010), *Enterococcus faecium*'un özgül suşlarının patulini ve AFB₁'i sulu çözeltilerden farklı verimlerle uzaklaştırdığını bildirmiştir. Patulin, 48 saatlik inkübasyon sonunda 2 farklı suş tarafından %41.6 ve %45.3 oranlarında uzaklaştırılmıştır.

Fuchs ve ark. (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada patulini sulu çözeltilerden uzaklaştırma yeteneklerinin araştırılması için gıda ve hayvan kaynaklı 30 farklı LAB suşu çalışılmış, LAB suşlarının sulu çözeltilerden patulini farklı seviyelerde uzaklaştırdığı bulunmuştur. En etkili suş ile patulin seviyeleri %80 azaltılabilmektedir.

Bu çalışma ile elde edilen bulgular, önceki çalışmaları doğrulamış ve biyolojik yolla patulinin etkili detoksifikasyonunun mümkün olabileceğini göstermiştir. Çalışma kapsamında patulinin biyolojik olarak detoksifikasyonu için incelenen tüm suşların patulini değişik miktarlarda bağlama yeteneklerinin olduğu gözlenmiştir. Bu bağlanma, başlangıçtaki patulin derişimine, hücre derişimine, bakteri suşuna, sulu ortamın pH'sına ve inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Hatab ve ark. 2012).

Mikotoksinlerin sulu ortamdan uzaklaştırılmasının farklı iki mekanizma ile açıklanabileceği bildirilmiştir. Birinci mekanizmada, toksinlerin bakteriyel hücre duvarlarının yapısını oluşturan peptidoglikan ve polisakkarit gibi karbonhidrat kısımlarına kovalent bağlanma yerine geri dönüşümlü olarak bağlanması yoluyla sulu ortamlardan uzaklaştırıldığı düşünülmektedir. Hatab ve ark. (2012) tarafından yapılan FT-IR çalışmaları, patulinin araştırılan tüm suşlara bağlanmasından aynı fonksiyonel grupların çoğunun (karboksil, polisakkaritler, hidroksil, lipid ve amino) sorumlu olduğunu göstermiştir. Ancak sonuçlar, bu grupların göreceli katkılarının bakteriyel tür içerisinde değişiklik gösterebileceğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, patulinin laktik asit bakterilerine adsorpsiyonundan sorumlu olan bileşiklerin hücre duvarı bileşenlerinin olduğunu doğrulamaktadır. Daha önceki çalışmalarda, mikotoksinlerin LAB tarafından uzaklaştırılma mekanizması olarak bakteriyel hücre duvarına bağlanmayı gösteren benzer sonuçlar bildirilmiştir (El-Nezami ve ark. 2002, Peltonen ve ark. 2001). LAB tarafından AFB1'in bağlanmasında hücre duvarı bütünlüğünün önemli olduğu bulunmuştur. Mikotoksinlerin sulu ortamdan uzaklaştırılmasıyla ilgili diğer bir mekanizmada ise hücrelerden sulu ortama özgül enzimlerin salınmasıyla toksinlerin metabolik dönüşümler sonucu parçalanmasının mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (Hatab ve ark. 2012, Hosono ve ark. 1988, Fuchs ve ark. 2008, Reddy ve ark. 2011, Topçu ve ark. 2010).

Bu çalışmada, Topçu ve ark. (2010)'nın yöntemine göre patulin derişimi 1µg/ml, pH 4 ve sıcaklık 37 °C olarak sabit tutularak canlı ve cansız hücrelerin değişen derişimlerinin patulin detoksifikasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir. İncelenen 13 suşun tümünün, patulini değişen miktarlarda bağlama veya parçalama yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda, 10⁷,

10^8 , 10^9 ve 10^{10} cfu/ml derişimlerdeki LAB suşları denenmiştir (Fuchs ve ark. 2008, Hatab ve ark. 2012, Topçu ve ark. 2010). Bu çalışmada 10^{11} cfu/ml ağırlıkta olmak üzere 10^8 , 10^9 ve 10^{10} cfu/ml derişimindeki hücreler incelenmiştir. İncelenen LAB suşları arasında, patulinin en etkili detoksifikasyonunu sağlamış olanların 10^{11} cfu/ml derişimindeki *Leu. lactis* (NRLL B-3468), 4.2.1, 22.1, 23.4, 24.3 nolu *Lb. plantarum* ve 22.2 nolu *Leu. mesenteroides* suşları olduğu gözlenmiş ve bunların patulini sırasıyla %98.73, %98.14, %98.20, %93.89, %97.91 ve %97.77 oranlarında sulu ortamdan uzaklaştırdıkları tespit edilmiştir. Kefirden elde edilmiş referans suş olan 10^{11} cfu/ml derişimindeki *Lb. kefir* (NRLL B-1839) de verimli bir detoksifikasyon yeteneği göstermiş ve patulini en yüksek %86.48 ve yine 10^{11} cfu/ml derişimindeki 7.8 nolu *Lb. plantarum* suşu ise %73.89 oranında detoksifiye etmiştir. Elde edilen bu bulgular, daha önce 10^9 cfu/ml derişimindeki 2 farklı *Lb. plantarum* suşu ve 1 µg/ml derişiminde patulin içeren sulu ortam ile çalışmış olan Fuchs ve ark. (2008)'nin 4 saatlik inkübasyon sonunda elde etmiş olduğu sonuçlara göre bu çalışmada kullanılan 10^{11} cfu/ml derişimindeki LAB suşlarının daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu durumun, hücre derişimi ve suş farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda *Lb. kefir* (NRLL B-1839) suşunun canlı hücreleri tarafından patulinin azalışı sırasıyla %19.30, %46.12, %70.84 ve %86.48; *Lb. paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560) suşunun cansız hücreleri tarafından patulinin azalışı ise sırasıyla %38.07, %37.60, %68.15 ve %92.57 oranlarında gerçekleşmiştir. 1, 5, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda *Lb. kefir* (NRLL B-1839) suşunun canlı; *Lb. paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560) suşunun cansız hücreleri tarafından patulin değişimini ve mikroorganizma içermeyen (kontrol) tampondaki patulin değişimini gösteren kromatogramlar Ek'te verilmiştir.

Patulinin biyolojik detoksifikasyonunun araştırılmasını amaçlayan bu çalışmada ilk defa *Leu. mesenteroides subs. mesenteroides* (B-512), *Lb. hilgardii* (B-1843), *Lb. lactis* (3468), *Lb. kefir* (B-1839), *Lb. paracasei subs. paracasei* (B-4560) suşları ve turşulardan elde edilen *Leu. mesenteroides* ve *Lb. plantarum* suşları araştırmaya tabi tutulmuştur. Yapılan analiz sonucunda, 10^9 cfu/ml derişimindeki *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides* (NRLL B-512)'in

patulini diğer suşlardan çok daha düşük oranlarda detoksifiye ettiği, buna karşın turşulardan izole edilen 10^{11} cfu/ml derişimindeki 22.2 nolu *Leu. mesenteroides* suşunun ise %97'leri bulan oldukça yüksek detoksifikasyon yeteneği gösterdiği gözlenmiştir. Bu durumun, suş ve hücre derişimi farklılığına bağlı olduğu düşüncesi bu çalışma ile bir kez daha doğrulanmış bulunmaktadır. Mikotoksinlerin sulu ortamlardan farklı suşlar tarafından farklı derecelerde uzaklaştırılmasının, muhtemelen bileşiklerin kimyasal yapılarının ve etkilerden sorumlu moleküler mekanizmaların farklılığından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Fuchs ve ark. 2008). Topçu ve ark. (2010), *Enterococcus faecium*'un özgül suşlarının aflatoksin B₁ ve patulini sulu solüsyonlardan farklı verimlerle uzaklaştırma mekanizmasının bakterilerin hücre duvarlarının farklı olmasına bağlamaktadır. Benzer şekilde, Peltonen ve ark. (2001), suşların aflatoksin B₁'i farklı seviyelerde bağlamalarının muhtemelen farklı bakteriyel hücre duvarı yapılarından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Canlı ve cansız hücrelerin patulini detoksifiye etme özellikleri arasında büyük farkların olduğu görüşü (Fuchs ve ark. 2008), yapılan bu çalışma ile birkaç cansız LAB suşu dışında uyuşmamaktadır. Topçu ve ark. (2010), patulin detoksifikasyonunda *E. faecium* M74 ve *E. faecium* EF031 suşlarının canlı ve cansız hücreleri arasında dikkate değer farklılıkların olmadığını bildirmiştir. Benzer şekilde, El-Nezami ve ark. (2004), cansız bakterilerin aflatoksin ve zearalenon toksinlerini canlı bakterilere eşit veya onlardan daha yüksek oranlarda bağladıklarını bildirmiştir. Yukarıdaki çalışmalarla benzer sonuçlar, bizim çalışmamızda da kullanılan cansız hücreler ile elde edilmiştir. Cansız *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (NRLL B-4560) ve 22.2 nolu *Leu. mesenteroides* suşları ile, bu suşların canlı hücreleri ile elde edilen sonuçlara göre hemen hemen eşit veya daha yüksek oranda başarılar elde edilmiştir. Hatab ve ark. (2012) tarafından cansız 10 tane LAB suşu ile yapılan çalışmada, bizim çalışmamıza göre oldukça düşük (100 µg/L, 10 kat düşük) patulin derişimi ve 10^{10} cfu/ml derişimlerdeki LAB suşlarının detoksifikasyon özellikleri araştırılmış, 30 °C'de gerçekleştirilen çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* 6224 suşunun %80 oranında etkili olduğu bulunmuştur. Araştırma sonucunda, tüm suşların patulin seviyelerini %40-%80 oranlarında düşürebildiği bulunmuştur. Cansız hücrelerle

yapılan çalışmada, bu kadar yüksek başarıların elde edilmiş olmasının başlangıçtaki patulin derişimlerinin diğer çalışmalara göre 10 kat daha düşük tutulmuş olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada cansız hücreler ile elde edilen sonuçlar, *Leu. mesenteroides subs. mesenteroides* (B-512), *Lb. hilgardii* (B-1843) ve 10.1 nolu *Lb. coryniformis* suşları dışındaki cansız LAB suşlarının de benzer şekilde %24-%92 oranlarında başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Moss ve Long (2002), elma suyunun *S. cerevisiae* ile alkolik fermentasyon süresince, C₁₄-etiketli patulinin kararlılığını yitirdiğini göstermiştir. Fermentasyonların HPLC analizi, muhtemelen E- ve Z-ascladiol olduğu düşünülen iki önemli metabolitin varlığını göstermiştir (Speijers 2004). E-ascladiolun kendisinin de bir mikotoksin olduğu ve patulin ile karşılaştırıldığında daha az bir toksisiteye sahip olmakla birlikte bu mikotoksinin de sülfidril içeren bileşiklerle reaksiyona girdiği belirtilmiştir (Moake ve ark. 2005). Canlı LAB ile yapılan detoksifikasyon çalışmamızda, patulinin metabolik yollarla parçalanmış olması ihtimali, bağlanma mekanizmasından daha çok muhtemeldir. Gerçekleşen patulin parçalanması sonucunda yeni oluşan ürünlerin niteliği ve toksisitesi konusunda kesin bulgular mevcut değildir (Lawley ve ark. 2008). Ayrıca patulinin parçalanma reaksiyonu geri dönüşümlü olduğundan ortamda patulinin tekrar oluşması mümkündür. Yapılan detoksifikasyon deneylerinin bazılarında bu açıkça görüldüğü gibi bu çalışmada da bu durumun gerçekleştiği doğrulanmıştır.

Sonuç ve Öneriler:

Meyve sularında patulin varlığının aranmasını ve patulinin bakteriyel yolla detoksifikasyonunu amaçlayan bu çalışmada sonuç olarak;

1. 32 tane meyve suyunda patulin varlığı HPLC yöntemi ile incelenmiş ve 8 tanesinde (%25) patulin saptanmıştır.
2. Tespit edilen patulin seviyeleri, 24.16-281.49 µg/l arasında değişiklik göstermiştir.

3. Bu seviyeler, Türk Gıda Kodeksi'ne göre bebek ve çocuklara yönelik üretilen elma ürünlerinde izin verilen maksimum patulin sınır değeri olan 10 µg/l'den ve meyve suları ve konsantrelerinde izin verilen maksimum patulin sınır değeri olan 50 µg/l'den yüksektir. Dolayısıyla test edilen 8 örneğin tüketiminin sağlığa uygun olmadığı düşünülmektedir.

4. Patulinin bakteriyel yolla detoksifikasyonu için 13 tane laktik asit bakteri suşu kullanılmıştır. Bunların 5 tanesi ARS kültür koleksiyonundan temin edilen ve ilk defa patulin detoksifikasyonunda araştırılan *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides* (B-512), *Lactobacillus kefir* (B-1839) *Lactobacillus hilgardii* (B-1843), *Leuconostoc lactis* (B-3468) ve *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (B-4560) referans bakteri suşları, 8 tanesi ise turşulardan izole edilen *Lb. plantarum* (4.2.1, 7.8, 22.1, 23.4, 24.3), *Leu. mesenteroides* (22.2), *Lb. coryniformis* (10.1) ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* (10.2) bakterileridir.

5. Bu çalışmadaki en yüksek detoksifikasyon oranları canlı *Leu. lactis* (B-3468) suşu ile %98.73, *L. plantarum* (4.2.1, 22.1, 23.4 ve 24.3)'un 4 suşu ile sırasıyla %98.14, %98.20, %93.89 ve %97.91 ve *Leu. mesenteroides* suşu ile %97.77, cansız *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides* (B-512) suşu ile %90 ve *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (B-4560) suşu ile de %92-%93 olarak saptanmıştır ki bu değerler LAB suşlarının patulinin biyolojik detoksifikasyon çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

6. Bu çalışmada en yüksek detoksifikasyon oranlarının yukarıda belirtilen bakterilerin canlı ve cansız olarak uygulanması ile saptanması, detoksifikasyon mekanizmasının canlı hücrelerde hem hücre duvarına bağlama yoluyla hem de metabolik yollarla, cansız hücrelerde ise hücre duvarına bağlama yoluyla olabileceğini işaret etmektedir.

7. Patulinin parçalanma mekanizması ve parçalanma sonucu meydana gelen ürünlerin nitelikleri hakkında daha kesin bilgilerin ortaya konmasına yönelik çalışmalar tasarlanmalıdır.

8. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ışığında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından patulinin sıkı kontrolü için üretim öncesi, üretim

ve üretim sonrasında bu mikotoksinin rutin olarak saptanmasına yönelik yönetmeliklerin oluşturulması,

9. Meyve suyu işletmelerinin patulin kontaminasyonu probleminin en aza indirgenmesi için hijyenik koşullarda üretim yapmaları,

10. Meyve suyu üretiminde cansız LAB suşlarının gıda katkısı olarak kullanımı önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Acar J. ve Gökmen, V. (1998a), TMMOB Gıda Mühendisliği Dergisi, Alkollü ve alkolsüz içecekler, Sayı:5.
- Acar, J., Gökmen, V., Taydas, E., E. (1998b), The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production, *Z Lebensm Unters Forsch A*. 207:328–31.
- Allende, A., Tomas-Barberan, F., A., Gil, M., I. (2006), Minimal processing for healthy traditional foods, *Trends in Food Science & Technology* 17: 513–519.
- Anonim, (2004), "The Good, the Bad, and the Deadly", www.textbookofbacteriology.net/lactics.html
- Anonim, (2007), Tüketici sağlığı, yaşam kalitesi ve optimal beslenme, http://www.tupadem.hacettepe.edu.tr/tuketici_yazilari1.pdf
- Anonim, (2008), Meyve Suları, http://www.tgdf.org.tr/turkce/tgdf_raporlari/igmmeyvesulari.pdf
- Anonim, (2010a), Türkiye’ de Meyve Suyu Sanayinde Verimlilik ve Rekabet Gücünün İncelenmesi, <http://web.adu.edu.tr/user/garmagan/publication/9meyvesuyu2010.pdf>
- Anonim, (2010b), Tarım İstatistikleri Özeti, http://www.tuik.gov.tr/Kitap.do?metod=KitapDetay&KT_ID=13&KITA_P_ID=53
- Anonim, (2011), Türk Gıda Kodeksi, Gıdalardaki Bulaşanların Maksimum Limitleri, EK-1, Bölüm 2. Mikotoksinler, www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/kodeks_yonetmelik/bulasanlar_yonetmelik.html
- Anonim, (2012a), www.tr.wikipedia.org/wiki/Pastörizasyon

- Anonim, (2012b), Detailed information of microorganism genetic resources, http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_searchdetailen.php?maff=401601
- Anonim, (2012c), ARS Culture Collection (NRLL) Database Server <http://nrml.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/process.html>
- Arıcı, M. (2005), Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Çoğalması Üzerine Patulinin Etkisi, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi/ Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 2(1): 35:43.
- Arranz, I., Derbyshire, M., Kroeger, K., Mischke, C., Stroka, J., Anklam, E. (2005), Liquid Chromatographic Method for Quantitation of Patulin at 10 ng/mL in Apple-Based Products Intended for Infants: Interlaboratory Stüdyo, *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* 88(2): 518-525.
- Artık, N., Gökmen, V., Poyrazoğlu, E., Kahraman, N. (2001), Elma suyu üretiminde farklı durultma tekniklerinin üründeki patulin ve bazı kalite kriterlerine etkisi, TOGTAG-TARP PROJE No: 2049.
- Aytaç, S., A. ve Acar, J. (1994), Einfluss fon L-Ascorbinsäure und Schwefeldioxidzusatz auf die Stabilität fon Patulin in Apfelsaften und Pufferlösungen, *Ernahrung/Nutrition*, 18(1): 15–17.
- Babalola, O., O. (2003), Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria, *African J. of Biotechnol.*, 2(12): 710-713.
- Baert, K., Meulenaer, B., D., Kasase, C., Huyghebaert, A., Ooghe, W., Devlieghere, F. (2007), Free and bound patulin in cloudy apple juice, *Food Chemistry*, 100: 1278–1282.
- Barreira, M. J., Alvito, P. C., Almeida, C., M., M. (2010), Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal, *Food Chemistry* 121: 653–658.
- Batu, A., Demirdöven, A. (2010), Modifiye Atmosferde Paketleme ve Soğukta Depolamanın Elmanın Duyusal Kalitesi Üzerine Etkisi, *YYÜ TAR BİL DERG* 20(2): 58-67.

- Bissessur, J., Permaul, K., Odhav, B. (2001), Reduction of patulin during apple juice clarification, *J Food Prot* 64(8): 1216–9.
- Bonerba, E., Ceci, E., Conte, R., Tantillo, G. (2010), Survey of the presence of patulin in fruit juices, *Food Additives and Contaminants: Part B*, 3(2): 114–119.
- Brackett, R., E., Marth, E., H. (1979), Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice, *Journal of Food Protection*, 42(11): 864–866.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J., Nising, C.F. (2009), Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites, *Chemical Reviews*, 109 (9): 3903–3990.
- Burroughs, L., F. (1977), Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentations, *JAOAC* 60(1):100.
- Cai, Y. (1996), Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* from bean sprouts, University of Ottawa, Faculty of Medicine, Canada.
- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.,J., Sanchis, V. (2009), Survey of patulin in apple juice and apple products in Catalonia, Spain and an estimate of dietary intake, *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2(1): 59–65.
- Castoria, R., Morena, V., Caputo, L., Panfili, G., De Curtis, F., De Cicco, V. (2005), Effect of the Biocontrol Yeast *Rhodotorula glutinis* Strain LS11 on Patulin Accumulation in Stored Apples, *Phytopathology* 95 (11) : 1271-1278.
- Ciegler, A., Vesonder, R., F., Jackson, L., K. (1977), Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*, *Applied and Environmental Microbiology* 33 (4): 1004-1006

- Coelho, A., Celli, M., Sataque Ono, E., Hoffmann, F., Pagnocca, F., Garcia, S., Sabino, M., Harada, K. Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin J* 1: 325–331.
- Collin, S., Bodart, E., Badot, C., Bouseta, A., Nizet, S. (2008), Identification of the main degradation products of patulin generated through heat detoxification treatments, *J. Inst. Brew.* 114(2): 167–171.
- Daeschel, M., A., Fleming, H., P. (1984), Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations, *Food Microbiology* Volume 1, Issue 4, Pages 303–313.
- De Man, J., C., Rogosa, M., Sharpe, M., E. (1960), A Medium for The Cultivation of *Lactobacilli*, *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130- 138.
- Dickens, F., Jones, H., E., H. (1961), Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances, *Brit J Cancer* 15: 85–100.
- Dombrink-Kurtzman, M., A. (2006), The isoeipoxydon dehydrogenase gene of the patulin metabolic pathway differs for *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium expansum*, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 89: 1 –8.
- Dunnick, J., K. ve O’Leary, W., M. (1970), Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic resistance, *Journal of Bacteriology*, 892-900.
- Durmuş, E., Yiğit, A. (2003), Türkiye’nin Meyve Üretim Yöreleri, *Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi* 13 (2) : 23-54.
- Drusch, S., Kopka, S., Kaeding, J. (2007), Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid, *Food Chemistry* 100: 192–197.
- Edizer, Y., Bekar, T. (2007), Tokat Merkez İlçede Yetiştirilen Bazı Yerel Elma (*Malus communis* L.) Çeşitlerinin Fenolojik ve Pomolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi* 24 (1): 1-8.

- Ekinci, K., Akbolat, D., Demircan, V., Ekinci, Ç. (2012), Isparta İli Elma Üretiminde Enerji Kullanım Etkinliğinin Belirlenmesi, http://www.emo.org.tr/ekler/04b7f668328dab6_ek.pdf
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998), Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1, *Food Chem. Toxicol.* 36: 321–326.
- El-Nezami, H., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkänen, H. (2002), Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*, *Food Additives and Contaminants* 19: 680–686.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y., K., Haskard, C., A., Juvonen, R., Salminen, S., Mykkanen, H. (2004), Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG, *J. Agric. Food Chem.* 52: 4577–4581.
- Ertas, Ö., S., Kayali, A. (2005), Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış, *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 34 (1) 41 – 57.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *FAOSTAT – Agricultural statistics database.* 2006. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 02 abr. 2007.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmüller, S. (2008), Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria, *Food and Chemical Toxicology* 46: 1398– 1407.
- Fremy, J., M., Castegnaro, M., J., Gleizes, E., De Meo, M., Laget, M. (1995), Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes, *Food Addit Contam* 12: 864–6.
- Gökmen, V. ve Acar, J. (1998), Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey, *Journal of Chromatography A*, 815: 99–102.

- Gökmen, V., Acar, J., Sarıoğlu, K. (2005), Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction, *Analytica Chimica Acta* 543: 64–69.
- Harris, L., J., Fleming, H., P., Klaenhammer, T., R. (1992), Novel Paired Starter Culture System for Sauerkraut, Consisting of a Nisin-Resistant *Leuconostoc mesenteroides* Strain and a Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strain, *Applied and Environmental Microbiology* 58 (5):1484-1489.
- Hatab, S., Yue, T., Mohamad, O. (2012), Removal of patulin from apple juice using inactivated lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology* 112: 892–899.
- Hayashi, R., (2002). Trends In High Pressure Bioscience and Biotechnology, Elsevier, Progress in Biotechnology 19: 349.
- Hayes, A., W., Phillips, T., D., Williams, L., Ciegler, A. (1979), Acute toxicity of patulin in mice and rats, *Toxicology*, 13: 91-100.
- He, J., Tsao, R., Yang, R., Zhou, T. (2009), Purification of patulin from *Penicillium expansum* culture: high-speed counter-current chromatography (HSCCC) versus preparative high-performance liquid chromatography (prep-HPLC), *Food Additives and Contaminants* 26(1): 101–107.
- Horvath, E., Papp, G., Belagyi, J., Gazdag, Z., Vagvölgyi, C., Pesti, M. (2010), In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Food and Chemical Toxicology* 48:1898–1904.
- Hosono, A., Yoshimura, A., Otani, H. (1988), Desmutagenic property of cell walls of *Streptococcus faecalis* on the mutagenicities induced by amino acid pyrolysates, *Milchwissenschaft* 43:168–170.
- Iha, M., H., Sabino, M. (2008), Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks, *Food Control* 19: 417–422.

- Kadalkal, Ç., Nas, S., Poyrazoğlu, E., Şimşek, A. (2003a), Elma çürüklük düzeyinin elma suyuna patulin ve fumarik asit düzeyine etkisi, *Gıda* 28 (3): 259-266.
- Kadalkal, Ç. ve Nas, S. (2003b), Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice, *J Sci Food Agric* 83:987–990.
- Karaca, H. (2005), Kuru incirlerin aflotoksin, patulin, ergosterol içeriği ve farklı koşullarda aflotoksinlerin parçalanma düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Karaca, H. ve Velioğlu, Y., S. (2009), Effects of some metals on chelating agents on patulin degradation by ozone, *Ozone: Science & Engineering*, 31: 224–231.
- Karaca, H., Velioğlu, Y., S., Nas, S. (2010), Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone, *Toxin Reviews*; 29(2): 51–59.
- Karav, S. (2009), Farklı türden meyve sularının doğal sorbitol içeriği, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Keleş, F. (1979), Erzurum, Kars, Erzincan ve Gümüşhane illerinde yetiştirilen önemli elma çeşitlerinden askorbik asit katılarak elde edilen elma sularının ambarlanması sırasında bünyelerinde meydana gelen kimyasal ve fiziksel değişmeler üzerinde araştırmalar (1), Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Erzurum.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu Ö. (2011), Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 27(1): 62-74.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998), Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 4:103–125.

- Knasmüller, S., Steinkellner, H., Hirschl, A., M., Rabot, S., Nobis, E., C., Kassie, F. (2001), Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines, *Mutation Research* 480–481:129–138.
- Koçkaya, E., A., Selmanoğlu, G., Özsoy, N., Gül, N. (2009), Evaluation of patulin toxicity in the thymus of growing male rats, *Arti Hig Rada Toksikol*, 60:411-418.
- Kokkinidou, S. (2008), Degradation kinetics of patulin by ascorbic acid and development of predictive model using response surface methodology, A thesis in food science, Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010), Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86:1595–1612.
- Lawley, R., Curtis, L., Davis, J. (2008), Patulin, The Food Safety Hazard Guidebook. Royal Society of Chemistry Publishing, p. 213-216.
- Leggott, N., L., Shephard, G., S. (2001), Patulin in South Africa commercial apple products, *Food Control* 12:73–76.
- Li, J., Wu, R., Hu, Q., Wang, J. (2007), Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate, *Food Control* 18:530–534.
- Lu, Z., Breidt, Jr. F., Fleming H., P., Altermann, E., Klaenhammer, T., R. (2003), Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ϕ JL-1, from cucumber fermentations, *International Journal of Food Microbiology* 84:225– 235.

- Madigan, M., T., Martinko, J., M., Brock, T., D. (2006), Brock Biology of Microorganisms. 11th ed., Upper Saddle River, N.J. : Pearson /Prentice Hall.
- Moake, M., M., Padilla-Zakour, O., I., Worobo, R., W. (2005), Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 8-21.
- Moss, M., O., Long, M., T. (2002), Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants*, 13:57-9.
- Morales, H., Marin S., Ramos, A., J., Sanchis, V. (2010), Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A Review, *Food Control*, 21:953–962.
- Moukas, A., Panagiotopoulou, V., Markaki, P. (2008), Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques, *Food Chemistry* 109(4):860-867.
- Murillo-Arbizu, M., Gonzalez-Penas, E., Amezcua, S. (2010), Comparison between Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography for the study of the occurrence of patulin in apple juice intended for infants, *Food and Chemical Toxicology* 48:2429-2434.
- Miller, L., Berger, T. (1985), Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard Application Note 228–41, Hewlett-Packard, Avondale, Pennsylvania 8 p.
- Paterson, R., R., M., Archer, S., Kozakiewicz, Z., Lea, A., Locke, T., O'Grady, E. (2000), A gene probe for the patulin metabolic pathway with potential for use in patulin and novel disease control, *Biocontrol Science and Technology* 10:509- 512.
- Paterson, R., R., M., Kozakiewicz, Z., Locke, T., Brayford, D., Jones, S., C., B. (2003), Novel use of the isoeopoxydon dehydrogenase gene probe of the

patulin metabolic pathway and chromatography to test penicillia isolated from apple production systems for the potential to contaminate apple juice with patulin, *Food Microbiology* 20:359–364.

Paterson, R., R., M., Venancio, A., Lima, N. (2004), Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health, *Research in Microbiology*, 155:507–513.

Paterson, R., R., M. (2006), Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR, *Process Biochemistry* 41:1467–1474.

Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. (2001), Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Journal of Dairy Science* 84:2152–2156.

Randhawa, S., Brashears, M., M., McMahon, K., W., Fokar, M., Karunasena, E. (2010), Comparison of phenotypic and genotypic methods used for the species identification of *Lactobacillus* NP51 and development of a strain-specific PCR assay, *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2:274–283.

Reddy, K., R., N., Spadaro, D., Gullino, M., R., Garibaldi, A. (2011), Potential of two *Metschnikowia pulcherrima* (yeast) strains for in vitro biodegradation of patulin, *J. Food Prot.* 74(1):154-156.

Ricelli, A., Baruzzi, F., Solfrizzo, M., Morea, M., Fanizzi, F., P. (2007), Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 73(3):785–792.

Roseanu, A., Jecu, L., Badea, M., Evans, R., W. (2010), Mycotoxins: An overview on their quantification methods, *ROM. J. BIOCHEM.* 47 (1): 79–86.

Sanchez, I., Palop, L., Ballesteros, C. (2000), Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of ‘Almagro’ eggplants, *International Journal of Food Microbiology* 59:9–17.

- Sasser, M. (1990), Microbial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME), http://www.midi-inc.com/pdf/MIS_Technote_101.pdf
- Schachtsiek, M., Hammes, W., P., Hertel, C. (2004), Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001^T Surface Protein Cpf Mediating Coaggregation with and Aggregation among Pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12):7078.
- Silva, S., J., N., Schuch, P., Z., Bernardi, C., R., Vainstein, M., H., Jablonski, A., Bender, R. (2007), Patulin in Food: State-of-the-art and analytical trends, *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, 29 (2): 406-413.
- Spadaro, D., Ciavarella, A., Frati, S., Garibaldi, A., Gullino, M., L. (2007), Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy, *Food Control* 18:1098–1102.
- Speijers, G., J., A. (2004), Patulin, Mycotoxins in Food: Detection and Control, (Ed: Magan, N., Olsen, M), Cambridge:Woodhead Publishing, 339-352.
- Steiner, I., Werner, D., Washüttl, J. (1999), Patulin in Obstsäften, II. Patulinabbau, *Ernahrung/Nutrition*, 23(6):251–255.
- Sutton, S., V., W., Cundell, A., M. (2004), Microbial identification in the pharmaceutical industry, *Pharmacoepial Forum*, 30(5): 1884-1894.
- Swetwivathana, A., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2009), Identification of Nisin Z producing *Lactococcus lactis* N12 associated with traditional Thai fermented rice noodle (KanomJien), *As. J. Food Ag-Ind.* 2(02):116-125.
- Şahin, İ. (1982), Asit Fermentasyonları, A. Ü. Ziraat Fakültesi Teksir No: 78, Ankara, 142s.
- Tangüler, H. ve Erten, H. (2006), Gıdalarda Bulunan bir Laktik Asit Bakterisi: Weissella, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.

[www.gidadernegi.org/TR/Genel/dg.ashx?DIL=1&BELGEANAH=1274
&DOSYASIM=240934314.pdf](http://www.gidadernegi.org/TR/Genel/dg.ashx?DIL=1&BELGEANAH=1274&DOSYASIM=240934314.pdf)

- Tangüler, H. (2010), Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tangni, E., K., Theys, R., Mignolet, E., Maudoux, M., Michelet, J., Y., Larondelle, Y. (2003), Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment, *Food Additives and Contaminants* 20(5):482–489.
- Topçu, A., Bulat, T., Wishah, R., Boyacı, İ., H. (2010), Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains, *International Journal of Food Microbiology* 139:202–205.
- Valle-Algarra, F., M., Mateo, E., M., Gimeno-Adelantado, J., V., Mateo-Castro, R.(2009), Optimization of clean-up procedure for patulin determination in apple juice and apple purees by liquid chromatography, *Talanta* 80:636–642.
- Welke, J., E., Hoeltz, M., Dottori, H., A., Noll, I., B. (2010), Fungi and patulin in apples and the role of processing on patulin levels in juices: a study on naturally contaminated apples, *Journal of Food Safety* 30:276–287.
- Woller, R. ve Majerus, P. (1982), Patulin in Obsterzeugnissen-egenschaften, Bildung und Vorkommen, *Flüssiges Obst* 49:564–570.
- Wu, R., Han, F., Shang, J., Hu, H., Han, L. (2009), Analysis of patulin in apple products by liquid-liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: a comparative study, *Eur Food Res Technol* 228:1009–1014.
- Yıldırım, T. (2007), Laktik Asit Bakterilerine (LAB) Ait Bazı Türlerin AFLP (Çoğaltılan Parça Boy Farklılaşması) Yöntemi ile Parmak İzi Analizleri,

Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Yue, T., Dong, Q., Guo, C., Worobo, R., W. (2011), Reducing patulin contamination in apple juice by using inactive yeast, *J Food Prot* 74:149–153.

Yun, H., Lim, S., Yang, S., H., Lee, W., Y., Kwon, J., Lim, B., L., Kim, D. (2008), Effect of gamma irradiation on the growth and patulin production of *Penicillium griseofulvum* in an apple model system, *Food Sci. Biotechnol.* 17(4):723-727.

Zegota, H., Zegota, A., Bachmann, S. (1988), Effect of irradiation and storage on patulin disappearance and some chemical constituents of apple juice, *Z Lebensm Unters Forsch* 187:321–4.

Ek: Deney Sonuçları

