



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences

**ULTRASONLA AKTİVE VE ISI, ASİT,
ULTRASONLA İNAKTİVE EDİLMİŞ LAKTİK
ASİT BAKTERİLERİNİN SÜTTE AFLATOKSİN
M₁ BAĞLAMA DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

TEVHİDE ELİF GÜNER

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 10102.10



BALIKESİR

2025

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ULTRASONLA AKTİVE VE ISI, ASİT, ULTRASONLA İNAKTİVE
EDİLMİŞ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN SÜTTE AFLATOKSİN M₁
BAĞLAMA DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

TEVHİDE ELİF GÜNER

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HAKAN TAVŞANLI**

**ORTAK/İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FİGEN ÇETİNKAYA**

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 10102.10

BALIKESİR

2025



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ KABUL VE ONAY

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde **Tevhide Elif GÜNER** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

**“Ultrasonla Aktive ve Isı, Asit, Ultrasonla İnaktive Edilmiş Laktik Asit
Bakterilerinin Sütte Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeylerinin Araştırılması”**

başlıklı tez çalışması,
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından

DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10 / 01 / 2025

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Filiz KÖK
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
(Başkan)

Doç. Dr. Hakan TAVŞANLI
Balıkesir Üniversitesi
Üye **(Danışman)**

Prof. Dr. İzzet KARAHAN
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Osman İrfan İLHAK
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Recep KARA
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Doktora Tezi,
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 20/01/2025 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI
Enstitü Müdürü

BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıpları kabullendiğimi **beyan ederim.**

20/01/2025

İmza

Tevhide Elif GÜNER

İTHAF

Değerli Anneme/Eşime/Oğluma...

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamın konusunun belirlenmesi, araştırılması ve yürütölmesi sırasında olduğu kadar lisansüstü eğitimimde de desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hakan TAVŞANLI'ya,

Lisansüstü eğitimimde bana her daim bilimsel katkılarını sunan Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Baőkanı Sayın Prof. Dr. Osman İrfan İLHAK'a, Sayın Doç. Dr. Mukadderat GÖKMEN'e. Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İzzet Karahan'a

HPLC analizi için Tıp Faköltesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cengiz GÖKBULUT ve Veteriner Hekim Dr. Bűra ASLAN AKYOL'a

Tez çalıőmamdaki desteklerinden dolayı Araő. Gör. Buse ÖZTÜRK, Doktora Öğrencisi Aslıhan AYALP ERKAN ve Doktora Öğrencisi Ezgi TEGÜN'e

sonsuz teőekkür ve őükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Küfler	4
2.2. Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler	5
2.3. Aflatoksinler	5
2.4. Gıdalarda Küf ve Mikotoksin Sorunu	9
2.5. Mikotoksin Kontrol Yöntemleri.....	13
2.6. Mikotoksin Detoksifikasyon Yöntemleri.....	13
2.7. Laktik Asit Bakterileri	15
2.8. Biyolojik Detoksifikasyon ve Mekanizması	20
2.9. Süte Uygulanan Ultrasonun Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Etkileri.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Aflatoksin M ₁ Standardı.....	27
3.1.2. Test Bakterileri	27
3.1.3. Besi Yerleri, Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	27
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Mikroorganizma Stoklarının Hazırlanması	29
3.2.2. Stok Mikroorganizmaların Canlandırılması	29
3.2.3. Mikroorganizma Yoğunluğunun Belirlenmesi	29
3.2.4. Çalışmada Kullanılacak Laktik Asit Bakteri Hücrelerinin Elde Edilmesi	30
3.2.5. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Çözeltilisinin Hazırlanması.....	31
3.2.6. UHT Yağsız süt	31
3.2.7. Aflatoksin M ₁ Standardının Hazırlanması	31
3.2.8. Aflatoksin M ₁ Miktarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi	32

3.2.9. Çalışma Grupları.....	37
3.2.10. Detoksifikasyonun Tespiti	45
3.2.11. Çalışma Gruplarının Kısaltmaları.....	46
3.2.12. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Mikrobiyolojik Ekim Sonuçları	48
4.2. Çalışma Gruplarının Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi.....	49
4.2.1. Kontrol Gruplarının AFM ₁ Bağlama Düzeyi	49
4.2.2. Canlı Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi.....	49
4.2.3. Isı ile İnaktif Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi	51
4.2.4. Asit ile İnaktif Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi	52
4.2.5. PBS İçerisinde Ultrason ile Aktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi.....	53
4.2.6. PBS içerisinde Ultrason ile İnaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyleri.....	55
4.2.7. UHT Yağsız Süt İçerisinde Ultrason ile Aktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi	56
4.2.8. UHT Yağsız Süt İçerisinde Ultrason ile İnaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi.....	58
4.2.9. Canlı Bakteri Gruplarının Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi.....	59
4.2.10. İnaktif Bakteri Gruplarının Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi.....	60
4.2.11. PBS ve UHT Yağsız Süt Ortamında Ultrason ile Aktifleştirilmiş ve İnaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M ₁ Bağlama Düzeyi....	62
4.2.12. Tüm Çalışma Gruplarının AFM ₁ Bağlama Düzeyi	64
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	86
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ÖZET

ULTRASONLA AKTİVE VE ISI, ASİT, ULTRASONLA İNAKTİVE EDİLMİŞ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN SÜTTE AFLATOKSİN M₁ BAĞLAMA DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İnsan ve hayvan beslenmesinde aflatoksinler, toksik etkileri ile ekonomik kayıplara ve sağlık açısından büyük tehlikelerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu etkileri gidermenin yolu aflatoksin sindiriminin veya emiliminin engellenmesidir. Bu anlamda çalışmanın amacı, laktik asit bakterilerine (*Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* ve bakteriler bir arada kullanıldığında) farklı aktivasyon (ultrason) ve inaktivasyon (ısı, asit ve ultrason) uygulamalarının UHT yağsız süt ortamında, aflatoksin M₁ bağlama etkinliğini araştırmaktır.

Çalışmanın sonucunda tüm uygulama gruplarındaki aflatoksin M₁ bağlama oranı, kontrol gruplarına göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı zamanda UHT yağsız süt içerisinde ultrason uygulanan gruplarda aflatoksin M₁ bağlama düzeyinin, kontrol gruplarına göre $p<0.01$ düzeyinde anlamlı olduğu belirlenmiştir. UHT yağsız süt ortamında ultrason uygulanan grupların aflatoksin M₁ bağlama oranı (%34-43.5), canlı, ısı ve asit ile inaktifleştirilen grupların yanı sıra fosfat tamponlu tuzlu su ortamında ultrason ile aktif/inaktifleştirilen grupların bağlama oranından (%16.5-27.5) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). UHT yağsız süt ortamında ultrason ile inaktifleştirilen grupta, bakteriler tek başına veya bir arada kullanıldığında grup içi bağlama oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ancak, UHT yağsız süt ortamında ultrasonla aktifleştirilen grupta, bakterilerin bir arada kullanıldığı grup (%34) ile *Lactobacillus acidophilus* (%43) grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). UHT yağsız süt ortamında bir arada aktifleştirilen bakterilerin aflatoksin M₁ bağlama oranı (%34) ile bir arada inaktifleştirilen bakterilerin bağlama oranı (%43) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bunun yanında en yüksek bağlama UHT yağsız süt ortamında ultrason ile inaktifleştirilen *Lacticaseibacillus rhamnosus* grubunda (%43.5), en düşük bağlama ise aktifleştirilen bakterilerin bir arada kullanıldıkları grupta (%34) belirlenmiştir ($p<0.05$). UHT yağsız süt ortamında ultrason ile aktifleştirilen bakteri

grubunda en yüksek bağlama kapasitesi *Lactobacillus acidophilus*'da (%43), inaktifleştirilen bakteri grubunda ise en düşük bağlama oranı *Lactobacillus acidophilus*'da (%40.5) saptanmıştır ($p>0.05$). UHT yağsız süt ortamında ultrason uygulanan gruplar dışında, bakteri türlerinin (canlı ve ısı ile inaktif *Limosilactobacillus reuteri* hariç) gruplar arası bağlama oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ancak canlı *Limosilactobacillus reuteri*'nin bağlama oranı (%28) ile ısı ile inaktif hale getirilmiş *Limosilactobacillus reuteri*'nin bağlama oranı (%16.5) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmada, UHT yağsız süt ortamında ultrason uygulamasının diğer gruplara göre daha etkili olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Bu çalışma aflatoksin M₁ detoksifikasyonunda, probiyotik bakterilerin süt içerisinde farklı inaktivasyon ve aktivasyon yöntemleri uygulanarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M₁, detoksifikasyon, laktik asit bakterileri, ultrason.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF AFLATOXIN M₁ BINDING LEVELS OF ULTRASOUND ACTIVATED AND HEAT, ACID, ULTRASOUND INACTIVATED LACTIC ACID BACTERIA IN MILK

Aflatoxins in human and animal nutrition cause significant economic losses and pose serious health risks due to their toxic effects. The way to mitigate these effects is to prevent the digestion or absorption of aflatoxins. In this context, the aim of the study was to investigate the efficacy of aflatoxin M₁ binding in *Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* (individually and in combination) under different activation (ultrasound) and inactivation (heat, acid, and ultrasound) treatments in an ultra-high temperature (UHT) skim milk medium.

The study found that the aflatoxin M₁ binding rate in all treatment groups was statistically significant compared to the control groups ($p < 0.05$). Additionally, in the groups where ultrasound was applied in UHT skim milk medium, the aflatoxin M₁ binding level was significantly higher than in the control groups ($p < 0.01$). The aflatoxin M₁ binding rate of the groups subjected to ultrasound in UHT skim milk medium (34-43.5%) was statistically significantly higher than that of the live, heat-, and acid-inactivated groups, as well as those activated/inactivated by ultrasound in phosphate-buffered saline medium (16.5-27.5%) ($p < 0.01$). In the UHT skim milk medium, no statistically significant difference was observed in the binding rates within the group where bacteria were inactivated by ultrasound, either individually or in combination ($p > 0.05$). However, in the group activated by ultrasound in the UHT skim milk medium, a statistically significant difference was observed between the group where bacteria were used in combination (34%) and the *Lactobacillus acidophilus* group (43%) ($p < 0.05$). A statistically significant difference was also detected between the binding rate of bacteria activated together in UHT skim milk medium (34%) and the binding rate of bacteria inactivated together (43%) ($p < 0.05$). Furthermore, the highest binding was observed in the *Lacticaseibacillus rhamnosus* group inactivated by ultrasound in UHT skim milk medium (43.5%), while the lowest binding was found in the group where bacteria were used in combination and activated by ultrasound (34%) ($p < 0.05$). Among the bacteria activated by ultrasound in UHT skim milk

medium, the highest binding capacity was recorded in *Lactobacillus acidophilus* (43%), while among those inactivated by ultrasound, the lowest binding rate was also observed in *Lactobacillus acidophilus* (40.5%) ($p>0.05$). Except for the groups treated with ultrasound in UHT skim milk medium, no statistically significant difference was detected in the binding rates of bacterial species (except for live and heat-inactivated *Limosilactobacillus reuteri*) among the groups ($p>0.05$). However, a statistically significant difference was found between the binding rate of live *Limosilactobacillus reuteri* (28%) and that of heat-inactivated *Limosilactobacillus reuteri* (16.5%) ($p<0.05$).

The study demonstrated that ultrasound treatment in UHT skim milk medium was more effective than other methods ($p<0.01$). This study suggests that probiotic bacteria can be used for aflatoxin M₁ detoxification in milk through different activation and inactivation methods.

Keywords: *Aflatoxin M₁, detoxification, lactic acid bacteria, ultrasound.*

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
aw	: Water Activitiy (Su Aktivitesi)
ACN	: Acetonitrile (Asetonitril)
AD	: Asit ile Denatüre Olmuş LAB + UHT Yağsız Süt+Aflatoksin M ₁
AFB ₁	: Aflatoksin B ₁
AFB ₂	: Aflatoksin B ₂
AFG ₁	: Aflatoksin G ₁
AFG ₂	: Aflatoksin G ₂
AFM ₁	: Aflatoksin M ₁
AFM ₂	: Aflatoksin M ₂
CB	: Canlı Laktik Asit Bakterileri + UHT Yağsız Süt + Aflatoksin M ₁
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri)
CFS	: Cell Free Supernatant (Hücresiz Süpernatant)
CO ₂	: Karbondioksit
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzime bağlı immünosorban yöntem)
FAO	: Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
gr	: Gram
GRAS	: Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenli Kabul Edilir)
HCl	: Hydrochloric Acid (Hidroklorik Asit)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
IARC	: International Agency For Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)

ID	: Isı ile Denatüre Olmuş Laktik Asit Bakterileri + UHT Yağsız Süt+ Aflatoksin M ₁
K	: Kelvin
kg	: Kilogram
kob	: Koloni Oluşturan Birim
K	: UHT Yağsız Süt + Aflatoksin M ₁ (Kontrol)
KUA	: UHT Yağsız Süte Aktivasyon Düzeyinde Ultrason Uygulaması + Aflatoksin M ₁ (Kontrol)
KUİ	: UHT Yağsız Süte Aktivasyon Düzeyinde Ultrason Uygulaması + Aflatoksin M ₁ (Kontrol)
L	: Litre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LOD	: En Küçük Tespit Limiti
LOQ	: En Küçük Yoğunluk Belirleme Limiti
M	: Molar
McF	: Mac Farland
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
ml	: Mililitre
Mix	: Bir Arada kullanılan <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> Bakterileri
MRD	: Maximum Recovery Diluent
MRS	: DeMan, Rogosa and Sharpe
ng	: Nanogram (One Billionth of a Gram, Gramın Milyarda Biri)
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfatla Tamponlanmış Tuzlu Su)
pH	: Power Of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
r ²	: Korelasyon Katsayısı
RASFF	: Rapid Alert System for Food and Feed (Gıda ve Yem İçin Hızlı Uyarı Sistemi)
sn	: Saniye
SUA	: UHT Yağsız Süt İçerisinde Ultrason ile Aktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterileri + UHT Yağsız Süt+ Aflatoksin M ₁

SUİ	: UHT Yağsız Süt İçerisinde Ultrason ile İnaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterileri + UHT Yağsız Süt+ Aflatoksin M ₁
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TLC	: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
UA	: PBS İçerisinde Ultrason ile Aktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterileri + UHT Yağsız Süt + Aflatoksin M ₁
UHT	: Ultra High Temperature (Ultra Yüksek Isı)
Uİ	: PBS İçerisinde Ultrason ile inaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterileri + UHT Yağsız Süt + Aflatoksin M ₁
US	: Ultrason
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Çalışmada Kullanılacak LAB Hücrelerinin Elde Edilmesi	30
Şekil 3.2. 1 ng/ml Yoğunluğundaki AFM ₁ 'in Standart Kromatogram Görüntüsü	32
Şekil 3.3. Çalışmada Kullanılan HPLC Cihazı	32
Şekil 3.4. 5 ng/ml Yoğunluğundaki Standart Kromatogram Görüntüsü	33
Şekil 3.5. 50 ng/ml Yoğunluğundaki Standart Kromatogram Görüntüsü	33
Şekil 3.6. AFM ₁ Analizi İçin Standart Kalibrasyon Eğrisi	34
Şekil 3.7. Boş UHT Yağsız Süt Kromatogram Görüntüsü	35
Şekil 3.8. 1 ng/ml AFM ₁ Yoğunluğunda Hazırlanan UHT Yağsız Süt Örneğinin Kromatogram Görüntüsü	35
Şekil 3.9. 2 ng/ml AFM ₁ Yoğunluğunda Hazırlanan UHT Yağsız Süt Örneğinin Kromatogram Görüntüsü	36
Şekil 3.10. 5 ng/ml AFM ₁ Yoğunluğunda Hazırlanan UHT Yağsız Süt Örneğinin Kromatogram Görüntüsü	36
Şekil 3.11. Canlı Bakteri Grubundaki Bakteri Peletlerinin Elde Edilmesi	38
Şekil 3.12. Isı ile Denatüre Bakteri Grubundaki Bakteri Peletlerinin Elde Edilmesi	39
Şekil 3.13. Asit ile Denatüre Bakteri Grubundaki Bakteri Peletlerinin Elde Edilmesi	40
Şekil 3.14. PBS İçerisinde US Uygulanan Gruplarda Bakteri Peletlerinin Elde Edilmesi	42
Şekil 3.15. PBS İçerisinde US Uygulamasının Görüntüsü	42
Şekil 3.16. Kontrol Grubunda Uygulama Aşaması	43
Şekil 3.17. UHT Yağsız Süt İçerisinde US Uygulanan Gruplarda Çalışma Aşamaları	44
Şekil 3.18. UHT Yağsız Süt İçerisinde US Uygulamasının Görüntüsü	44
Şekil 3.19. UHT Yağsız Süt İçerisinde US Uygulanan Grupların Kontrol Gruplarındaki Çalışma Aşamaları	45
Şekil 3.20. Tüm Çalışma ve Kontrol Gruplarında AFM ₁ Detoksifikasyonun Tespiti	46
Şekil 4.1. Mix LAB'lerin CB Grubundaki AFM ₁ Kromatogram Görüntüsü	50
Şekil 4.2. Mix LAB'lerin ID Grubundaki AFM ₁ Kromatogram Görüntüsü	52
Şekil 4.3. Mix LAB'lerin AD Grubundaki AFM ₁ Kromatogram Görüntüsü	53
Şekil 4.4. Mix LAB'lerin UA Grubundaki AFM ₁ Kromatogram Görüntüsü	54

Şekil 4.5. Mix LAB'lerin UI Grubundaki AFM ₁ Kromatogram Görüntüsü	56
Şekil 4.6. Mix LAB'lerin SUA Grubundaki AFM ₁ Kromatogram Görüntüsü	57
Şekil 4.7. Mix LAB'lerin SUI Grubundaki AFM ₁ Kromatogram Görüntüsü	59

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. IARC'nin İnsanlarda Kansere Yapıcı Etkisini Değerlendirdiği Maddeleri Sınıflandırmada Kullandığı Kategoriler (IARC, 2002).	8
Tablo 3.1. HPLC Analizi ile AFM ₁ İçin Belirlenen Validasyon Parametreleri	37
Tablo 4.1. Çalışma Gruplarında Kullanılan LAB Sayıları (kob/ml)	48
Tablo 4.2. Kontrol Gruplarında 2 ng/ml'lik Kontaminasyonuna Göre AFM ₁ Düzeyi	49
Tablo 4.3. 2 ng/ml'lik AFM ₁ Kontaminasyonuna Göre Canlı Bakterilerin UHT Yağsız Süt Ortamında AFM ₁ Bağlama Düzeyi.....	50
Tablo 4.4. 2 ng/ml'lik AFM ₁ Kontaminasyonuna Göre Isı ile İnaktif Bakterilerin UHT Yağsız Süt Ortamında AFM ₁ Bağlama Düzeyi	51
Tablo 4.5. 2 ng/ml'lik AFM ₁ Kontaminasyonuna Göre Asit ile İnaktif Bakterilerin UHT Yağsız Süt Ortamında AFM ₁ Bağlama Düzeyi	52
Tablo 4.6. 2 ng/ml'lik AFM ₁ Kontaminasyonuna Göre PBS İçerisinde US ile Aktifleştirilmiş Bakterilerin UHT Yağsız Süt Ortamında AFM ₁ Bağlama Düzeyi... ..	54
Tablo 4.7. 2 ng/ml'lik AFM ₁ Kontaminasyonuna Göre PBS İçerisinde US ile İnaktifleştirilmiş Bakterilerin UHT Yağsız Süt Ortamında AFM ₁ Bağlama Düzeyi	55
Tablo 4.8. 2 ng/ml'lik AFM ₁ Kontaminasyonuna Göre UHT Yağsız Süt İçerisinde US ile Aktifleştirilmiş Bakterilerin UHT Yağsız Süt Ortamında AFM ₁ Bağlama Düzeyi	57
Tablo 4.9. 2 ng/ml'lik AFM ₁ Kontaminasyonuna Göre UHT Yağsız Süt İçerisinde US ile İnaktifleştirilmiş Bakterilerin UHT Yağsız Süt Ortamında AFM ₁ Bağlama Düzeyi	58
Tablo 4.10. 2 ng/ml'lik Kontaminasyona Göre Canlı Bakteri Gruplarının AFM ₁ Konsantrasyonu ± Standart Sapma (% Bağlama Oranı)	60
Tablo 4.11. 2 ng/ml'lik Kontaminasyona Göre İnaktif Bakteri Gruplarının AFM ₁ Konsantrasyonu ± Standart Sapma (% Bağlama Oranı)	62
Tablo 4.12. 2 ng/ml'lik Kontaminasyona Göre PBS Ve UHT Yağsız Süt İçerisinde Aktifleştirilmiş Ve İnaktifleştirilmiş Bakteri Gruplarının AFM ₁ Konsantrasyonu ± Standart Sapma (% Bağlama Oranı)	64
Tablo 4.13. 2 ng/ml'lik Kontaminasyona Göre Tüm Çalışma Gruplarının AFM ₁ Konsantrasyonu ± Standart Sapma (% Bağlama Oranı)	66

1. GİRİŞ

Aflatoksinler, *Aspergillus* türleri tarafından üretilen, organizmalar için zararlı olan, bağışıklık baskılayıcı, mutajenik, teratojenik ve kanserojen olabilen toksik metabolitlerdir (Sarlak ve ark., 2017; Serrano-Niño ve ark., 2013). Başlıca aflatoksin türleri arasında aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin G₁ (AFG₁) ve aflatoksin G₂ (AFG₂) yer almaktadır. Tarımsal gıda ürünlerinde en toksik ve yaygın olanı ise AFB₁'dir. Aflatoksin M₁ (AFM₁), AFB₁ ile kirlenmiş yemleri tüketen geniş getiren hayvanların karaciğerinde biyotransforme olan AFB₁'in 4-hidroksi türevidir. AFM₁, glukuronik asitle bağlanarak safra yoluyla atılabilir veya sistemik dolaşıma katılabilir. Sistemik dolaşıma giren AFM₁, doğrudan vücuttan atılabileceği gibi süte de geçiş yapabilir. Dolayısı ile sütte AFM₁ birikimine neden olmaktadır (Fashandi ve ark., 2018; Marchese ve ark., 2018). Süt toksini olarak da adlandırılan AFM₁'in sitotoksik, genotoksik ve kanserojen etkileri gösterilmiştir (Bovo ve ark., 2013; Sarlak ve ark., 2017). Aynı zamanda AFM₁, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (The International Agency for Research on Cancer) tarafından Grup 1 insan kanserojeni olarak da bildirilmiştir (The International Agency for Research on Cancer [IARC], 2002).

Türkiye'deki süt ve süt ürünlerinde rastlanan AFM₁ düzeyinin sistematik olarak incelendiği bir çalışmada (2006-2016 yılları arasında) örneklerin %49'unda AFM₁ tespit edildiği, %21'inin ise yasal sınırların üzerinde AFM₁ içerdiği bildirilmiştir (Ünusan, 2019). Bu durum süt ve süt ürünleri yoluyla aflatoksinlere maruziyetin günümüzde devam ettiğini göstermiş olup güvenli süt ve süt ürünleri sağlamak için mikotoksin dekontaminasyon prosedürlerinin geliştirilmesi son derece önemlidir (Wochner ve ark., 2019).

Besin açısından zengin bir gıda olan süt, insan sağlığını destekleme, büyüme ve gelişmeyi kolaylaştırmada önemli bir rol oynar. Büyümeyi sürdürmek, enerji sağlamak, üreme fonksiyonlarını desteklemek, bakım ve onarım süreçlerini kolaylaştırmak, iştahı azaltmak ve genel refahı korumak için çok önemli olan bir dizi

temel makro ve mikro besine sahiptir (Tadesse ve ark., 2024). Süt ve süt ürünleri önemli besin kaynakları olduğundan, bu ürünlerin AFM₁ ile kontaminasyonu insan sağlığı için potansiyel bir risktir. Özellikle çocukların ve gençlerin 2-4 porsiyon, ileri yaşlardaki kişilerin 3 porsiyon süt ve süt ürünleri tüketimi önerilmektedir (Besler ve ark., 2015). Ancak bağışıklık sistemi hassas olan bireyler ve bebeklerin sütte bulunabilecek toksik maddelerden daha büyük zarar göreceği göz önünde bulundurulduğunda AFM₁'e maruziyetin azaltılmasına yönelik stratejilere gereksinim duyulmaktadır (Yılmaz ve Ozay, 2001).

AFM₁ endüstriyel termal işlemlere karşı dirençlidir, bu nedenle sütte AFM₁ bulunması tüketiciler için sağlık riski oluşturmaktadır (El Khoury ve ark., 2011; Martinez ve ark., 2019). Bazı fiziksel ve kimyasal uygulamaların aflatoksin seviyelerini azalttığı gösterilmiş olsa da gıdalardaki AFM₁ azaltımı için etkili stratejiler olarak onaylanmamıştır. Bu nedenle, aflatoksin seviyelerini azaltmak için biyolojik ajanlar, özellikle probiyotik mikroorganizmalar gibi doğal bağlayıcılar kullanılan çalışmalara dikkat artmıştır (Meng ve ark., 2020; Panwar ve ark., 2019).

Son yıllarda özellikle probiyotik bakteriler ile aflatoksinlerin biyolojik detoksifikasyonu ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. En sık kullanılan prosedürlerden biri ise kontamine ortamdaki mikotoksinleri adsorbe edebilen laktik asit bakterileri (LAB) türlerinin kullanılmasıdır (Assaf ve ark., 2019). Mekanizma netlik kazanmamış olsa da adsorbsiyonun; mikotoksin ve bakteri hücre duvarı bileşenleri arasında fiziksel bir bağ ile meydana geldiği düşünülmektedir (Bovo ve ark., 2013). Isıl işlem, bakteriyel hücre duvarlarında denatürasyona neden olmaktadır. Denatürasyon ile aflatoksinlerin bakteri hücre duvarı ve plazma membran bileşenlerine bağlanması gerçekleşebilir. Ancak hücre canlı olduğunda bunlara erişilememektedir. Asit uygulaması ise bakteri hücre duvarındaki bazı bağları kırabilir. Bu uygulamalar ile hidrofobik etkileşimler artabilir. Ayrıca bakteri ölü (inaktif) olduğunda toksin ile bakteri arasındaki bağ daha kalıcı hale gelmektedir (Haskard ve ark., 2001; Lee ve ark., 2003). Gıda teknolojisinde son dönemlerde öne çıkan yöntemlerden biri olan ultrason (US), çeşitli işlemlerde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Yuan ve ark., 2021). US uygulamasının yoğunluğuna ve ortaya çıkan sıcaklığa bağlı olarak mikroorganizmaların aktivasyon/inaktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Guimarães ve ark., 2021).

Probiyotik bakterilerin aflatoksin bağlama kapasitesi suşun türü, toksin konsantrasyonu, ortam pH'ı (power of hydrogen), bakteri konsantrasyonu, bakterilerin fizyolojik durumu inkübasyon sıcaklığı ve süresine bağlı olarak değişebilmektedir (Fashandi ve ark., 2018).

Yapılan literatür taramasında canlı, ısı ve asit ile muamele edilen probiyotik bakterilerin aflatoksin konsantrasyonunu azaltmada etkili olabileceği gösterilmiştir. Ancak asit ve US ile aktivasyon/inaktivasyona maruz bırakılan LAB'nin süt ortamında AFM₁ bağlama kapasitesi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmada *Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus reuteri* ve *Lactocaseibacillus rhamnosus*, probiyotik bakterilerine US uygulanarak AFM₁ bağlama oranları araştırılmıştır. Bunun yanında LAB'ler; ısı, asit ve US ile inaktif hale getirilerek, inaktivasyon yöntemlerinin AFM₁ bağlama oranları üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın gelecekteki çalışmalarda bağlanma mekanizmalarının netleşmesine katkı sunması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Küfler

Küfler, mantarlar (fungi) alemine ait ökaryotik mikroorganizmalar olup, dallanmış filamentler (miselyum) şeklinde yapılar oluştururlar ve saprofit (çürükçül) ya da parazit olarak yaşamlarını sürdürürler (Kacániová, 2003). Küflerin obligat aerob özellikte olduğu aynı zamanda sıcak ve rutubetli ortamlarda iyi ürediği bilinmektedir (Jakić-Dimić ve ark., 2009). Buzdolabı sıcaklığı, pH 3.5 ve minimum 0.65 su aktivitesinde (aw) dahi gelişebilmektedirler (Erol, 2007). Hifli yapılarından dolayı doğada yaygın olarak bulunurlar (Köppen ve ark., 2010). Günümüzde yem ve gıda ürünlerini kontamine eden 100.000'den fazla küf türü mevcuttur (Hossain ve ark., 2004). Gıda ve yemlerin küf ile invazyonuna hasat öncesi, hasat, işleme, taşıma ve muhafaza aşamasında rastlanmaktadır (Saini ve Kaur, 2012). Uygun ortam koşullarında küfler, ham ve işlenmemiş materyalde çoğalarak bir yandan ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip kalite kaybına neden olmakta, diğer yandan da dünya çapında insan ve hayvan sağlığı üzerinde ölüme varabilen ciddi sağlık problemlerine neden olan toksik metabolitleri (mikotoksin) oluşturmaktadır (Karaca, 2005). Mikotoksin kelimesi mykes (Yunanca, mantar) ve toxicum (Latince, zehir) kelimelerinin birleşimiyle türetilmiştir (Köppen ve ark., 2010). Literatüre göre doğada mikotoksin üreten yaklaşık 400 adet küf türünün 500'den fazla mikotoksin ürettiği tespit edilmiştir. Tüm küf türleri toksin üretmez; aynı zamanda tüm sekonder küf metabolitleri de toksik değildir (da Rocha ve ark., 2014). Mikotoksinler, ağırlıklı olarak *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps* cinsleri tarafından üretilir. Küfler tarafından sentezlenen mikotoksinlere aflatoksinler, okratoksin, trikotesenler, zearalenon, patulin, fumonisinler örnek olarak verilebilir (Girgin ve ark., 2001). Bunun yanında küfler, birkaç farklı mikotoksin üretebilir ve bazı mikotoksinler birkaç küf tarafından üretilir (Jard ve ark., 2011). Küfler, doğrudan enfeksiyonlara yol açarak mikozis adı verilen hastalıklara neden olmaktadır. Ayrıca, küflerin ürettiği mikotoksinler, insanlarda ve hayvanlarda "mikotoksikozis" olarak bilinen toksik

sendromlara yol açarak ciddi sağlık sorunları oluşturabilmektedir (Özkaya ve ark., 1999).

2.2. Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler

Küf normal gelişimini tamamladıktan sonra mikotoksin sentezlenmeye başlar. Mikotoksin üretiminin başlangıcı genellikle stres tepkisi ile ilişkilidir. Örneğin; oksidatif stres, besin stresi, ışık, pH, sıcaklık ve aw gibi çevresel faktörler birçok küf türünde mikotoksin üretimini güçlü bir şekilde etkilemektedir (Reverberi ve ark., 2010). Küflerin mikotoksinleri mikroorganizmalardan, nematodlardan, otlayan hayvanlardan, insan ve böceklerden korunmak için "kimyasal savunma sistemi" olarak geliştirdiği de düşünülmektedir (Ertas ve ark., 2011). Her bir gıdanın bileşimi, nem oranı, yapısı ve bulunduğu çevrenin iklim koşulları, üzerinde gelişen küf türlerini, cinslerini ve miktarlarını etkilemektedir. Buna bağlı olarak, bu küflerin ürettiği mikotoksin türleri ve seviyeleri de değişkenlik gösterir (Tunail, 2000). Tarım ve hasat sırasında yapılan yanlış uygulamalar, yetersiz kurutma, işleme, paketlenme, depolama ve nakliye süreçleri, küf oluşumunu kolaylaştırarak mikotoksin üretimini artırabilmektedir (da Rocha ve ark., 2014).

2.3. Aflatoksinler

Bu toksinlere, *Aspergillus*'un baş harfi "A" ve flavus kelimesinden türetilen "fla" eklenerek, sonuna "toksin" sözcüğü eklenmiş ve böylece "Aflatoksin" adı verilmiştir (Frazier, 1986). Aflatoksin, en tehlikeli mikotoksin ve gıda güvenliği sorunları olan *Aspergillus flavus*, ve *Aspergillus parasiticus* küflerinin ürettiği son derece toksik sekonder metabolitlerdir (Afshar ve ark., 2020). Metanol (MeOH), kloroform ve benzen gibi çözücüler içinde çözünürler ve düşük moleküler ağırlığa sahiptirler (Campagnollo ve ark., 2016). Aflatoksinler, "difurokumarosiklopentenon" ve "difurokumarolakton" sınıflarına dahil bileşiklerdir (Özkaya ve Temiz, 2003). Toplamda B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂ olmak üzere altı farklı tipi bulunmakla birlikte, gıdalarda en sık rastlanan tür B₁'dir (Ashiq, 2015). Aflatoksin türünün isimlendirilmesi ultraviyole (UV) ışık altında gösterdikleri renklere göre belirtilmektedir. Mavi (blue)

floresan verenler AFB₁ ve AFB₂, yeşil (green) floresan verenler AFG₁ ve AFG₂'dir. AFB₁ ve AFB₂ içeren yemlerle beslenen ineklerin sütünde rastlanan, ana moleküle benzer fakat daha az biyolojik etki gösteren türevler ise AFM₁ ve aflatoksin M₂ (AFM₂) olarak adlandırılmaktadır (Reddy ve ark., 2006). M harfi ise süte geçen türevleri olduğu için "Milk Toxin" anlamını içerir. "1" rakamı, yüksek düzeyde toksisiteyi, "2" rakamı ise düşük düzeyde toksisiteyi temsil etmektedir (Tunç, 2019). Dört ana aflatoksinden (B₁, B₂, G₁ ve G₂), G₂ daha az toksik olmakla birlikte B₁ tüm aflatoksinler arasında en toksik olanıdır (Nazhand ve ark., 2020).

A. parasiticus sıklıkla yağlı tohumları kontamine ederek; B₁, B₂, G₁ ve G₂ aflatoksinlerini üretirken, *A. flavus* genellikle tahıllarda bulunur ve sadece B₁ ve B₂ aflatoksinlerini üretir (Giorni, 2007). Aflatoksin üretimini destekleyen koşullar, en çok subtropikal ve tropik iklime sahip özellikle gelişmekte olan ülkelerde daha yaygın karşılaşılan, %13'ün üzerindeki nem ve 24 ile 37°C arasındaki sıcaklık değerleridir (Jakić-Dimić ve ark., 2009). Çünkü bu bölgelerdeki sıcaklık ve yüksek nem oranı, küflerin gelişmesi için ideal koşullar sağlamaktadır. Ancak, 10-13°C'nin altında ve 41-42°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aflatoksin üretimi sınırlanmaktadır. Aflatoksin üreten küfler, pH 5-6 seviyelerinde en yüksek toksin üretimini gerçekleştirmektedir. pH 4'ün altındaki ortamlarda ise gelişimleri yavaşlamakta ve ürettikleri toksin miktarı da düşmektedir. Optimum aw değerlerinin 0.82-0.99 aralığında olduğu bilinmektedir (Giorni, 2007).

Aflatoksinler, yüksek ısıya oldukça dirençlidir ve ancak 300°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda tamamen parçalanabilir. Bu nedenle, sütte ve diğer gıdalarda bulunan aflatoksinler, pastörizasyon, süt tozuna dönüştürme veya diğer pişirme sıcaklıklarında kimyasal yapısını koruyarak bozulmadan kalır (Tuncer, 1987). Bazı raporlar ise aflatoksinlerin pastörizasyon ve sterilizasyon gibi ısıtma işlemleri sırasında stabil olduğunu desteklerken (Awasthi ve ark., 2012; Govaris ve ark., 2001; Prandini ve ark., 2009), diğerleri pastörizasyonun sütteki AFM₁ miktarını kısmen azaltabileceğini desteklemektedir (Deveci, 2007). Literatürde bildirilen verilerdeki çeşitlilik, süt işlemede uygulanan geniş sıcaklık-zaman kombinasyonları, AFM₁ kantifikasyonu için kullanılan farklı analitik yöntemler (ELISA, HPLC ve TLC), bugüne kadar araştırmada kullanılan hem doğal hem de yapay olarak kontamine edilmiş AFM₁ ve

sütün analiz yöntemine atfedilebilir. Aflatoksinler özellikle bu yönleriyle insan sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır.

Kış mevsiminde toplanan süt örneklerinde yaz mevsiminde toplanan süt örneklerine kıyasla daha yüksek AFM₁ konsantrasyonlarına rastlanmaktadır. Yaz mevsiminde süt hayvanlarının meralarda otlatılması sütteki AFM₁ miktarının azalmasını sağlamaktadır. Kış mevsiminde ise hatalı depolama koşulları nedeniyle kontamine mısır silajı, pamuk tohumu, soya fasulyesi, kuru ot ve buğdaya dayanan yüksek miktarda konsantre yem kullanılması aflatoksinle kontamine yemleri tüketen hayvanların sütlerinde AFM₁ artışının görülmesiyle sonuçlanmaktadır (Shahbazi, 2017). Süt ve süt ürünlerinde Güney Asya ve Afrika ülkelerinde yüksek AFM₁ düzeylerine rastlanmakta ayrıca Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde de artış gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Ferreira ve ark., 2019; McCullough ve Lloyd, 2019). Süt ve süt ürünlerinin günlük tüketiminin yanı sıra, özellikle çocuk beslenmesinde önemli bir yere sahip olduğu dikkate alındığında, uluslararası düzenlemelerde AFM₁ için belirlenen maksimum üst sınır 0 ila 1 µg/kg (mikrogram/kilogram) arasında değişmektedir (Iqbal ve ark., 2015). Türk Gıda Kodeksi'ne göre ise "çiğ süt, ısıl işlem görmüş süt ve süt ürünlerinin üretiminde kullanılan süt" için izin verilen en yüksek AFM₁ miktarı 0.05 µg/kg olarak belirlenmiştir (Türk Gıda Kodeksi [TGK], 2011).

Aflatoksinlerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu akut ve kronik seyirli mikotoksikoza "aflatoksikozis" denir (Çelik, 2001). Yüksek düzeyde aflatoksin tüketmek akut aflatoksikozis ile sonuçlanır ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde, farklı akut zehirlenme vakaları ortaya çıkabilmektedir (Santini ve Ritieni, 2013). Akut toksikoz belirtileri, akut karaciğer hasarı (hepatotoksisite), kusma, karın ağrısı, pulmoner veya serebral ödem, nekroz, depresyon, anoreksi, sarılık, diyare, ışığa karşı duyalılık, hemoraji (kanama), besinlerin emiliminde ve/veya metabolizmasında değişiklikler, hızlı bir ölüm (genellikle birkaç saat veya gün) şeklindedir (Yang ve ark., 2020). Ancak günümüzde, insanlarda akut aflatoksin toksisite insidansı çok düşüktür. Genelde aflatoksin toksisitesinin kronik formu ile daha çok karşılaşmaktadır. Uzun süre düşük seviyelerde aflatoksin tüketmek, kronik aflatoksikozis ile sonuçlanır (Yiannikouris ve Jouany, 2002). Kronik aflatoksikozis, konjenital bozulma ile ilişkili teratojenik etkiler (doğum kusurları) ile sonuçlanmakta, özellikle ilk embriyonik

evrede fetüste sakatlıklar ve embriyonun vücut tarafından emilmesi görülmektedir (Scaglioni ve ark., 2014). Ayrıca aflatoksinler, DNA üzerinde değişikliklere yol açarak mutasyonlara, kromozom kırılmalarına, kazanılmasına veya kaybına neden olabilen mutajenik etkiler ile kanser oluşumuna zemin hazırlayan karsinojenik etkiler göstermektedir (Thrasher ve Crawley, 2015). Toksikite ve karsinojenitenin başlıca hedef organı karaciğerdir. Bağışıklık hücreleri üzerinde toksik etkilerinin bulunması, onları mikotoksinler arasında en fazla araştırılan türlerden biri haline getirmiştir. Kronik aflatoksikozisin, fagositik aktiviteyi ve T ile B hücrelerin sayısını azaltıp (immunsupresyon) bulaşıcı hastalıklara karşı direnci azalttığı rapor edilmiştir (Istiqomah ve ark., 2017).

Epidemiyolojik, genetik ve deneysel çalışmalar sonucunda, karsinojenik ve genotoksik özellik göstermeleri nedeniyle World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü) ve Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü), AFB₁'i "Sınıf 1", AFM₁'i de "Sınıf 2B" olarak sınıflandırmıştır (World Health Organization [WHO] ve Food and Agriculture Organization [FAO], 1974). Ancak yapılan son çalışmalarla birlikte AFM₁, AFB₁'den yaklaşık on kat daha az toksik olmasına rağmen sitotoksik ve kanserojen etkileri benzer düzeyde olmasından dolayı IARC (2002), AFM₁'i insanlar için karsinojenik madde olarak kabul etmiş ve "Grup 1" sınıfına dahil etmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. IARC'nin insanlarda kanser yapıcı etkisini değerlendirdiği maddeleri sınıflandırmada kullandığı kategoriler (IARC, 2002).

Grup 1	İnsanlarda kanserojen olan maddelerdir.
Grup 2A	İnsanlarda kanserojen olma olasılığı olan maddelerdir.
Grup 2B	İnsanlarda kanserojen olabilecek maddelerdir.
Grup 3	İnsanlarda kanserojen olarak sınıflanamayan maddelerdir.
Grup 4	İnsanlarda kanserojen olma olasılığı olmayan maddelerdir.

2.4. Gıdalarda Küf ve Mikotoksin Sorunu

Gıdalar, karmaşık bileşenler olup, tüm yaşam biçimleri için karbon, enerji ve diğer gerekli maddelerin temel kaynağını oluşturur (Gupta ve Srivastava, 2014). Ancak günümüzde, gıdaların dioksin, mikotoksin, ağır metaller, pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ilaçlar ve hormonlar gibi kontaminantlarla kirlenmesi, gıda güvenliği açısından en büyük endişe konularından biri haline gelmiştir (Barreira ve ark., 2010). WHO'ya göre dünya çapında her yıl 600 milyon gıda kaynaklı hastalık vakası ve 420 bin ölüm, insan sağlığını etkileyen, mikotoksin üretimi olan, güvenli olmayan gıdalardan kaynaklanmaktadır (Li ve ark., 2023).

Küfler çok çeşitli çevresel koşullarda gelişme yetenekleri nedeniyle gıda ve yemlerin ortak kirleticileri olarak kabul edilirler (Barreira ve ark., 2010). Diğer birçok mikrobiyal kirleticinin aksine, küf türleri fırsatçı olmakla birlikte hemen hemen her tür gıdada gelişebilmektedir (Cheong ve ark., 2014). Mikotoksinlerin bir kısmı endotoksin olarak misel içinde birikme özelliğine sahipken, çoğu mikotoksin miselden substrata doğru salgılanmaktadır. Bundan dolayı küf içeren besinlerden miseller uzaklaştırıldığında besinde mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmamaktadır (Liu ve ark., 2020).

Küf sporları hijyenik koşulların yeterli olmadığı üretim prosesine (gıda işleme alanlarına), ham maddeden, gıdadaki bir bileşikten, konteynerlerden hatta hava, kontamine giysi ve ayakkabılar yoluyla geçerek gıda ürününü kontamine edebilmektedir (Levinskaite, 2012). Küf kontaminasyonlarının dünya çapında her yıl yaklaşık 60 milyar dolarlık tarımsal üretim kaybına neden olabileceği bildirilmiştir (Varsha ve Nampoothiri, 2016). Küf türleri tarafından üretilen mikotoksinler dünyanın her yerinde bulunur, tropikal ve subtropikal bölgelerde daha yüksek prevalansa sahiptir (Gruber-Dorninger ve ark., 2019). Ayrıca küresel düzeyde gıda ve yem örneklerinin %30-100'ünü kontamine etmektedir (Pinotti ve ark., 2016). Eskola ve ark. (2020) ise küresel ısınma ve hava şartlarının etkisine bağlı olarak dünya çapında mahsüllerin %60-80'inin mikotoksinlerle kontamine olduğunu bildirmiştir. Gıda ürünlerinin mikotoksinlerle kontamine olması, üretim, depolama ve dağıtım gibi farklı aşamalarda gerçekleşebilmektedir (Bayram ve Anlı, 2008; Kabak ve Var, 2006). Gıda ve Yem için Hızlı Uyarı Sistemi'nin (Rapid Alert System for Food and Feed) 2019

yılındaki raporuna göre mikotoksinler gıda ürünleri üzerindeki en önemli 10 tehlike arasında listelenmiştir (Rapid Alert System for Food and Feed [RASFF], 2019).

Çevremizde gün geçtikçe gıda ve yemlerin aflatoksine maruz kalması halk sağlığı yönünden başlıca endişe konusu olmuştur. Şili’de sütte tespit edilen AFM₁ konsantrasyonlarının 0 ila 13 yaş arası çocuklarda halk sağlığı için bir sorun olarak kabul edildiği ve bebeklerin özellikle risk altında olduğu bildirilmiştir (Foerster ve ark., 2023). İnsanların mikotoksinlere maruziyeti doğrudan kontamine tarım ürünlerinin (tahıl, mısır, meyve vb.) alımı sırasında veya çiftlik hayvanlarının mikotoksinlerle bulaşık olan yemleri tüketmeleri ile mikotoksinlerin “Carry over” özelliği yoluyla meydana gelmektedir. Bu sebeple, toksin içeren yemleri tüketen hayvanlardan elde edilen gıdalar (et, yumurta, süt) vasıtasıyla toksinlerin insanlara geçmesi mümkün olmaktadır (Tiryaki ve ark., 2011). Ayrıca, toksinlerin metabolize olmuş halleri, insan sütünde, bazı organlarda ve nadiren de yağlı kas dokularında tespit edilebilir (Tunail, 2000). Özellikle AFM₁ kontaminasyonu süt ve süt ürünlerinde kritik rol oynamaktadır (Yüksel ve Albayrak, 2020). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention [CDC]) tarafından yaklaşık 4.5 milyar insanın kronik olarak mikotoksinlere maruz kaldığı bildirilmiştir (Emmott, 2015). 2015 ile 2019 yılları arasında Avrupa Birliği’ne üye olan ülkelere ihraç edilen ürünlerde aflatoksin ile ilgili hızlı uyarı sistemi geri bildirim sayısına bakıldığında Türkiye’nin en yüksek geri bildirim sayısına sahip olduğu bildirilmiştir (Jallow ve ark., 2021). Bunun yanı sıra, yasal limitlerin üzerinde bulunan maddelerin ihracatının yasaklanması, söz konusu ürünlerin iç piyasada yeniden tüketime sunulmasına yol açmaktadır (Kabak ve ark., 2006).

Mikotoksinler halk sağlığının yanında ülke ekonomilerinde de ciddi kayıplara neden olmaktadır. Bu ekonomik kayıplar altı ana maddede özetlenebilir; (i) toksik küflerin insan ve hayvanlarda neden olduğu hastalıkların tedavi maliyetleri, (ii) mikotoksin kontaminasyonu sonucu mahsullerde oluşan değer kayıpları, (iii) mikotoksinlerin hayvanlarda yol açtığı sağlık sorunları nedeniyle meydana gelen verim düşüşlerinden doğan masraflar, (iv) yem maddelerinden mikotoksinlerin temizlenmesi için gerekli olan maliyetler, (v) ülkelerin mikotoksin limitlerine uygun olmayan ürünleri ticari olarak ihraç edilmesinin engellenmesiyle ortaya çıkan zararlar, (vi) mikotoksin yönünden yasal sınırlar üzerinde olan maddelerin ihracatının

engellenmesi sonucunda tekrar iç pazarda bu ürünlerin tüketilmesinden kaynaklı ekonomik kayıplar olarak sınıflandırılabilir (Kabak ve ark., 2006).

Akdeniz ülkelerinde süt ve süt ürünlerinde bulunan AFM₁ varlığını 20 yıllık süre boyunca (2000-2020) sistematik olarak inceleyen bir çalışmada; AFM₁ görülme sıklığı %40 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada çiğ sütlerin %40'dan fazlasında AFM₁ tespit edilmiştir. Türkiye'de yapılan 47 çalışmada ise çiğ süt örneklerinde tespit edilen AFM₁ aralığı 0.0-0.30 ng/ml (nanogram/mililitre); ısı işlem görmüş sütlerde 0.0-0.70 ng/ml ve süt ürünlerinde ise 0.0-5.20 ng/ml olduğu bildirilmiştir. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda da süt ürünlerinde (AFM₁ konsantrasyonu yüksekten düşüğe doğru; peynir > tereyağı > yoğurt > sütlü tatlı > dondurma) oldukça yüksek konsantrasyonlarda AFM₁ varlığı bildirilmiştir (Malissiova ve ark., 2024).

AFM₁ bakımından peynir prosesi incelendiğinde, krema ayırımı son üründeki AFM₁ konsantrasyonunu etkileyebilmektedir. Bunun nedeni olarak, AFM₁ kazeinin hidrofobik bölgelerine bağlanan suda çözünen bir bileşiktir ve bu nedenle yağsız kısımda daha baskın olmaktadır (Kaniou-Grigoriadou ve ark., 2005). Battacone ve ark. (2005)'a göre AFM₁'in konsantrasyonu lorda süttekinden daha yüksektir.

Peynir çeşitlerinde AFM₁ seviyelerini etkileyebilecek bazı faktörler vardır (Khaneghah ve ark., 2021). Bunlardan bazıları süt türü (sağılan hayvan, ülkenin coğrafi kökeni ve mevsimsel koşullar), sütün kontaminasyon derecesi (süt kalitesi), peynir üretimi, olgunlaşma ve depolama koşulları (tuz konsantrasyonu, bağıl nem, mayalama sıcaklığı, kesim boyutu, baskılama süresi, peynir ve tuzlu suyun pH'ı) ve toksin kantifikasyonunda kullanılan analitik yöntemlerdir (Alahlah ve ark., 2020; Battacone ve ark., 2005; Campagnollo ve ark., 2016; Casquete ve ark., 2017; Cavaliere ve ark., 2006; Cavallarin ve ark., 2014; Chavarría ve ark., 2017; Hassan ve Kassaify, 2014; Kamel ve ark., 2017; Kure ve Skaar, 2019). Beyaz peynirde yapılan çalışmada 0-90 günlük olgunlaşma sırasında AFM₁ konsantrasyonundaki değişim çok küçük bir azalma ile ortalama %9.8 olarak kaydedilmiştir (Colak, 2007). Bazı çalışmalarda ise peynirin olgunlaşma ve depolama süresinin AFM₁ seviyelerini etkilemediği rapor edilmiştir (Fernandes ve ark., 2012; Iha ve ark., 2013; Nilchian ve Rahimi, 2012). Diğer bazı araştırmalarda ise bu durumun tam tersi olarak olgunlaşma ve depolamanın AFM₁ seviyelerini artırdığı ifade edilmiştir (Hassan ve ark., 2018; Montagna ve ark.,

2008). Bunun yanında peynir türlerindeki AFM₁ konsantrasyonunun, toksinin zamanla bozulması nedeniyle depolama sırasında azaldığını bildiren çalışmalar da vardır (Anfossi ve ark., 2011; Oliveira ve ark., 2011). Aynı değişken durumlar yoğurt örneklerinde de rapor edilmiştir. Bazı araştırmacılar (Blanco ve ark., 1993; Stoloff, 1980; Van Egmond, 1983) tarafından yoğurt prosesi boyunca AFM₁ düzeyinde değişiklik olmadığı belirtilirken, diğerleri tarafından fermantasyondan sonra yoğurt örneklerindeki AFM₁ seviyelerinin başlangıçta süte eklenenlere kıyasla önemli bir düşüş gösterdiği bildirilmiştir (Govaris ve ark., 2002). Fermantasyon sırasında pH seviyesinin düşmesi, kazein gibi süt proteinlerinin yapısının değiştirerek yoğurt pıhtısının oluşumu sağlanmaktadır. Yoğurt üretimi sırasında kazein yapısında ortaya çıkan bu değişim, AFM₁'in kazeinle etkileşimini etkileyebilir ve çökeltideki toksinin adsorpsiyonuna neden olabilir (Brackett ve Marth, 1982; Dosako ve ark., 1980).

Türkiye’de 2021-2024 yılları arasında çiğ süt örnekleri ile yapılan çalışmalarda; Çilenti ve ark. (2024) tarafından Adıyaman ilinde 2021-2022 tarihlerinde satışa sunulan 96 çiğ inek sütünde %44.79 oranında pozitif sonuç tespit edilmiştir. Maksimum tespit ettiği toksin konsantrasyonunun 0.054 ng/ml olması ile birlikte sokak satıcılarından alınan örneklerin tamamının pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Çalışmada TGK’nin maksimum yasal sınırını aşan 4 örneğin 2’sinin sokak sütü olduğu rapor edilmiştir. Çorum ilinde Özbey ve ark. (2023) tarafından 200 çiğ inek sütü örneğinden yapılan çalışmada ise sütlerin %64.5’inde AFM₁ tespit edilmiş ve bunların 0.022-0.401 ng/ml arasındaki seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir. Yine başka bir çalışmada Diyarbakır ilinde küçük ölçekli aile tipi işletmelerden toplanan 42 çiğ inek sütlerinin %95.2’sinde AFM₁ tespit edilmiş ve bunların %16.6’sının yasal sınırı aştığı bildirilmiştir (Duman Aydın ve ark., 2023).

Türkiye’de peynir örnekleri ile 2020 yılında yapılan çalışmada Demir ve ark. (2021) tarafından Elazığ, Kovancılar, Bingöl ve Tunceli’den toplanan taze beyaz peynir örneklerindeki AFM₁ insidansının sırasıyla 0.71-4.50 ng/ml, 1.80-4.33 ng/ml, 0.12-3.96 ng/ml ve 1.35-3.51 ng/ml arasında değiştiği bildirilmiştir.

Dönmez ve Uzun (2024), İstanbul ilinde 84 tereyağı örneğinde AFM₁ düzeylerini 0.04-0.15 ng/ml arasında ve örneklerin %79.7’sinin yasal sınırları aştığını rapor etmiştir.

2.5. Mikotoksin Kontrol Yöntemleri

Küfler doğada yaygın olarak bulunmaları ve çok dayanıklı toksinler (mikotoksin) üretmeleri nedeniyle bunlardan korunma ve kontrol oldukça zordur (Jard ve ark., 2011). Mikotoksinlerin yan etkilerini azaltmak veya ortadan kaldırmak için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bunlar; mikotoksik küflerin gelişmesinin önlenmesi ve toksinlerle kirlenmiş gıda ve yemlerin detoksifikasyonu şeklindedir (Hathout ve Aly, 2014). Bu bileşikleri ortadan kaldırma seçeneklerini araştıran bir dizi çalışmada, sorunu çözenin en iyi yolunun mikotoksin oluşumunu önlemek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu amaçla, tarımsal ürünlerin mekanik hasar görmesini engellemek, bitkileri doğru zamanda hasat etmek ve hayvanlara küflenmiş yem vermekten kaçınmak önemlidir. Bunların yanında yemlerde ve insan gıdalarında aw değerini 0.60'ın altına düşürmek, depolama esnasında uygun muhafaza koşulları (sıcaklık, nem) sağlamak, oksijen alımını durdurmak, gıdaların izlenebilirliklerinin sürekliliğini sağlamak, yasal yönden kabul edilebilir mikotoksin limitlerini aşan gıda ve yemlerin tüketilmesini engellemek yapılabilecek uygulamalardandır (Kabak ve ark., 2006; Magan ve Aldred, 2007; Magan ve ark., 2010). En etkili stratejinin küf gelişimini önleyerek mikotoksin sentezlenmesini engellemek olmasına karşın bu yöntem pek mümkün olmamaktadır (Sevim, 2016). Bu nedenle, mikotoksinlerin dekontaminasyonu, inaktivasyonu ve uzaklaştırılmasına yönelik alternatifler aranmalıdır.

2.6. Mikotoksin Detoksifikasyon Yöntemleri

Mikotoksinlerin sağlık ve ekonomik açıdan neden olduğu sorunlar, araştırmacıları gıdalarda mikotoksin azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalara yönlendirmiş ve bu amaçla “detoksifikasyon” olarak tanımlanan uygulamalar ortaya konmuştur (Yılmaz ve Ozay, 2001). Günümüzde mikotoksinlerin gıda ve yemlerden uzaklaştırılması amacıyla uygulanan işlemler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç ana kategoride toplanabilmektedir (Karlovsky ve ark., 2016).

Detoksifikasyon yöntemlerinin kabul edilebilir olması için FAO ve WHO'nun belirlediği kriterler şunlardır; (i) toksini etkisiz hale getirerek, parçalayarak

uzaklaştırmalı, (ii) yeni toksik maddelerin oluşumuna neden olmamalı, (iii) ürünün besin değerini korumalı, (iv) ürün üretim sürecindeki teknolojik işlemleri büyük ölçüde değiştirmemeli, (v) mümkünse küf sporlarını tamamen ortadan kaldırmalıdır (FAO ve WHO, 1974).

Fiziksel detoksifikasyon yöntemleri arasında; mekanik ayırma, yoğunluk farkına dayalı ayrıştırma, yıkama, parlatma, öğütme ve çözücü ile ekstraksiyon gibi işlemlerin yanı sıra termik inaktivasyon, ekstrüzyon (sıkıştırma ve yüksek ısıda işleme yöntemi), ışınlama, mikrodalga ile ısıtma ve ultraviyole uygulamaları da bulunmaktadır (Awad ve ark., 2010; Peltonen ve ark., 2001). Bugüne kadar incelenen mikotoksinlerin önemli bir kısmı geleneksel ısıl işlemlere (80-121°C) oldukça dayanıklıdır. Haşlama, kızartma ve pastörizasyon gibi işlemler sırasında toksinlerin miktarında ya çok az bir azalma gözlenmekte ya da hiçbir değişiklik meydana gelmemektedir (Mishra ve Das, 2003). Örneğin; ısıl işlem ile istenen etkiyi elde etmek için ham madde kalitesini düşürecek olan yüksek bir sıcaklık kullanılmak zorundadır (Guan ve ark., 2012). Tahıllardaki mikotoksinlerin azaltılmasında temizleme, yıkama, su ile ekstraksiyon, öğütme, ışınlama, yüzdürme ve hasarlı tanelerin ayrılması gibi fiziksel yöntemlerin yalnızca sınırlı bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Karlovsy ve ark., 2016). Aynı zamanda durulama ve soyma, mikotoksin ve yan ürünlerini solüsyonda bırakarak ikincil kontaminasyona neden olabilmektedir (Abad ve ark., 2002). Ayrıca fiziksel yöntemlerin büyük bir kısmının etkisiz olduğu, nispeten yüksek maliyetlere yol açtığı ve uygulama sırasında ürünlerdeki faydalı besin öğelerinin azalmasına veya tamamen yok olmasına neden olabileceği ifade edilmektedir (Kolosova ve Stroka, 2011).

Alkalizasyon, oksidasyon, asitleştirme, amonyaklaştırma ve indirgeme dahil olmak üzere kimyasal yöntemler, gıda ve yem endüstrisinde mikotoksin içeriğini gidermek veya azaltmak için uygulanmaktadır (Jard ve ark., 2011). Bu maddeler arasında, kalsiyum hidroksit, monometilamin, sodyum bisülfid, nemli ve kuru ozon, klor gazı, hidrojen peroksit, askorbik asit, hidroklorik asit (HCl), kükürt dioksit gazı, formaldehit, amonyak ve amonyum hidroksit yer almaktadır (Awad ve ark., 2010). Toksinleri dezenfekte etmek için klor dioksit gibi kimyasal maddelerin kullanılması gıdaların görünümünü ve tadını bozabilmektedir (Yu ve ark., 2020a). Ozon detoksifikasyonu, üretim maliyetlerini artıran özel ekipman ve ek fonlar

gerektirmektedir (Li ve ark., 2015). Detoksifikasyon elde etmek için kimyasal reaktiflerin kullanılması da ham maddelerin kalitesini etkileyebilir ve daha fazla kontaminasyona yol açabilir (Zhang ve ark., 2018). Dolayısıyla, çoğunlukla kimyasal detoksifikasyon yöntemleri FAO şartlarını karşılamamaktadır (Conte ve ark., 2020). Buna ek olarak, kimyasal maddelerin taşınmasının işçiler için potansiyel bir risk oluşturabileceği belirtilmektedir (Awad ve ark., 2010). Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki bu olumsuz etkileri ve etkinlik açısından yetersiz kalmaları nedeniyle insan sağlığına zarar vermeyen uygun maliyetli, güvenilir ve etkili yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir (Liu ve ark., 2020).

Son zamanlarda, iyi olarak tanımlanmış mikroorganizmaların veya bunların antimikrobiyal bileşiklerinin muhafaza için gıdalarda kullanımı, tüketicilerin sentetik kimyasallara güvenmek yerine daha doğal gıda muhafaza yaklaşımlarına taleplerinin artması nedeniyle büyük bir ilgi görmüştür (Mishra ve Das, 2003). Özellikle süt ve süt ürünlerinin; çocuklar ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar olmak üzere tüm yaş grupları için ihtiyaç duyulan besin maddelerine sahip olması nedeniyle tüketilmesi önerilmektedir (Gürbay ve ark., 2006). Bu nedenle, insan tüketimine yönelik gıdaların güvenliğini artırmak için biyolojik detoksifikasyon önlemlerinin geliştirilmesi esastır. Biyolojik detoksifikasyonun fiziksel ve kimyasal detoksifikasyondan daha etkili olduğu düşünülmektedir (Yao ve Long, 2020). Biyolojik detoksifikasyon çalışmalarında LAB'ler, güvenli, ucuz, çevre dostu, hızlı gelişmeleri ve mikotoksinler üzerinde yaklaşık %12–100 arasında detoksifikasyon oranlarından dolayı özellikle araştırma konusu olmuş ve ticari ölçekte kullanılabilir hale gelmiştir (Afshar ve ark., 2020; Peles ve ark., 2021; Pop ve ark., 2022).

2.7. Laktik Asit Bakterileri

LAB'ler genellikle uzun veya kısa çubuk ya da kok formunda bulunmaktadır. Tamamı gram-pozitif, spor oluşturmeyen, aside toleranslı özelliklere sahiptir. Çoğunluğu mikroaerofilik olmakla birlikte mutlak anaerob türleri de içermektedir. Ayrıca katalaz negatif ve sitokrom içermeyen bir mikroorganizma grubunu oluştururlar (Çakmakçı ve ark., 2011; Kandler, 1983). Gram pozitif bakteri hücre duvarı, D-amino asit içeren peptitler tarafından çapraz bağlanmış polisakkarit

zincirlerinden oluşan, peptidoglikan ve teikoik asit katmanlarından oluşmaktadır (Vollmer ve ark., 2008). Optimum gelişme koşullarına göre mezofilik (20-30°C) ve termofilik (37-45°C) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Fashandi ve ark., 2018). Bu bakteriler *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp. gibi birçok cinsten oluşmaktadır (Hladíková ve ark., 2012; Peles ve ark., 2021). Tüm LAB'ler, fermantasyon sırasında karbonhidrat metabolizmasından ana ürün olarak laktik asit üretmektedir. LAB'ler, heksozlardan laktik asit (% 50), asetik asit, CO₂ (karbondioksit), etanol ve mannitol üreten heterofermentatif LAB ve heksozlardan esas olarak laktik asit (% 85) üreten homofermentatif LAB olmak üzere iki ana fizyolojik gruba ayrılmıştır (Kandler, 1983). Laktobasil türleri, fermente gıdalardan doğal olarak izole edilir ve insan mikrobiyotasının temel üyeleridir. İnsanlarda, ağız boşluğunu, gastrointestinal ve ürogenital yolları ve anne sütünü kolonize ederler (Sömer ve ark., 2012). Bir bütün olarak, bu cins insanlar için faydalıdır, birçok probiyotik özelliğe sahiptir ve nadiren hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Boonma ve ark., 2014).

Şimdiye kadar birçok LAB, gıdalarda küf oluşumunu engelleme yeteneklerinden dolayı “Yeşil koruyucular” olarak kabul edilmiştir (Pawlowska ve ark., 2012). LAB, gıdalarda kullanım için güvenli olduğu, gıdaların raf ömrünü uzattığı, yoğurtta olduğu gibi sindirilebilirliği artırdığı, mikotoksinleri uzaklaştırmada iyi işlev görmeleri ve kolayca kültürlenip muhafaza edilebilen çok sayıda suş olduğu için diğer mikroorganizmalara göre daha çok tercih edilmektedir (Wu ve ark., 2009).

LAB'lerin içerisinde probiyotik bakteriler de yer almaktadır. Probiyotikler “yeterli miktarda alındığında sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Özden, 2013). Özellikle diyare, alerji, inflamatuvar-irritabl bağırsak hastalıkları, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, obezite, diyabet, gastrointestinal sistem kanseri vb. pek çok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir (Butel, 2014; Galli ve Risé, 2017). Probiyotiklerin kullanımının temel nedeni, bu mikroorganizmaların uzun bir güvenilirlik geçmişine sahip olması ve genel olarak güvenli kabul edilmesidir (Generally Recognized As Safe [GRAS]). Bazı LAB'lerin, gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilme gibi fizyolojik özellikleri, onların probiyotik olarak kullanılma potansiyelini artırmaktadır. LAB'lerin bu yetenekleri,

düşük pH, safra tuzları ve geniş bir sıcaklık aralığında hayatta kalma ve gelişebilme kabiliyetlerinden kaynaklanmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2011).

Probiyotikler ve probiyotik içeren diyet takviyelerinin tüketimi gastrointestinal sistem semptomlarını ve sağlığını iyileştirmek için önerilmektedir (Jana ve ark., 2020). Probiyotikler, sağlık üzerinde olumlu etkilerini yalnızca, tüketim anına kadar besin içerisinde minimum düzeyde bulunması gereken miktarda mikroorganizma içerdiğinde gösterebilir. TGK Etiketleme Yönetmeliği'ne göre, bir gıdanın probiyotik ürün olarak sınıflandırılabilmesi için en az 10^6 kob/gr (koloni oluşturan birim/gram) canlı probiyotik bakteri içermesi gerekmektedir (TGK, 2011). Ancak, depolama ve sindirimin probiyotik canlılığı üzerindeki olumsuz etkileri dikkate alındığında, etkili bir aktivite için bu miktarın 10^8 - 10^9 kob/ml seviyesinde olması önerilmektedir (Knorr, 1998). Ayrıca, sindirim sistemine 10^9 kob/ml canlı hücre alınabilmesi için, probiyotik ürünlerin düzenli olarak yaklaşık 100 g/gün tüketilmesi gerektiği belirtilmektedir (Karimi ve ark., 2011).

Lacticaseibacillus rhamnosus (eski adıyla *Lactobacillus rhamnosus*), *Lactobacillus acidophilus* ve *Limosilactobacillus reuteri* (eski adıyla *Lactobacillus reuteri*) insan bağırsağından izole edilen en çok çalışılan ve uygulanan *Lactobacillus* türlerindedir (Boonma ve ark., 2014; Gürsoy ve Kınık, 2011). *L. rhamnosus* GG, 1983'te Gorbach ve Goldin tarafından izole edilen ve antibiyotikle ilişkili ishal, idrar yolu enfeksiyonları, gıda alerjileri hatta ülseratif kolit ve irritabl bağırsak sendromu gibi iltihaplı bağırsak hastalıkları üzerindeki yararlı etkilerini vurgulayan çok sayıda klinik çalışmada kapsamlı olarak araştırılmıştır (Capurso, 2019; Segers ve Lebeer, 2014). Sonuç olarak, *L. rhamnosus*, sağlığa faydalı özellikleri nedeniyle en kapsamlı şekilde incelenen türlerden biri olarak ortaya çıkmıştır (Hill ve ark., 2018). 1990 yılında dışkıdan izole edilerek *L. acidophilus* adı verilen bakteri, günümüzde probiyotik bakterilerin temsilcisi olarak bilinmektedir (Yörük ve Güner, 2011). Glikoz intoleransı ve oksidatif stresi geciktirdiği, total kolesterol seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir (Ejtahed ve ark., 2012; Yadav ve ark., 2006). Başlangıçta anne sütünde keşfedilen ve şu anda neredeyse tüm omurgalıların ve memelilerin bağırsaklarında bulunduğu bildirilen *L. reuteri*, iyi bağırsak kolonizasyonuna ve bakteriyosin salgılama yeteneğine sahiptir. Ayrıca musin (mukoprotein) genlerine sahip olması

bağırsak organoidlerinin gelişimini ve olgunlaşmasını teşvik etmekte ve musin salgılanmasını artırmaktadır (Jiang ve ark., 2022).

LAB'ler, bağırsak sisteminin doğal florası olmalarının yanında tarımın başlangıcından itibaren yiyecek ve içecekleri korumak için et, süt ve sebzelerin fermentasyonunda kullanılmıştır (Miller ve Wetterstrom, 2000). Bunun yanında silaj, şarap, ekşi hamur ve birçok yerli fermente gıdanın üretimi için de gereklidir (Nuraida, 2015; Zannini ve ark., 2016). Mikotoksinlerin gıda ve yemlerden biyolojik yöntemlerle detoksifikasyonunda, mikroorganizmaların gıda üretiminde uygulanan fermantasyon süreçleri sırasında etkili olabileceği öne sürülmüştür (Assaf ve ark., 2019). Bu faktörler ve teknolojik özellikleri nedeniyle *Lactobacillus* suşları gıda üretimi, muhafazası ve fermantasyonunda starter kültür veya probiyotik mikroorganizmalar olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır (Douillard ve ark., 2013).

LAB'ler, metabolik aktiviteleri sonucunda laktik asit üreterek pH seviyesini düşürmektedir. Bu özellikleri sayesinde, birçok fermente gıdada aroma bileşenlerinin oluşumunu desteklemeleri ve pH'yı etkin bir şekilde düşürmeleri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır (Sömer ve ark., 2012). Genel olarak, laktobasillerin sütü asitleştirme kapasitelerinin 37°C ve 40°C sıcaklıklarda, 30°C'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiş ve bu açıdan en etkili suşların *L. rhamnosus*'a ait olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda incelenen laktobasiller arasında asitleştirme kabiliyeti en düşük olan suşların *L. reuteri*'ye ait olduğu görülmüştür (Gürsoy ve Kınık, 2011). LAB'ler, ürettikleri metabolitlerle diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve antagonistik etki göstermektedir. Laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosinler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi oluşturdukları metabolitler, birçok mikroorganizmanın gelişimini engellemektedir (Ceyhan ve Alıç, 2012). Bunun yanı sıra *L. reuteri* suşları tarafından gerçekleştirilen metabolizmanın son ürünleri olan bakteriyosinler, reuterin ve reuterisiklin gibi daha karmaşık moleküller sentezlerler (Abuqwider ve ark., 2022). Ayrıca hücre yüzeyi ekstraktının gıda endüstrisinde gıda kaynaklı patojenlere ve saprofitlere karşı alternatif bir antimikrobiyal ve antibiyofilm ajanı olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Guan ve ark., 2023).

Son yıllarda, paraprobiyotikler ve postbiyotikler olarak adlandırılan, probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki faydalarını ve etkilerini gösterebilmeleri için bakteriyel canlılığın şart olmadığı kavramına dayanarak yeni terimler ortaya çıkmıştır. “İnaktif probiyotikler” olarak da bilinen paraprobiyotikler, yeterli miktarda uygulandığında tüketicilere fayda sağlayan, ölü mikrobiyal hücreleri ifade etmektedir (Aguilar-Toalá ve ark., 2018; Taverniti ve Guglielmetti, 2011; Tsilingiri ve Rescigno, 2013).

Bakteriyel hücre inaktivasyonu, mikrobiyal hücre yapılarını veya fizyolojik fonksiyonlarını etkileyebilen fiziksel (mekanik parçalama, ısı işlem, ultraviyole ışınlanması, dondurarak kurutma ve US) veya kimyasal (asit) yöntemlerle gerçekleştirilebilir (Aguilar-Toalá ve ark., 2018). Ölü probiyotik hücrelerin canlı probiyotiklere göre avantajları bulunmaktadır. En önemlisi, bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde enfeksiyona veya artmış inflamatuvar yanıtlara yol açan risklerin azalmasıdır. Daha güvenli olmalarının yanı sıra, paraprobiyotikler probiyotiklere kıyasla daha uzun raf ömrüne sahiptir (Nakamura ve ark., 2016; Taverniti ve Guglielmetti, 2011).

Metabiyotikler, biyojenikler veya basitçe metabolitler/CFS'ler (cell free supernatant-hücresiz süpernatantlar) olarak da bilinen postbiyotikler, canlı bakteriler tarafından salgılanan veya bakteriyel lizis sonrasında salınan, çözünür faktörleri ifade etmektedir (Aguilar-Toalá ve ark., 2018; Cicensia ve ark., 2014; Konstantinov ve ark., 2013; Tsilingiri ve Rescigno, 2013). Bu biyoürünler arasında kısa zincirli yağ asitleri, enzimler, antimikrobiyal peptitler, teikoik asitler, peptidoglikan türevi muropeptitler, endo- ve ekzopolisakkaritler, hücre yüzeyi proteinleri, vitaminler, plazmalojenler ve organik asitler yer almaktadır (Konstantinov ve ark., 2013; Oberg ve ark., 2018; Tsilingiri ve Rescigno, 2013). Postbiyotikler, açık kimyasal yapıları, güvenli doz parametreleri, uzun raf ömürleri; antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antiobezojenik, antihipertansif, hipokolesterolemik, antiproliferatif ve antioksidan aktivitelere sahip çeşitli moleküllerin varlığı nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu özellikler, postbiyotiklerin konak sağlığının iyileştirilmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Ancak kesin mekanizmalar henüz tam olarak açıklanmamıştır (Aguilar-Toalá ve ark., 2018; Taverniti ve Guglielmetti, 2011; Tsilingiri ve Rescigno, 2013).

2.8. Biyolojik Detoksifikasyon ve Mekanizması

Hücre duvarı bileşenleri yoluyla mikotoksin adsorpsiyonu (bağlanarak uzaklaştırma), LAB'ler tarafından (sentetik ortamdan, gıdadan veya yemden) mikotoksinin uzaklaştırılmasında en yaygın mekanizmadır. LAB'nin hücre duvarı; peptidoglikan, protein, polisakkarit, lipoteikoik asit ve teikoik asitleri içeren bir tabakadan oluşur (Chapot-Chartier ve ark., 2010). Her bakterinin kendine özgü hücre yüzey alanı, hücre duvar hacmi, nitrojen-karbon (N/C) oranı ve hidrofobikliği vardır. Ayrıca, her tür LAB'deki peptidoglikanların aminoasit kompozisyonları veya glikopolimer yapılarının farklı oluşu, hücre yüzeyinin modelini ve yapısını etkilemiştir (Chapot-Chartier ve ark., 2010; Delcour ve ark., 1999). Bu durum, LAB'ler tarafından mikotoksinleri uzaklaştırma kabiliyetlerinde önemli farklılıklara neden olacağı anlamına gelmektedir (Adunphatcharaphon ve ark., 2021). Mikotoksinlerin hücre yüzeyine adsorbe edilerek uzaklaştırılması, LAB suşlarının hücre duvarındaki polisakkaritler, protein ve peptidoglikanların varlığı ile bağlantılıdır (Chapot-Chartier ve Kulakauskas, 2014; Haskard ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar sonucunda ortamda bulunan protein miktarı ne kadar yüksekse bağlanmanın o kadar fazla olacağı bildirilmektedir (Brackett ve Marth, 1982). Dahası fermantasyon ile beraber hücre zarının yeniden şekillenmesi ve peptidoglikan biyosentezinin değiştiği bilinmektedir. Bu durum hücre duvarı kalınlığı, agregasyon özellikleri ve hücre duvarı bileşiminin değişmesine yol açmaktadır (Suissa ve ark., 2023). Diğer yandan teikoik asit gibi diğer bileşenler de bağlanma sürecinde rol oynamaktadır (Hernandez-Mendoza ve ark., 2009b). LAB'nin hücre duvarındaki teikoik asit fraksiyonları yüksek konsantrasyonlarda fosfor içerir ayrıca teikoik asit içeriği tür ve suş özgülüğüne bağlıdır (Livins' ka ve ark., 2012; Ojha ve ark., 2017).

Aflatoksin adsorpsiyonunun tersinir olduğu ve bu durumun, kontamine besiyerinde bulunan mikotoksinin tamamen ortamdan uzaklaştırılmasını engellediği belirtilmektedir (Guan ve ark., 2008). Adsorbanların geri dönüşümlü bağlanmasının, Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan bağların etkileşiminden kaynaklandığına inanılmaktadır. Mikotoksin kovalent olmayan şekilde hücre dışı olarak bağlanırsa, bağlanma da yeterince güçlü değilse, gastrointestinal sistemdeki bakteri yüzeyinin sürekli yıkanmasıyla ortama salınabilmektedir. Birçok çalışmada LAB'lerin aflatoksine geri dönüşümlü ve yeterli olmayan oranlarda

bağlandığı bildirilmiştir (Bovo ve ark., 2013; Bueno ve ark., 2007; Haskard ve ark., 2001; Hernandez-Mendoza ve ark., 2009a; Peltonen ve ark., 2001; Serrano-Niño ve ark., 2013). Ayrıca çalışmalarda AFM₁ ile bakteri stabilizasyonu değerlendirilmiş ve sıvı ortamda yıkanma sonrası bakterilerin AFM₁'i ortama geri saldıgı tespit edilmiştir (Bovo ve ark., 2013; Serrano-Niño ve ark., 2013). Bu nedenle, bakterilerin fizyolojik durumunu değiştirerek (ısı ve asit ile inaktivasyon gibi) birçok bağlanma ve kalıcılığı artırma çalışmaları yapılmıştır (Abdelmotilib ve ark., 2018; Bovo ve ark., 2013; Corassin ve ark., 2013; El-Nezami ve ark., 1998b; Haskard ve ark., 2001; Ismail ve ark., 2017; Kabak ve Var, 2008; Karazhiyan ve ark., 2016; Kuharić ve ark., 2018; Rahaie ve ark., 2010; Yücel, 2019; Yüksel ve Albayrak, 2020). Bu çalışmalar kendi içerisinde karşılaştırıldığında, gruplarda kullanılan LAB'lerin tür ve alt türlerine bağlı olarak genellikle inaktif bakterilerin canlı bakterilerden daha yüksek detoksifikasyon kapasitesine sahip olduğu bildirilmektedir.

Bağlanma mekanizmaları net olmamakla birlikte, araştırmacılar inaktif hücrelerle bağlanma artışını "Gram pozitif bakterilerde hücre duvarının peptidoglikan yapısından dolayı oldukça kalın olması mikotoksinlerin daha fazla bağlanmasını engelleyebilir" şeklinde açıklamaktadır (Haskard ve ark., 2001). Peptidoglikan tabakanın kalınlığı fiziksel işlemlerle, örneğin; ısı ve asit gibi çevresel faktörlerle azaltılabilmektedir. Böylece daha fazla mikotoksin bağlanma alanlarının açığa çıkmasına zemin hazırlanabilmektedir (El-Nezami ve ark., 1998a; Peltonen ve ark., 2001; Pierides ve ark., 2000). Ayrıca mikotoksinlerin hücre duvarında bulunan spesifik monoklonal antikora bağlandığından dolayı bakteri canlılığının gerekli olmadığı da düşünülmektedir (Dalié ve ark., 2010). Aynı zamanda fermentasyonun olası etkilerinden kaçınmak ve daha yüksek bağlanma oranlarına ulaşmak için de inaktif hücreler tercih edilebilmektedir.

Isıl işlem, protein denatürasyonuna veya polisakkaritler, peptitler ve proteinler arasında Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumuna neden olabilmektedir (Haskard ve ark., 2000). Birçok LAB suşu hücre yüzeyinde, ısıl işlemde sonra gözenek boyutunun arttığı ve güçlü hidrofiliten hidrofobik hale geldiği bildirilmiştir (El-Nezami ve ark., 2002; Piotrowska, 2014). LAB'nin hücre yüzeyinin hidrofobik karakteri arttıkça toksini bağlama kapasitesi de artmaktadır (Oatley ve ark., 2000; Rahaie ve ark., 2010).

Teikoik asit ve polisakkaritler, asit uygulamalarının ana hedefleridir. Asidik işlem (HCl ve triklorasetik asit), polisakkaritler içindeki glikozidik bağları ve/veya peptitlerdeki amid bağlarını kırabilir. Bu yapıların uzaklaştırılması gözenek boyutunu artırmakta ve bakteri hücre duvarının alt yüzeyini daha fazla bağlanma için uygun hale getirmektedir (Bejaoui ve ark., 2004). Böylece, hidrofobik etkileşimlerin artmasına neden olmaktadır. Canlı ve ısıtılmış işlem görmüş bakteriler hücre dışı bağlanmaya izin verirken asit ile muamele edilmiş bakteriler hücre içi bağlanmaya da izin verebilmektedir (Haskard ve ark., 2001).

2.9. Süte Uygulanan Ultrasonun Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Etkileri

Yeni ortaya çıkan teknolojiler sürekli olarak gelişmekte ve enerji verimliliğiyle ilgili faydaların yanı sıra daha fazla besin değerini korumaya odaklanmaktadır. Yeni ortaya çıkan teknolojilerden US, insan kulağının işitme aralığının üst sınırını (20 kHz) aşan, frekans salınımlı bir ses basınç dalgası olarak tanımlanmaktadır (Yu ve ark., 2020b). US uygulamaları, son yıllarda gıdaların raf ömrünü uzatmaya yönelik geleneksel işlemlere alternatif bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Gıda biliminde, US teknolojisi homojenizasyon, emülsifikasyon, ekstraksiyon, kristalizasyon, kesme ve mikrobiyal inaktivasyon gibi birçok süreçte yaygın olarak kullanılmaktadır (Yuan ve ark., 2021). Özellikle süt endüstrisinde pastörizasyona alternatif bir yöntem olarak değerlendirilen US işlemi, düşük maliyetli, basit, hızlı, toksik özellik taşımayan, çevre dostu ve enerji tasarrufu sağlayan özellikleriyle dikkat çekmektedir. Yüksek sıcaklık uygulamalarıyla karşılaştırıldığında, homojenizasyon verimini artırması ve ürün yapısını iyileştirmesi gibi önemli avantajlara sahiptir (Huang ve ark., 2017; Paniwnyk, 2017).

US teknolojisi, frekans ve yoğunluk özelliklerine göre farklı alanlarda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde uygulama yönünden iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar yüksek güç, düşük frekanslı US (18-100 kHz) ve düşük güç, yüksek frekanslı US (100 kHz-1 MHz)'dir (Yıldız, 2021). Birçok gıda işleme prosesinde US, genellikle 20 kHz ile 10 MHz arasında bir frekans aralığında uygulanmaktadır. Yüksek frekanslı

US uygulamaları, gıdaların şeker, asitlik, sertlik, olgunluk, pıhtılaşma ve jel oluşumu gibi fizikokimyasal özelliklerinin analitik olarak ölçülmesinde kullanılmaktadır. Buna karşılık, düşük frekanslı US, gıdaların fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmek amacıyla tercih edilmektedir. Özellikle, süt ve süt ürünlerinde yüksek enerji, 20-25 kHz frekansındaki US uygulamaları fiziksel, kimyasal ve mekanik olarak değişimlere yol açmaktadır (Abrahamsen ve Narvhus, 2022; Bermudez-Aguirre, 2017; Demirdöven ve Baysal, 2008; İçier ve Baysal, 2012).

US işleminin temel etkisi, kavitasyon olarak adlandırılan bir olgudur. Kavitasyon, ses dalgalarının bir sıvı ortamdan geçişi sırasında düşük basınç bölgelerinde moleküller arasındaki mesafenin artmasıyla kabarcıkların oluşması, bu kabarcıkların büyüerek kritik bir hacme ulaşması ve ardından içe doğru çökmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Kabarcığın çöküşü sırasında, son derece hızlı ısıtma ve soğutma süreçleri meydana gelmekte ve bu süreçler, yaklaşık 5000 K (5000 Kelvin, 4726.85°C) sıcaklık ve 1000 atm basınç gibi aşırı koşullar yaratmaktadır (Güneşer ve Erdoğan, 2023).

Süte US uygulanması, sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerinde belirgin değişimlere yol açmaktadır. US'nin süt bileşenleri üzerindeki etkileri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Akdeniz ve Akalın, 2020b; Chandrapala ve ark., 2012; Ertugay ve ark., 2004; Hamdy ve ark., 2018; Kashaninejad ve Razavi, 2020; Liu ve ark., 2014; Ragab ve ark., 2019; Parreiras ve ark., 2020; Scudino ve ark., 2020; Villamiel ve de Jong, 2000). US'nin gıda proteinleri üzerindeki moleküler yapıyı değiştirme konusundaki etkinliği iyi bilinmektedir. Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalar, US'nin süt proteinleri üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde incelemiştir. US uygulamasının peynir altı suyu proteinlerinde yapısal değişikliklere yol açtığı açıkça ortaya konulmuşken, kazein proteinleri üzerindeki kimyasal ve yapısal etkiler ise hala araştırılmaktadır.

US'nin süt proteinlerine etkisi, uygulanan US gücüne bağlı olarak farklılık göstermektedir. Yüksek güç ve düşük frekansta, denatüre protein agregatlarının süspansiyon içinde çözünmesi sağlanırken, düşük güç ve yüksek frekansta oluşan serbest radikaller proteinlerin kimyasal yapısını değiştirebilmektedir. Bu etkiler sonucunda süt proteinlerinin çözünebilirlik, bulanıklık, köpük oluşturma,

emülsifikasyon, jelleşme gibi teknolojik özellikleri ile birlikte sindirilebilirlik, antioksidan ve antihipertansif gibi biyolojik özelliklerinde de değişimler gözlenmektedir (Corzo-Martínez ve ark., 2017; Munir ve ark., 2019; Nguyen ve ark., 2009). Kazein, üçüncül yapıya sahip olmadığından, klasik pastörizasyon uygulamaları sırasında yapısında belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. Ancak, yüksek sıcaklıkta pastörizasyon veya sterilizasyon, sütteki çözünebilir kalsiyumun çökmesine, koloidal kalsiyum fosfatın çözünürlüğünün azalmasına ve κ -kazein ile bazı α -kazeinlerin misellerden ayrılmasına neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra, yüksek sıcaklık işlemleri, serum proteinleri (β -laktoglobulin, α -laktalbumin) ile kazein arasında kompleks ve agregat oluşumunu tetiklemektedir. Buna karşın, US uygulaması kazein misellerinin doğal yapısını büyük ölçüde korur. US'nin gücüne bağlı olarak, kazein misellerinin boyutlarının küçüldüğü ve diğer süt bileşenleriyle etkileşimlerinde değişikliklerin meydana geldiği rapor edilmiştir (Carrillo-Lopez ve ark., 2021; Chandrapala, 2016; Munir ve ark., 2019; Nunes ve Tavares, 2019). Bu kapsamda gerçekleştirilen bir çalışmada, düşük frekanslı US uygulamasıyla (20 kHz), süt serum fazına kazein misellerinden kazein proteinlerinin salındığı belirlenmiştir (Liu ve ark., 2014). 20 kHz frekansta US'nin kazein jel oluşumu üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada, kazein misellerinin yüzey hidrofobitesinin arttığı, ancak yüzey yükünde herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan US uygulamasıyla daha sıkı ve sağlam protein jel ağının oluştuğu ve kazein jelinde daha düşük sinerezis olduğu belirtilmiştir (Chandrapala ve ark., 2013).

US uygulamasının yoğunluğuna bağlı olarak, peynir altı suyu proteinlerinde kimyasal değişimler gözlenmiş; bu değişimler arasında ikincil ve üçüncül yapıların bozulması ve yüzey hidrofobitesinin artması yer almıştır. Bunun yanı sıra, US'nin jel sertliğini ve su tutma kapasitesini önemli ölçüde artırdığı (Cheng ve ark., 2019), protein çözünürlüğü ve emülsiyon aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Jiang ve ark., 2018). Ayrıca US'nun peynir altı suyunda köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesini artırdığı da bildirilmiştir (Jambrak ve ark., 2008).

Yapılan araştırmalar, US uygulamasının sütteki laktoz miktarını anlamlı bir şekilde etkilemediğini, ancak fermente süt ürünlerinin üretiminde laktozun hidrolizini hızlandırarak fermentasyon süresini kısalttığını göstermektedir (Cameron ve ark., 2009; Carrillo-Lopez ve ark., 2021; Juraga ve ark., 2021; Naeim, 2019). Fermente süt

ürünleri üretiminde US uygulaması, laktik asit bakterilerinin ürettiği hücre içi enzim olan β -galaktosidazın hücre dışına daha kolay salınmasını sağlayarak laktozun daha yüksek düzeyde hidrolize edilmesine olanak tanımaktadır. Bu sayede, fermente süt ürünlerinde laktik asit üretimi hızlanmakta ve fermentasyon süreci daha kısa sürede tamamlanmaktadır (Akdeniz ve Akalın, 2020a; Huang ve ark., 2017). Özellikle probiyotik fermente süt ürünlerinin üretiminde, düşük güçlü US uygulaması, probiyotik bakteri hücrelerinde oksijen, besin maddeleri ve büyüme faktörlerinin kütle transferini kolaylaştırmaktadır. Bu sayede, probiyotik bakterilerin gelişimi teşvik edilmekte, probiyotik türüne özgü laktoz hidrolizi sonucu farklı asitlerin üretimi artmakta ve yüksek konsantrasyonda oligosakkaritler ile biyoaktif peptitlerin oluşumu sağlanmaktadır (Guimarães ve ark., 2019). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (Abesinghe ve ark., 2022), manda sütünden yoğurt üretimi sırasında *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'un lag (inokülasyondan hemen sonra) ve logaritmik gelişim fazlarında (inokülasyondan 1 saat sonra) süte uygulanan US işleminin (20 kHz frekans ve 10 dk [dakika]) yoğurt fermentasyonunda β -galaktosidaz aktivitesi ve laktoz hidrolizini önemli ölçüde atırdığı tespit edilmiştir.

Sütte bulunan enzimler üzerinde US'nin etkisi iki ana mekanizma ile gerçekleşmektedir. Birincisi, US'nin enzim ve substrat arasındaki etkileşimini artırarak kütle transferini hızlandırmasıdır. Bu süreç, enzimatik reaksiyonun daha hızlı gerçekleşmesine ve enzimin biyolojik aktivitesinin yükselmesine olanak tanır. Bu durum enzimlerin hücrelerden salınıp, aktif bölgelere daha kolay erişimini sağlayarak aktivitelerini artırabilir. İkinci mekanizma ise yüksek güçlü US'nin enzimin yapısında bulunan van der Waals etkileşimlerini zayıflatması veya hidrojen bağlarını koparması sonucu enzimin ikincil ve üçüncül yapılarını bozmasıdır. Bu yapısal değişiklikler, enzimin biyolojik aktivitesinde azalmaya neden olabilir. Ayrıca, US işlemi sırasında oluşan serbest radikaller, enzimdeki amino asit kalıntılarıyla reaksiyona girerek enzimin stabilitesini veya katalitik etkisini değiştirebilir. Termo-ultrason olarak bilinen US ve ısı işleminin bir arada uygulanması ise enzimlerin denatürasyonuna yol açarak yapısal bozulmalarını hızlandırabilir. Bu etki, özellikle sütün raf ömrünün uzatılması açısından önemlidir. Bu etkilerin şiddeti, kullanılan US'nin gücü, frekansı ve işlem süresi gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir (Huang ve ark., 2017; Mawson ve ark., 2011; Munir ve ark., 2019).

Süt ve süt ürünlerinde US uygulamasının, sütte bulunan vitaminler üzerindeki etkisiyle ilgili yapılan çalışmaların sayısının oldukça sınırlı olduğu dikkat çekmektedir. Farklı çalışmalar, US uygulamasının süt vitaminleri üzerinde genellikle sınırlı etkiler gösterdiğini; özellikle A vitamini miktarında belirgin bir değişim olmazken, E ve B vitaminlerinde uygulama parametrelerine bağlı olarak azalma meydana gelebildiğini ortaya koymuştur (Marchesini ve ark., 2012; Razavi ve Esmailzadeh-Kamari, 2020). Bunun yanında US uygulanan sütün antioksidan aktivitesinin, çiğ ve pastörize süte göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Parreiras ve ark., 2020).

Sütün mineral dengesine US uygulamasının etkisini inceleyen çalışmalar da oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalar, US'nin süt ve süt ürünlerindeki çözünebilir kalsiyum ve fosfor miktarı üzerinde genellikle sınırlı etkiler gösterdiğini (Chandrapala ve ark., 2012; Shanmugam ve ark., 2012) ancak uygulama sıcaklığına bağlı olarak çözünebilir kalsiyum miktarında artış görülebileceğini ortaya koymuştur (Türkmen, 2012).

Yüksek enerji düşük frekanslı ultrasonik işlem, gıdalarda mikrobiyal ve enzimatik inaktivasyon amacıyla kullanılmakta olup, mikrobiyal inaktivasyon ve aktivasyon üzerindeki çeşitli faydalarıyla dikkat çekmektedir (Demirdöven ve Baysal, 2008). US uygulamasının yoğunluğuna (frekans, güç, uygulama süresi ve numune hacmi kombinasyonu) ve ortaya çıkan sıcaklığa bağlı olarak işlemin, gıda ürünleri üzerinde mikroorganizmaların ve enzimlerin aktivasyonu/inaktivasyonu gibi zıt etkiler gösterebileceği bildirilmiştir (Guimarães ve ark., 2021). Bu nedenle, birçok araştırmacı tarafından bakteri veya mayaları US ile inaktif hale getirerek toksin bağlamayı artırma çalışmaları yapılmıştır (Abedi ve ark., 2022a; Abedi ve ark., 2022b; Karazhiyan ve ark., 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada materyal olarak AFM₁ standardı, test bakterileri, besiyerleri ve kimyasal maddeler kullanıldı. Kromatografik analizler HPLC (High Performance Liquid Chromatography-Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.1. Aflatoksin M₁ Standardı

AFM₁ standardı Lab. Instruments tarafından ≥ 1.1 ml'lik sıvı formda ve 10 mg/L (miligram/litre) konsantrasyonda asetonitril (ACN) içerisinde çözündürülmüş AFM₁ olarak temin edildi.

3.1.2. Test Bakterileri

Çalışmada kullanılacak LAB türleri; Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarı koleksiyonundan temin edildi. Bakterilerden; *L. rhamnusus* ATCC 7469, *L. reuteri* DSM 17938 ve *L. acidophilus* CECT 4529 kullanıldı.

3.1.3. Besi Yerleri, Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Besiyerleri ve kullanılan kimyasal maddelerin hepsi İNTERLAB Laboratuvar Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.'den temin edildi. Analizlerde kullanılan besiyerleri, kimyasallar ve cihazlar aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir;

- MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) Broth Merck M110661.0500
- MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) Agar Merck M110660.0500
- MRD (Maximum Recovery Diluent) Merck 1.12535
- HPLC saf metanol, 2.5 L 106018.2500
- HPLC saf asetonitril, 2.5 L Merck 1.00030.2500
- Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) tablet, Sigma-Aldrich SIAL-P4417-100TAB
- %32' lik HCl (Tekkim, Türkiye)
- Gliserol
- Saf su
- Mc Farland (McF) cihazı (Biosan Den-1 hücre densitometre cihazı)
- Problu ultrases sistemi (Bandelin Hd 2200.2, prob TT 13 Amplichron® Almanya)
- HPLC (Agilent 1260, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj cihazı (Hettich, Almanya)
- Mikrosantrifüj cihazı (Hettich, Almanya)
- Otomatik pipet (CalPro S Otomatik Pipet 100 - 1000 µl)
- Pipet ucu (200 µl, Isolab)
- Pipet ucu (1000 µl, Isolab)
- Eppendorf tüpü (2 ml)
- Falkon tüpü (15 ml, Isolab)
- Balon Joje (500 ml, Isolab)
- Plastik petri kabı (90 mm-17 mm, Isolab)
- Vakum konsantratör (Heto, Danimarka)
- İnkübatör (Memmert, Almanya)
- Vorteks cihazı (Velp, ZX3, İtalya)
- Otoklav cihazı (Hirayama, Hiclave HV85, Japonya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizma Stoklarının Hazırlanması

LAB'ler 10 ml steril MRS Broth besiyerine aktarıldı. 37°C'de, 24 saat inkübe edilerek aktifleştirildi. Stok mikroorganizmalar elde etmek için canlandırılan bakterilerden son konsantrasyon %25 gliserol olacak şekilde gliserol ile karıştırıldı (750 µl [mikrolitre] bakteri + 250 µl gliserol). Stok LAB -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Stok Mikroorganizmaların Canlandırılması

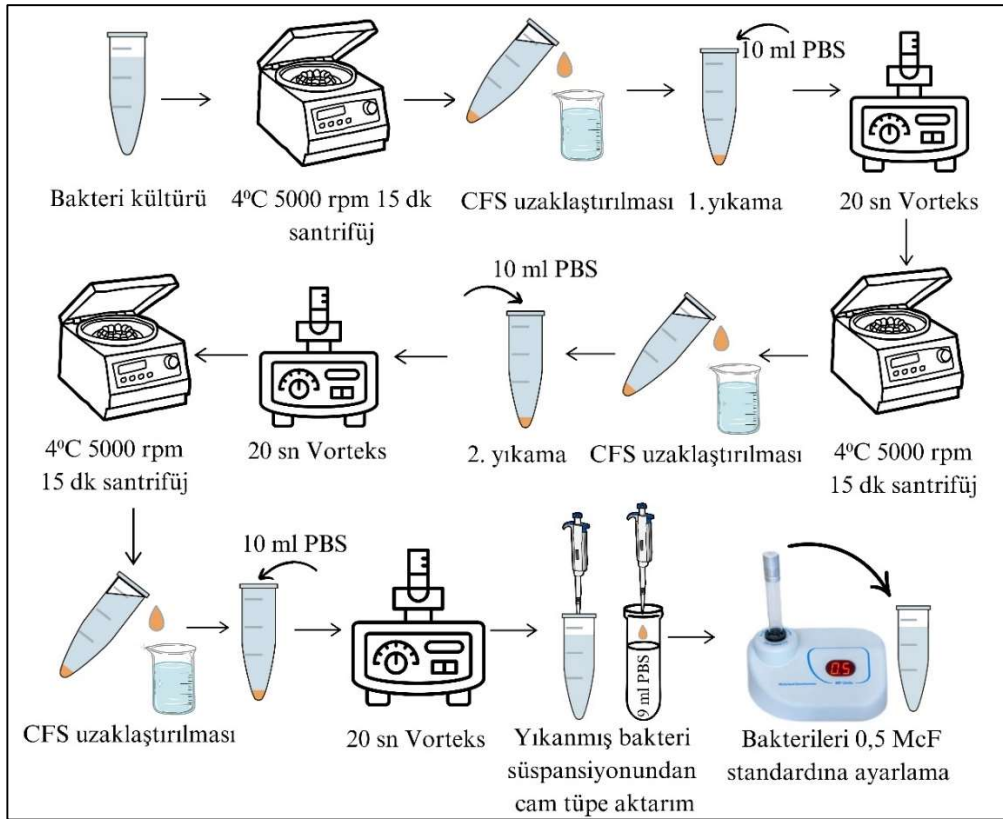
Muhafaza edilen (-20°C'de) LAB'ler steril MRS Broth besiyeri ortamına 100 µl aktarıldı ve inkübasyona bırakıldı (37°C'de 24 saat). İnkübasyon sonucunda analizlerde kullanılacak olan mikroorganizmalar elde edildi.

3.2.3. Mikroorganizma Yoğunluğunun Belirlenmesi

LAB'lerin yoğunluğunu belirlemek için steril MRS Agar'a ekimler yapılarak petrielerde mikroorganizma sayıları belirlendi. Bu amaçla seri dilüsyonlardan dökme plak yöntemine göre ekimleri yapılarak LAB sayımı gerçekleştirildi. Analiz edilmeye hazır olan mikroorganizma süspansiyonundan 1 ml alınarak 9 ml'lik steril MRD'ye aktarıldı. Sıra ile 10. dilüsyona kadar paralel seyreltmeler yapıldı. Uygun dilüsyonlardan 3 tekrarlı ekim yapılarak petrieler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonunda mikroorganizma kolonileri incelendi. Aynı zamanda McFarland cihazı ile 0.5 McF'ye ayarlanarak yapılan 3 tekrarlı ekim sonucuna göre ortalama 1.2×10^8 kob/ml (koloni oluşturan birim/ml) bakteri elde edildi. Bunun sonucunda çalışmada bakterilerin 0.5 McF'ye ayarlanarak kullanılmasına karar verildi (Sanaldi ve Coban, 2023).

3.2.4. Çalışmada Kullanılacak Laktik Asit Bakteri Hücrelerinin Elde Edilmesi

Elde edilen mikroorganizmalara 15 dakika (dk), 5000 rpm (3360 g) santrifüj işlemi uygulandı. Dibe çöken mikroorganizmaların üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 10 ml steril PBS ile vorteks cihazı kullanılarak birinci yıkama işlemi yapıldı. İlk yıkama işleminden sonra yeniden +4°C’de 15 dk, 5000 rpm (3360 g) santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant (üst faz) uzaklaştırılarak 10 ml steril PBS ile ikinci yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemi 2 defa yapıldı. Çalışma gruplarına eklenecek bakteri peletleri olarak ayarlandı (Şekil 3.1). Ayrıca LAB karışımı (mix’leri) elde etmek için, 0.5 McF standardına uygun olarak hazırlanan her bakteriden yaklaşık 3.333’er ml alınarak steril boş tüpe aktarıldı. Bu uygulamalar her çalışma öncesi tekrarlandı. Çalışmalar 3 paralel olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılacak LAB hücrelerinin elde edilmesi.

3.2.5. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde satın alınan PBS'ten 100 ml saf suya 1 tablet eklenerek PBS sıvısı hazırlandı. Ardından otoklavda sterilize edilip (115°C, 10 dk) kullanıma hazır hale getirildi.

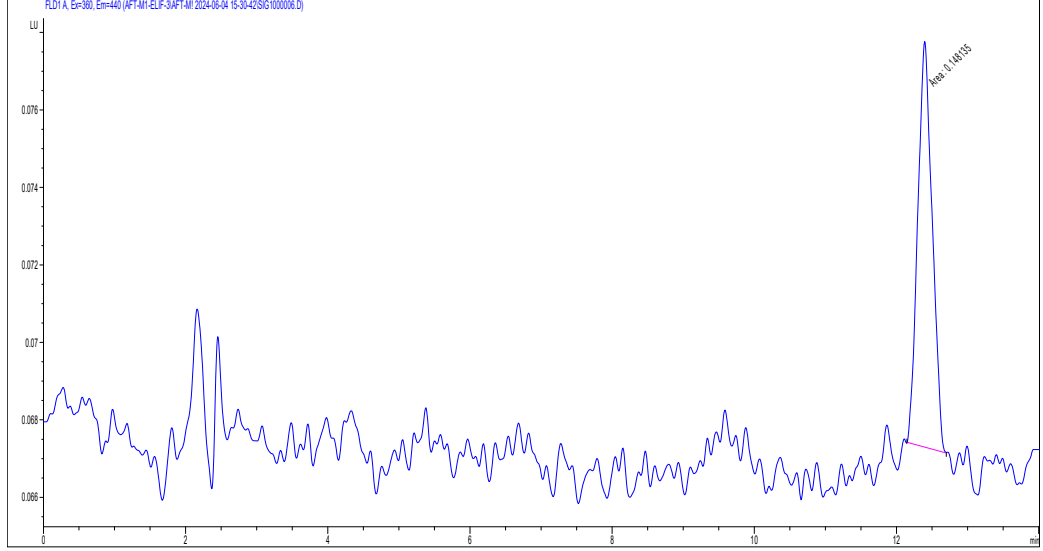
3.2.6. UHT Yağsız süt

En fazla % 0.1 süt yağı içeren UHT yağsız süt kullanıldı.

3.2.7. Aflatoksin M₁ Standardının Hazırlanması

AFM₁ standardından 0.5 ml alınarak 9.5 ml ACN ve ultra saf su (1:1) içerisinde çözüldürüldü ve stok solüsyonu (500 ng/ml) elde edildi. Ardından alüminyum folyoya sarılıp +4°C'de muhafaza edildi. Çalışmaya başlamadan önce stok solüsyonundan 1 ml alınarak 9 ml steril distile su ile karıştırıldı. Daha sonra 37°C'de 15 dk bekletilerek 50 ng/ml AFM₁ içeren çalışma ortamı elde edildi. Bu uygulama her çalışma grubunda taze olarak hazırlandı.

1 ng/ml yoğunluğundaki AFM₁ ile yapılan HPLC analizinde baselinedaki dalgalanmalar süt içerisinde fazla meydana geldiğinden pik ayrımının daha rahat yapılabilmesi için 2 ng/ml yoğunluğundaki AFM₁ ile çalışılmaya karar verildi (Şekil 3.2). Kromatografik analiz sonucunda, AFM₁'in 11.7-12.6 dk aralığında pik yaptığı belirlendi.



Şekil 3.2. 1 ng/ml yoğunluğundaki AFM₁'in standart kromatogram görüntüsü.

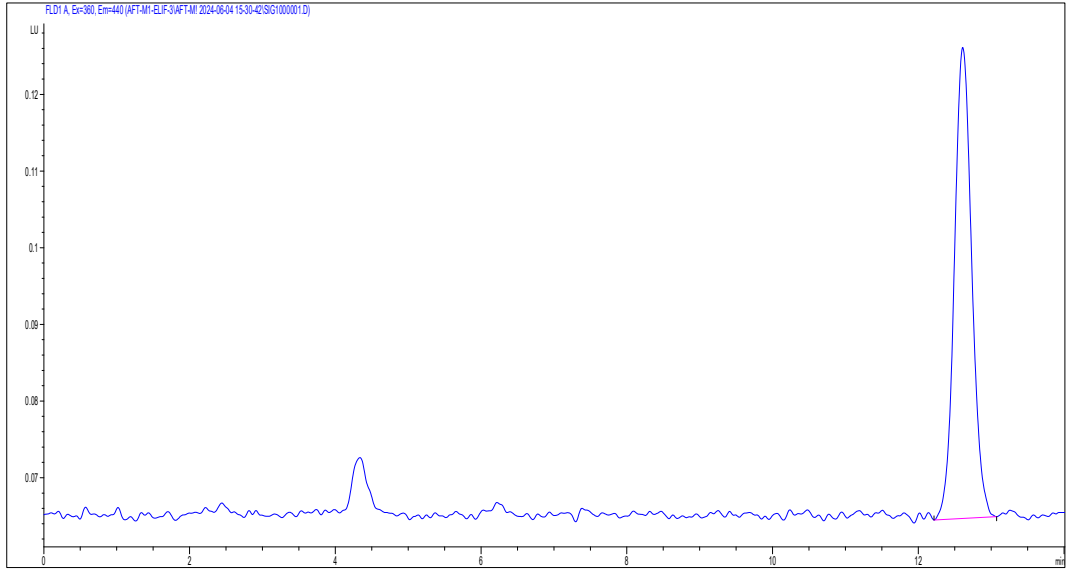
3.2.8. Aflatoksin M₁ Miktarının Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi

AFM₁ düzeyleri Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında bulunan HPLC cihazı ile belirlendi (Şekil 3.3).

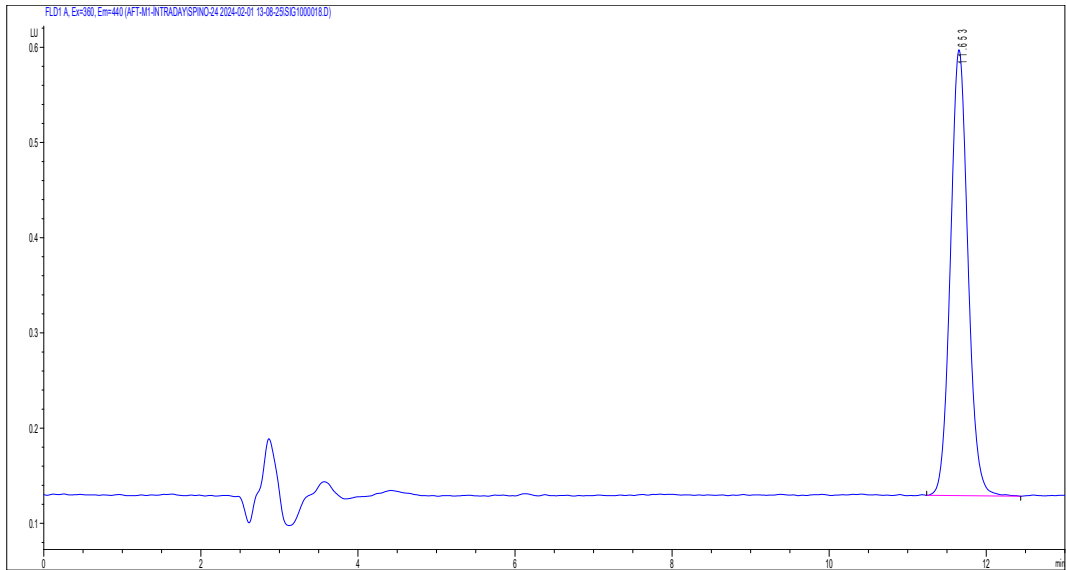


Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı.

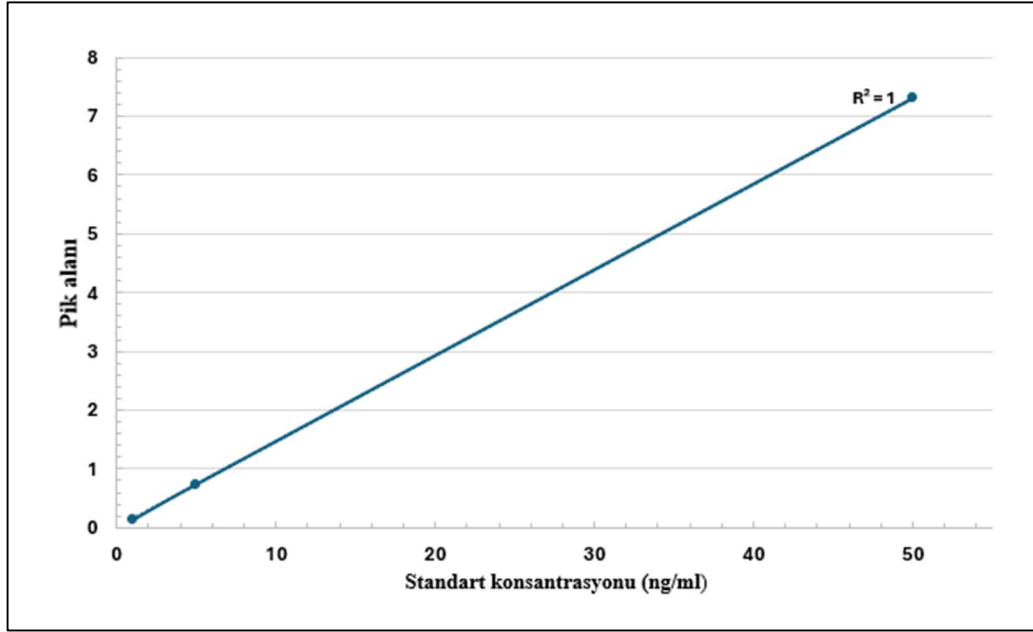
Stok AFM₁ standart solüsyonu (500 ng/ml), saf analitik AFM₁ standardı ile ACN ve ultra saf su (1:1) kullanılarak hazırlandı. Bu stok solüsyon 1 (Şekil 3.2), 5 (Şekil 3.4) ve 50 (Şekil 3.5) ng/ml olacak şekilde 10 ml'lik falkon tüplerinde mobil faz ile seyreltilerek ara standart solüsyonları hazırlandı. Hazırlanan ara standart solüsyonlarının kromatografik analizleri yapılarak standart eğrileri (Şekil 3.6) oluşturuldu ve buradan r² (korelasyon katsayısı) değerleri hesaplanarak doğrulukları teyit edildi.



Şekil 3.4. 5 ng/ml yoğunluğundaki standart kromatogram görüntüsü.



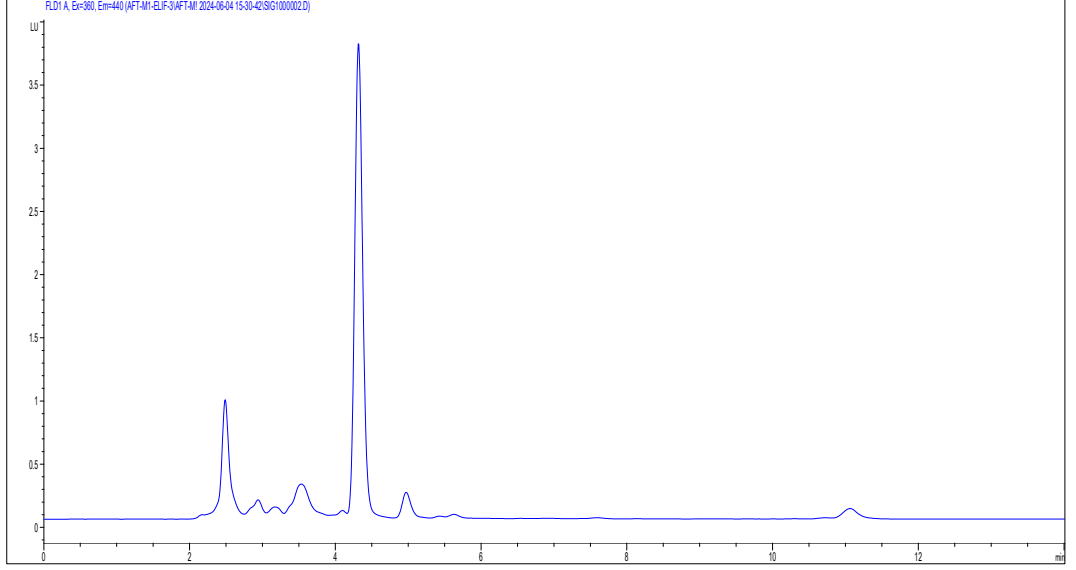
Şekil 3.5. 50 ng/ml yoğunluğundaki standart kromatogram görüntüsü.



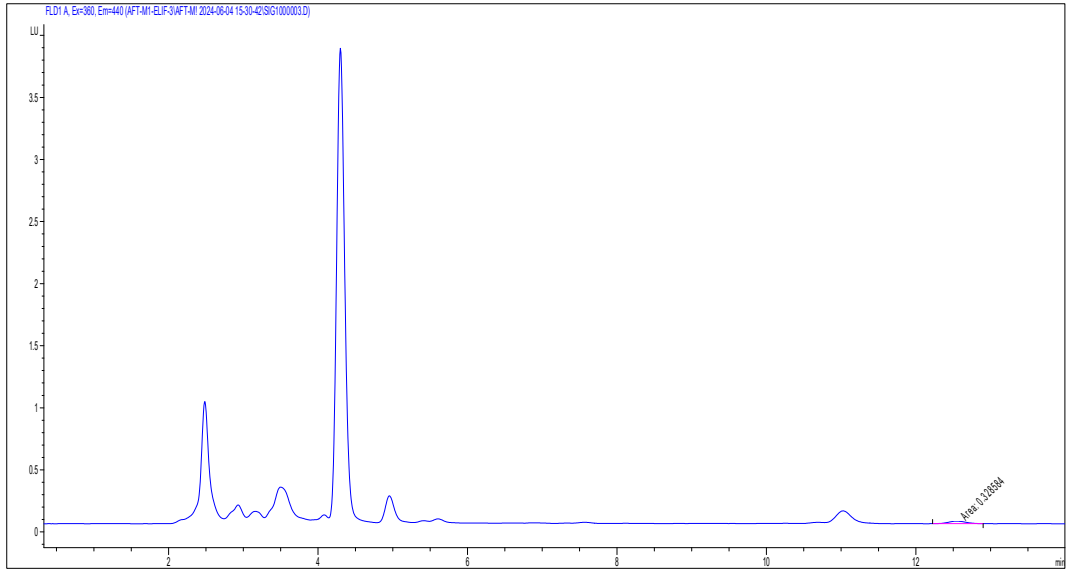
Şekil 3.6. AFM₁ analizi için standart kalibrasyon eğrisi.

UHT yağsız süt örnekleri çözdürüldükten ve vortekslendikten sonra UHT yağsız süt içindeki AFM₁ düzeyleri daha önce Markaki ve Melissari (1997) tarafından tarif edilen metotta yapılan bazı değişiklikler ile HPLC’de analiz edildi. Buna göre 2 ml’lik eppendorf tüplerine 0.5 ml UHT yağsız süt örnekleri koyularak 1 dk vortekslendi. Sonrasında 1 ml ACN eklenerek 2 dk boyunca vortekslendi ve 0.2 gr MgSO₄ (magnezyum sülfat) eklenerek tekrar vortekslendi. Ardından 12.000 rpm’de 10 dk santrifüj (mikrosantrifüj) edildi. Bunun sonucunda ayrılan süpernatant pipet yardımı ile alınıp 10 ml’lik cam tüplere aktarılarak 65°C’ye ayarlı vakum konsantratörde uçuruldu. Sonrasında örnekler 200 µl mobil faz ile çözdürülerek 75 µl’si analiz için kromatografik sisteme uygulandı.

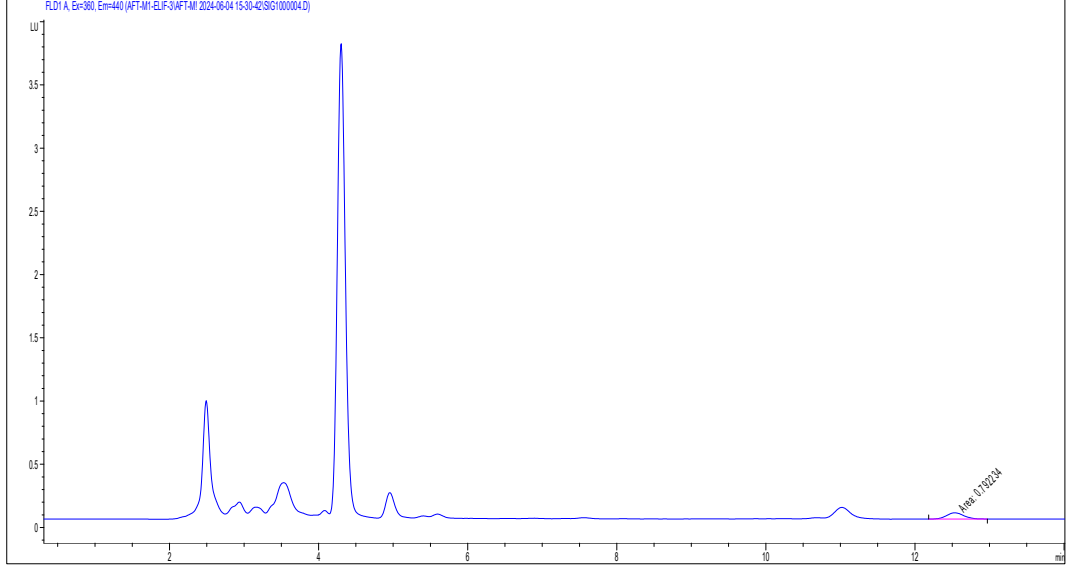
Örneklerin HPLC analizine başlamadan önce içinde AFM₁ olmadığı bilinen UHT yağsız süt örnekleri eppendorf tüplerine aktarılarak biri boş (Şekil 3.7) olmak üzere yoğunlukları 1 (Şekil 3.8), 2 (Şekil 3.9) ve 5 (Şekil 3.10) ng/ml olacak şekilde AFM₁ standart solüsyonu ilave edildi. Ardından ekstraksiyon işleminin geri alım oranları gün içi ve günler arası varyasyon, en küçük tespit (LOD) ve en küçük yoğunluk belirleme limitleri (LOQ) saptanarak yöntemin validasyonu gerçekleştirildi (Tablo 3.1).



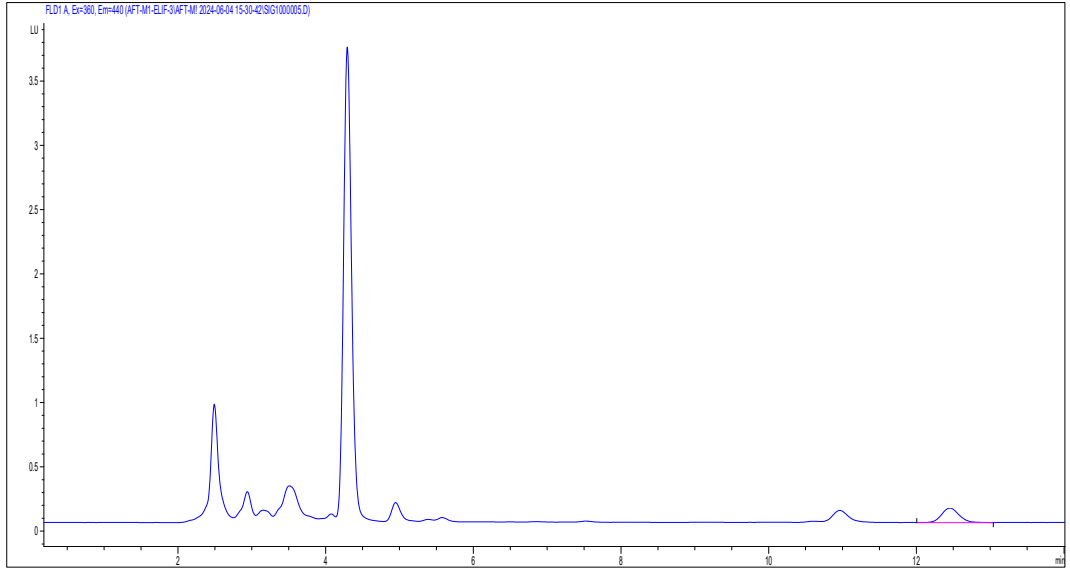
Şekil 3.7. Boş UHT yağsız süt kromatogram görüntüsü.



Şekil 3.8. 1 ng/ml AFM₁ yoğunluğunda hazırlanan UHT yağsız süt örneğinin kromatogram görüntüsü.



Şekil 3.9. 2 ng/ml AFM₁ yoğunluğunda hazırlanan UHT yağsız süt örneğinin kromatogram görüntüsü.



Şekil 3.10. 5 ng/ml AFM₁ yoğunluğunda hazırlanan UHT yağsız süt örneğinin kromatogram görüntüsü.

Tablo 3.1. HPLC analizi ile AFM₁ için belirlenen validasyon parametreleri.

Parametreler	AFM ₁
LOD değeri	0.25 ng/ml
LOQ değeri	0.75 ng/ml
Çalışılan yoğunluklar	1-5 ng/ml
r ² değeri	0.99998
Gün içi geri alım (%)	92.30
Gün içi varyasyon katsayısı (%)	8.69
Günler arası geri alım (%)	92.81
Günler arası varyasyon katsayısı (%)	3.39

LOD: En küçük tespit limiti

LOQ: En küçük yoğunluk belirleme limiti

r²: Korelasyon katsayısı

AFM₁ analizi için mobil faz olarak MeOH:ACN (1:1), ultra saf su, fosforik asit (%85, pH: 3.41) karışımı izokrotik programda iki girişli pompa aracılığı ile akış hızı dk'da 1 ml olacak şekilde pompalandı ve analiz 13 dk'da tamamlandı. Analizde kolon olarak C₁₈ kolon (Eclipse XDB, 5µm [mikrometre], 4.6 x 250 mm) ve kolon koruyucu olarak nükleosil C₁₈ (3 µm) kartuş kullanıldı. Analiz sırasında kolon ısısı 60°C'ye ayarlandı. Analizler floresan dedektörde 360 nm eksitasyon ve 440 nm emülsiyon dalga boylarında yapıldı.

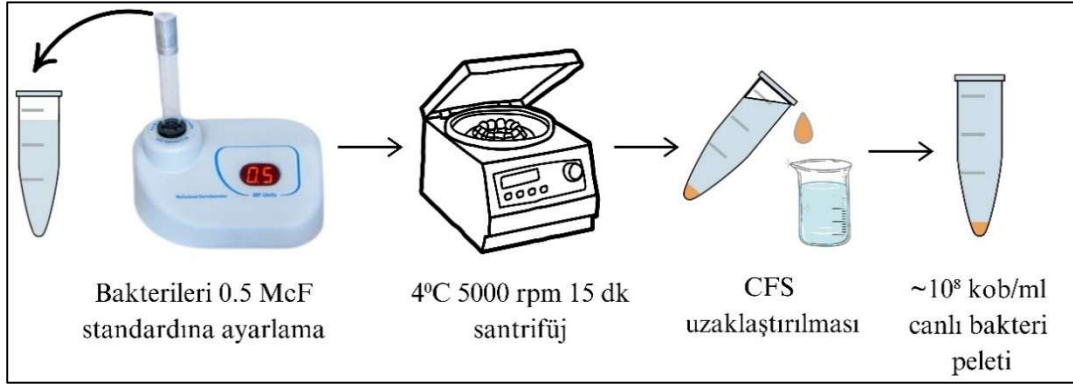
Bağlanmış yüzde AFM₁ miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{AFM}_1 (\%) = [1 - \frac{\text{Örneğin AFM}_1 \text{ pik alanı}}{\text{Kontrolün AFM}_1 \text{ pik alanı}}] \times 100$$

3.2.9. Çalışma Grupları

Canlı Bakteriler

Canlı LAB peletlerini ayarlamak amacıyla LAB sayıları 0.5 McF standadına uygun olarak ayarlandı. Ardından 4°C, 5000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılıp falkon dibinde kalan, canlı LAB'lere ait peletler bağlanma deneyine hazır hale getirildi (Şekil 3.11) (Yücel, 2019).

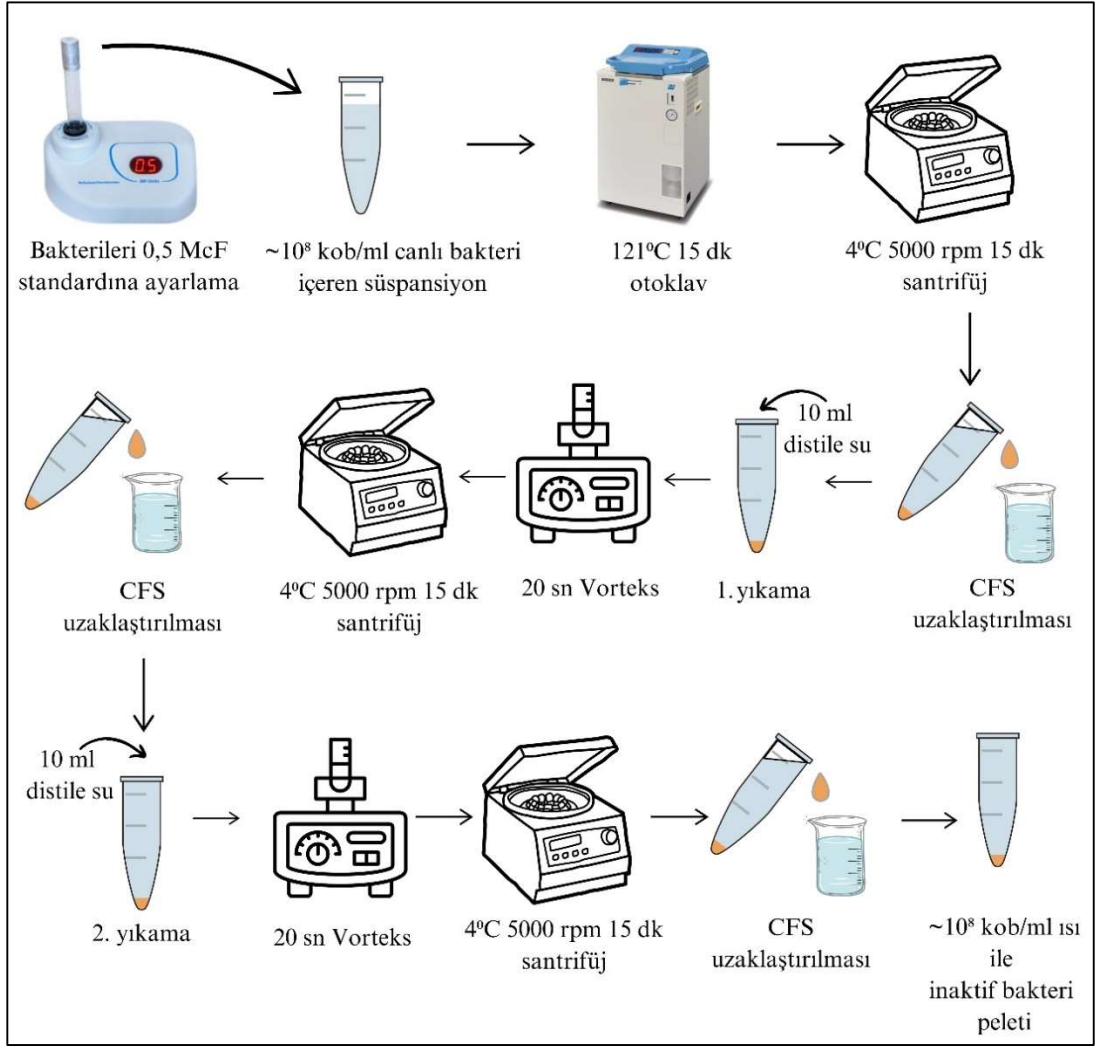


Şekil 3.11. Canlı bakteri grubundaki bakteri peletlerinin elde edilmesi.

Canlı bakteri grubunda kullanılan bakteri sayılarının kontrolü için 0.5 McF'ye ayarlanan bakteri süspansiyonundan 1 ml alınarak 9 ml'lik steril MRD'ye aktarıldı. Sıra ile 10. dilüsyona kadar paralel seyreltmeler yapıldı. Uygun dilüsyonlardan steril MRS Agar'a, dökme plak yöntemiyle, 3 tekrarlı ekim yapılarak petripler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonunda mikroorganizma kolonilerinin sayımı yapıldı (Tablo 4.1). Bu uygulamalar her çalışma öncesi tekrarlandı.

Isı Uygulaması

Hashemi ve Amiri (2022) tarafından tarif edilen metotta yapılan 0.5 McF standardında hazırlanan LAB'ler 10 ml steril PBS içinde; 121°C'de 15 dk otoklavlanarak inaktif hale getirildi. Ardından inaktif LAB'ler 4°C, 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek 2 defa 10 ml steril distile su ile yıkandı ve her yıkama sonrası 20 saniye (sn) vortekslendi. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp falkon dibinde kalan, ısı ile inaktif LAB'lere ait peletler bağlanma deneyine hazır hale getirildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Isı ile denatüre bakteri grubundaki bakteri peletlerinin elde edilmesi.

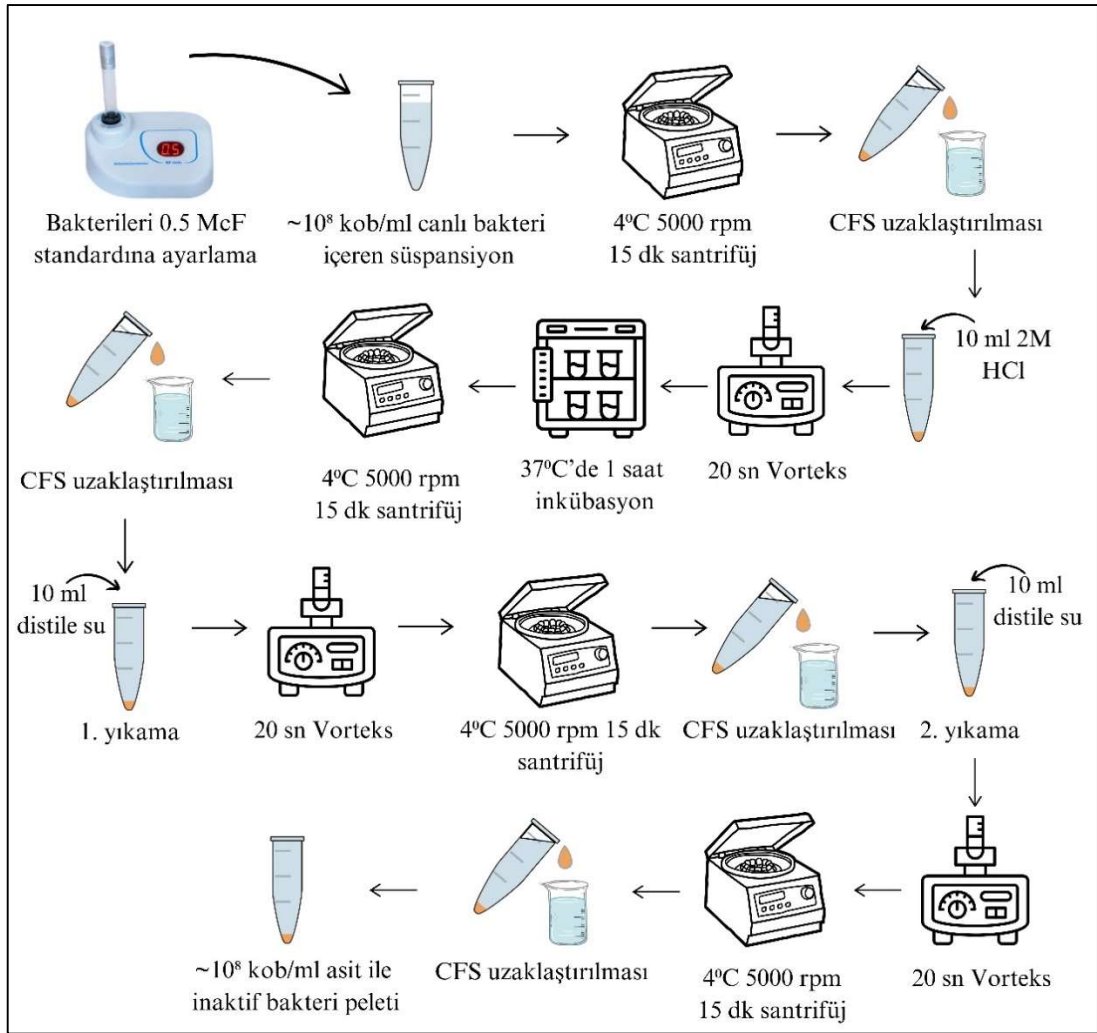
10 ml PBS içerisinde hazırlanan bakteri süspansiyonu otoklavlandıktan sonra, herhangi bir dilüsyon işlemi uygulanmaksızın süspansiyon doğrudan MRS Agar'a dökme plak yöntemiyle ekildi. Bu yöntemle, ısıl işlem sonrası bakterilerin canlılık durumu (ölü veya canlı) kontrol edildi. Petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonunda koloni gelişimi incelendi (Tablo 4.1). Bu uygulamalar her çalışma öncesi tekrarlandı.

Asit Uygulaması

Karazhiyan ve ark. (2016) tarafından tarif edilen metotta olduğu gibi $\sim 10^8$ kob/ml LAB içerdiği bilinen peletlerin üzerine 10 ml 2M (molar) HCl eklendi.

2M HCl hazırlanışı: Molarite formülüne göre hesaplandı. Balon jojeye bir miktar distile su eklendi, %32'lik HCl'den (yoğunluk 1.16, molekül ağırlığı 36.5 g/mol) 98.42 ml alınarak distile suyun üzerine ilave edildi ardından 500 ml'ye tamamlanana kadar tekrar distile su eklendi. Çalışmada kullanılacak HCl yarım saat önceden 37°C'de bekletildi.

Üzerine HCl eklenen pelletler vortekslendi. Daha sonra 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Ardından inaktif LAB'ler 4°C, 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek 2 defa 10 ml steril distile su ile yıkandı ve her yıkama sonrası 20 sn vortekslendi. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp falkon dibinde kalan asit ile inaktif LAB'lere ait pelletler bağlanma deneyine hazır hale getirildi (Şekil 3.13).

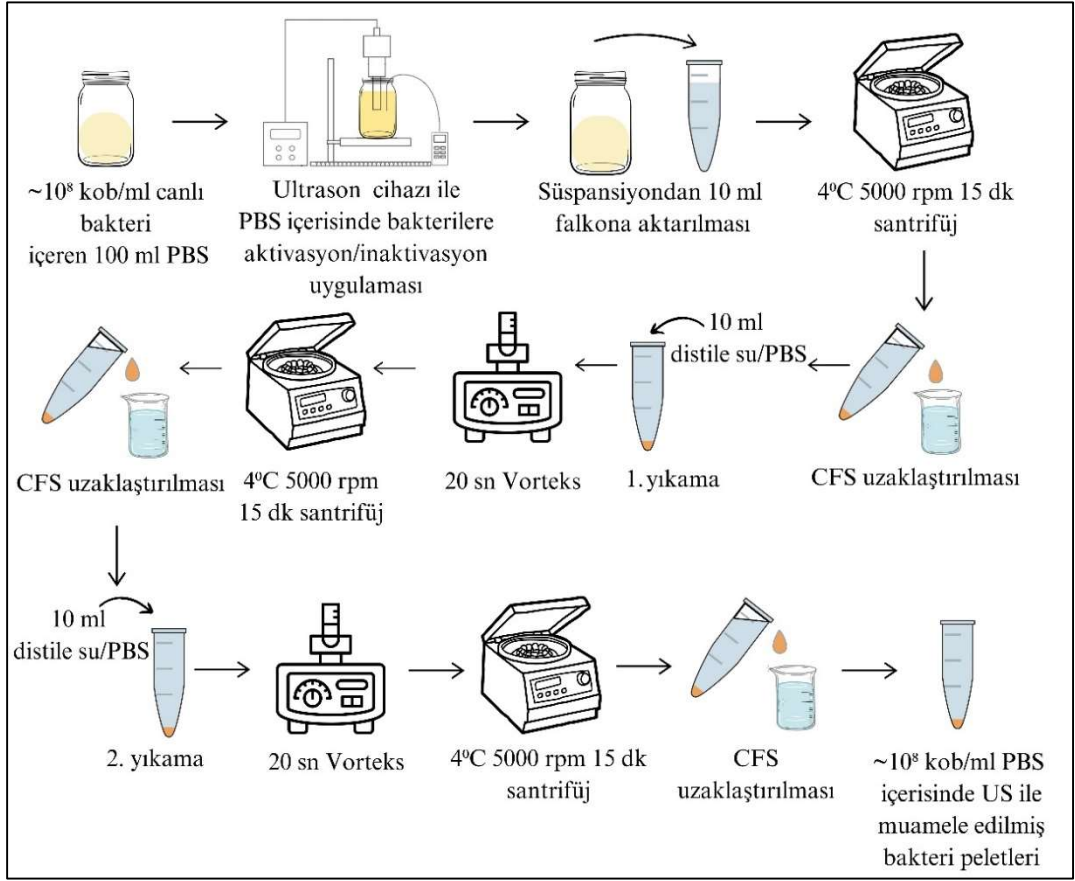


Şekil 3.13. Asit ile denatüre bakteri grubundaki bakteri pelletlerinin elde edilmesi.

Asit ile inaktif bakteri grubunda kullanılan bakterilerin asit uygulaması sonrası fizyolojik durumunun (canlı-ölü) kontrolü için; 2. yıkamada distile su eklenip vortekslendikten sonra sulandırma yapmadan süspansiyonun kendisinden MRS Agar'a dökme plak yöntemiyle ekim yapıldı. Petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonunda koloni gelişimi incelendi (Tablo 4.1). Bu uygulamalar her çalışma öncesi tekrarlandı.

Ultrason Uygulaması

İçerisinde $\sim 10^8$ kob/ml LAB olan 100 ml PBS (oda ısısında), 190 ml'lik cam kavanozlara koyuldu. Ardından LAB'ye problu ultrases sistemi (Bandelin Hd 2200.2, prob TT 13, 200 Watt maksimum güç, Amplicron® Almanya) ile 20 kHz / %100 genlikte, termometre ile 90°C ölçülene kadar (16 dk 15 sn) ve 20 kHz / %15 genlikte 45°C ölçülene kadar (10 dk 54 sn) US uygulandı. US uygulamasında 20 kHz frekans ile %100 ve %15 genlik kullanımının nedeni, yapılan ön çalışmalar sırasında bakterilerin bulunduğu ortamda hem aktif hem de inaktif formda tutulabilmelerini sağlayacak uygun frekansların belirlenmiş olmasıdır. US işlemi bitince kavanoz içerisinden 10 ml alınarak steril falkona koyuldu. Ardından 4°C, 5000 rpm' de 15 dk santrifüjlenerek inaktif olanlar 2 defa 10 ml steril distile su ile aktif olanlar ise 2 defa 10 ml PBS ile yıkandı. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp falkon dibinde kalan US ile aktif ve inaktif hale getirilen LAB'lere ait peletler bağlanma deneyine hazır hale getirildi (Şekil 3.14; Şekil 3.15).



Şekil 3.14. PBS içerisinde US uygulanan gruplarda bakteri peletlerinin elde edilmesi.



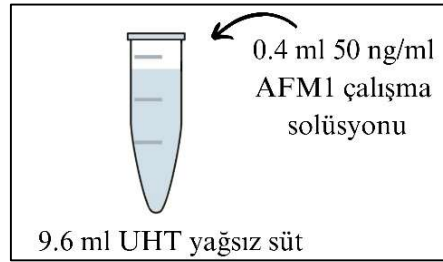
Şekil 3.15. PBS içerisinde US uygulamasının görüntüsü.

PBS içerisinde aktivasyon düzeyinde US uygulanan bakterilerin sayılarını belirlemek için; uygulama öncesi bakteri süspansiyonundan 1 ml alınarak 9 ml'lik MRD'ye aktarıldı. Sıra ile 10. dilüsyona kadar paralel seyreltmeler yapıldı. Uygun dilüsyonlardan MRS Agar'a, dökme plak yöntemiyle, 3 tekrarlı ekim yapılarak petriyer 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda bakteri

kolonilerinin sayımı yapıldı. PBS içerisinde aktivasyon düzeyinde US uygulaması sonrası bakteri sayılarını belirlemek için; bakteriler AFM₁ ile 1 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra yukarıda bahsedildiği gibi bakterilerin ekimleri yapıp sayıları tekrar kontrol edildi (Tablo 4.1).

PBS içerisinde US ile inaktifleştirilen bakteri grubunda kullanılan bakterilerin US sonrası fizyolojik durumunun (canlı-ölü) kontrolü için US sonrası sulandırma yapmadan süspansiyonun kendisinden MRS Agar’a dökme plak yöntemiyle ekim yapıldı. Petriler 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda koloni gelişimi incelendi (Tablo 4.1). Bu uygulamalar her çalışma öncesi tekrarlandı.

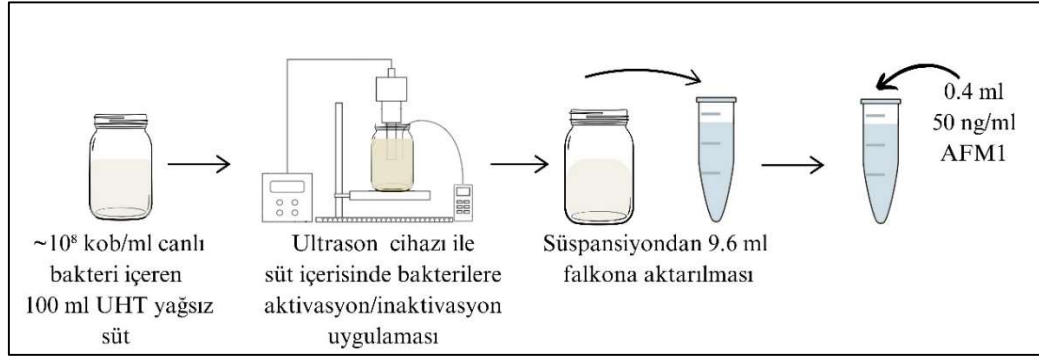
Çalışma gruplarının pozitif kontrol grupları için; içerisinde LAB bulunmayan UHT yağsız süt ortamı 2 ng/ml AFM₁ ile kontamine edildi (Şekil 3.16). Bu uygulama her çalışma öncesi tekrarlandı.



Şekil 3.16. Kontrol grubunda uygulama aşaması.

UHT Yağsız Süt İçerisinde Ultrason Uygulaması

Bu çalışmada LAB’ler UHT yağsız süt ortamı içerisinde aktif ve inaktif hale getirilerek AFM₁ bağlama oranı da araştırıldı. İçerisinde $\sim 10^8$ kob/ml LAB olan 100 ml UHT yağsız süt (oda ısısında), 190 ml’lik cam kavanozlara koyuldu. Ardından LAB’lere problu ultrases sistemi ile 20 kHz / %100 genlikte termometre ile 90°C ölçülene kadar (8 dk 17 sn) ve 20 kHz / %15 genlikte termometre ile 45°C ölçülene kadar (4 dk 50 sn) US uygulandı. US işlemi bitince peletlere yıkama işlemi gerçekleştirilmedi. Süt soğumaya bırakılmadan içerisinden 9.6 ml alınarak steril falkona koyuldu. Daha sonra içerisine 0.4 ml AFM₁ çalışma solüsyonu eklendi ve vortekslendi (Şekil 3.17; Şekil 3.18).



Şekil 3.17. UHT yağsız süt içerisinde US uygulanan gruplarda çalışma aşamaları.



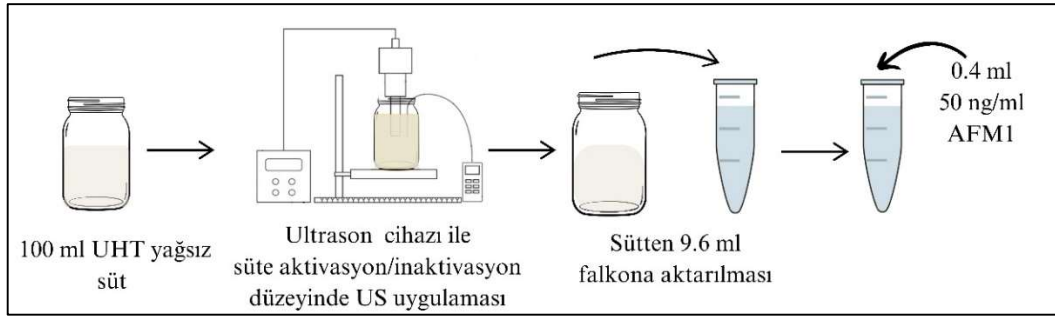
Şekil 3.18. UHT yağsız süt içerisinde US uygulamasının görüntüsü.

UHT yağsız süt içerisinde aktivasyon düzeyinde US uygulanan bakterilerin sayılarını belirlemek için; uygulama öncesi bakteri süspansiyonundan 1 ml alınarak 9 ml'lik MRD'ye aktarıldı. Sıra ile 10. dilüsyona kadar paralel seyreltmeler yapıldı. Uygun dilüsyonlardan MRS Agar'a, dökme plak yöntemiyle, 3 tekrarlı ekim yapılarak petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda bakteri kolonilerinin sayımı yapıldı. UHT yağsız süt içerisinde aktivasyon düzeyinde US uygulaması sonrası bakteri sayılarını belirlemek için; bakteriler AFM₁ ile 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra yukarıda bahsedildiği gibi bakterilerin ekimleri yapıp sayıları tekrar kontrol edildi (Tablo 4.1).

UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilen bakteri grubunda kullanılan bakterilerin US sonrası fizyolojik durumunun (canlı-ölü) kontrolü için US sonrası sulandırma yapmadan süspansiyonun kendisinden MRS Agar'a dökme plak yöntemiyle ekim yapıldı. Petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon

süresi sonunda koloni gelişimi incelendi (Tablo 4.1). Bu uygulamalar her çalışma öncesi tekrarlandı.

UHT yağsız süt içerisinde US uygulanan grupların kontrol gruplarında ise herhangi bir LAB içermeyen 100 ml UHT yağsız süte yukarıda belirtildiği gibi aktivasyon ve inaktivasyon işlemleri uygulandıktan sonra süt (9.6 ml) toksin (0.4 ml) ile bir araya getirildi (Şekil 3.19).



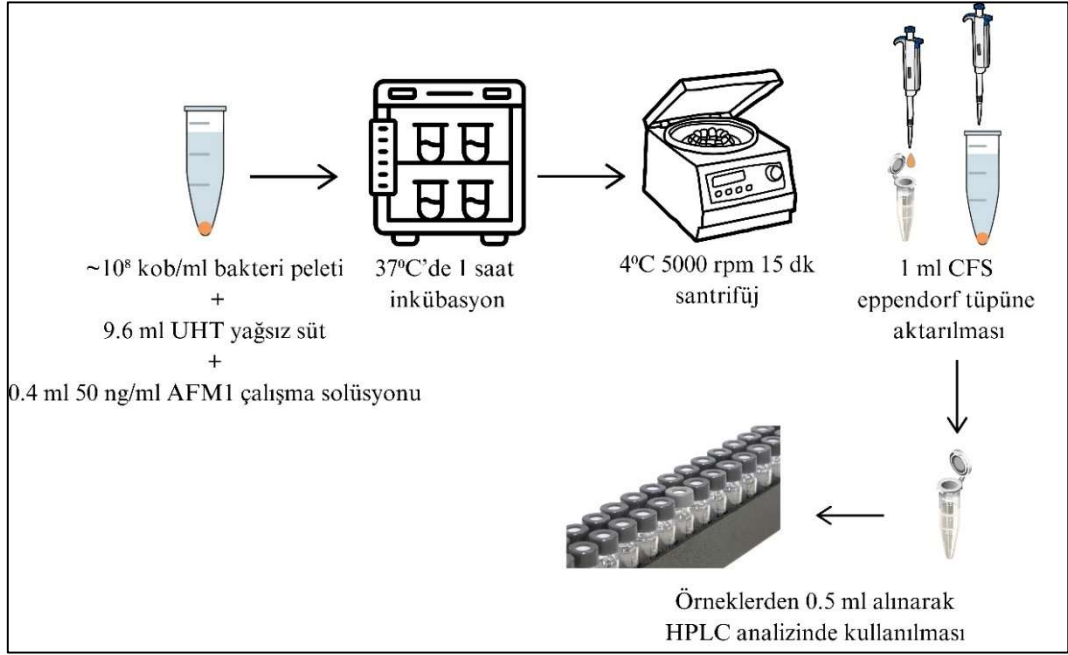
Şekil 3.19. UHT yağsız süt içerisinde US uygulanan grupların kontrol gruplarındaki çalışma aşamaları.

3.2.10. Detoksifikasyonun Tespiti

Çalışmada tüm gruplardaki AFM₁ detoksifikasyonu aşağıdaki işlem basamakları sonucunda tespit edildi (Şekil 3.20):

1. UHT yağsız süt (9.6 ml) + 0.4 ml AFM₁ (50 ng/ml) + LAB (~10⁸ kob/ml) + 20 sn vorteks yapıldı.
2. Kontrol grupları (9.6 ml UHT yağsız süt + 0.4 ml AFM₁ [50 ng/ml]) + 20 sn vorteks yapıldı.
3. Tüm örnekler inkübasyon (1 saat, 37°C) sonrası, +4°C’de, 5000 rpm ve 15 dk boyunca santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası süpernatantlar (1 ml) eppendorfa aktarıldı ve -20°C’de muhafaza edildi.
5. Süpernatantlar (0.5 ml) AFM₁ miktarının tespiti için HPLC’de okutuldu.

Bağlanma çalışmaları 3 paralel halinde yapıldı.



Şekil 3.20. Tüm çalışma ve kontrol gruplarında AFM₁ detoksifikasyonun tespiti.

3.2.11. Çalışma Gruplarının Kısaltmaları

1. K: UHT yağsız süt + AFM₁ (Kontrol)
2. KUA: UHT yağsız süte aktivasyon düzeyinde US uygulaması + AFM₁ (Kontrol)
3. KUI: UHT yağsız süte inaktivasyon düzeyinde US uygulaması + AFM₁ (Kontrol)
4. CB: Canlı LAB + UHT yağsız süt + AFM₁
5. ID: Isı ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁
6. AD: Asit ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁
7. UA: PBS içerisinde US ile aktive edilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁
8. UI: PBS içerisinde US ile inaktive edilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁
9. SUA: UHT yağsız süt içerisinde US ile aktive edilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁
10. SUI: UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktive edilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

3.2.12. İstatistiksel Analiz

Detoksifikasyon verileri SPSS 26 (IBM SPSS, USA) istatistik paket programı ile analiz edildi. Verilerin normallik testi Kolmogorov-Smirnov sınamasıyla gerçekleştirildi. Test sonucunda homojen dağılım gösteren gruplar arası farklılığın tespitinde varyans analizi (One Way Anova) ve Duncan testi uygulandı. İstatistiki verilerin karşılaştırılmasında $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mikrobiyolojik Ekim Sonuçları

Yapılan 3 paralel ekim sonuçlarına göre; canlı bakteri gruplarında kullanılmak üzere geliştirilen LAB'ler ortalama 10^8 kob/ml düzeyinde elde edilmiştir. Isı ile denatüre olmuş (ID), asit ile denatüre olmuş (AD), PBS içerisinde US ile inaktifleştirilmiş (Uİ) ve UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB'lerin (SUI) mikrobiyal ekim sonuçlarında üremenin olmaması inaktivasyonun sonucu olarak değerlendirilmiştir. PBS ortamında US ile aktifleştirilmiş LAB'ler (UA) ve UHT yağsız süt içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB'lerin (SUA), US uygulamasından önce ve sonra sayılarında herhangi bir değişiklik olmadığı ve yaklaşık 10^8 kob/ml düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma gruplarında kullanılan LAB sayıları (kob/ml).

	CB	ID	AD	SUI ve Uİ	UA (önce)	UA (sonra)	SUA (önce)	SUA (sonra)
<i>L. acidophilus</i>	2.0×10^8	0	0	0	1.0×10^8	3.0×10^8	2.0×10^8	3.0×10^8
	1.2×10^8	0	0	0	1.4×10^8	1.4×10^8	1.3×10^8	1.4×10^8
	1.1×10^8	0	0	0	1.2×10^8	2.2×10^8	1.4×10^8	2.0×10^8
<i>L. reuteri</i>	1.8×10^8	0	0	0	4.0×10^8	1.0×10^8	6.0×10^8	6.0×10^8
	1.6×10^8	0	0	0	4.0×10^8	5.0×10^8	3.0×10^8	4.0×10^8
	1.2×10^8	0	0	0	4.0×10^8	3.0×10^8	2.0×10^8	2.1×10^8
<i>L. rhamnosus</i>	2.0×10^8	0	0	0	1.1×10^8	1.0×10^8	5.0×10^8	7.0×10^8
	1.5×10^8	0	0	0	1.6×10^8	3.0×10^8	1.1×10^8	2.2×10^8
	1.2×10^8	0	0	0	1.4×10^8	2.0×10^8	1.6×10^8	2.0×10^8
Mix	1.1×10^8	0	0	0	1.0×10^8	3.0×10^8	2.6×10^8	3.0×10^8
	1.3×10^8	0	0	0	3.0×10^8	1.0×10^8	2.7×10^8	2.8×10^8
	2.0×10^8	0	0	0	2.0×10^8	2.0×10^8	3.0×10^8	3.1×10^8

CB: Canlı LAB

ID: Isı ile denatüre olmuş LAB

AD: Asit ile denatüre olmuş LAB

SUI: UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB

Uİ: PBS içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB

UA: PBS içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB

SUA: UHT yağsız süt içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

4.2. Çalışma Gruplarının Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

4.2.1. Kontrol Gruplarının AFM₁ Bağlama Düzeyi

Çalışmada kullanılan UHT yağsız sütte AFM₁ tespit edilmemiştir.

KUİ grubu ile K ve KUA gruplarındaki AFM₁ konsantrasyonu arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). K grubu ile KUA grubundaki AFM₁ konsantrasyonu benzer olarak tespit edilmiştir ($p>0.05$).

2 ng/ml’lik kontaminasyona (AFM₁) göre K grubunda %1.5’luk, KUA grubunda %2’lik, KUİ grubunda ise %18’lik bağlanma meydana gelmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol gruplarında 2 ng/ml’lik kontaminasyona göre AFM₁ düzeyi.

Kontroller	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	AFM ₁ bağlanma oranı (%)
K	1.97±0.01 ^a	1.5
KUA	1.96±0.01 ^a	2.0
KUİ	1.64±0.06 ^b	18.0
P değeri	<0.01	

K: UHT yağsız süt + AFM₁

KUA: UHT yağsız süte aktivasyon düzeyinde US uygulaması + AFM₁

KUİ: UHT yağsız süte inaktivasyon düzeyinde US uygulaması + AFM₁

^{a-b}: Aynı sütunda farklı üst simge bulunan ortalamalar anlamlı derecede farklıdır.

ss: Standart sapma

4.2.2. Canlı Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

CB grubunda en yüksek bağlama oranı *L. reuteri*’de (%28), en düşük bağlama oranı ise mix grupta (%22) meydana gelmiştir. CB grubunda grup içi bakterilerin karşılaştırılmasında AFM₁’i bağlama açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. 2 ng/ml'lik AFM₁ kontaminasyonuna göre canlı bakterilerin UHT yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama düzeyi.

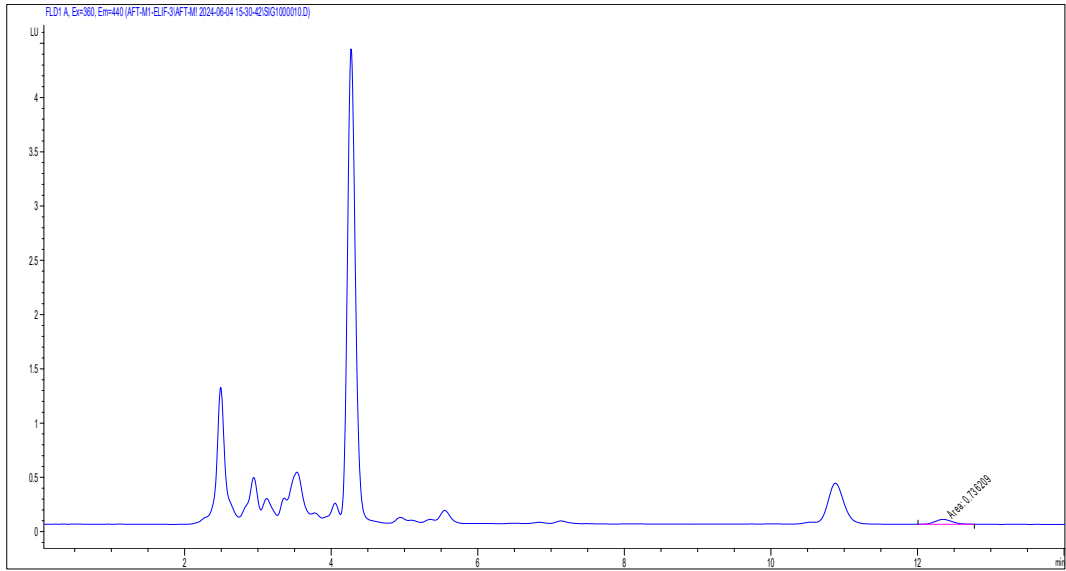
CB grubu		
Bakteriler	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	Bağlama oranı (%)
<i>L. acidophilus</i>	1.52±0.13	24.0
<i>L. reuteri</i>	1.44±0.06	28.0
<i>L. rhamnosus</i>	1.47±0.20	26.5
Mix	1.56±0.09	22.0
P değeri	>0.05	

CB: Canlı LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

ss: Standart sapma

HPLC analizinde mix LAB örneklerinin CB grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mix LAB'lerin CB grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü.

4.2.3. Isı ile İnaktif Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

ID grubunda en yüksek bağlama oranı *L. rhamnosus*'ta (%26), en düşük bağlama oranı ise *L. reuteri*'de (%16.5) saptanmıştır. ID grubunda grup içi bakteriler karşılaştırıldığında AFM₁ bağlama oranlarında istatistiksel fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. 2 ng/ml'lik AFM₁ kontaminasyonuna göre ısı ile inaktif bakterilerin UHT yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama düzeyi.

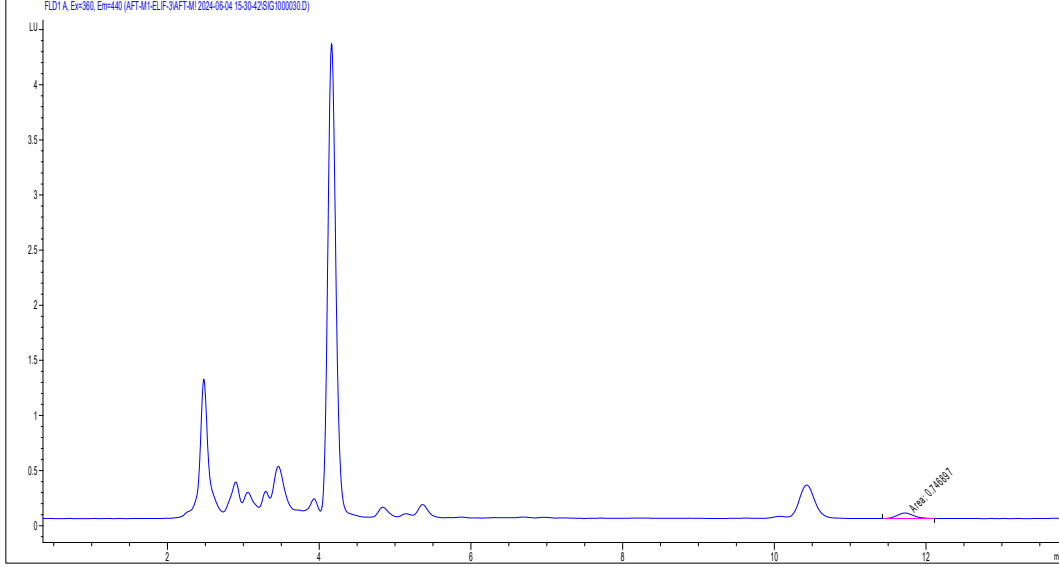
Bakteriler	ID grubu	
	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	Bağlama oranı (%)
<i>L. acidophilus</i>	1.59±0.06	20.5
<i>L. reuteri</i>	1.67±0.15	16.5
<i>L. rhamnosus</i>	1.48±0.11	26.0
Mix	1.55±0.13	22.5
P değeri	>0.05	

ID: Isı ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

ss: Standart sapma

HPLC analizinde mix LAB örneklerinin ID grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Mix LAB'lerin ID grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü.

4.2.4. Asit ile İnaktif Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

AD grubunda en yüksek bağlama oranı *L. rhamnosus*'ta (%22.5), en düşük bağlama oranı ise mix grupta (%18) saptanmıştır. AD grubunda grup içi bakteriler karşılaştırıldığında AFM₁ bağlama oranlarında istatistiksel fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. 2 ng/ml'lik AFM₁ kontaminasyonuna göre asit ile inaktif bakterilerin UHT yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama düzeyi.

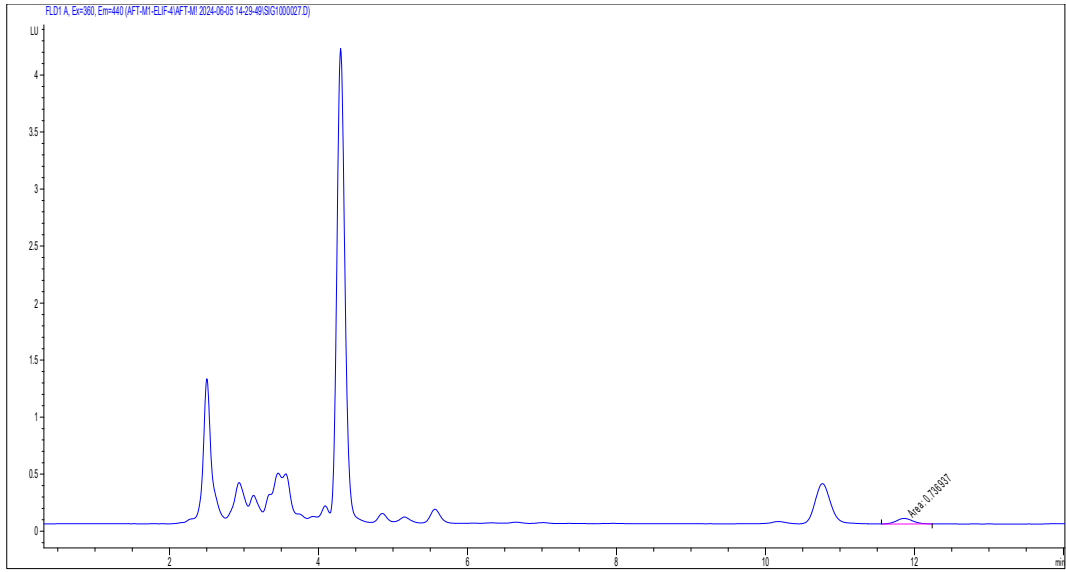
Bakteriler	AD grubu	
	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	Bağlama oranı (%)
<i>L. acidophilus</i>	1.61±0.14	19.5
<i>L. reuteri</i>	1.58±0.13	21.0
<i>L. rhamnosus</i>	1.55±0.11	22.5
Mix	1.64±0.16	18.0
P değeri	>0.05	

AD: Asit ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

ss: Standart sapma

HPLC analizinde mix LAB örneklerinin AD grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Mix LAB'lerin AD grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü.

4.2.5. PBS İçerisinde Ultrason ile Aktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

UA grubunda en yüksek bağlama oranı *L. acidophilus*'ta (%25), en düşük bağlama oranı ise mix grupta (%22) saptanmıştır. UA grubunda grup içi bakterilerin karşılaştırılmasında AFM₁'i bağlama açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. 2 ng/ml’lik AFM1 kontaminasyonuna göre PBS içerisinde US ile aktifleştirilmiş bakterilerin UHT yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama düzeyi.

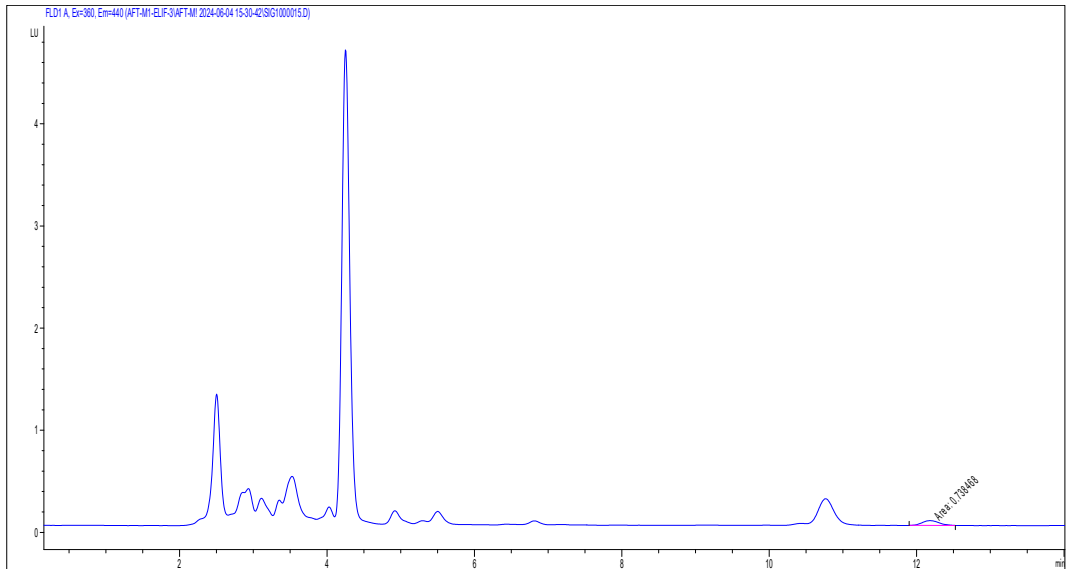
UA grubu		
Bakteriler	AFM1 konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	Bağlama oranı (%)
<i>L. acidophilus</i>	1.50±0.10	25.0
<i>L. reuteri</i>	1.54±0.04	23.0
<i>L. rhamnosus</i>	1.52±0.08	24.0
Mix	1.56±0.04	22.0
P değeri	>0.05	

UA: PBS içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

ss: Standart sapma

HPLC analizinde mix LAB örneklerinin UA grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Mix LAB’lerin UA grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü.

4.2.6. PBS içerisinde Ultrason ile İnaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyleri

Uİ grubunda en yüksek bağlama oranı *L. acidophilus*'ta (%27.5), en düşük bağlama oranı ise *L. rhamnosus*'ta (%22) saptanmıştır. Uİ grubunda grup içi bakterilerin karşılaştırılmasında AFM₁'i bağlama açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. 2 ng/ml'lik AFM₁ kontaminasyonuna göre PBS içerisinde US ile inaktifleştirilmiş bakterilerin UHT yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama düzeyi.

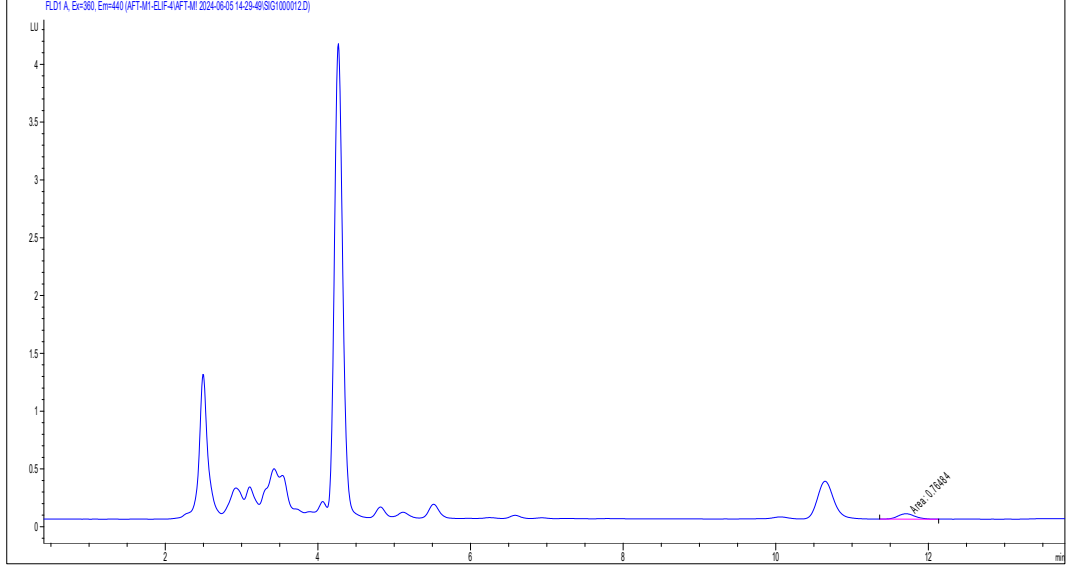
Bakteriler	Uİ grubu	
	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	Bağlama oranı (%)
<i>L. acidophilus</i>	1.45±0.11	27.5
<i>L. reuteri</i>	1.53±0.08	23.5
<i>L. rhamnosus</i>	1.56±0.02	22.0
Mix	1.51±0.11	24.5
P değeri	>0.05	

Uİ: PBS içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

ss: Standart sapma

HPLC analizinde mix LAB örneklerinin Uİ grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Mix LAB'lerin Uİ grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü.

4.2.7. UHT Yağsız Süt İçerisinde Ultrason ile Aktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

SUA grubunda grup içi bakterilerin karşılaştırılmasında en yüksek bağlama *L. acidophilus*'ta (%43), en düşük bağlama oranı ise mix grupta (%34) tespit edilmiştir. *L. acidophilus* grubunun bağlama oranı, mix grubunun bağlama oranına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus*'un AFM₁'i bağlama kapasitesinin benzer olduğu görülmüştür ($p > 0.05$). Yine mix grubun bağlama oranınının *L. reuteri* ve *L. rhamnosus*'tan farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. 2 ng/ml'lik AFM₁ kontaminasyonuna göre UHT yağsız süt içerisinde US ile aktive edilmiş bakterilerin UHT yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama düzeyi.

SUA grubu		
Bakteriler	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	Bağlama oranı (%)
<i>L. acidophilus</i>	1.14±0.09 ^a	43.0
<i>L. reuteri</i>	1.19±0.06 ^{ab}	40.5
<i>L. rhamnosus</i>	1.26±0.06 ^{ab}	37.0
Mix	1.32±0.06 ^b	34.0
P değeri	<0.05	

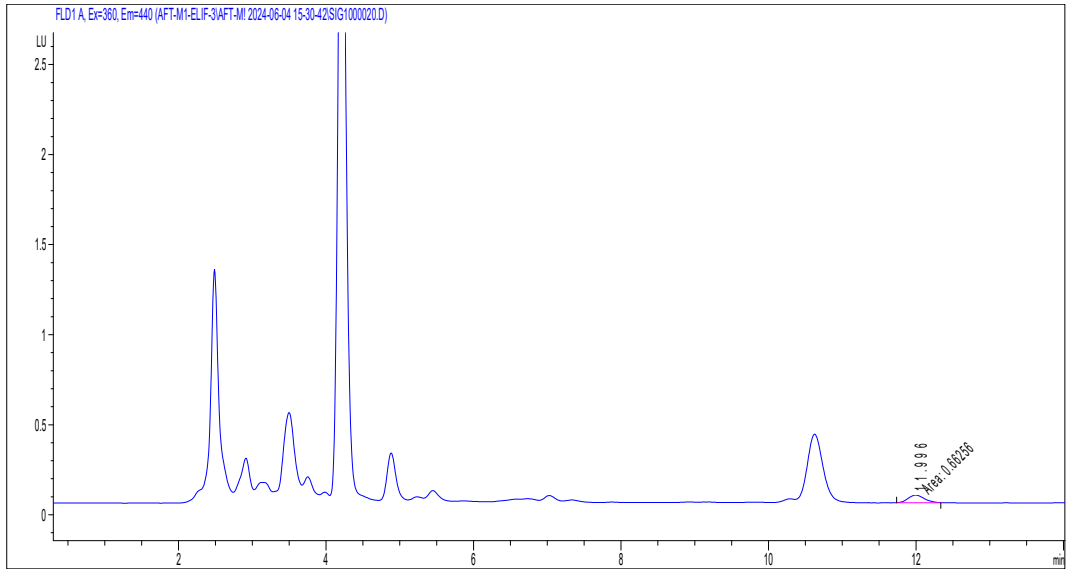
SUA: UHT yağsız süt içerisinde US ile aktive edilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

^{a-b}: Aynı sütünde farklı üst simge bulunan ortalamalar anlamlı derecede farklıdır.

ss: Standart sapma

HPLC analizinde mix LAB örneklerinin SUA grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Mix LAB'lerin SUA grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü.

4.2.8. UHT Yağsız Süt İçerisinde Ultrason ile İnaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

SUI grubunda en yüksek bağlama kapasitesi *L. rhamnosus*'ta (%43.5), en düşük bağlama kapasitesi ise *L. acidophilus*'ta (%40.5) tespit edilmiştir ($p>0.05$). SUI grubunda grup içi bakterilerin karşılaştırılmasında AFM₁'i bağlama açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. 2 ng/ml'lik AFM₁ kontaminasyonuna göre UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilmiş bakterilerin UHT yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama düzeyi.

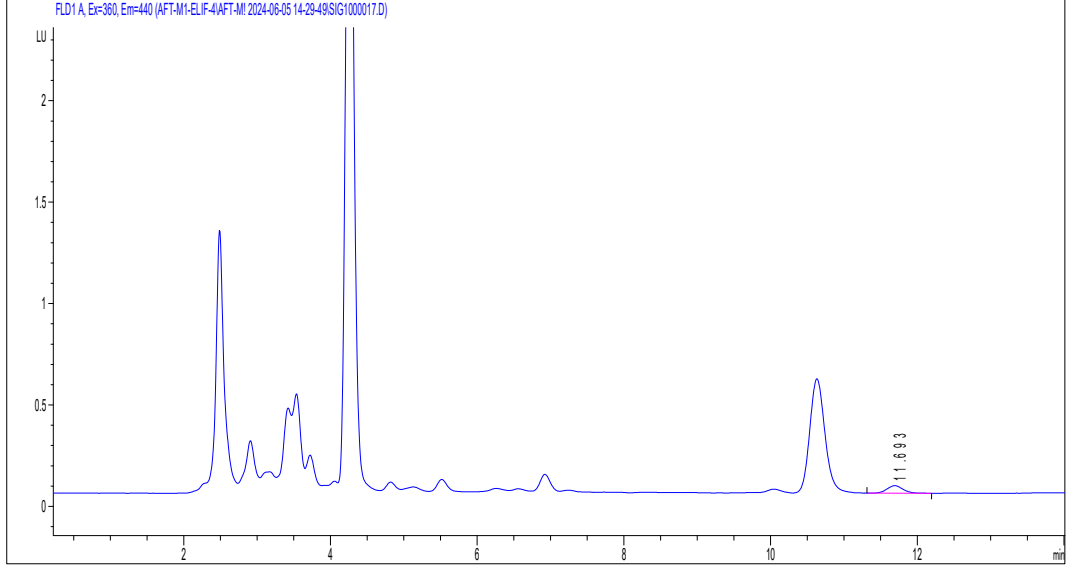
Bakteriler	SUI grubu	
	AFM ₁ konsantrasyonu (ng/ml) ± ss	Bağlama oranı (%)
<i>L. acidophilus</i>	1.19±0.06	40.5
<i>L. reuteri</i>	1.16±0.04	42.0
<i>L. rhamnosus</i>	1.13±0.04	43.5
Mix	1.14±0.01	43.0
P değeri	>0.05	

SUI: UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

ss: Standart sapma

HPLC analizinde mix LAB örneklerinin SUI grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Mix LAB'lerin SUİ grubundaki AFM₁ kromatogram görüntüsü.

4.2.9. Canlı Bakteri Gruplarının Aflatoxin M₁ Bağlama Düzeyi

Canlı bakterilerin olduğu tüm gruplarda en yüksek AFM₁ bağlama kapasitesi SUA grubundaki *L. acidophilus*'ta (%43), en düşük bağlama kapasitesi ise CB ve UA grubundaki mix bakterilerde (%22) tespit edilmiştir ($p<0.01$). Canlı bakterilerin olduğu tüm gruplarda grup içi en düşük bağlama kapasitesinin mix bakterilerde olduğu saptanmıştır. Sadece SUA grubundaki mix grubun düşük bağlama oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

L. acidophilus canlı olduğunda en yüksek SUA grubunda (%43), en düşük CB (%24) grubunda bağladığı görülmüştür ($p<0.01$). CB ve UA gruplarındaki *L. acidophilus*'un bağlama oranları benzer tespit edilmiştir ($p>0.05$). SUA grubundaki yüksek bağlama oranı, CB ve UA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$).

L. reuteri canlı olduğunda en yüksek SUA grubunda (%40.5), en düşük UA (%23) grubunda bağladığı belirlenmiştir ($p<0.01$). CB ve UA gruplarındaki *L. reuteri*'nin bağlama oranları benzer tespit edilmiştir ($p>0.05$). SUA grubundaki yüksek bağlama oranının, CB ve UA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$).

L. rhamnosus canlı olduğunda en yüksek bağlama kapasitesi SUA grubunda (%37), en düşük UA (%24) grubunda tespit edilmiştir ($p<0.01$). CB ve UA gruplarındaki *L. rhamnosus*'un bağlama oranlarının benzer olduğu görülmüştür ($p>0.05$). SUA grubundaki yüksek bağlama oranının, CB ve UA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$).

Mix gruplar canlı olduğunda en yüksek bağlama SUA grubunda (%34), en düşük bağlama ise CB (%22) ve UA (%22) gruplarında görülmüştür ($p<0.01$). CB ve UA gruplarındaki mix bakterilerin bağlama oranları benzer tespit edilmiştir ($p>0.05$). SUA grubundaki yüksek bağlama oranı, CB ve UA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. 2 ng/ml'lik kontaminasyona göre canlı bakteri gruplarında AFM₁ konsantrasyonu \pm standart sapma (% bağlama oranı).

Bakteriler	Canlı bakteri grupları		
	CB	UA	SUA
<i>L. acidophilus</i>	1.52 \pm 0.13 (24.0) ^A	1.50 \pm 0.10 (25.0) ^A	1.14 \pm 0.09 (43.0) ^{aC}
<i>L. reuteri</i>	1.44 \pm 0.06 (28.0) ^{AB}	1.54 \pm 0.04 (23.0) ^A	1.19 \pm 0.06 (40.5) ^{abC}
<i>L. rhamnosus</i>	1.47 \pm 0.20 (26.5) ^{AB}	1.52 \pm 0.08 (24.0) ^A	1.26 \pm 0.06 (37.0) ^{abC}
Mix	1.56 \pm 0.09 (22.0) ^A	1.56 \pm 0.04 (22.0) ^A	1.32 \pm 0.06 (34.0) ^{bBC}

CB: Canlı LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

UA: PBS içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız + AFM₁

SUA: UHT yağsız süt içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

^{a-b}: Her bir sütunun kendi içerisinde sahip olduğu farklı üst simgeler arasındaki ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$)

^{A-B}: Her bir satırın kendi içerisinde sahip olduğu farklı üst simgeler arasındaki ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p<0.01$)

4.2.10. İnaktif Bakteri Gruplarının Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

İnaktif bakteri grupları arasında en yüksek AFM₁ bağlama oranı SUİ (%43.5) grubunda en düşük bağlama oranı ise ID (%16.5) grubunda belirlenmiştir ($p<0.01$).

İnaktif *L. acidophilus*'un en yüksek SUİ (%40.5) grubunda, en düşük AD (%19.5) grubunda bağladığı görülmüştür ($p<0.01$). SUİ grubundaki *L. acidophilus*'un diğer inaktif gruplara (ID, AD ve Uİ) oranla daha yüksek bağlama oranına sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). ID, AD ve Uİ gruplarındaki inaktif *L. acidophilus*'un bağlama kapasitesinin benzer olduğu saptanmıştır ($p>0.05$).

İnaktif *L. reuteri*'nin en yüksek bağlama kapasitesinin SUİ (%42) grubunda, en düşük bağlama kapasitesinin ise ID (%16.5) grubunda olduğu saptanmıştır ($p<0.01$). ID, AD ve Uİ gruplarındaki bağlama oranlarının benzer olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). SUİ grubundaki *L. reuteri*'un diğer inaktif gruplara (ID, AD ve Uİ) oranla daha yüksek bağlama oranına sahip olduğu görülmüştür ($p<0.01$).

L. rhamnosus'un en yüksek SUİ (%43.5), en düşük Uİ (%22) grubunda bağladığı görülmüştür ($p<0.01$). ID, AD ve Uİ gruplarındaki bağlama oranlarının ise benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). SUİ grubundaki *L. rhamnosus*'un diğer inaktif gruplara (ID, AD ve Uİ) oranla daha yüksek bağlama oranına sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$).

İnaktif mix gruplarda en yüksek bağlama kapasitesi SUİ (%43) grubunda belirlenirken, en düşük bağlama kapasitesi AD (%18) grubunda tespit edilmiştir ($p<0.01$). Diğer bakterilerde olduğu gibi ID, AD ve Uİ gruplarındaki bağlama oranları benzer bulunmuştur ($p>0.05$). SUİ grubundaki mix bakterilerin diğer inaktif gruplara (ID, AD ve Uİ) oranla daha yüksek bağlama oranına sahip olduğu görülmüştür ($p<0.01$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. 2 ng/ml’lik kontaminasyona göre inaktif bakteri gruplarının AFM₁ konsantrasyonu \pm standart sapma (% bağlama oranı).

İnaktif bakteri grupları				
Bakteriler	ID	AD	Uİ	SUİ
<i>L. acidophilus</i>	1.59 \pm 0.06 (20.5) ^{AB}	1.61 \pm 0.14 (19.5) ^{AB}	1.45 \pm 0.11 (27.5) ^B	1.19 \pm 0.06 (40.5) ^C
<i>L. reuteri</i>	1.67 \pm 0.15 (16.5) ^A	1.58 \pm 0.13 (21.0) ^{AB}	1.53 \pm 0.08 (23.5) ^{AB}	1.16 \pm 0.04 (42.0) ^C
<i>L. rhamnosus</i>	1.48 \pm 0.11 (26.0) ^{AB}	1.55 \pm 0.11 (22.5) ^{AB}	1.56 \pm 0.02 (22.0) ^{AB}	1.13 \pm 0.04 (43.5) ^C
Mix	1.55 \pm 0.13 (22.5.0) ^{AB}	1.64 \pm 0.16 (18.0) ^A	1.51 \pm 0.11 (24.5) ^{AB}	1.14 \pm 0.01 (43.0) ^C

ID: Isı ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

AD: Asit ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Uİ: PBS içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

SUİ: UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

^{A-B}: Her bir satırın kendi içerisinde sahip olduğu farklı üst simgeler arasındaki ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.01$)

4.2.11. PBS ve UHT Yağsız Süt Ortamında Ultrason ile Aktifleştirilmiş ve İnaktifleştirilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin M₁ Bağlama Düzeyi

Tüm US gruplarında *L. rhamnosus* SUİ (%43.5) grubunda en yüksek bağlama kapasitesi göstermiştir. En düşük bağlama oranının ise UA grubundaki mix grupta (%22) ve Uİ grubundaki *L. rhamnosus*’ta (%22) olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

PBS içerisinde US uygulanan gruplarda gruplar arası istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). En yüksek bağlama oranı Uİ grubunda *L. acidophilus*’ta (%27.5) saptanırken, en düşük bağlama oranı UA grubundaki mix grup (%22) ve Uİ grubundaki *L. rhamnsosus* bakterisinde (%22) olduğu belirlenmiştir ($p > 0.05$).

UHT yağsız süt içerisinde US uygulanan gruplarda en yüksek bağlama kapasitesinin SUİ grubundaki *L. rhamnosus*’ta (%43.5); en düşük bağlama kapasitesinin ise SUA grubundaki mix grupta (%34) olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). SUA grubunda en yüksek bağlama kapasitesinin *L. acidophilus*’ta (%43), SUİ

grubunda en düşük bağlama kapasitesinin yine *L. acidophilus*'ta (%40.5) olduğu saptanmıştır ($p>0.05$). SUA ve SUİ grupları arasındaki karşılaştırmada *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bakterilerinde istatistiki fark tespit edilmemiştir. Ancak, SUİ grubundaki mix bakterilerin SUA grubuna göre daha yüksek oranda AFM₁ bağladığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tüm US grupları değerlendirildiğinde, en yüksek SUA (%43) grubunda bağlayan *L. acidophilus*'un en düşük UA (%25) grubunda AFM₁ bağladığı belirlenmiştir ($p<0.05$). *L. acidophilus*'un SUA ve SUİ gruplarındaki yüksek bağlama oranları UA ve Uİ gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca UA ve Uİ gruplarında veya SUA ve SUİ gruplarındaki bağlama kapasitesi benzer olarak tespit edilmiştir ($p>0.05$).

L. reuteri'nin en yüksek bağlama kapasitesi SUİ (%42) grubunda saptanmıştır. En düşük bağlama oranının ise UA (%23) grubunda olduğu tespit edilmiştir. *L. reuteri*'nin SUA ve SUİ gruplarındaki yüksek bağlama oranları UA ve Uİ gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). UA ve Uİ gruplarında veya SUA ve SUİ gruplarındaki bağlama kapasitesinin ise benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$).

SUİ grubunda en yüksek bağlama kapasitesine sahip olan *L. rhamnosus*'un (%43.5), en düşük bağlama kapasitesi Uİ (%22) grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$). *L. rhamnosus*'un SUA ve SUİ gruplarındaki yüksek bağlama oranları UA ve Uİ gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bunun yanında UA ve Uİ gruplarında veya SUA ve SUİ gruplarındaki bağlama oranlarının ise benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$).

Mix bakterilerde en yüksek bağlama oranı SUİ (%43) grubunda belirlenirken en düşük bağlama oranı UA (%22) grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$). Mix bakterilerin SUA ve SUİ gruplarındaki yüksek bağlama oranları UA ve Uİ gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bununla birlikte SUİ grubundaki yüksek bağlama oranı (%43), UA, Uİ ve SUA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). SUA grubundaki mix bakterilerin ise UA ve Uİ

gruplarına göre daha yüksek oranda AFM₁ bağladığı tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. 2 ng/ml'lik kontaminasyona göre PBS ve UHT yağsız süt içerisinde aktifleştirilmiş ve inaktifleştirilmiş bakteri gruplarının AFM₁ konsantrasyonu \pm standart sapma (% bağlama oranı).

Bakteriler	US grupları			
	UA	Uİ	SUA	SUI
<i>L. acidophilus</i>	1.50 \pm 0.10 (25.0) ^A	1.45 \pm 0.11(27.5) ^A	1.14 \pm 0.09 (43.0) ^{aC}	1.19 \pm 0.06 (40.5) ^C
<i>L. reuteri</i>	1.54 \pm 0.04 (23.0) ^A	1.53 \pm 0.08(23.5) ^A	1.19 \pm 0.06 (40.5) ^{abC}	1.16 \pm 0.04 (42.0) ^C
<i>L. rhamnosus</i>	1.52 \pm 0.08 (24.0) ^A	1.56 \pm 0.02(22.0) ^A	1.26 \pm 0.06 (37.0) ^{abBC}	1.13 \pm 0.04 (43.5) ^C
Mix	1.56 \pm 0.04(22.0) ^A	1.51 \pm 0.11(24.5) ^A	1.32 \pm 0.06 (34.0) ^{bB}	1.14 \pm 0.01 (43.0) ^C

UA: PBS içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Uİ: PBS içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

SUA: UHT yağsız süt içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

SUI: UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada

^{a-b}: Her bir sütunun kendi içerisinde sahip olduğu farklı üst simgeler arasındaki ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$)

^{A-B}: Her bir satırın kendi içerisinde sahip olduğu farklı üst simgeler arasındaki ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$)

4.2.12. Tüm Çalışma Gruplarının AFM₁ Bağlama Düzeyi

Tüm uygulama gruplarındaki AFM₁ düzeyi, kontrol gruplarına göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı zamanda SUA ve SUI gruplarında AFM₁ bağlama düzeyinin, KUA ve KUI gruplarına göre $p<0.01$ düzeyinde anlamlı olduğu belirlenmiştir.

SUA ve SUI grupları hariç diğer grupların AFM₁ bağlama oranı değerlendirildiğinde, en yüksek bağlama oranı *L. reuteri*'de (CB grubu, %28) tespit edilirken, en düşük bağlama oranı yine *L. reuteri*'de (ID grubu, %16.5) kaydedilmiştir ($p<0.05$). *L. acidophilus*'un SUA ve SUI grupları hariç diğer tüm gruplardaki bağlama oranlarının benzer olduğu kaydedilmiştir ($p>0.05$). İstatistiksel olarak fark olmasa da en yüksek Uİ grubunda (%27.5), en düşük AD grubunda (%19.5) bağladığı

belirlenmiştir. SUA ve SUİ grupları hariç *L. reuteri*'nin CB grubundaki bağlama kapasitesinin AD, UA ve Uİ grubundaki bağlama kapasitesinden farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). *L. reuteri*'nin ID grubundaki bağlama kapasitesinin yine AD, UA ve Uİ grubu ile benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). Ancak canlı *L. reuteri*'nin AFM₁ bağlama kapasitesinin ısı ile inaktif *L. reuteri* ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bunun yanında SUA ve SUİ grupları hariç *L. rhamnosus*'un gruplar arasındaki bağlanma oranlarının benzer olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). İstatistiksel olarak fark olmasa da en yüksek bağlama oranı CB grubunda (%26.5), en düşük bağlama oranı ise Uİ grubunda (%22) olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde mix bakterilerde de (SUA ve SUİ grupları hariç) gruplar arasındaki bağlama oranlarının farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

UHT yağsız süt ortamındaki US çalışma grupları (SUA ve SUİ) ile diğer gruplar (CB, ID, AD, UA, Uİ) karşılaştırıldığında, AFM₁ bağlama oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Tüm bakteri gruplarında en yüksek AFM₁ bağlama kapasitesinin SUA ve SUİ gruplarında olduğu kaydedilmiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. 2 ng/ml’lik kontaminasyona göre tüm çalışma gruplarının AFM₁ konsantrasyonu ± standart sapma (% bağlama oranı).

	CB	ID	AD	UA	Uİ	SUA	SUI
Bakteriler	K					KUA	KUI
	1.97±0.01(1.5) ^{aA}					1.96±0.01(2) ^{aA}	1.64±0.06(18) ^{aB}
<i>L. acidophilus</i>	1.52±0.13 (24) ^{bABC}	1.59±0.06 (20.5) ^{bABC}	1.61±0.14 (19.5) ^{bABC}	1.50±0.10(25) ^{bABCD}	1.45±0.11 (27.5) ^{bBCD}	1.14±0.09 (43) ^{bE}	1.19±0.06 (40.5) ^{bE}
<i>L. reuteri</i>	1.44±0.06 (28) ^{bCD}	1.67±0.15 (16.5) ^{bA}	1.58±0.13 (21) ^{bABC}	1.54±0.04 (23) ^{bABC}	1.53±0.08 (23.5) ^{bABC}	1.19±0.06 (40.5) ^{bcE}	1.16±0.04 (42) ^{bE}
<i>L. rhamnosus</i>	1.47±0.20 (26.5) ^{bCD}	1.48±0.11 (26) ^{bABCD}	1.55±0.11 (22.5) ^{bABC}	1.52±0.08 (24) ^{bABC}	1.56±0.02 (22) ^{bABC}	1.26±0.06 (37) ^{bcE}	1.13±0.04 (43.5) ^{bE}
Mix	1.56±0.09 (22) ^{bABC}	1.55±0.13 (22.5) ^{bABC}	1.64±0.16 (18) ^{bAB}	1.56±0.04 (22) ^{bABC}	1.51±0.11 (24.5) ^{bABC}	1.32±0.06 (34) ^{cD}	1.14±0.01 (43) ^{bE}

K: UHT yağsız süt + AFM₁ (kontrol)

KUA: UHT yağsız süte aktivasyon düzeyinde US uygulaması + AFM₁ (kontrol)

KUI: UHT yağsız süte inaktivasyon düzeyinde US uygulaması + AFM₁ (kontrol)

CB: Canlı LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

ID: Isı ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

AD: Asit ile denatüre olmuş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

UA: PBS içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Uİ: PBS içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

SUA: UHT yağsız süt içerisinde US ile aktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

SUI: UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleştirilmiş LAB + UHT yağsız süt + AFM₁

Mix: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* bir arada;

^{a-b}: Her bir sütunun kendi içerisinde sahip olduğu farklı üst simgeler arasındaki ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$)

^{A-B}: Her bir satırın kendi içerisinde sahip olduğu farklı üst simgeler arasındaki ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$)

5. TARTIŞMA

AFM₁, AFB₁ ile kontamine olmuş yemleri tüketen hayvanların sütünde bulunan immünotoksik bir metabolittir. AFM₁ güçlü bir toksin olduğundan hayvan ve insan sağlığı için tehdit oluşturabilmekte ayrıca ekonomik zarara neden olmaktadır. Bundan dolayı kontamine olmuş süt ve yan ürünlerinde AFM₁'i bağlama veya etkisiz hale getirmek için pratik yöntemlere büyük talep vardır.

Mevcut çalışmada bazı probiyotik suşlar kullanılarak AFM₁ ile kirlenmiş sütün detoksifikasyonu araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ve *L. reuteri* insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olmayan güvenilir probiyotik mikroorganizmalardır. Son zamanlarda süt ve süt ürünlerine ilave edilerek besinlerin zenginleştirilmesinde rol alan bu laktobasil suşları detoksifikasyon çalışmasında kullanılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin mikotoksinleri bağlama ve etkilerinin azaltılmasına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda; farklı toksin türü, inkübasyon süresi, toksin konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı, hücre (bakteri veya maya) konsantrasyonu, bakterilerin izole edildikleri ortam, detoksifikasyon ortamı ve hücrelerin fizyolojik durumunu değiştiren yöntemlerin farklı olması her çalışmada bağlanma oranlarının değişmesine neden olmaktadır (Yücel, 2019).

Bakteri sayısının AFM₁ detoksifikasyonu üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, önemli miktarda toksin bağlanabilmesi için bakteri konsantrasyonunun en az 10⁸ kob/ml olması gerektiği ve bakteri konsantrasyonu arttıkça toksin bağlama kapasitesinin de arttığı rapor edilmiştir (Abbès ve ark., 2013; El-Nezami ve ark., 1998a; Ismail ve ark., 2017; Kabak ve Var, 2008). Benzer şekilde, Line ve Brackett (1995) tarafından AFB₁'in önemli ölçüde uzaklaştırılması için $\geq 10^8$ kob/ml popülasyonlarının gerekli olduğu belirtilmiştir. Bakteri konsantrasyonunun AFM₁ bağlama oranı üzerindeki etkisini araştıran diğer bir çalışmada, 1×10⁹ kob/ml, 3×10⁹ kob/ml ve 5×10⁹ kob/ml olan bakteri konsantrasyonlarından en yüksek bağlama

oranının 5×10^9 kob/ml bakteri olan grupta olduğu bildirilmiştir (Abdelmotilib ve ark., 2018). Yapılan bir başka çalışmada Ismail ve ark. (2017) tarafından süttten AFM₁ uzaklaştırılmasında ısı ile inaktif hücre sayısı arttıkça (10^7 - 10^{10} kob/ml) bağlama oranının %100'e ulaştığı rapor edilmiştir. Bakteri sayısı ile ilgili çalışmalar incelendiğinde ideal bir toksin bağlama oranı için en az 10^8 kob/ml bakterinin gerekli olduğu bildirilmektedir. Bu literatürlerin ışığında tez çalışmasında bakteri sayıları $\sim 10^8$ kob/ml olmak üzere sabit tutulmuştur.

Bakteri ve toksinin bir araya getirildiği ortam sıcaklığı, bakterilerin miktoksinle bağlanma oranını önemli ölçüde etkilemektedir. İnkübasyon sıcaklığının aflatoksin bağlanması üzerine etkisi incelendiğinde, araştırmacılar tarafından hücrelerin daha hızlı gelişmesi ve enzimatik reaksiyonların artmasına bağlı olarak inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak ayarlanmıştır (Abedi ve ark., 2022a; Abedi ve ark., 2022b; Bovo ve ark., 2013; El-Nezami ve ark., 1998a; Ismail ve ark., 2017; Serrano-Niño ve ark., 2013; Shah ve Wu, 1999). Çalışma sonuçlarının değişken olduğu, toksin ve bakteri türü değişikçe ortam sıcaklığının detoksifikasyon üzerine etkisinin değişebileceği görülmüştür. Bu değişikliği minimize etmek için bu çalışmada inkübasyon sıcaklığı 37°C'de sabit tutulmuştur.

Toksin konsantrasyonu bakterinin adsorpsiyon oranlarını etkilemektedir. Yüksek toksin konsantrasyonunda bağlama oranı da fazla olmaktadır (Fakhrabadipour ve ark., 2023; Lee ve ark., 2003; Rezasoltani ve ark., 2022; Wochner ve ark., 2019). Ancak bakteri hücrelerinin AFM₁ bağlama yüzeyleri sınırlıdır. Hücrelerde belirli sayıda bağlanma bölgesi vardır. Bu bağlanma bölgeleri doygunluğa ulaştığı anda AFM₁ bağlama oranları sabit kalmaktadır. Bu durumu açıklar nitelikte Yüksel ve Albayrak (2020) toksin konsantrasyonu 0.5 ng/ml'den 5 ng/ml'ye yükseldiğinde bağlama oranlarında artma olduğunu ancak konsantrasyon 10 ng/ml'ye yükseldiğinde bağlama oranında konsantrasyona bağlı bir artış olmadığını gözlemlemiştir. Bundan dolayı bu tez çalışmasında, literatürlerde atfedilen ve HPLC analizatöründe doğrulanabilen konsantrasyon olan 2 ng/ml belirlenmiştir.

Bakterinin mikotoksini bağlama yeteneğinde, bakteri-aflatoksin inkübasyon süresinin de önemli olduğu vurgulanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada, detoksifikasyonun hızlı bir süreç olduğu, aflatoksin ve mikroorganizmalar arasında

kurulan bağıın temasın ilk dakikalarında meydana geldiği ve sonraki süreçlerde önemli bir farka rastlanmadığı bildirilmiştir (Bovo ve ark., 2013; Corassin ve ark., 2013; Fazeli ve ark., 2009; Kumara ve ark., 2019; Peltonen ve ark., 2001; Serrano-Niño ve ark., 2013; Sezer ve ark., 2013; Yüksel ve Albayrak, 2020). Bundan dolayı tez çalışmasında inkübasyon süresi 1 saat olarak belirlenmiştir.

İnkübasyon sürelerinin detoksifikasyon kapasitesi üzerindeki etkisini inceleyen diğer bazı çalışmalarda inkübasyon süresi arttıkça (0-72 saat arası) detoksifikasyon kapasitesinin arttığı tespit edilmiştir (Abbès ve ark., 2013; Abdelmotilib ve ark., 2018; Abedi ve ark., 2022a; Ben Salah-Abbes ve ark., 2015; El-kest ve ark., 2015; El Khoury ve ark., 2011; Fakhrabadipour ve ark., 2023; Jebali ve ark., 2015; Panwar ve ark., 2019; Rahnama Vosough ve ark., 2014; Rezasoltani ve ark., 2022).

Bovo ve ark. (2013) tarafından 7 LAB'nin PBS ve yağsız sütteki AFM₁'i giderme yeteneğinin değerlendirildiği çalışmada, 15 dk ve 24 saat inkübasyon süreleri arasında AFM₁ bağlama kapasitesi bakımından önemli bir farklılığın olmadığı bildirilmiştir. Ancak sadece *L. rhamnosus*'un inkübasyon süresi arttıkça daha fazla bağlama oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Serrano-Niño ve ark. (2013) ise PBS ortamında 0-4-12 saat süren inkübasyonlarda en yüksek AFM₁ bağlama oranlarının 12. saatte olduğunu bildirmiştir.

Bu tez çalışmasında LAB'lerin AFM₁ bağlama yeteneğine US'nin etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla LAB'ler; canlı, ölü (ısı, asit ve US ile inaktif) ve US ile aktivasyon yöntemleri uygulanarak gruplandırılmıştır. Çalışmada sabit parametreler inkübasyon süresi (1 saat) ve sıcaklığı (37°C), AFM₁ konsantrasyonu (2 ng/ml), ortam (yağsız süt) ve bakteri konsantrasyonu (~10⁸ kob/ml) olarak belirlenmiştir.

Çalışmada laktik asit bakteri türlerinin seçiminde aflatoksin bağlama kapasitesi yüksek olan, probiyotik özellikleri belirlenen suşlar seçilmiştir. Bakterilerin aflatoksin detoksifikasyonunun, biyolojik bozunma yerine, mikroorganizma hücre duvarındaki peptidoglikan ve oligosakkaritler gibi bileşenler aracılığıyla fiziksel adsorpsiyon yoluyla gerçekleştiği belirtilmektedir (Bovo ve ark., 2013; Corassin ve ark., 2013;

Serrano-Niño ve ark., 2013). Hücre yüzey alanı ve hücre duvar hacminin detoksifikasyon kapasitesi üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, bu parametrelerin artmasıyla bağlanma kapasitesinin de arttığı bildirilmektedir (Wang ve ark., 2015). Bu bağlamda, çalışmada kullanılan *Lactobacillus* suşları yaklaşık 1 ila 1.5 µm uzunlukta ve 0.7 ila 1 µm çapında çubuk şeklinde hücrelerdir (Schär-Zammaretti ve Ubbink, 2003). Aynı tür içindeki farklı LAB suşlarının aflatoksin bağlama kapasitesinde belirgin farklılıklar gözlemlenebilir. Bu farklılıklar, genetik çeşitlilik, hücre duvarı bileşimindeki varyasyonlar, yüzey kimyasındaki farklılıklar ve çevresel adaptasyon süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Özellikle hücre duvarı yapılarının değişkenliği, aynı cinsin hatta aynı türün alt türleri arasında bile bağlanma yüzdelерinin farklı olmasına neden olmaktadır (Ahlberg ve ark., 2015).

Ortamda bakteri bulunmaksızın sadece toksinin bulunduğu K grubunda %1.5 oranında, KUA grubunda ise %2 oranında bağlanma meydana gelmiştir. Süt ortamında yapılan çalışmalarda, AFM₁'in süt proteinleri arasındaki hidrofobik etkileşimler ile α-laktalbumin, kazein ve β-laktoglobüline afinitesinin olduğu bildirilmiştir (Chavarría ve ark., 2017). Sanaldi ve Coban (2023) tarafından yapılan diğer bir çalışmada süt ortamında, içerisinde aflatoksin bağlayabilecek herhangi bir bileşen olmayan PBS ortamına göre daha yüksek bağlama oranları elde edilmiştir. Dolayısıyla bu bağlanma oranları Brackett ve Marth (1982) yaptığı çalışmada bildirdiği gibi kazeinin AFM₁'e gram başına 17.9-55.3 µg aralığında bağlanmasından kaynaklanmış olabilir.

Koyun sütü ortamında yapılan bir çalışmada CB grubundaki bulgulardan daha yüksek bağlama oranı (canlı *L. acidophilus* %39.81; canlı *L. rhamnosus* %39.71) bildirilmiştir (Sanaldi ve Coban, 2023). Bu durum süt bileşenlerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Koyun sütü %5.68 protein içerirken, çalışmada kullanılan UHT yağsız süt %3.1 protein içermektedir. Tüm bu araştırmalar probiyotik bakterilerin buldukları ortama göre etkinliklerinin değiştiğini göstermiştir. Bundan dolayı AFM₁ bağlanma mekanizmasının tam olarak açıklanabilmesi için süt bileşimi, protein, kazein miktarları ile bu bileşenlerle AFM₁ arasındaki ilişkiyi ortaya çıkaracak çalışmalar yapılabilir.

KUI grubunda ise AFM₁ bağlanma oranı %18 olarak tespit edilmiştir. UHT yağsız süt içerisine inaktivasyon düzeyinde US uygulanarak yüksek güçlü ultrasonik

yöntem kullanılmıştır. Yüksek güçlü US'nin etkisi ile akustik kavitasyon meydana gelmektedir. Akustik kavitasyon ile yüksek düzeyde serbest radikaller, mikrojetler, kayma kuvvetleri ve şok dalgaları gibi şiddetli fiziksel kuvvetler oluşmaktadır (Mehenktaş, 2022). Süt içerisine US uygulanan çalışmalarda, yüksek güçlü US'nin etkisiyle kazein misellerinin alt birimlere ayrıldığı ve bu alt birimlerin, kısmen denatüre olmuş peynir altı suyu proteinleriyle güçlü şekilde yeniden birleşerek sağlam ağ yapıları oluşturduğu belirtilmiştir (Carrillo-Lopez ve ark., 2021). Ayrıca, US'nin süt ortamında oluşturduğu homojenizasyonun, küçük yağ globülleri aracılığıyla protein kümelerini güçlendirerek bu etkiyi destekleyebileceği düşünülmektedir (Akdeniz ve Akalın, 2017; Riener ve ark., 2009). Bu etki doğrultusunda, KUİ grubunda AFM₁'in güçlü ağ yapısına bağlanmasından dolayı bağlanma oranında bir artış gözlemlenmiş olabilir. Aynı zamanda artan sıcaklığın AFM₁ miktarını kısmen azalttığı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Tez çalışmasında UHT yağsız süt içerisinde US ile inaktifleşme işlemi esnasında sütün sıcaklığı 90°C'ye çıkarılmıştır. Ardından süt soğumaya bırakılmadan AFM₁ ilave edilmiştir. Bu bağlamda, US ile ısı artışının KUİ grubundaki bağlanmayı nasıl etkileyebileceğini açıklar nitelikte El-Deeb ve ark. (1992) tarafından süte uygulanan sterilizasyon işleminin AFM₁'i %26 oranında, yavaş pastörizasyon işleminin ise %9.5 oranında azalttığı bildirilmiştir. Buna ek olarak Omeiza ve ark. (2018) süte 80°C'de 20 dk ısı işleminin sonucunda AFM₁'de %17.6 oranında azalma rapor etmiştir. Dolayısı ile bu olgu, sıcaklığın neden olduğu ve bağlanma mekanizmasını değiştirebilen desolvasyon sürecinin bir sonucu olarak da ortaya çıkmış olabilir. Chen ve Hoover (2003)'a göre, sıcaklıktaki artış, proteinlerin açığa çıkan hidrofobik bölgelerini artırarak, bağlanma mekanizmasını değiştirmiş olabilir. Aynı araştırmacılar tarafından, daha düşük sıcaklıklarda protein yüzeylerindeki adsorpsiyonun neredeyse hiç değişmediği ancak sıcaklığın artmasıyla protein ve matris arasındaki bağlanma afinitesinde belirgin bir artış olduğu bildirilmiştir (Chen ve Hoover, 2003). Bu durumun protein ve toksinlerin etkileşimini artırdığı düşünülmektedir. US'nin süt yapısı üzerindeki bu etkileri, toksin bağlanma süreçlerini optimize eden mekanizmaların anlaşılmasında önemli bir rol oynamaktadır.

KUA grubunda ise sıcaklık maximum 45°C'ye çıkarılmıştır ve süt soğumaya bırakılmadan toksin ilave edilmiştir. Bunlara bağlı olarak KUİ grubunda AFM₁ bağlanma oranı (%18) diğer kontrol gruplarına göre daha yüksek elde edilmiş olabilir.

Canlı bakterilerin bulunduğu gruplar karşılaştırıldığında CB ve UA grupları arasında fark bulunamamışken, UHT yağsız süt içerisinde US uygulanan SUA diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha yüksek bağlama oranları tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında süt veya PBS içerisinde bakterilerin US ile aktifleştirilip AFM₁ bağlama kapasitesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Aktivasyon düzeyinde US uygulamasında inaktivasyon düzeyinde US uygulamasına göre daha düşük seviyede güç uygulanmıştır. Aktivasyon düzeyinde US uygulamasından sonraki 1 saatlik inkübasyonun sonunda, bakteri sayılarında herhangi bir artış olmadığı kaydedilmiştir. Tez bulgularına benzer olarak süt içerisinde daha düşük güçte US uygulamasının bakteri sayılarında herhangi bir artış meydana getirmediği ancak metabolik ürünlerde farklılıklar olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Tavşanlı ve ark., 2023; Ojha ve ark., 2017; Wu ve ark., 2000). Bunun yanında süt içerisinde yoğurt bakterilerine uygulanan düşük güçteki US'nin sinerjik etkiyi artırdığını tespit eden birçok çalışma yapılmıştır (Barukčić ve ark., 2015; Gholamhosseinpour ve Hashemi, 2019; Guimarães ve ark., 2021). Çalışmalardaki bulgulardan yola çıkarak, düşük güçte US, bakterilerin canlılıklarını korumasına izin verirken, metabolik ürünlerde farklılıklar oluşturarak süt fermentasyonunda belirgin sinerji sağlayabilir. Bundan dolayı SUA grubundaki yüksek bağlama oranları; US etkisi ile bakterilerde sinerjik etki, metabolik aktivite ve metabolik ürünlerde meydana gelen artışa bağlı olarak kaydedilmiş olabilir.

Bu çalışmada UHT yağsız süt ortamında canlı *L. acidophilus* (CB) %24 oranında bağlarken, PBS içerisinde US ile aktifleştirilmiş *L. acidophilus* (UA) %25, UHT yağsız süt ortamında US ile aktifleştirilmiş *L. acidophilus* (SUA) %43 oranında bağlama göstermiştir. Çalışma bulgularına benzer olarak *L. acidophilus* suşlarının (canlı) yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama oranını değerlendiren Kabak ve Var (2008) tarafından ortalama %22.7 oranında bağlama tespit edilmiştir. Canlı *L. acidophilus* ile AFM₁'i bağlamaya yönelik yapılan bir diğer çalışmada da benzer sonuçlar (%19.95-25.28) elde edilmiştir (Serrano-Niño ve ark., 2013). *L. acidophilus* suşlarının yağsız süt ortamında yüksek bağlama oranı gösterdiğini kaydeden çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan, Rezasoltani ve ark. (2022) çalışmalarında %41.42-51.66 aralığında AFM₁ bağladığını bildirmiştir. Sanaldi ve Coban, (2023) tarafından ise tam yağlı inek sütü ortamında %38.5 oranında bağlama kapasitesi tespit

edilmiştir. Diğer bazı çalışmalarda da *L. acidophilus* için yüksek bağlama oranlarının (%37.9-41.96) elde edildiği bildirilmiştir (Abdelmotilib ve ark., 2018; Elsanhoty ve ark., 2014). Bunun yanında düşük bağlama oranları (%5.11-18.3) tespit eden çalışmalar da mevcuttur (Kabak ve Var, 2008; Pierides ve ark., 2000; Sanaldi ve Coban, 2023; Yücel, 2019). Çalışmalar arasında farklı AFM₁ uzaklaştırma oranları elde edilmesinin nedeni; kullanılan inkübasyon süresi ve sıcaklığı, kullanılan ortam, analiz yöntemleri, toksin ve bakteri konsantrasyonunun her çalışmada farklı olmasından kaynaklanabilir. Bunun yanında Wochner ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada ise tam yağlı inek sütü ortamında çok daha yüksek bağlama oranı (%71.52) bildirilmiştir. Bu durum mevcut çalışmadan farklı olarak araştırmacıların, süt ortamına prebiyotik ilave etmesinden kaynaklanıyor olabilir. Tez çalışmasından daha uzun inkübasyon süreleri kullanmasına rağmen SUA grubundaki *L. acidophilus*'un bağlama oranından (%43) daha düşük sonuçlar rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Abdelmotilib ve ark., 2018; Kabak ve Var, 2008; Pierides ve ark., 2000; Sanaldi ve Coban, 2023). Bu durum, süt ortamında ultrason uygulamasının bağlama kapasitesini artırmada etkili olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında UHT yağsız süt ortamında canlı *L. reuteri* (CB) %28 oranında AFM₁ bağlarken, PBS ortamında US ile aktive edildiğinde (UA) %23, UHT yağsız süt içerisinde US ile aktive edildiğinde (SUA) %40.5 oranında AFM₁ bağlamıştır. Yapılan literatür incelemesine göre süt ortamında canlı *L. reuteri*'nin AFM₁ detoksifikasyonuna yönelik yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanında Hashemi ve Amiri (2022) tarafından kaymaklı süt ürünü (Sarshir) ortamında, *L. reuteri* canlı olduğunda %36 oranında AFM₁ bağladığı bildirilmiştir.

Serrano-Niño ve ark. (2013) tarafından canlı *L. reuteri* ile AFM₁'i bağlamaya yönelik PBS ortamında yapılan çalışmada *L. reuteri*'nin AFM₁'i %19.95-25.28 aralığında bağladığı bildirilmiştir. Yücel (2019) tarafından yapılan çalışmada ise PBS ortamında %12.11 ve %18.12 oranları tespit edilmiştir. Düşük bağlama oranları tespit etmelerinin nedeni farklı toksin konsantrasyonu ile çalışmalarının yanında farklı ortam ve farklı suşları kullanmalarından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmada UHT yağsız süt ortamında, canlı *L. rhamnosus*'un (CB) %26.5 oranında; US ile aktive edildiğinde (UA) %24 oranında, UHT yağsız süt içerisinde

US ile aktifleştirildiğinde ise (SUA) %37 oranında AFM₁ bağladığı görülmüştür. Yağsız süt ortamında yapılan çalışmalarda, mevcut çalışmanın bulgularına benzer olarak, Abbès ve ark. (2013) ile Kabak ve Var (2008) canlı *L. rhamnosus* suşları için sırasıyla %25.1 ve %21.74 oranında bağlama oranı rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasındaki bulgulardan daha yüksek oranlar tespit eden Khadivi ve ark. (2020), canlı iki farklı *L. rhamnosus* suşu ile çalışmış ve %62.75 ile %91.82 oranında bağlama tespit etmiştir. Mevcut çalışmadan daha yüksek sonuçlar elde edilmesi; AFM₁ analiz yönteminin, toksin ve bakteri konsantrasyonunun farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Yapılan başka bir çalışmada, Pierides ve ark. (2000) tarafından %69.6 detoksifikasyon oranı bildirilmiştir. Mevcut çalışmadan daha fazla bağlama oranları tespit etmelerinin nedeni daha yüksek toksin ve bakteri konsantrasyonu ve uzun inkübasyon süresinin sonucu olabilir. Ancak aynı çalışmada farklı *L. rhamnosus* suşundan elde ettiği %18.8 oranındaki bağlama ile mevcut çalışmadan daha düşük detoksifikasyon oranı tespit edilmiştir. Buradan suşların alt türleri arasında da bağlama oranlarının değiştiği sonucuna varılabilir. Bu durumu destekler nitelikte Pierides ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada tam yağlı inek sütü içerisinde canlı 2 farklı *L. rhamnosus* suşunun %26 ve %63.6 oranında detoksifikasyon yeteneği olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Sanaldi ve Coban (2023) tarafından tam yağlı inek sütü içerisinde yapılan çalışmada canlı *L. rhamnosus*'un %34.63 oranında AFM₁ bağladığı bildirilmiştir. Araştırmalarda mevcut çalışmadaki oranlardan daha yüksek bağlama oranlarının tespit edilmesi, kullanılan ortam, inkübasyon süresi, toksin miktarı, bakterilerin alt türleri ve bakteri konsantrasyonlarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bu tez çalışmasından daha yüksek detoksifikasyon oranı tespit eden Martinez ve ark. (2019) tarafından silaj ortamından izole edilen *L. rhamnosus* suşunun %61 oranında AFM₁ bağlayabildiği bildirilmiştir. Buradan Oatley ve ark. (2000)'ın da belirttiği gibi, bakterilerin izole edildikleri ortama göre detoksifikasyon kapasitelerinin değişebileceği düşünülmektedir.

Abbès ve ark. (2013) ile Kabak ve Var (2008) tarafından PBS ortamında *L. rhamnosus*'un bağlanma oranları sırasıyla %26.2 ve %20.21 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar tez çalışmasının sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bunun yanında mevcut çalışmadan daha düşük bağlama oranları (sırasıyla %17.13 ve %17.05) bildiren çalışmalar da mevcuttur (Bovo ve ark., 2013; Yücel, 2019). Çalışmalarında kullandıkları farklı toksin ve bakteri konsantrasyonlarının yanında inkübasyon süresi

ve ortamın da farklı olması mevcut çalışmada elde edilen bağlama oranlarından daha düşük oranlar tespit etmelerinin sebebi olabilir.

Canlı gruplarda (CB, UA, SUA) en düşük bağlama oranları mix bakteri gruplarında meydana gelmiştir. Ancak sadece SUA grubunda, mix bakterilerin AFM₁'i bağlama oranındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu durum, canlı bakterilerin bir arada kullanıldıklarında, tekli kullanımına göre süt içerisindeki substratlar için rekabet halinde olmaları ve metabolik aktivitelerinin toksin bağlanma sürecine dolaylı olarak etki etmesinden kaynaklanmış olabilir (Sevim, 2016). Bu durumu açıklar nitelikte, Sanaldi ve Coban (2023), PBS ortamında mix grupların (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ve *B. bifidum*) tek gruplara göre daha fazla toksin bağladığını, ancak süt ortamında tek ve mix gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığını bildirmiştir. Kombine kültürlerde metabolik rekabet, ortamın iyonik dengesini ve elektrostatik etkileşimleri bozarak hücre yüzeyinin özelliklerini değiştirip toksinlerin hücre yüzeyine bağlanma oranını düşürebilir (Oliveira ve ark., 2009). Bundan dolayı SUA grubunda, ultrasonun etkisiyle artan metabolik aktivite nedeniyle, mix grupta bağlanma oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olabilir. Bunun yanında kombine kültürlerde bakteriler arasındaki farklı hücre yüzeyi özelliklerinin (hidrofobiklik, yük farkı gibi) bağlanma mekanizmasını etkilediği yapılan çalışmalarda da ortaya konmuştur (Halttunen ve ark., 2008). Bağlanma mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da, mevcut tez çalışması, kombine kültürlerin bağlanma kapasitelerinin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Mevcut tez çalışmasında mix grupta bulunan bakterileri bir araya getirerek kullanan bir çalışmaya yapılan literatür taramasında rastlanmamıştır. Ancak farklı mikroorganizmaları bir araya getirerek yapılan çalışmalar mevcuttur. Bakteriler tek kullanıldıklarında, birlikte kullanılmalarına göre daha fazla toksin bağladığını bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. El Khoury ve ark. (2011) tarafından *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* tek ve birlikte kullanıldığında, süt ortamında en yüksek AFM₁ bağlama oranının, *L. bulgaricus* tek başına kullanıldığında elde edildiği bildirilmiştir. Halttunen ve ark. (2008), PBS ortamında yaptıkları çalışmada, probiyotik bakterilerin tek ve kombine olarak AFB₁ bağlama kapasitelerini araştırmış ve kombine kültürlerde toksin

bağlama kapasitesinin daha düşük olduğunu tespit etmiştir. Çalışmaların sonuçları, bu tez çalışmasının bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Canlı mikroorganizmalar bir arada olduğunda daha fazla bağladığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Abedi ve ark., 2022a; Abedi ve ark., 2022b; Fakhrabadipour ve ark., 2023). Khadivi ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, canlı *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* mikroorganizmalarının bir arada bulunduğu durumda, yağsız süt ortamında AFM₁ bağlama oranlarının, mikroorganizmaların tek başına kullanıldığı duruma kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Abdelmotilib ve ark. (2018) tarafından ise PBS ortamında canlı bakteriler (*L. plantarum*, *L. acidophilus* ve *B. bifidum*) bir arada kullanıldığında daha yüksek bağlama oranlarının elde edildiği bildirilmiştir. Buna bağlı olarak her bakteri/maya hücresinin birbiriyle olan etkileşimin farklı olduğu ve aynı zamanda toksinle mikroorganizmanın bir araya getirildiği ortamın da bağlanma aktivitelerini değiştirdiği söylenebilir (Sevim, 2016).

Tez çalışmasında, aynı gruptaki bakteri türleri arasında AFM₁ detoksifikasyon oranları açısından herhangi bir fark tespit edilmemiştir. Bu durum, çalışmada kullanılan bakterilerin bağlama bölgeleri arasında minimal farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın sonucuna benzer olarak, LAB'ler arasında mikotoksin bağlama kapasiteleri bakımından fark olmadığını bildiren araştırmalar da mevcuttur (Adriansyah ve ark., 2022; Bovo ve ark., 2013; Kabak ve Var, 2008; Serrano-Niño ve ark., 2013). Bunun yanında inkübasyon süresinin artması ile birlikte bağlama oranlarının da değiştiği bildirilmiştir (Elsanhoty ve ark., 2014). Tez çalışmasında inkübasyon süresinin 1 saat olarak sabit tutulması bakteriler arasında bağlanma farkının görülmemesinin bir diğer nedeni olabilir.

Bakterilerin ortamda bulunan aflatoksini nasıl uzaklaştırdığı tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. Ancak Hernandez-Mendoza ve ark. (2009b) tarafından hem bakteri hücre duvarının hem de saflaştırılmış parçalarının AFB₁'i ortamdaki uzaklaştırabildiği, ancak enzimatik işlemlere yanıt olarak hücre duvarının kaybı veya yıkımı (tamamen veya kısmen) meydana geldiğinde, uzaklaştırma kapasitesinde önemli bir azalmanın gözlemlendiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, AFM₁'in bilinen metabolitlerinin HPLC analizatöründe tespit edilememesinden dolayı AFM₁'in metabolitlerine parçalanarak detoksifiye olmadığı sadece bakteri hücre duvarına

bağlanarak ortamdan uzaklaştırıldığı sonucuna varılmıştır (Pierides ve ark., 2000). Bu nedenle bakteri canlılığının gerekli olmadığı düşünülmektedir (Dalié ve ark., 2010). Bunun yanında bakteri inaktif olduğunda daha fazla hidrofobik yapı ortaya çıkmakta ve bağlanmalar daha kalıcı olmaktadır (Abedi ve ark., 2022a). Ayrıca AFM₁'i bağlayan ölü mikrobiyal hücreler, sindirim sisteminde emilmeden insan vücudundan kolayca atılabilir ve bu durum AFM₁ biyoyararlanımının azalmasına neden olmaktadır (Ismail ve ark., 2017).

İnaktif bakterilerin bulunduğu gruplar karşılaştırıldığında ID, AD ve Uİ grupları arasında fark bulunmazken, UHT yağsız süt içerisinde US uygulanan SUİ grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha yüksek bağlama oranları tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında süt veya PBS içerisinde bakterilerin US ile inaktifleştirilip AFM₁ bağlama kapasitesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

SUİ grubundaki bakterilerin bağlama kapasitelerinde meydana gelen artış, yüksek güçte uygulanan US'nin hücre duvarı üzerindeki etkisi ile açıklanabilir. Yüksek güçte US uygulaması, hücre duvarının kısmen parçalanmasına veya yapısal bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (Onyeaka ve ark., 2023). Bu durum, toksinin bakterilerin hücre duvarı tabakalarına daha fazla bağlanmasını kolaylaştırmış ve bağlama kapasitesinin artmasına yol açmış olabilir. Ayrıca, bozulan hücre yapısı, toksin bağlanması için daha fazla yüzey alanı ve bağlanma noktası oluşturmaktadır. Bu etki, US'nin hücre yapısını değiştirerek toksin bağlama kapasitesini etkileyebileceğini göstermektedir.

Mevcut çalışmada 1s1 ile inaktif *L. acidophilus* (ID) UHT yağsız süt ortamında %20.5 oranında AFM₁ bağlamıştır. Yapılan literatür taramasında 1s1 ile inaktif *L. acidophilus*'un UHT yağsız süt içerisinde AFM₁ detoksifikasyonuna yönelik çalışma sayısının kısıtlı olduğu görülmüştür. Yalnız bir çalışmada mevcut çalışma bulgularına benzer olarak, 1s1 ile inaktif *L. acidophilus* süşunun yağsız süt ortamında, AFM₁'i %23.73 oranında bağladığı bildirilmiştir (Kabak ve Var, 2008).

Tez çalışmasının bulgularına benzer olarak Pierides ve ark. (2000) tarafından 1s1 ile inaktif edilen *L. acidophilus*'un PBS ortamında %25.5 oranında AFM₁ bağladığı

tespit edilirken; Abdelmotilib ve ark. (2018) ve Elsanhoty ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmalarda sırasıyla %58.98 ve %45.9 bağlama oranları bildirilmiştir. Araştırmacıların kullandıkları toksin konsantrasyonu, çalışma ortamı ve inkübasyon süresinin bu çalışmadan farklı olması bağlama oranlarını daha yüksek tespit etmelerinin nedeni olabilir. Bunun yanında inaktif *L. acidophilus*'un bulgularımızdan daha düşük oranda (%16.82) AFM₁ bağladığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Kabak ve Var, 2008). Bu durum çalışmalarda farklı toksin konsantrasyonu ve *L. acidophilus* suşu kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan literatür taramalarında ısı ile inaktif *L. reuteri*'nin süt ortamında AFM₁ detoksifikasyonuna yönelik yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanında Hashemi ve Amiri (2022) tarafından kaymaklı süt ürünü (Sarshir) ortamında, *L. reuteri* ısı ile inaktif olduğunda %90 oranında AFM₁ bağladığı bildirilmiştir. Mevcut çalışmadan daha yüksek oranda bağlama oranları tespit etmelerinin sebebi; çalışmada kullandıkları ortamın farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

UHT yağsız süt ortamında ise *L. rhamnosus*'un ID grubunda %26 oranında AFM₁ bağladığı görülmüştür. Benzer oranlar Bovo ve ark. (2013), Kabak ve Var (2008) ve Pierides ve ark. (2000)'ın yağsız süt ortamında yaptıkları çalışmalarda (sırasıyla %24.46, %25.13 ve %26,6) da bildirilmiştir. Bunun yanında Pierides ve ark. (2000) tarafından ısı ile inaktif 2 farklı *L. rhamnosus* suşunun tam yağlı inek sütü içerisinde %30.1 ve %36.6 oranında AFM₁ detoksifikasyon kapasitesine sahip olduğu da bildirilmiştir.

Kabak ve Var (2008) tarafından ısı ile inaktif *L. rhamnosus*'un PBS ortamında AFM₁'i %23.37 oranında bağladığı bildirilmiştir. Bovo ve ark. (2013)'ın yaptıkları çalışmada ise PBS ortamında %35.69 oranında bağlama tespit edilmiştir. Sonuçlardaki farklılıklar daha yüksek toksin ve bakteri konsantrasyonun yanında farklı ortam kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir. Isı ile inaktif edilen üç farklı *L. rhamnosus* suşunun PBS ortamında AFM₁ bağlama kapasitesini değerlendiren Pierides ve ark. (2000) 15-16 saatlik inkübasyon süresinin ardından sırasıyla %39.9, %51.6 ve %57.8 oranlarında bağlama tespit etmiştir. Kullandıkları ortamın farklı olması, inkübasyon süresi, toksin ve bakteri konsantrasyonun yüksek olması bu tez çalışmasından daha yüksek bağlama oranları elde etmelerinin nedeni olabilir. Ayrıca mevcut çalışmada,

inkübasyon süresi 1 saat olmasına rağmen, SUİ grubundaki *L. rhamnosus*'un Pierides ve ark. (2000) bulgularına benzer şekilde %43.5 oranında bağlama kapasitesine sahip olduğu kaydedilmiştir. Bununla birlikte %47.1 oranında bağlama yüzdesi elde eden Elsanhoty ve ark. (2014) tarafından, inkübasyon süresinin ve toksin konsantrasyonunun bu tez çalışmasından daha yüksek tutulduğu görülmüştür. Yani bu durumun, kısa inkübasyon süresinde US uygulamasının AFM₁ bağlama etkinliğini artırabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada inaktif mix grupları arasında en yüksek bağlama kapasitesi SUİ grubundaki mix bakterilerde (%43) tespit edilmiştir. Diğer inaktif gruplarda (ID, AD ve Uİ) AFM₁ bağlama oranlarının (%22.5, %18 ve %24.5) benzer olduğu bulunmuştur.

Yapılan literatür taramasında süt ortamında inaktif mix LAB'lerin AFM₁ bağlama oranlarını karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmalarda genel olarak farklı bakteri ve maya türleri tek/kombine olarak çalışılmış (Abdelmotilib ve ark., 2018; Adriansyah ve ark., 2022; Corassin ve ark., 2013; Ismail ve ark., 2017; Kamyar ve Movassaghazani, 2017) veya fizyolojik durumun (canlı-ölü) AFM₁ detoksifikasyonu üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Abdelmotilib ve ark., 2018). Bunun yanında okratoksin ve AFB₁ detoksifikasyonunu ekşi maya (sourdough) ortamında araştıran Abedi ve ark. (2022a) ve Abedi ve ark. (2022b) tarafından mix bakterilerin US ile inaktif duruma getirildiğinde ısı ile inaktiflere göre daha yüksek bağlama kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, mix bakterilerin SUİ ve ID grupları arasındaki bağlama oranları araştırmacıların bulguları ile benzer tespit edilmiştir. Ancak, tez çalışmasında Uİ ve ID gruplarında bulunan mix bakterilerin bağlama oranlarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Genel olarak çalışmalardaki oranların farklılığı kullanmış oldukları toksin ve bakteri konsantrasyonu, inkübasyon süresi, toksin ile bakterinin bir araya getirildikleri ortam bileşenlerinin aynı olmamasından kaynaklanmaktadır.

US gruplarında, UA ve Uİ grupları arasındaki bağlama oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ancak, SUA ve SUİ gruplarının, UA ve Uİ

gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek detoksifikasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

SUA ve SUİ gruplarındaki bağlama oranlarının mix grup dışında benzer olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, SUA ve SUİ gruplarındaki bağlama mekanizmalarının farklılık gösterdiği düşünülmektedir. SUİ grubundaki bağlama artışının temel sebebi, KUI grubundaki %18'lik bağlanma oranına ek olarak, SUİ grubunda bakterilere yüksek güçte US uygulanmasıyla akustik kavite oluşumunun meydana gelmesidir. Akustik kavite, mekanik (basınç), termal (lokalize ısıtma) ve kimyasal (serbest radikaller) etkiler oluşturmaktadır. Bu süreç sırasında bakterinin membran geçirgenliği artmakta ve hücre seçiciliği kaybolmaktadır. Basınç ve sıcaklık etkisiyle ortaya çıkan mekanik enerji ile hidroksil radikallerinin neden olduğu DNA hasarı, bakterilerin hücre duvarlarını parçalayarak hücre içi içeriğin salınmasına yol açmakta ve bu durum mikrobiyal inaktivasyonla sonuçlanmaktadır (Abedi ve ark., 2022a; Abedi ve ark., 2022b; Nunes ve ark., 2022; Onyeaka ve ark., 2023). Dolayısıyla hücre duvarı bütünlüğünün bozulması, hidrofobik etkileşimleri artırabilir. Hücre yapılarının (peptidoglikan, enzimler, peptitler, metabolitler ve nükleik asit kalıntıları gibi) dışarı salınması ve hücre dışındaki toksinin hücre yüzeyine daha kolay bağlanmasını sağlayabilir. Böylece hücre içi ve dışı ortamlarda bulunan moleküller arasında etkileşim artabilir ve toksinlerin hücre yüzeyindeki bağlanma bölgelerine daha fazla erişim imkânı doğabilir. Bu süreç, bakterilerin toksin bağlama kapasitesini artırarak bağlanma mekanizmasını destekleyebilir.

SUA grubundaki bağlama artışının sebebi ise, KUA grubundaki %2'lik düşük bağlanma oranına ek olarak, SUA grubunda bakterilere süt içerisinde daha düşük güçte US uygulanmasıdır. Bu uygulama sırasında akustik kavite oluşumuna gelmemektedir. Daha düşük yoğunluk ve ısı üretimi söz konusu olmaktadır (Ojha ve ark., 2017). Burada oluşan hafif basınç dalgaları bakterilerin fiziksel ve kimyasal bağlanma yüzeylerini etkileyebilir. Akustik kavite oluşumuna gelmeksizin mekanik etkiler, bakteriyel metabolizmanın artışına neden olarak toksinin bağlama sürecini hızlandırabilir. Artan metabolik aktivite, bakterilerin yüzey proteinleri veya hücre dışı salgılar gibi bağlanmayı destekleyen bileşenler üretmesini sağlayabilir. Hücre zarı geçirgenliğinin artışıyla bakterilerin hücre duvarındaki toksin bağlanma bölgelerine daha fazla erişim sağlamasını kolaylaştırabilir (Ektik ve Tavşanlı, 2021; Guimarães ve

ark., 2021; Ojha ve ark., 2017; Tavşanlı ve ark., 2023). US, süt ortamında mikro ve makro bileşenlerin homojen dağılımını sağlayarak bakterilerle toksinin daha etkin bir şekilde etkileşime girmesine olanak tanıyabilir. Ayrıca US'nin etkisiyle süt içerisindeki yağ globülleri küçülmekte ve protein yapıları kısmen açığa çıkmaktadır (Riener ve ark., 2009). Bu durum, toksinlerin hem süt bileşenleri hem de bakterilerle daha iyi temas etmesine yol açabilir. Dolayısıyla SUA grubundaki bağlama artışı hücre zarındaki yapısal değişikliklere, bakterilerin metabolik aktivitelerinin artışına ve süt ortamındaki homojenizasyonun iyileşmesine bağlanabilir. Bu mekanizmalar, hücre içi ve dışı etkileşimlerin artmasına ve toksin bağlanmasının desteklenmesine olanak sağlayabilir.

Her ne kadar SUA ve SUI gruplarındaki bağlama oranları benzer tespit edilmiş olsa da bakterilerin bağlama kapasitesinin SUA grubunda daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu fark ile aktivasyon düzeyinde US uygulamasının bakterileri toksin bağlama açısından daha etkili hale getirdiği düşünülmektedir. Ancak canlı bakteriler, ortam koşullarına veya metabolik ihtiyaçlarına bağlı olarak toksini bağlama veya serbest bırakma eğilimi gösterebilir. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda canlı bakterilerin toksin bağlama sürecinin kalıcı olmadığı ve zamanla toksini geri salabileceği bildirilmektedir (Haskard ve ark., 2001; Lee ve ark., 2003). Bu durum, canlı bakterilerin bağlanma mekanizmalarının dinamik yapısını ve toksin bağlama sürekliliği üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır. Örneğin, Lee ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada, inaktif bakterilerin adsorpsiyon afinitesinin daha yüksek, desorpsiyon oranlarının ise daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu durumun, bağlanan aflatoksinin geri salınma olasılığını azaltarak bağlanmayı daha kararlı hale getirdiği belirtilmiştir. Canlı hücrelerin zar geçirgenliği zamanla değişebilir ve bu durum, bağlanma yüzeylerinin ve bölgelerinin sayısında farklılık yaratabilir. Benzer şekilde, Sadiq ve ark. (2019), probiyotik bakterilerin toksin bağlama kapasitelerinin suşlara ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir. Bu bulgular, canlı bakterilerin toksinlerle etkileşimlerinin çeşitli faktörlerden etkilendiğini göstermektedir. Ancak canlı bakterilerde bağlanma geçici olabilirken, inaktif edilmiş hücrelerde yüzey yapılarının toksinlerle fiziksel bağlanma sağlamaya devam ettiği ve bu bağlanmanın daha kalıcı olabileceği görülmektedir.

SUA ve SUİ gruplarında, UA ve Uİ gruplarına kıyasla daha yüksek bağlama oranlarının bir diğer nedeni, SUA ve SUİ gruplarında bakterilere UHT yağsız süt içerisinde US uygulandıktan sonra yıkama işlemi yapılmaması olduğu düşünülmektedir. Çalışmada SUA ve SUİ gruplarına yıkama yapılmamasının nedeni, yıkama işlemi sırasında süt bileşenleri ve bağlanan bakterilerin yıkama ile birlikte ortamdaki uzaklaşma riskinin bulunmasıdır. Bu durum, bakterilerin toksin bağlama etkinliğini değerlendirme sonuçlarını etkileyebileceği için, bakterilerin doğal bağlanma koşullarını korumak adına yıkama işleminden kaçınılmıştır. Literatürde bu konuda doğrudan bir bilgi bulunmamakla birlikte, bu karar çalışmanın doğruluğunu ve güvenilirliğini korumak amacıyla alınmıştır. Ancak UA ve Uİ gruplarında bakterilere PBS içerisinde US uygulandıktan sonra yıkama işlemi gerçekleştirilip (Karazhiyan ve ark., 2016) daha sonra bakteri peletleri UHT yağsız süt ortamında toksinle bir araya getirilmiştir. US uygulamaları ile bakteriler inaktif hale geldiğinde ortamda parçalanmış bakterilere ait hücre içeriği hücre duvarı parçaları gibi AFM₁ uzaklaştırmasını destekleyen yapılar açığa çıkabilmektedir (Nunes ve ark., 2022; Onyeaka ve ark., 2023). Bununla birlikte US uygulaması ile aktif hale gelen bakterilerde metabolik (biyoaktif peptitler, bazı organik asitler ve enzim aktivitesi gibi) artış meydana gelmektedir (Akdeniz ve Akalın, 2020a; Guimarães ve ark., 2019; Guimarães ve ark., 2021; Tavşanlı ve ark., 2023). Dolayısıyla yıkama işlemi sırasında, bakterilerin AFM₁'i azaltabilecek hücre parçaları veya metabolitlerinin uzaklaştırılması, UA ve Uİ gruplarındaki bağlama oranlarının SUA ve SUİ gruplarına kıyasla daha düşük tespit edilmesine neden olmuş olabilir. Bu durum, Sezer ve ark. (2013) tarafından bakterilerin metabolik ürünlerinden biri olan bakteriyosinlerin AFB₁'i daha fazla azalttığı bildirilmesiyle de uyumludur. Ayrıca, Martinez ve ark. (2019), bakterilerin metabolik enzimlerinin AFM₁'i daha az toksik metabolitlere parçalayabildiğini ortaya koymuştur. Bunun yanında, Gao ve ark. (2011) ile Zhao ve ark. (2011), bakteri CFS'sinin AFM₁'i etkili bir şekilde uzaklaştırabildiğini bildirmiştir. Bununla birlikte sahada kullanım kolaylığı açısından bakıldığında, SUA ve SUİ gruplarında uygulanan işlem aşamaları teknolojik açıdan daha uygulanabilir bir yaklaşım sunmaktadır.

Çalışmada genel olarak UHT yağsız süt ortamında en yüksek bağlama SUA ve SUİ gruplarında tespit edilmiştir. Diğer gruplarda (canlı ve ısı ile inaktif *L. reuteri* hariç), gruplar arası bağlama oranları arasında fark tespit edilmemiştir. Benzer olarak

Bueno ve ark. (2007) ve Lee ve ark. (2003) tarafından da hem canlı hem de cansız hücrelerin aflatoksini bağlamada aynı adsorban yeteneğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan dolayı hücrenin canlı olmasının aflatoksin uzaklaştırılmasında bir ön koşul olmadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Yücel (2019) tarafından canlı ve ısı ile öldürülmüş bakteri hücrelerinin AFM₁ bağlama oranlarının araştırıldığı çalışmada, canlı hücrelerde %40.11; ölü hücrelerde ise %39.07 oranında bağlama tespit edilmiştir. Aynı şekilde, Chaudhary ve Patel (2022) tarafından süt içerisinde ısı ile işlenmiş hücrelerin canlı hücrelere kıyasla AFM₁ bağlama oranında önemli bir fark göstermediği bildirilmiştir. Sonuç olarak hücrelerin canlı ya da ölü olmasının bağlama oranı üzerine dikkate değer bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir. Ancak bu tez çalışmasında canlı *L. reuteri* hücrelerinin (CB), ısı ile inaktif edildiği (ID) duruma göre istatistiksel olarak daha fazla toksin bağladığı tespit edilmiştir. *L. reuteri* ile ilgili çalışmalar, daha önce de belirtildiği gibi, sınırlıdır. Ancak Hashemi ve Amiri (2022), ısı ile inaktive edilmiş *L. reuteri*'nin canlı hücrelerine göre daha yüksek detoksifikasyon kapasitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu farklılık, ortam koşullarının (kaymak) yanı sıra, çalışmalarında ısı ile ölü hücreleri 10⁹ kob/ml, canlı hücreleri 10⁴ kob/ml kullanmalarından kaynaklanıyor olabilir.

Canlı ve ölü hücreler arasında fark olduğunu rapor eden çalışmalarda, Jebali ve ark. (2015) tarafından PBS ortamında 24 saatlik inkübasyon sonunda canlı bakteri hücrelerinin (%89.1), ısı ile inaktif (%52.2) hücrelere göre daha fazla AFM₁ bağlama kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Sarlak ve ark. (2017) canlı hücrelerin ısı ile inaktif hücrelere göre daha yüksek detoksifikasyon oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Bovo ve ark. (2013) tarafından AFM₁'i bağlama yeteneğinin değerlendirildiği çalışmada, ısı ile inaktif edilmiş bakterilerde %12.42 ile %45.67 aralığında, canlı bakterilerde ise %5.60 ile %33.54 aralığında bağlama oranı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada canlı ve ısı ile ölü *L. bulgaricus*'un 24 saatlik inkübasyonun sonunda bağlama oranlarında fark tespit edilmemiştir. Pierides ve ark. (2000) tarafından PBS ortamında ısı ile öldürülmüş bakterilerin canlı bakterilere göre daha fazla bağlama kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Ancak aynı araştırmacılar tarafından yağsız süt ortamında LAB'ler canlı olduğunda (%69.6) ısı ile öldürülenlere (%27.4) göre daha fazla bağlama oranı bildirilmiştir. Bunun sebebi; LAB'lerin UHT yağsız süt ve PBS ortamında farklı davranmalarından kaynaklanıyor olabilir. Bir başka çalışmada ise 6 farklı LAB içerisinde sadece ısı ile inaktif *L. acidophilus* NCC 12'nin

canlı gruptan daha fazla bağladığı bildirilmiştir (Kabak ve Var, 2008). Bu durum bakterinin AFM₁ bağlamasında canlı ya da ısı ile öldürülmüş olmasının yanında bakteri türünün de önemli olduğunun bir kanıtıdır. Araştırmacılar tarafından *L. rhamnosus*'un AFM₁ bağlama oranı, 37°C'de 15-16 saat inkübasyonda test edilmiştir. Süre sonunda, canlı hücrelerin %46.3-50.7 aralığında, ısıyla öldürülmüş hücrelerin ise %51.6-57.8 aralığında AFM₁ bağladığı rapor edilmiştir (Pierides ve ark., 2000).

SUI grubundaki mix LAB'lerin AFM₁ bağlama oranı (%43), SUA grubuna (%34) kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir. Bu farklılık daha öncede belirtildiği gibi inaktif grupta bakterilerin substrat için rekabet halinde olmamalarından kaynaklanıyor olabilir (Sanaldi ve Coban, 2023; Sevim, 2006).

Yapılan tez çalışmasında farklı uygulamaların (canlı, ısı, asit ve US) kendi kontrol grupları ile arasında fark tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramalarında asit ile öldürülen LAB'nin süt içerisinde AFM₁ bağlama kapasitesi üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanında Karazhiyan ve ark. (2016) tarafından yoğurt ortamına canlı, asit, ısı ve US uygulanarak eklediği *S. cerevisiae*'nin AFM₁'i bağlama oranları arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. Araştırmanın bulguları, genel olarak mevcut çalışma bulgularına benzerdir. Tez çalışmasının bulgularından farklı olarak El-Nezami ve ark. (1998b), Haskard ve ark. (2001) ve Rahaie ve ark. (2010) tarafından canlı, asit ve ısı uygulanan mikroorganizmalar arasında AFB₁ bağlama oranının en yüksek asit koşulları altında olduğu bildirilmiştir. Farklı sonuçlar elde edilmesi toksin türü farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışma grupları arasında önemli farklılıklar US'nin UHT yağsız süt ortamında (SUA, SUI) uygulanmasıyla tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasının bulgularına benzer olarak Abedi ve ark. (2022a) tarafından AFB₁'i en yüksek bağlama oranının termosonikasyonla işlenmiş (%88.1) bakteri gruplarında olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada AFB₁ ile çalışıldığı dikkate alındığında tez çalışmasından yüksek detoksifikasyon oranları elde etmeleri beklenen bir durumdur. Pierides ve ark. (2000), hiçbir durumda AFM₁'in uzaklaştırılma oranının AFB₁'in uzaklaştırılma oranını aşmadığını bildirmiştir. Bu fark, AFM₁ molekülünde bulunan ek -OH grubundan kaynaklanmaktadır ve bu durum AFM₁'in polaritesini AFB₁'e göre artırmaktadır. Artan polarite, AFM₁'i daha hidrofilik hale getirerek sulu çözeltilerde çözünme

eğilimini artırmaktadır. Sonuç olarak, AFM₁'in bakterilere bağlanma oranı azalmakta ve bu da AFB₁'e kıyasla daha düşük bir uzaklaştırılma oranı tespit edilmesine neden olmaktadır.

Çalışma gruplarında canlı, aktivasyon ve inaktivasyon yöntemine göre yüksek ve düşük bağlama kapasitesine sahip olan LAB türünün değiştiği tespit edilmiştir. Ancak aynı grup içerisindeki bakteriler arasında bağlama kapasitesi açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Bakteri türünden ziyade bakteriye uygulanan işlemlerin AFM₁ detoksifikasyonu üzerinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, çalışma grupları arasında önemli farklılıklar, US uygulamasının UHT yağsız süt ortamındaki bakterilere (SUA ve SUI) uygulanmasıyla ortaya çıkmıştır.

Çalışmalardan elde edilen sonuçlardaki farklılıklar; ekstraksiyon prosedürleri, toksin konsantrasyonu, bakterilerin izole edildikleri ortam, analiz öncesinde geçen süre, inkübasyon sıcaklığı, sütün bileşimindeki değişkenlikler, kullanılan bakteri türü ve alt türü, inaktivasyon yönteminin niteliği ile detoksifikasyonun gerçekleştiği ortamın farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, AFM₁ detoksifikasyonuna yönelik yapılan çalışmalar arasında oranların farklılık göstermesi kaçınılmazdır. Ancak genel değerlendirme sonucunda, US'un süt içerisindeki bakterilere uygulanmasının AFM₁ bağlama oranı açısından anlamlı bir fark yarattığı ve bu nedenle kontamine sütlerde AFM₁'in uzaklaştırılması için etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Küçük çocuklar ve bebekler tarafından süt ve süt ürünleri tüketimi çok yüksektir. Yüksek süt tüketimi ve düşük vücut ağırlığı nedeniyle küçük çocuklar aflatoksinlerin toksisitesine karşı daha savunmasızdır. Bu nedenle, gıda güvenliğinin sağlanması ve halk sağlığının korunması için süt ve süt ürünlerinde aflatoksin seviyelerinin olabildiğince azaltılması gerekmektedir. Toksinlerin kontrolüne yönelik temel prensip, oluşumlarının önlenmesi olsa da süt ürünlerindeki AFM₁ riski varlığını halen sürdürmektedir. Bu nedenle aflatoksin riskini kontrol altına almak için güvenli ve pratik dekontaminasyon stratejileri ve bunların kombinasyonlarına ihtiyaç vardır. *Lactobacillus* suşlarının, biyokoruyucu, biyokontrol ajanı ve probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin yanı sıra, toksinleri bağlama yetenekleri sayesinde hem beslenme alanında hem de toksinlerin gıda ortamlarından uzaklaştırılmasında etkili bir şekilde kullanılabilmesi iyi bilinmektedir. Probiyotiklerin birçok faydası olduğu ve insan sağlığının iyileştirilmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir, ancak canlı olmaları nedeniyle kullanım sınırlamalarının olduğu belirtilmektedir. Son yıllarda, bir probiyotik yararlı etkilerinden faydalanmak için canlılığının gerekli olmadığı gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, sağlık üzerinde olumsuz etkiler yaratan AFM₁'in, fonksiyonel gıda üretiminde kullanılan ve insan sağlığına zararı olmayan LAB'ler aracılığıyla bağlanarak UHT yağsız süt ortamından uzaklaştırılma potansiyeli incelenmiştir. Bu amaçla mikroorganizma yoğunluğu, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, AFM₁ konsantrasyonu ve ortam sabit tutularak canlılık parametresinin bağlanma üzerine etkileri tespit edilmiştir. Seçilen LAB'lerin AFM₁ bağlama kapasitesi ve stabilitesi, bakteri türüne değil inaktivasyon ve aktivasyon yöntemine bağlı bulunmuştur. LAB'ler kullanılarak yapılan detoksifikasyon çalışmasında, çalışma gruplarında AFM₁ detoksifikasyonunun kontrol gruplarına kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuç LAB'lerin AFM₁ detoksifikasyonunda etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca UHT yağsız süt içerisinde ultrasonik işlemlerden

kaynaklanan canlı ve canlı olmayan LAB hücrelerinin mikotoksin bağlama kapasitesi önemli ölçüde daha yüksek kaydedilmiştir. Bu bulgular ışığında, LAB'lerin AFM₁ detoksifikasyonunda kullanımının artırılması ve özellikle US teknolojisi ile kombine edilerek daha etkili sonuçlar elde edilmesi önerilmektedir. Bu çalışmada kullanılan LAB'lerin, aflatoksinlerin potansiyel sağlık riskleri taşıdığı yerli fermente gıdalarda starter kültür seçimi açısından önemli bir kriter olarak değerlendirilmesi gerektiği ortaya konulmuştur. Ayrıca, US ile muamele edilen sütlerin, çalışmada kullanılan LAB'lerle fermentasyona tabi tutulması, inek sütündeki AFM₁ yükünü belirli bir ölçüde azaltabilir. Bununla birlikte bakteriler işlenecek olan süte herhangi bir işlem den geçmeden önce inoküle edilip ardından US işlemi gerçekleştirilirse daha yüksek oranda toksin detoksifikasyonu sağlanabilir. Bunun yanı sıra, fermente olmayan gıdalarda süt içerisinde US ile inaktive edilmiş bakteriler, fermentasyona yol açmaz ve bu bakterilerin bağlanma kapasitesi daha kalıcı olabilir. Ayrıca süt ve süt ürünlerinde tespit edilen AFM₁ miktarı, çalışmadan elde edilen oranlara göre belirli miktardaki toksini TGK'nin belirlediği limitlerin altına düşürebilir.

Yapılan tez çalışmasında elde edilen veriler mikotoksinle kontamine olmuş süt ürünlerine potansiyel olarak uygulanabilecek daha etkili uzaklaştırma yöntemlerinin tasarımında kullanılabilir. Probiyotik bakteriler arasındaki etkileşimlerin daha ayrıntılı incelendiği çalışmalar yapılarak, bu etkileşimlere dayalı uygun ve etkili ürünler geliştirilmelidir. Farklı seviyelerde inkübasyon süresi, sıcaklık, aflatoksin ve bakteri konsantrasyonu kullanılarak her değişkenin bağlama yeteneğine katkısını daha iyi anlamak ve probiyotik bakterilerin AFM₁'i bağladığı mekanizmanın tam olarak belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecekte, LAB'ye aflatoksinleri uzaklaştırma yeteneği veren genetik özellikler belirlenmelidir. Bu da süt endüstrisinde ticari uygulamayı hedeflemektedir. Çalışmanın kısıtlılığı duyuşal değerlendirme sonuçlarının bulunmamasıdır. Ayrıca, AFM₁'in probiyotikli süt içerisindeki toksinin sindirim sistemindeki emilimini, metabolik etkilerini ve vücuttaki potansiyel biyolojik zararlarını değerlendirmek için in vivo model çalışmalarına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abad, E., Llerena, J. J., Sauló, J., Caixach, J. and Rivera, J. (2002). Comprehensive study on dioxin contents in binder and anti-caking agent feed additives. *Chemosphere*, 46(9-10), 1417-1421. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00274-0)
- Abbès, S., Salah-Abbès, J. B., Sharafi, H., Jebali, R., Noghabi, K. A. and Oueslati, R. (2013). Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM₁ in vitro and to counteract AFM₁ immunotoxicity in vivo. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 279-286. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.718810>
- Abdelmotilib, N. M., Hamad, G. M., Elderea, H. B., Salem, E. G. and El Sohaimy, S. A. (2018). Aflatoxin M₁ reduction in milk by a novel combination of probiotic bacterial and yeast strains. *European Journal of Nutrition and Food Safety*, 8(2) 83-99. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2018/39486>
- Abedi, E., Mousavifard, M. and Hashemi, S. M. B. (2022b). Ultrasound-assisted detoxification of ochratoxin a: Comparative study of cell wall structure, hydrophobicity, and toxin binding capacity of single and co-culture lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 15(3), 539-560. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02767-7>
- Abedi, E., Pourmohammadi, K., Jahromi, M., Niakousari, M. and Torri, L. (2019). The effect of ultrasonic probe size for effective ultrasound-assisted pregelatinized starch. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 1852-1862. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02347-2>
- Abedi, E., Pourmohammadi, K., Mousavifard, M. and Sayadi, M. (2022a). Comparison between surface hydrophobicity of heated and thermosonicated cells to detoxify aflatoxin B₁ by co-culture *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* in sourdough: Modeling studies. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 154, 112616. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112616>
- Abesinghe, A. M. N. L., Vidanarachchi, J. K., Islam, N. and Karim, M. A. (2022). Effects of ultrasound on the fermentation profile and metabolic activity of lactic acid bacteria in buffalo's (*Bubalus bubalis*) milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 79, 103048. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103048>
- Abuqwider, J., Altamimi, M. and Mauriello, G. (2022). *Limosilactobacillus reuteri* in health and disease. *Microorganisms*, 10(3), 522 . <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030522>
- Abrahamsen, R. K. and Narvhus, J. A. (2022). Can ultrasound treatment replace conventional high temperature short time pasteurization of milk? A critical review. *International Dairy Journal*, 131, 105375. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105375>
- Adriansyah, P. N. A., Rahayu, W. P., Kusumaningrum, H. D. and Kawamura, O. (2022). Aflatoxin M₁ reduction by microorganisms isolated from kefir grains. *International Food Research Journal*, 29(1) 78-85. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.1.09>
- Adunphatcharaphon, S., Petchkongkaew, A. and Visessanguan, W. (2021). In vitro mechanism assessment of zearalenone removal by plant-derived *Lactobacillus plantarum* BCC 47723. *Toxins*, 13(4), 286. <https://doi.org/10.3390/toxins13040286>
- Afshar, P., Shokrzadeh, M., Raeisi, S. N., Ghorbani-HasanSaraei, A. and Nasiraii, L. R. (2020). Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon*, 178, 50-58.
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B. and Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V. and Korhonen, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042>

Akdeniz, V. ve Akalın, A. S. (2022a). Recent advances in dual effect of power ultrasound to microorganisms in dairy industry: activation or inactivation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(4), 889-904.

Akdeniz, V. ve Akalın, A.S. (2020b). The effect of high power ultrasound on the milk homogenization efficiency and milk fat globule size compared to conventional homogenization, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(1), 252-259. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i1.252-259.2830>

Akdeniz, V. ve Akalın, A. S. (2017). Ultrason uygulamasının süt ürünlerinde homojenizasyon, jel yapısı, viskozite ve su tutma kapasitesi üzerine etkisi. *Gıda*, 42(6), 743-753. <https://doi.org/10.15237/gida.GD17062>

Alahlah, N., El Maadoudi, M., Bouchriti, N., Triqui, R. and Bougtaib, H. (2020). Aflatoxin M₁ in UHT and powder milk marketed in the northern area of Morocco. *Food Control*, 114, 107262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107262>

Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C. and Giraudi, G. (2011). Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products. *Aflatoxins-Detection, Measurement and Control*, 1-20.

Ashiq, S. (2015). Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 159-175. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12122>

Assaf, J. C., Nahle, S., Chokr, A., Louka, N., Atoui, A. and El Khoury, A. (2019). Assorted methods for decontamination of aflatoxin M₁ in milk using microbial adsorbents. *Toxins*, 11(6), 304. <https://doi.org/10.3390/toxins11060304>

Awad, W. A., Ghareeb, K., Böhm, J. and Zentek, J. (2010). Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives and Contaminants*, 27(4), 510-520. <https://doi.org/10.1080/19440040903571747>

Awasthi, V., Bahman, S., Thakur, L. K., Singh, S. K., Dua, A. and Ganguly, S. (2012). Contaminants in milk and impact of heating: an assessment study. *Indian Journal of Public Health*, 56(1), 95-99. <https://doi.org/10.4103/0019-557X.96985>

Bermudez-Aguirre, D. (Ed.). (2017). *Ultrasound: Advances in food processing and preservation*. Academic Press.

Barreira, M. J., Alvito, P. C. and Almeida, C. M. (2010). Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food chemistry*, 121(3), 653-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.085>

Barukčić, I., Jakopović, K. L., Herceg, Z., Karlović, S. and Božanić, R. (2015). Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.013>

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P. and Pulina, G. (2005). Transfer of aflatoxin B₁ from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3063-3069. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72987-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72987-8)

Bayram, M. ve Anlı, E. (2008). Mikotoksinler ve şarap. *Türkiye*, 10, 21-23.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 1038-1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x>

- Ben Salah-Abbes, J., Abbes, S., Jebali, R., Haous, Z. and Oueslati, R. (2015). Potential preventive role of lactic acid bacteria against Aflatoxin M₁ immunotoxicity and genotoxicity in mice. *Journal of Immunotoxicology*, 12(2), 107-114. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.904025>
- Besler, H. T., Rakıcioğlu, N., Ayaz, A., Büyüktuncer Demirel, Z., Gökmen Özel, H., Samur, F. G., ... Yıldız, E. (2015). *Türkiye'ye Özgü Besin ve Beslenme Rehberi*. Ankara: Merdiven Reklam Tanıtım.
- Blanco, J. L., Carrion, B. A., Liria, N., Diaz, S., Garcia, M. E., Dominguez, L. and Suarez, G. (1993). Behaviour of aflatoxins during manufacture and storage of yoghurt. *Milchwissenschaft*, 48 (7), 385-387.
- Boonma, P., Spinler, J. K., Qin, X., Jittaprasatsin, C., Muzny, D. M., Doddapaneni, H., Gibbs, R., Petrosino, J., Tumwasorn, S. and Versalovic, J. (2014). Draft genome sequences and description of *Lactobacillus rhamnosus* strains L31, L34, and L35. *Standards in Genomic Sciences*, 9, 744-754. <https://doi.org/10.4056/sigs.5048907>
- Bovo, F., Corassin, C. H., Rosim, R. E. and de Oliveira, C. A. (2013). Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin m₁ in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2230-2234. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0770-9>
- Brackett, R. E. and Marth, E. H. (1982). Association of aflatoxin M₁ with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 174(6), 439-441. <https://doi.org/10.1007/bf01042721>
- Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A. and Oliver, G. (2007). Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2148-2154. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2148>
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>
- Cameron, M., McMaster, L. D. and Britz, T. J. (2009). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science and Technology*, 89(1), 83-98. <https://doi.org/10.1051/dst/2008037>
- Campagnollo, F. B., Ganev, K. C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A. G., Granato, D., Corassin, C. H., Oliveira, C. A. F. and Sant'Ana, A. S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. *Food Control*, 68, 310-329. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.007>
- Capurso, L. (2019). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53, 1-41. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001170>
- Carrillo-Lopez, L. M., Garcia-Galicia, I. A., Tirado-Gallegos, J. M., Sanchez-Vega, R., Huerta-Jimenez, M., Ashokkumar, M. and Alarcon-Rojo, A. D. (2021). Recent advances in the application of ultrasound in dairy products: Effect on functional, physical, chemical, microbiological, and sensory properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105467. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105467>
- Casquete, R., Benito, M. J., de Guía Córdoba, M., Ruiz-Moyano, S. and Martín, A. (2017). The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6987-6996. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12865>
- Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Marzioni, F., Nazzari, M., Samperi, R. and Laganà, A. (2006). Aflatoxin M₁ determination in cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1135(2), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.048>
- Cavallarin, L., Antoniazzi, S., Giaccone, D., Tabacco, E. and Borreani, G. (2014). Transfer of aflatoxin M₁ from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. *Food Control*, 38, 174-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.008>

- Ceyhan, N. ve Aliç, H. (2012). Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 107-113.
- Chandrapala, J. (2016). Ultrasound processing of milk and dairy products. In M. Ashokkumar (Ed.), *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry*, 1287–1320. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-287-278-4_66
- Chapot-Chartier, M. P. and Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1-23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- Chapot-Chartier, M. P., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Andre, G., Mistou, M. Y., Trieu-Cuot, P., Furlan, S., Bidnenko, E., Courtin, P., Péchoux, C., Hols, P., Dufrêne, Y. F. and Kulakauskas, S. (2010). Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10464-10471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082958>
- Chaudhary, H. J. and Patel, A. R. (2022). Removal of aflatoxin M₁ from milk and aqueous medium by indigenously isolated strains of *W. confusa* H1 and *L. plantarum* S2. *Food Bioscience*, 45, 101468. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101468>
- Chandrapala, J., Martin, G. J. O., Zisu, B., Kentish, S. E. and Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on casein micelle integrity. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6882–6890. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5318>
- Chandrapala, J., Zisu, B., Kentish, S. and Ashokkumar, M. (2013). Influence of ultrasound on chemically induced gelation of micellar casein systems. *Journal of Dairy Research*, 80(2), 138–143. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000696>
- Chavarria, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong-González, E., Cortés-Muñoz, M., Rodríguez, C. and Granados-Chinchilla, F. (2017) Distribution, stability, and protein interactions of Aflatoxin M1 in fresh cheese. *Food Control* 73:581–586. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.005>
- Chen, H. and Hoover, D. G. (2003). Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(1), 25-34. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00083-8)
- Cheng, Y., Donkor, P. O., Ren, X., Wu, J., Agyemang, K., Ayim, I. and Ma, H. (2019). Effect of ultrasound pretreatment with mono-frequency and simultaneous dual frequency on the mechanical properties and microstructure of whey protein emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 89, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.007>
- Cheong, E. Y. L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Le, T. T. K., Nhiep, N. T., Ho, H. T. M., Zwielehner, J., Bansal, N. and Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>
- Cicenia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M. and Severi, C. (2014). Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48, 18-22. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000231>
- Colak, H. (2007). Determination of aflatoxin M₁ levels in Turkish White and Kashar cheeses made of experimentally contaminated raw milk. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(2), 9. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2428>
- Conte, G., Fontanelli, M., Galli, F., Cotrozzi, L., Pagni, L. and Pellegrini, E. (2020). Mycotoxins in feed and food and the role of ozone in their detoxification and degradation: An update. *Toxins*, 12(8), 486. <https://doi.org/10.3390/toxins12080486>
- Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E. and Oliveira, C. (2013). Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. *Food Control*, 31(1), 80-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.033>

Corzo-Martínez, M., Villamiel, M. and Moreno, F. J. (2017). Impact of high-intensity ultrasound on protein structure and functionality during food processing. In M. Villamiel, A. Montilla, J. V. García-Pérez, J. A. Cárcel, and J. Benedito (Eds.), *Ultrasound in Food Processing* (417–436). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118964156.ch16>

Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G. ve Çakır, İ. (2011). Mikrobiyoloji. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları* 36, 197 Ankara.

Çelik, S. (2001). Karaciğer karsinogeni olan aflatoksinlerin biyokimyasal, histolojik etkileri ve sağaltım seçenekleri. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(3), 131-136.

Çilenti, S., Garip, Z. ve Temamoğulları, F. (2024). Adıyaman ilinde satışa sunulan çiğ sütlerde aflatoksin M₁ varlığının araştırılması ve potansiyel risk değerlendirmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 35(1), 70-76. <https://doi.org/10.35864/evmd.1447970>

da Rocha, M. E. B., Freire, F. D. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F. and Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>

Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M. and Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370-380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>

Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. and Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 159-184.

Demir, P., Bilgehan, G. and Arslan, A. (2021). Investigation of aflatoxin M₁ levels of fresh white cheeses offered for sale in Elazığ, Kovancılar, Bingöl, and Tunceli, in Turkey. *Journal of Raw Materials to Processed Foods*, 2(2), 63-77.

Demirdöven, A. and Baysal, T. (2008). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25(1), 1-11.

Deveci, O. (2007). Changes in the concentration of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of White Pickled cheese. *Food Control*, 18(9), 1103-1107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.012>

Dosako, S. I., Kaminogawa, S., Taneya, S. I. and Yamauchi, K. (1980). Hydrophobic surface areas and net charges of α s1-, κ -casein and α s1-casein: κ -casein complex. *Journal of Dairy Research*, 47(1), 123-129. <https://doi.org/10.1017/S0022029900020951>

Douillard, F. P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T. E., Järvinen, H. M., Messing, M., ... de Vos, W. M. (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *Public Library of Science*, 9(8), e1003683. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003683>

Dönmez, D. ve Uzun, M. (2024). Kış ve ilkbaharda marketlerden toplanan tereyağı örneklerinde Aflatoksin M₁ düzeyinin araştırılması. *Food and Health*, 10(3), 235-243. <https://doi.org/10.3153/FH24022>

Duman Aydın, B., Çelik, A. ve Güran, H. Ş. (2023). İnek ve Anadolu manda çiğ sütlerinde aflatoksin M₁ düzeyinin belirlenmesi. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 37(1).

Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M. and Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*, 28(5), 539-543. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013>

Ektik, N. ve Tavşanlı, H. (2021). Yoğurt üretiminin farklı aşamalarında ultrason uygulamasının yoğurtların mikrobiyolojik ve bazı fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi. *Izmir*

- Democracy University Health Sciences Journal*, 4(1), 94-104. <https://doi.org/10.52538/duhes.929936>
- El Khoury, A., Atoui, A. and Yaghi, J. (2011). Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*, 22(10), 1695-1699. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.001>
- El-Deeb, S. A., Zaki, N., Shoukry, Y. M. R. and Kheadr, E. E. (1992). Effect of some technological processes on stability and distribution of aflatoxin M₁ in milk. *Egyptian Journal of Food Science*, 20(3), 29-42.
- El-kest, M. M., El-Hariri, M., Khafaga, N. I. and Refai, M. K. (2015). Studies on contamination of dairy products by aflatoxin M₁ and its control by probiotics. *Journal of Global Biosciences*, 4(1), 1294-1312.
- El-Nezami, H. S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S. and Mykkänen, H. (2002). Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants*, 19(7), 680-686. <https://doi.org/10.1080/02652030210134236>
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998a). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00160-9)
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998b). Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protection*, 61(4), 466-468. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.4.466>
- Elsanhoty, R. M., Salam, S. A., Ramadan, M. F. and Badr, F. H. (2014). Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control*, 43, 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.002>
- Emmott, A. (2015). Market-led aflatoxin Interventions: Smallholder groundnut value chains in Malawi.
- Erol, İ. (2007) *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Pozitif Matbaacılık. Ankara
- Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y. and Karadal, F. (2011). A survey of concentration of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Turkey. *Food Control*, 22(12), 1956-1959. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.009>
- Ertugay, M. F., Şengül, M. and Şengül, M. (2004). Effect of ultrasound treatment on milk homogenisation and particle size distribution of fat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(2), 303-308. <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol28/iss2/9/>
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S. and Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2773-2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Fakhrabadipour, M., Khajehrahimi, A. E., Haghdoost, N. S., Anvar, S. A. and Tala, M. (2023). Efficiency of *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* for detoxification of aflatoxin M₁ in skim milk. *International Journal of Dairy Technology*, 76(3), 443-722. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12942>
- Fashandi, H. M., Abbasi, R. and Mousavi Khaneghah, A. (2018). The detoxification of aflatoxin M₁ by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(9), e13704. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13704>
- Fazeli, M. R., Hajimohammadali, M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M. R., ... Pouragahi, S. (2009). Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 72(1), 189-192. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.1.189>
- Fernandes, A. M., Corrêa, B., Rosim, R. E., Kobashigawa, E. and Oliveira, C. A. F. (2012). Distribution

and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 24(1-2), 104-108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>

Ferreira, R. G., Cardoso, M. V., de Souza Furtado, K. M., Espíndola, K. M. M., Amorim, R. P. and Monteiro, M. C. (2019). Epigenetic alterations caused by aflatoxin B₁: a public health risk in the induction of hepatocellular carcinoma. *Translational Research*, 204, 51-71. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.09.001>

Foerster, C., Monsalve, L. and Ríos-Gajardo, G. (2023). Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and exposure estimation for its consumption in the Chilean population. *Food Control*, 148, 109677. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109677>

Food and Agriculture Organization and World Health Organization (1974). *Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications: seventeenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 25 June-4 July 1973*. World Health Organization.

Frazier, W.C. (1986): *Food Microbiology*. Universty of Wisconsin, Madison, 440-461.

Galli, C. and Risé, P. (2017). The role of fats in milk and dairy products in nutrition and health from infancy to adulthood. In *Dairy in human health and disease across the lifespan* (pp. 57-72). Academic Press.

Gao, X., Ma, Q., Zhao, L., Lei, Y., Shan, Y. and Ji., C. (2011). Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁, and G₁ detoxification. *Eur Food Res Technol* 232, 957–962. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1463-3>

Gholamhosseinpour, A. and Hashemi, S. M. B. (2019). Ultrasound pretreatment of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus plantarum* AF1: Carbohydrate metabolism and antioxidant activity. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1), e12930. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12930>

Giorni, P. (2007). Impact of environmental and plant factors on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 330-338.

Girgin, G., Başaran, N. ve Şahin, G. (2001). Dünyada ve Türkiye de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 58(3), 97-118.

Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P. A. and Botsoglou, N. A. (2001). Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing, ripening and storage of Telemes cheese. *Food Additives and Contaminants*, 18(5), 437-443. <https://doi.org/10.1080/02652030120550>

Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P. A. and Botsoglou, N. A. (2002). Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. *Food Additives and Contaminants*, 19(11), 1043-1050. <https://doi.org/10.1080/0265203021000007831>

Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T. and Schatzmayr, G. (2019). Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. *Toxins*, 11(7), 375. <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>

Guan, C., Zhang, W., Su, J., Li, F., Chen, D., Chen, X., ... Zhang, C. (2023). Antibacterial and antibiofilm potential of *Lacticaseibacillus rhamnosus* YT and its cell-surface extract. *BioMed Central microbiology*, 23(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02751-3>

Guan, E. Q., Cui, L., Bian, K., Li, M. M., Cui, G. J. and Chen, F. (2012). Study on methods to reduce the deoxynivalenol toxin in wheat seeds infected by fusarium head blight [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 32(03), 585-588.

Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q. and Niu, T. (2008). Aflatoxin B₁ degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8), 1489-1503. <https://doi.org/10.3390/ijms9081489>

Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Scudino, H., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Ashokkumar, M., Freitas, M. Q. and Cruz, A. G. (2019). High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products. *Ultrasonics Sonochemistry*, 57, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.004>

Guimarães, J. T., Scudino, H., Ramos, G. L., Oliveira, G. A., Margalho, L. P., Costa, L. E., ... Cruz, A. G. (2021). Current applications of high-intensity ultrasound with microbial inactivation or stimulation purposes in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 42, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.06.004>

Gupta, R. and Srivastava, S. (2014). Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology*, 42, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.005>

Güneşer, O. ve Erdoğan, S. (2023). Ultrases uygulamasının süt bileşenleri üzerine etkisi. *Uşak Üniversitesi Fen ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(1), 40-58.

Gürbay, A., Engin, A. B., Çağlayan, A. and Şahin, G. (2006). Aflatoxin M1 levels in commonly consumed cheese and yogurt samples in Ankara, Turkey. *Ecology of Food and Nutrition*, 45(6), 449-459.

Gürsoy, O. ve Kınık, Ö. (2011). Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(3), 361-371.

Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J. and Salminen, S. (2008). Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 160-165. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02276.x>

Hamdy, A. M., Mohran, M. A., Hassan, A. I. and Fahmy, M. A. (2018). Effects of heat, ultrasound, and microwave pretreatments on the antigenicity of whey protein concentrate (β -lactoglobulin). *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 49, 75–87. <https://dx.doi.org/10.21608/ajas.2018.28370>

Hashemi, S. M. B. and Amiri, M. J. (2022). Detoxification of aflatoxin M₁ in sarshir by viable and nonviable *Limosilactobacillus reuteri* and *Limosilactobacillus rhamnosus*: Kinetic, equilibrium and desorption studies. *International Dairy Journal*, 127, 105223. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105223>

Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S. and Ahokas, J. T. (2001). Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3086-3091. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3086-3091.2001>

Haskard, C., Binnion, C. and Ahokas, J. (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, 128(1), 39-49. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00186-1)

Hassan, H. F. and Kassaify, Z. (2014). The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy products. *Food Control*, 37, 68-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.022>

Hassan, Z. U., Al-Thani, R., Atia, F. A., Almeer, S., Balmas, V., Migheli, Q. and Jaoua, S. (2018). Evidence of low levels of aflatoxin M₁ in milk and dairy products marketed in Qatar. *Food Control*, 92, 25-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.038>

Hathout, A. S. and Aly, S. E. (2014). Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology*, 64(3), 905-919. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0899-7>

Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S. and Steele, J. L. (2009a). Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1064-1068. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.042>

- Hernandez-Mendoza, A., Guzman-de-Peña, D. and Garcia, H. S. (2009b). Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 395-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04217.x>
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C. and Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
- Hladíková, Z., Smetanková, J., Greif, G. and Greifová, M. (2012). Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 80-85. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0013-3>
- Hossain, M. A., Ahmed, M. S. and Ghannoum, M. A. (2004). Attributes of *Stachybotrys chartarum* and its association with human disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2), 200-208.
- Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., ... Ma, H. (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>
- IARC, (2002). IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 82: 168-171. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf> (Accessed 01.10.2017).
- Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A. and Trucksess, M. W. (2013). Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control*, 29 (1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.058>
- Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A. and Faizal-Ahmad, A. R. (2015). Aflatoxin M₁ in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>
- Ismail, A., Levin, R. E., Riaz, M., Akhtar, S., Gong, Y. Y. and de Oliveira, C. A. (2017). Effect of different microbial concentrations on binding of aflatoxin M₁ and stability testing. *Food Control*, 73, 492-496. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.040>
- Istiqomah, L., Damayanti, E., Julendra, H., Suryani, A. E., Sakti, A. A. and Anggraeni, A. S. (2017, June). Effect of methionine and lactic acid bacteria as aflatoxin binder on broiler performance. In *AIP Conference Proceedings*, 1854(1), 020017. <https://doi.org/10.1063/1.4985408>
- İçier, F. ve Baysal, T. (2012). Gıda teknolojisinde minimal işleme. In T. Baysal ve F. İçier (Eds.), *Gıda Mühendisliğinde Isl Olmayan Teknolojiler*, 1-11. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti.
- Jakić-Dimić, D., Nešić, K. and Petrović, M. (2009). Contamination of cereals with aflatoxins, metabolites of fungi *Aspergillus flavus*. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-2), 1203-1208.
- Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z. and Li, P. (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2332-2381. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12734>
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z. and Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.004>
- Jana, T., Acker, B. W. and Cash, B. D. (2020). Probiotics and prebiotics, including fibers and medicinal foods. In *Clinical and Basic Neurogastroenterology and Motility*, (587-600). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813037-7.00042-X>
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A. and Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or

transformation. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 28(11), 1590-1609. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>

Jebali, R., Abbès, S., Salah-Abbès, J. B., Younes, R. B., Haous, Z. and Oueslati, R. (2015). Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to mitigate aflatoxins (B₁ and M₁) immunotoxicities in mice. *Journal of Immunotoxicology*, 12(3), 290-299. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.973622>

Jiang, J., Li, K., Xiao, Y., Zhong, A., Tang, J., Duan, Y. and Li, Z. (2022). *Limosilactobacillus reuteri* regulating intestinal function: a review. *Fermentation*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010019>

Jiang, Z., Yao, K., Yuan, X., Mu, Z., Gao, Z., Hou, J. and Jiang, L. (2018). Effects of ultrasound treatment on physico-chemical, functional properties, and antioxidant activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1522–1529. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8623>

Juraga, E., Vukušić Pavičić, T., Gajdoš Kljusurić, J., Brnčić, M., Juraga, T. and Herceg, Z. (2021). Properties of milk treated with high-power ultrasound and bacto-fugation. *Food Technology and Biotechnology*, 59(1), 92–102.

Kabak, B. and Var, I. (2006). Ülkemiz açısından sorun olan mikotoksinler ve riskli gıda maddeleri. *Türkiye*, 9, 24-26.

Kabak, B. and Var, I. (2008). Factors affecting the removal of aflatoxin M₁ from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health, part B*, 43(7), 617-624. <https://doi.org/10.1080/03601230802234740>

Kabak, B., Dobson, A. D. and Var, I. I. L. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 593-619. <https://doi.org/10.1080/10408390500436185>

Kacániová, M. (2003). Feeding soybean colonization by microscopic fungi. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 4(2), 165-168.

Kamel, E., Bazalou, M., Sdeek, F. A. and Konuk, M. (2017). Comparison of liquid chromatography instruments with single quadrupole and tandem mass spectrometry for trace level analysis: Aflatoxin M₁ (AFM₁) in white cheese. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 2294-2304. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1369435>

Kamyar, S. and Movassaghghazani, M. (2017). Reduction of Aflatoxin M₁ in milk using Kefir Starter. *Iranian Journal of Toxicology*, 11(6), 27-31. <https://doi.org/10.29252/arakmu.11.6.27>

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.

Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T. and Katikou, P. (2005). Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control*, 16(3), 257-261. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.03.003>

Karaca, H. (2005). *Kuru İncirlerin aflatoksin, patulin, ergosterol içeriği ve farklı koşullarda aflatoksinlerin parçalanma düzeyleri* [Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi].

Karazhiyan, H., Mehraban, SM, Karazhyan, R., Mehrzad, A. and Haghghi, E. (2016). Ability of different treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to surface bind aflatoxin M₁ in yoghurt. *Journal of Agricultural Food*, 18, 1489-1498.

Karimi, R., Mortazavian, A.M. and Da Cruz, A.G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science and Technology*, 91(3), 283-308. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0005-x>

- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., ... Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32(4), 179-205. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0257-7>
- Kashaninejad, M. and Razavi, S. M. A. (2020). Influence of thermosonication treatment on the average size of fat globules, emulsion stability, rheological properties, and color of camel milk cream. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (Food Science and Technology)*, 132, 109852. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109852>
- Khadivi, R., Razavilar, V., Anvar, S. A. A. and Akbari-Adergani, B. (2020). Aflatoxin M₁-binding ability of selected lactic acid bacteria strains and *Saccharomyces boulardii* in the experimentally contaminated milk treated with some biophysical factors. *Archives of Razi Institute*, 75(1), 63. <https://doi.org/10.22092/ARI.2019.123985.1265>
- Khaneghah, A. M., Moosavi, M., Omar, S. S., Oliveira, C. A., Karimi-Dehkordi, M., Fakhri, Y., ... Sant'Ana, A. S. (2021). The prevalence and concentration of aflatoxin M₁ among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Food Control*, 125, 107960. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107960>
- Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 9(8-9), 295-306.
- Kolosova, A. and Stroka, J. (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: A review. *World Mycotoxin Journal*, 4(3), 225-256. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1288>
- Konstantinov, S. R., Kuipers, E. J. and Peppelenbosch, M. P. (2013). Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(12), 741-745. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.178>
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. and Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1595-1612. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2535-1>
- Kuharić, Ž., Jakopović, Ž., Čanak, I., Frece, J., Bošnjir, J., Pavlek, Ž., ... Markov, K. (2018). Removing aflatoxin M₁ from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 69(4), 334. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3160>
- Kumara, S. S., Bashisht, A., Venkateswaran, G., Hariprasad, P. and Gayathri, D. (2019). Characterization of novel *Lactobacillus fermentum* from curd samples of indigenous cows from Malnad region, Karnataka, for their aflatoxin B₁ binding and probiotic properties. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1100-1109. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9479-7>
- Kure, C. F. and Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
- Lee, Y. K., El-Nezami, H., Haskard, C. A., Gratz, S., Puong, K. Y., Salminen, S. and Mykkänen, H. (2003). Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. *Journal of Food Protection*, 66(3), 426-430. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.3.426>
- Levinskaite, L. (2012). Susceptibility of food-contaminating *Penicillium* genus fungi to some preservatives and disinfectants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(1).
- Li, M. M., Guan, E. Q. and Bian, K. (2015). Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and quality evaluation of ozonised wheat. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 32(4), 544-553. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.976596>
- Li, Q., Zeng, X., Fu, H., Wang, X., Guo, X. and Wang, M. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum*: A comprehensive review of its antifungal and anti-mycotoxic effects. *Trends in Food Science and Technology*, 136, 224-238. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.019>

Line, A. J. and Brackett, R. E. (1995). Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, 58(1), 91-94. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.1.91>

Liu, Y., Mao, H., Hu, C., Tron, T., Lin, J., Wang, J. and Sun, B. (2020). Molecular docking studies and in vitro degradation of four aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂) by a recombinant laccase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science*, 85(4), 1353-1360. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15106>

Liu, Z., Juliano, P., Williams, R. P., Niere, J. and Augustin, M. A. (2014). Ultrasound effects on the assembly of casein micelles in reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Research*, 81(2), 146–155. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000721>

Livins' ka, O. P., Harmasheva, I. L., Vasyli'iev, V. M. and Kovalenko, N. K. (2012). Methodical approaches to isolation of teichoic acids from native cells of lactic acid bacteria probiotic strains. *Mikrobiolohichni Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, 74(2), 35-41.

Magan, N. and Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International journal of food microbiology*, 119(1-2), 131-139.

Magan, N., Aldred, D., Mylona, K. and Lambert, R. J. (2010). Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food additives and contaminants*, 27(5), 644-650.

Malissiova, E., Tsinopoulou, G., Gerovasileiou, E. S., Meleti, E., Soultani, G., Koureas, M., ...Manouras, A. (2024). A 20-year data review on the occurrence of aflatoxin m₁ in milk and dairy products in mediterranean countries—Current Situation and Exposure Risks. *Dairy*, 5(3), 491-514. <https://doi.org/10.3390/dairy5030038>

Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S. and Severino, L. (2018). Aflatoxin B₁ and M₁: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, 10(6), 214. <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>

Marchesini, G., Balzan, S., Montemurro, F., Fasolato, L., Andrighetto, I., Segato, S. and Novelli, E. (2012). Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties, and sensory traits of raw milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.09.003>

Markaki, P. and Melissari, E. (1997). Occurrence of aflatoxin M₁ in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, 14(5), 451-456. <https://doi.org/10.1080/02652039709374551>

Martinez, M. P., Magnoli, A. P., Pereyra, M. G. and Cavaglieri, L. (2019). Probiotic bacteria and yeasts adsorb aflatoxin M₁ in milk and degrade it to less toxic AFM₁-metabolites. *Toxicon*, 172, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.10.001>

Mawson, R., Gamage, M., Terefe, N. S. and Knoerzer, K. (2011). Ultrasound in enzyme activation and inactivation. In H. Feng, G. Barbosa-Cánovas, and J. Weiss (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, 369–404. Food Engineering Series. New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3_14

McCullough, A. K. and Lloyd, R. S. (2019). Mechanisms underlying aflatoxin-associated mutagenesis—implications in carcinogenesis. *DNA Repair*, 77, 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.03.004>

Mehenktaş, C. (2022). Süt işlemede ultrason kullanımı. *Akademik Gıda*, 20(4), 474–481.

Meng, D., Garba, B., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., Li, M. and Wang, Y. (2020). Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1063-1070. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.213>

- Miller, N. F. and Wetterstrom, W. (2000). The beginnings of agriculture: the ancient Near East and North Africa. In: Kiple K, Ornelas K, editors. *The Cambridge World History of Food*, 2, 1123-39. Cambridge Univ Press.
- Mishra, H. N. and Das, C. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 245-64. <https://doi.org/10.1080/10408690390826518>
- Montagna, M. T., Napoli, C., De Giglio, O., Iatta, R. and Barbuti, G. (2008). Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in southern Italy. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12), 2614-2621. <https://doi.org/10.3390/ijms9122614>
- Munir, M., Nadeem, M., Qureshi, T. M., Leong, T. S., Gamlath, C. J., Martin, G. J. and Ashokkumar, M. (2019). Effects of high pressure, microwave, and ultrasound processing on proteins and enzyme activity in dairy systems A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 57, 102192. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102192>
- Nakamura, F., Ishida, Y., Aihara, K., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., ... Fujiwara, S. (2016). Effect of fragmented *Lactobacillus amylovorus* CP1563 on lipid metabolism in overweight and mildly obese individuals: a randomized controlled trial. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 27(1), 30312. <https://doi.org/10.3402/mehd.v27.30312>
- Naeim, M. A. (2019). Impact of ultrasonic on some physiochemical and technological properties of raw milk. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 10(10), 397-401. <https://dx.doi.org/10.21608/jfds.2019.67436>
- Nazhand, A., Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B. and Santini, A. (2020). Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. *Foods*, 9(5), 644. <https://doi.org/10.3390/foods9050644>
- Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K. and Zhou, W. (2009). Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high-intensity ultrasound. *International Dairy Journal*, 19(6-7), 410-416. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.02.004>
- Nilchian, Z. and Rahimi, E. (2012). Aflatoxin M₁ in yoghurts, cheese and ice-cream in Shahrekord-Iran. *World Applied Sciences Journal*, 19(5), 621-624. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.19.05.65172>
- Nunes, B. V., da Silva, C. N., Bastos, S. C. and de Souza, V. R. (2022). Microbiological inactivation by ultrasound in liquid products. *Food and Bioprocess Technology*, 15(10), 2185-2209. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02818-z>
- Nunes, L. and Tavares, G. M. (2019). Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 90, 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.004>
- Nuraida, L. (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.001>
- Oatley, J. T., Rarick, M. D., Ji, G. E. and Linz, J. E. (2000). Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1133-1136. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.8.1133>
- Oberg, T. S., Steele, J. L., Ingham, S. C., Smeianov, V. V., Briczinski, E. P., Abdalla, A. and Broadbent, J. R. (2018). Correction to: Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(8), 765-765. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0983-y>
- Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P. and Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 410-417. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.001>

- Oliveira, C. A. F. D., Franco, R. C., Rosim, R. E. and Fernandes, A. M. (2011). Survey of aflatoxin M₁ in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 4(1), 57-60. <https://doi.org/10.1080/19393210.2010.538934>
- Oliveira, R. P. D. S., Perego, P., Converti, A. and De Oliveira, M. N. (2009). Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Food Engineering*, 91(1), 133-139.
- Omeiza, G. K., Mwanza, M., Enem, S. I., Godwin, E., Adeiza, M. A. and Okoli, C. (2018). Reducing efficiencies of the commonly used heat treatment methods and fermentation processes on aflatoxin M₁ in naturally contaminated fresh cow milk. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 8(08), 134. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2018.88013>
- Onyeaka, H., Miri, T., Hart, A., Anumudu, C. and Nwabor, O. F. (2023). Application of Ultrasound Technology in Food Processing with emphasis on bacterial spores. *Food Reviews International*, 39(7), 3663-3675. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2013255>
- Özbey, F., Yikici, E. and Kabak, B. (2023). Seasonal variation of aflatoxin M₁ level in cow milk from Turkey. *Journal of Food Safety and Food Quality/Archiv für Lebensmittelhygiene*, 74(5). <https://doi.org/10.53194/0003-925x-74-144>
- Özden, A. (2013). Sağlıklı yaşam için yararlı dost bakteriler. *Güncel Gastroenteroloji*, 17 (1), 22-38.
- Özkaya, Ş. ve Temiz, A. (2003). Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(1), 1-2.
- Özkaya, Ş., Taydaş, E. E., Başaran, A., Avcı, B. and Hızlı, S. (1999). *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Aflatoksin Analiz Kurs Notları*. 7-14 Ağustos.
- Paniwnyk, L. (2017). Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 794-806. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.025>
- Panwar, R., Kumar, N., Kashyap, V., Ram, C. and Kapila, R. (2019). Aflatoxin M₁ detoxification ability of probiotic *Lactobacilli* of Indian origin in in vitro digestion model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 460-469. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9414-y>
- Parreiras, P. M., Nogueira, J. A. V., da Cunha, L. R., Passos, M. C., Gomes, N. R., Breguez, G. S., Menezes, Falco, T. S., Bearzoti, E. and Menezes, C. C. (2020). Effect of thermosonication on microorganisms, the antioxidant activity, and the retinol level of human milk. *Food Control*, 113, 107172. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107172>
- Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A. and Arendt, E. K. (2012). "Green preservatives": combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*, 66, 217-238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>
- Peles, F., Sipos, P., Kovács, S., Györi, Z., Pócsi, I. and Pusztahelyi, T. (2021). Biological control and mitigation of aflatoxin contamination in commodities. *Toxins*, 13(2), 104.
- Peltonen, K. D., El-Nezami, H. S., Salminen, S. J. and Ahokas, J. T. (2001). Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1942-1945. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1942::AID-JSFA741>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1942::AID-JSFA741>3.0.CO;2-7)
- Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S. and Ahokas, J. (2000). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *Journal of Food Protection*, 63(5), 645-650. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.5.645>
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V. and Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal byproducts. *Toxins*, 8(2), 45. <https://doi.org/10.3390/toxins8020045>

Piotrowska, M. (2014). The adsorption of ochratoxin A by *Lactobacillus* species. *Toxins*, 6(9), 2826-2839. <https://doi.org/10.3390/toxins6092826>

Pop, O. L., Suharoschi, R. and Gabbianelli, R. (2022). Biodetoxification and protective properties of probiotics. *Microorganisms*, 10(7), 1278. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071278>

Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. and Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984-991. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>

Ragab, E. S., Lu, J., Pang, X. Y., Nassar, K. S., Yang, B. Y., Zhang, S. W. and Lv, J. P. (2019). Effect of thermosonication process on physicochemical properties and microbial load of goat's milk. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5309–5316. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04001-3>

Rahaie, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S. H. and Mazaheri, M. (2010). Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nuts. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 82-90. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100014>

Rahnama Vosough, P., Mohamadi Sani, A., Mehraban, M. and Karazhyan, R. (2014). In vitro effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on reduction of aflatoxin B₁. *Nutrition and Food Science*, 44(1), 32-40. <https://doi.org/10.1108/NFS-11-2012-0122>

RASFF yillik raporu
(https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2019.pdf)

Razavi, R. and Esmailzadeh, K. R. (2020). Comparative effect of thermo sonication and conventional heat process on lipid oxidation, vitamins, and microbial count of milk. *Journal of Food Researches*, 30(1), 167–182.

Reddy, L., Odhav, B. and Bhoola, K. (2006). Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *Biological Chemistry*, 387(1), 87-93. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.012>

Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. A. and Fanelli, C. (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 899-911. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2657-5>

Rezasoltani, S., Ebrahimi, N. A., Boroujeni, R. K., Aghdaei, H. A. and Norouzinia, M. (2022). Detoxification of aflatoxin M₁ by probiotics *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus acidophilus* in reconstituted milk. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 15(3), 263. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v15i3.2402>

Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J. and Lyng, J. G. (2009). The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation. *Food Chemistry*, 114(3), 905-911. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.037>

Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. and Chen, W. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1403-1436.

Saini, S. S. and Kaur, A. (2012). Aflatoxin B₁: Toxicity, characteristics and analysis: Mini review. *Global Advanced Research Journal of Chemistry and Material Science*, 1(4), 063-70.

Sanaldi, K. and Coban, A. Y. (2023). Detoxification of aflatoxin M₁ in different milk types using probiotics. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 95(1), e20220794. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220794>

Santini, A. and Ritieni, A. (2013). Aflatoxins: risk, exposure and remediation. *Aflatoxins-Recent Advances and Future prospects*, 343-376. <https://doi.org/10.5772/52866>

- Sarlak, Z., Rouhi, M., Mohammadi, R., Khaksar, R., Mortazavian, A. M., Sohrabvandi, S. and Garavand, F. (2017). Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M₁ in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). *Food Control*, 71, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.037>
- Scaglioni, P. T., Becker-Algeri, T., Drunkler, D. and Badiale-Furlong, E. (2014). Aflatoxin B₁ and M₁ in milk. *Analytica Chimica Acta*, 829, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.036>
- Schär-Zammaretti, P. and Ubbink, J. (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85(6), 4076-4092.
- Scudino, H., Silva, E. K., Gomes, A., Guimaraes, J. T., Cunha, R. L., Sant'Ana, A. S., Meireles, M. A. A. and Cruz, A. G. (2020). Ultrasound stabilization of raw milk: Microbial and enzymatic inactivation, physicochemical properties, and kinetic stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105185. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105185>
- Segers, M. E. and Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., San Martin-González, M. F. and García, H. S. (2013). Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control*, 31(1), 202-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.023>
- Sevim, S. (2016). *Probiyotik bakteriler ve inülinin aflatoksin M₁ detoksifikasyonu üzerine etkisi*. [Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi]. Ulusal Tez Merkezi. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/491679>
- Sezer, Ç., Güven, A., Oral, N. B. and Vatansever, L. (2013). Detoxification of aflatoxin B₁ by bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(5), 594-601. <https://doi.org/10.3906/vet-1301-31>
- Shah, N. and Wu, X. 1999. Aflatoxin B₁ binding abilities of probiotic bacteria. *Bioscience and Microflora*, 18(1): 43-48. <https://doi.org/10.12938/bifidus1996.18.43>
- Shahbazi, Y. (2017). Aflatoxin M₁ contamination in milk and dairy products: implications on human health. In *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (237-250). Academic Press.
- Shanmugam, A., Chandrapala, J. and Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.005>
- Sömer, V. F., Akpınar, D. and Kılıç, G. B. (2012). *Lactobacillus casei*'nin sağlık üzerine etkileri ve gıda endüstrisinde kullanımı. *Gıda*, 37(3), 165-172.
- Stoloff, L. (1980). Aflatoxin M in perspective. *Journal of Food Protection*, 43(3), 226-230. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.3.226>
- Suissa, R., Olender, T., Malitsky, S., Golani, O., Turjeman, S., Koren, O., ... Kolodkin-Gal, I. (2023). Metabolic inputs in the probiotic bacterium *Lacticaseibacillus rhamnosus* contribute to cell-wall remodeling and increased fitness. *npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00431-2>
- Tadesse, H., Tamene, A. and Dessie, G. (2024). Aflatoxin M₁ exposure and health risk assessment in children and adults due to pasteurized milk consumption in Addis Ababa, Ethiopia. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, 6(2), 51-59. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00431-2>

- Taverniti, V. and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6(3), 261-274. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>
- Tavşanlı, H., Güner, T. E., Altundal, B., Ektik, N. and İlhak, O. İ. (2024). The effect of ultrasound process on lactic acid bacteria, physicochemical and sensory properties of yoghurt, before and after inoculation of starter cultures into milk. *International Journal of Dairy Technology*, 77(1), 105–113.
- Thrasher, J.D. and Crawley, S.L. (2015). Neurotoxicity of Mycotoxins Erişim: 15 Şubat 2015, <http://www.drthrasher.org/page189.html>
- Tiryaki, O., Seçer, E. and Temur, C. (2011). Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri. *Anadolu Journal*, 21(1).
- Tsilingiri, K. and Rescigno, M. (2013). Postbiotics: what else?. *Beneficial Microbes*, 4(1), 101-107. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0046>
- Tunail N. (2000) Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Sim Matbaası. Ankara
- Tuncer, N. (1987). Ankara ve çevresinde üretilen yumurta örneklerinde aflatoksin rezidülerinin araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(1), 101-116.
- Tunç, M. (2019). Ozonlama işleminin kontamine çiğ fındıkların aflotoksin detoksifikasyonuna ve fizikokimyasal özelliklerine etkileri (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (2011). *T.C. Resmi Gazete* (28157, 29 Aralık 2011)
- Türkmen, F. (2012). Yüksek güçlü ultrases işleminin sütün fizikokimyasal ve jelleşme özelliklerine etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye. <http://hdl.handle.net/11527/2268>
- Ünüsân, N. (2019). Systematic review of mycotoxins in food and feeds in Turkey. *Food Control*, 97, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.015>
- Van Egmond, H. P. (1983). Mycotoxins in dairy products. *Food Chemistry*, 11(4), 289-307. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90076-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90076-6)
- Varsha, K. K. and Nampoothiri, K. M. (2016). Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control*, 69, 61-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.032>
- Villamiel, M. and de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472–475. <https://doi.org/10.1021/jf990181s>
- Vollmer, W., Blanot, D. and De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Wang, L., Wang, Z., Yuan, Y., Cai, R., Niu, C. and Yue, T. (2015). Identification of key factors involved in the biosorption of patulin by inactivated lactic acid bacteria (LAB) cells. *Public Library of Science*, 10(11), e0143431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143431>
- Wochner, K. F., Moreira, M. C., Kalschne, D. L., Colla, E. and Drunkler, D. A. (2019). Detoxification of Aflatoxin B₁ and M₁ by *Lactobacillus acidophilus* and prebiotics in whole cow's milk. *Journal of Food Safety*, 39(5), e12670. <https://doi.org/10.1111/jfs.12670>
- Wu, H., Hulbert, G. J. and Mount, J. R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(3), 211-218. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00020-5)

- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V. and Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug metabolism reviews*, 41(1), 1-7.
- Yadav, H., Jain, S. and Sinha, P. R. (2006). Effect of skim milk and dahi (yogurt) on blood glucose, insulin, and lipid profile in rats fed with high fructose diet. *Journal of Medicinal Food*, 9(3), 328-335. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.328>
- Yang, J., Wang, T., Lin, G., Li, M., Zhu, R., Yiannikouris, A., ... Mai, K. (2020). The assessment of diet contaminated with aflatoxin B₁ in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and the evaluation of the efficacy of mitigation of a yeast cell wall extract. *Toxins*, 12(9), 597. <https://doi.org/10.3390/toxins12090597>
- Yao, Y. and Long, M. (2020). The biological detoxification of deoxynivalenol: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111649. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111649>
- Yıldız, G. (2021). *Ultrases Teknolojisinin Gıdaların Biyoaktif Bileşenleri Üzerine Etkisi*. Ankara: İKSAD Publishing House.
- Yılmaz, A. ve Ozay, G. (2001). Gıda ve yemlerde mikotoksinlerin detoksifikasyonu. *Gıda Dergisi*, 7, 80-84.
- Yiannikouris, A. and Jouany, J. P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51(2), 81-99. <https://doi.org/10.1051/animres:2002012>
- Yörük, G. ve Güner, A. (2011). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.
- Yu, H., Liu, Y., Li, L., Guo, Y., Xie, Y., Cheng, Y. and Yao, W. (2020b). Ultrasound-involved emerging strategies for controlling foodborne microbial biofilms. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.010>
- Yu, Y., Shi, J., Xie, B., He, Y., Qin, Y., Wang, D., ... Sun, Q. (2020a). Detoxification of aflatoxin B₁ in corn by chlorine dioxide gas. *Food Chemistry*, 328, 127121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127121>
- Yuan, S., Li, C., Zhang, Y., Yu, H., Xie, Y., Guo, Y. and Yao, W. (2021). Ultrasound as an emerging technology for the elimination of chemical contaminants in food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 109, 374-385. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.048>
- Yücel, M. (2019). *Aflatoksin M₁'in (AFM₁) laktik asit bakterileri tarafından bağlanması* [Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi]. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/253305>
- Yüksel, N. ve Albayrak, Ç. B. (2020). Süt Ortamında *Lactobacillus plantarum* NRRLB 4496'nin Aflatoksin M₁ (AFM₁) Bağlama potansiyeli. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8(1), 99-106. <https://doi.org/10.33202/comuagri.647361>
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A. and Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121-1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>
- Zhang, H., Wang, X., Zhi, A., Zhang, M. and Wang, Z. (2018). Vomitoxin pollution status, toxic effects, harmful effects and detoxification utilization. *Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 46(05), 40-45.
- Zhao, L. H., Guan, S., Gao, X., Ma, Q. G., Lei, Y. P., Bai, X. M. and Ji, C. (2011). Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 147-155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04867.x>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tevhide Elif GÜNER
Eğitim	
Lise	Ertuğrul Gazi Lisesi (2010)
Lisans	Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2010-2016)
Doktora	Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı (2019-2025)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	Orta üstü derecede (Yökdil: 78,75) 27.08.2023



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR



(0 266) 612 14 62
sagbilen@balikesir.edu.tr
<http://www.balikesir.edu.tr>

