Makrofunguslar Tarafından Aflatoksin B_1 ve Okratoksin A Degradasyonu

Tuncay Söylemez

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2017

Ochratoxin A and Aflatoxin B_1 Degradation by Macrofungi

Tuncay Söylemez

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

August 2017

Makrofunguslar Tarafından Aflatoksin B_1 ve Okratoksin A Degradasyonu

Tuncay Söylemez

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Ağustos 2017

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Tuncay Söylemez'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Makrofunguslar Tarafından Aflatoksin B_1 ve Okratoksin A Degradasyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman **:** Prof. Dr. Mustafa Yamaç

İkinci Danışman **:** -

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Üye : Prof. Dr. Semra İlhan

Üye : Prof. Dr. Merih Kıvanç

Üye : Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Üye : Doç. Dr. Nalan Yılmaz Sarıözlü

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ danışmanlığında hazırlamış olduğum "Makrofunguslar Tarafından Aflatoksin B1 ve Okratoksin A Degradasyonu" başlıklı DOKTORAtezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.21/08/2017

Tuncay SÖYLEMEZ

İmza

ÖZET

Mikotoksinler funguslar tarafında üretilen sekonder metabolitlerdir. Canlılar üzerinde alındıkları dozlara ve kişisel dirence bağlı olarak ölümle sonuçlanan akut etkileri olabileceği gibi kanserojenik, teratojenik, hemorajik, dermatitik, hepatotoksik, nefrotoksik ve neurotoksik etkilerinden de söz edilmektedir. Mikotoksinler, çok sayıda fungus cinsi tarafından üretilse de *Aspergillus, Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri öne çıkmış görünmektedir. Daha yaygın ve toksik olmaları nedeni ile Aflatoksin B_1 ve Okratoksin A özel öneme sahip mikotoksinlerdir.

Bu çalışmada, yüzden fazla makrofungus izolatının ekstraselüler enzimleri ile aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyon potansiyeli araştırılmıştır. Aflatoksin B_1 ve okratoksin A miktarındaki azalma yarı sayısal ölçüm metodu olan HP-TLC ile görselleştirilmiştir. Her mikotoksinin yıkımında en başarılı olan onar adet makrofungus izolatının degradasyon yetenekleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı ile de doğrulanmıştır.

Çalışılan izolatlardan OBCC 5004 ve OBCC 5048 kodlu *Lentinus strigosus* ve *Agaricus campestris* sırası ile aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonunda en başarılı makrofungus izolatlarıdır. Bu izolatların toksin degradasyon oranları Plackett Burman ve Response Surface Metodu ile optimize edilmiştir. Aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonu optimize koşullarda sırası ile %49 ve %48 oranında gerçekleşmiştir. *Artemia salina* ile yapılan toksisite testinde aflatoksin B_1 ve okratoksin A' nın %20 ve %60 oranlarında detoksifiye olduğu belirlenmiştir .

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B_1, Okratoksin A, Biyodegradasyon, *Lentinus strigosus, Agaricus campestris*

SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites that produced by fungi. Mycotoxins can have fatal acute effects on organisms according to dose and individual resistance. They have carcinogenic, teratogenic, hemorrhagic, dermatitic, hepatotoxic, nephrotoxic and neurotoxic effects. Even if mycotoxins are produced by a lot of fungal genera, but *Aspergillus, Penicillium* and *Fusarium* genera have outshined. Aflatoxin B_1 and ochratoxin A are special important mycotoxin because of their toxicity and prevalence.

In this study, degradation potential of more than 100 macrofungi isolates was investigated for aflatoxin B_1 and ochratoxin A by their extracellular enzymes. The reduction in the amount of aflatoxin B_1 and ochratoxin A was visualized by semi-quantitative method HP-TLC. Mycotoxin degradation ability of most successful 10 macrofungi isolates for each toxin was confirmed by high pressure liquid chromatography.

Lentinus strigosus and *Agaricus campestris* coded as OBCC 5004 and OBCC 5048 were the most successful macrofungi isolates for aflatoxin B_1 and ochratoxin A degradation, respectively. The toxin degradation rates of these isolates were optimized by Plackett Burman and response surface methods. Aflatoxin B_1 and ochratoxin A degradation realized 48% and 49%. under optimized conditions, respectively. In the toxicity test made with *Artemia salina*, aflatoxin B_1 and ochratoxin A detoxification ratios were determined as 20% and 60%, respectively.

Keywords: Aflatoxins B_1, Ochratoxin A, Biodegradation, *Lentinus strigosus, Agaricus campestris*

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinden başlayarak tüm çalışma boyunca bilgisini, sabrını ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ' a;

Cihaz, teknik bilgi ve laboratuarlarını kullanmam konusunda destek olan Leibniz Üniversitesi Food Chemistry Enstitüsü başkanı Prof. Dr. R G Berger ve tüm ekibine;

Cihaz, teknik bilgi ve laboratuarlarını kullanmam konusunda destek veren AÜBİBAM Merkezi yönetici ve çalışanlarına;

Çalışmanın istatistiksel veri analizi aşamalarında zamanını ayırarak bilgi ve tecrübeleriyle çalışmayı boyutlandıran değerli hocam Prof. Dr. Zeki YILDIZ' a;

HPTLC cihazının kullanımı ve aflatoksin B_1 üretimi ve ekstraksiyonu konusunda yapmış olduğu katkılarından dolayı Doç. Dr. Rasime DEMİREL'e;

Tez süresince yaptığım çalışmalarda bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Göksu CEYLAN ve Ayşe Betül KARADUMAN başta olmak üzere tüm Fungikültür Laboratuvarı çalışanlarına;

Hayatımın diğer alanlarında olduğu gibi akademik çalışmalarımda da desteğini benden esirgemeyen değerli arkadaşım Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU' ya;

Sevgi ve desteğiyle her zaman yanımda olan eşim Ayşe SÖYLEMEZ'e ve varlıklarıyla bana yaşama ve başarma azmi veren çocuklarım Ömer Mirza SÖYLEMEZ ve Enver Seza SÖYLEMEZ'e;

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim sırasında da beni destekleyen, hayatta kazandığım ve kazanacağım tüm başarıların mimarı olan annem Hatice SÖYLEMEZ, babam Kadir SÖYLEMEZ ve kardeşim Özay SÖYLEMEZ' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuncay SÖYLEMEZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi
SUMMARY vii
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 11
3. MATERYAL ve YÖNTEM 21
3.1 Materyal 21
3.1.1. Makrofungus İzolatları 21
3.1.2. Besiyerleri 23
3.1.3. Çözeltiler 28
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım alanları 32
3.1.5. Kullanılan cihazlar 33
3.1.5.1. HPTLC 34
3.1.5.2. HPLC 35
3.1.5.3. Spektrofotometre 37
3.1.5.4. Mikroplate okuyucu 38
3.1.5.5. FPLC cihazı 39
3.1.5.6. IEF cihazı 40
3.2 Yöntem 40
3.2.1. Toksin degrade eden fungus izolatlarının belirlenmesi....40
3.2.1.1.Toksin eldesi ve kullanılacak AFB_1 belirlenmesi....41
3.2.1.2. Toksin giderici izolatların belirlenmesi 42
3.2.2. Aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonunun optimize edilmesi 44
3.2.2.1. Enzim üretimi için uygun besiyeri seçimi 44
3.2.2.2. İstatistiksel deney tasarımı ile optimizasyon 45

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.2.3. Plackett Burman tasarımı 45
3.2.2.4. Response Surface tasarımı 47
3.2.3. Toksisitenin belirlenmesi 49
3.2.4. Protein saflaştırma çalışmaları 51
3.2.4.1. FPLC ile protein saflaştırma 51
3.2.4.2. Degredasyon yapması beklenen enzimlerin aktivite ve degredasyon ilişkisi 52
3.2.4.3. IEF ile protein saflaştırma 52
3.2.5. Yüksek toksin degradasyonuna neden olan izolatların belirlenmesi 53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 56
4.1. Toksin Degrade Eden Fungus İzolatlarının Belirlenmesi 56
4.1.1. Toksin eldesi ve kullanılacak AFB_1 ekstraksiyon miktarının belirlenmesi.....56
4.1.2. Toksin giderici fungus izolatlarının tayini 57
4.1.3. Degredasyon oranının onaylanması 64
4.2. Aflatoksin B_1 ve Okratoksin A Degradasyonunun Optimize Edilmesi 68
4.2.1. Enzim üretimi için uygun besiyeri seçimi 68
4.2.2. İstatistiksel Deney Tasarımı ile Optimizasyon 69
4.2.2.1. Aflatoksin B_1 degradasyonunun istatistiksel deney tasarımı ile optimize edilmesi 69
4.2.2.2. Okratoksin A degradasyonunun istatistiksel deney tasarımı ile optimize edilmesi 80
4.4. Toksisitenin Belirlenmesi 93
4.5. Protein Saflaştırma Çalışmaları 96
4.5.1. FPLC ile protein saflaştırılması 96
4.5.2. FPLC ile ayrıştırılan proteinlerin enzim AFB_1 degredasyon ilişkileri 97
4.5.3. IEF ile protein saflaştırılması 99
4.6. Yüksek Toksin Degredasyonuna Neden Olan İzolatların Belirlenmesi 102
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 105
KAYNAKLAR DİZİNİ 108
ÖZGEÇMİŞ.....119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

1.1. Aflatoksin biyosentez yol izi ……..……..….2
1.2. Aflatoksinlerin yapısı ve konfigürasyonları ……..……...…..……..….4
1.3. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapısı ……....…..…….5
1.4. Okratoksinlerin kimyasal yapıları …….....…….……...…..……6
1.5. Okratoksin biyosentez yol izi ……..……...…..…….7
1.6. Okratoksinin kimyasal yapısı ve bileşenleri …….……....…….8
3.1. HPTLC Cihazı …….…….....….…….34
3.2. HPTLC Standart Eğrisi…….…….....…….35
3.3. HPLC Cihazı …….…….....……..…….36
3.4. HPLC Standart Eğrisi…….…….....…….36
3.5. HPLC Kromotogramı…….…….....……37
3.6. Spektrofotometre Cihazı …….....…….……...……..…….37
3.7. Mikroplate Okuyucu…….....…..……..…….....…….38
3.8. Mikroplate Okuyucu Standart Eğrisi …….....…..……...…….....…….39
3.9. FPLC Cihazı …….....…….……...…….……...…….39
3.10. IEF Cihazı …….…….....……..…….....40
3.11. *Artemia salina* Yumurtalarının İnkübasyon Düzeneği …….....…….49
4.1. *A. flavus* tarafından üretilen AFB_1 ….....……...…….……...……..….56
4.2. TLC plakalarına uygulanacak AFB_1 miktarının belirlenmesi ……..…..….....…….57
4.3. Fungus kültür sıvıları ile AFB_1 yıkımının İTK ile belirlenmesi ……...….....….58
4.4. Fungus kültür sıvıları ile OTA yıkımının İTK ile belirlenmesi …….....……..….58
4.5. OBCC 5004 kodlu *Lentinus strigosus*.....…....…….....….66
4.6. OBCC 5048 kodlu *Agaricus campestris*…...……...……..…..….66
4.7. OBCC 5004 kodlu izolatın Plackett-Burman deney tasarımında aflatoksin B_1 degradasyon oranları ….....……..……..….....….70
4.8. Plackett-Burman tasarımında kullanılan değişkenlerin AFB_1 degradasyonuna etki düzeylerini ifade eden Pareto grafiği …….....…….....…….72

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Şekil **Sayfa**

4.9. Plackett – Burman deney tasarımı için beklenen ve gözlenen AFB_1 degradasyon oranı değerleri ……73
4.10. Response surface deney tasarımında kullanılan değişkenlerin OBCC 5004 izolatı tarafından AFB_1 degradasyonu üzerine etkisi ……76
4.11. Response surface tasarımında AFB_1 degradasyonu üzerine yeast ekstrakt ve sukroz' un karşılıklı etkileşimi ……77
4.12. Response surface tasarımında AFB_1 degradasyonu üzerine buğday kepeği ve sukroz' un karşılıklı etkileşimi ……78
4.13. Response surface tasarımında AFB_1 degradasyonu üzerine buğday kepeği ve yeast ekstrakt' ın karşılıklı etkileşimi ……78
4.14. Response surface deney tasarımı ile OBCC 5004 izolatı tarafından AFB_1 degradasyonunda beklenen ve gözlenen sonuçlar arasındaki ilişki ……79
4.15. OBCC 5048 izolatının Plackett-Burman deney tasarımında okratoksin A degredasyon oranları ……80
4.16. Plackett-Burman tasarımında kullanılan değişkenlerin OTA degradasyonuna etki düzeylerini ifade eden Pareto grafiği ……83
4.17. Plackett – Burman deney tasarımı için beklenen ve gözlenen OTA degradasyon oranı değerleri ……84
4.18. Response surface deney tasarımında kullanılan değişkenlerin OBCC 5048 izolatı tarafından OTA degradasyonu üzerine etkisi ……87
4.19. Response surface tasarımında OTA degradasyonu üzerine yeast ekstrakt ve buğday kepeğinin karşılıklı etkileşimi ……88
4.20. Response surface tasarımında OTA degradasyonu üzerine buğday kepeği ve sukroz' un karşılıklı etkileşimi ……88
4.21. Response surface tasarımında OTA degradasyonu üzerine sukroz ve yeast ekstrakt' ın karşılıklı etkileşimi ……89

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Şekil **Sayfa**

4.22. Response surface deney tasarımı ile OBCC 5048 izolatı tarafından okratoksin A degradasyonunda beklenen ve gözlenen sonuçlar arasındaki ilişki 90
4.23. Standart ve degrade edilmiş AFB_1 ile inkübe edilen *Artemia* larvalarının saatlere göre mortalite grafiği 93
4.24. Standart ve degrade edilmiş OTA ile inkübe edilen *Artemia* larvalarının saatlere göre mortalite grafiği 94
4.25. OBCC 5004 kültür sıvısının FPLC sonrası SDS – PAGE bantları.....97
4.26. IEF ile saflaştırılan enzimin AFB_1 degradasyon grafiği.....100
4.27. IEF Sonrası SDS-PAGE ile degradasyon yapan enzimin görüntülenmesi.....101
4.28. OBCC 5004 kodlu izolatın evrimsel akrabalık dendrogramı.....103
4.29. OBCC 5048 kodlu izolatın evrimsel akrabalık dendrogramı.....104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

1.1. Türk gıda kodeksi aflatoksin risk tablosu ve üst limitleri …….....…….9
1.2. Türk gıda kodeksi okratoksin risk tablosu ve üst limitleri …….....…….10
3.1. AFB_1 ve OTA degradasyon etkinlikleri araştırılan fungus izolatları... ……....…….21
3.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım alanları …….....…….....…...33
3.3. AFB1 ölçümü için HPLC koşulları ……..……..…….....……...44
3.4. OTA ölçümü için HPLC koşulları ……..…..……..…..….....44
3.5. Plackett-Burman parametreleri ……..…….....……..……...46
3.6. AFB_1 ve OTA degradasyonu için kullanılan Plackett – Burman deney tasarımı.....47
3.7. Response Surface deney tasarımı ile etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri.....48
3.8. Response surface deney tasarımı …….…….....…….…….....……...48
3.9. PCR koşulları …….....……..…….……...……...53
4.1. Fungus izolatlarının HPTLC ile belirlenen AFB_1 ve OTA giderim oranları.….....59
4.2. HPLC ve HPTLC ile AFB_1 degradasyon oranlarının (%) karşılaştırılması….....…...64
4.3. HPLC ve HPTLC ile OTA degradasyon oranlarının (%) karşılaştırılması …….....65
4.4. Mikotoksin degradasyonunda etkili makrofunguslar ve degradasyon oranları 67
4.5. Toksin giderimi için seçilen fungus izolatlarının Modifiye Kirk besiyerinde ligninolitik enzim aktivite değerleri ……..….....…….……...68
4.6. OBCC 5004 kodlu izolatın AFB_1 degradasyonu ile ilgili PB deney tasarımı sonuçları .....…… ……...…….……...…….……...70
4.7. OBCC 5004 izolatının AFB_1 degradasyonu ile ilgili PB deney tasarımı regresyon analiz sonuçları …….....…….....…..……..…...…….……...71
4.8. OBCC 5004 izolatı ile Response Surface deney tasarımında gözlenen ve beklenen AFB_1 degradasyon oranları …….…….....……...……...74
4.9. OBCC 5004 izolatının AFB_1 degradasyonu açısından response surface deney tasarımı varyans ve regresyon analiz sonuçları …..…….....…….……...75
4.10. OBCC 5004 izolatı tarafından aflatoksin degradasyonunun model uyumuna ilişkin varyans analizi sonuçları …….....…….……..……...76

ÇİZELGELER DİZİNİ (devamı)

Çizelge **Sayfa**

4.11. OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu ile ilgili PB deney tasarımı sonuçları.....80
4. 12. OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu ile ilgili PB deney tasarımı regresyon analiz sonuçları ….....….81
4.13. OBCC 5048 izolatı ile Response Surface deney tasarımında gözlenen ve beklenen OTA degradasyon oranları ……...……...85
4.14. OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu açısından response surface deney tasarımı varyans ve regresyon analiz sonuçları…….....……..……...86
4.15. OBCC 5048 izolatı tarafından aflatoksin degradasyonunun model uyumuna ilişkin varyans analizi sonuçları……...……..…….....…...86
4.16. Response Surface metodu ile yapılan istatistiksel çalışma sonucu en uygun besiyeri içeriği ve çevresel koşulları…….....……..….....…...91
4.17. Degrade edilmiş ve edilmemiş AFB_1' in zamana bağlı toksisitesi…….....……...…...94
4.18. Degrade edilmiş ve edilmemiş OTA' nın zamana bağlı toksisitesi…….....….....95
4. 19. MnP ve lakkaz aktiviteleri ile AFB_1 degradasyon değerleri karşılaştırılması.....98
4.20. IEF'ten hasat edilen fraksiyonların AFB_1 degradasyonu…….....…...99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
µg	Mikrogram

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
AF	Aflatoksin
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
ASP	Aspergillus
FB_1	Fumonisin B_1
mg	Miligram
ng	Nanogram (10^{-9} g)
nm	Nanometre (10^{-9} m)
OTA	Okratoksin A
OTB	Okratoksin B
P	İstatistiki önem seviyesi
Ppb	Milyarda kısım
ppm	Milyonda kısım

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklamalar
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı
ZEN	Zearalenon

1. GİRİŞ VE AMAÇ

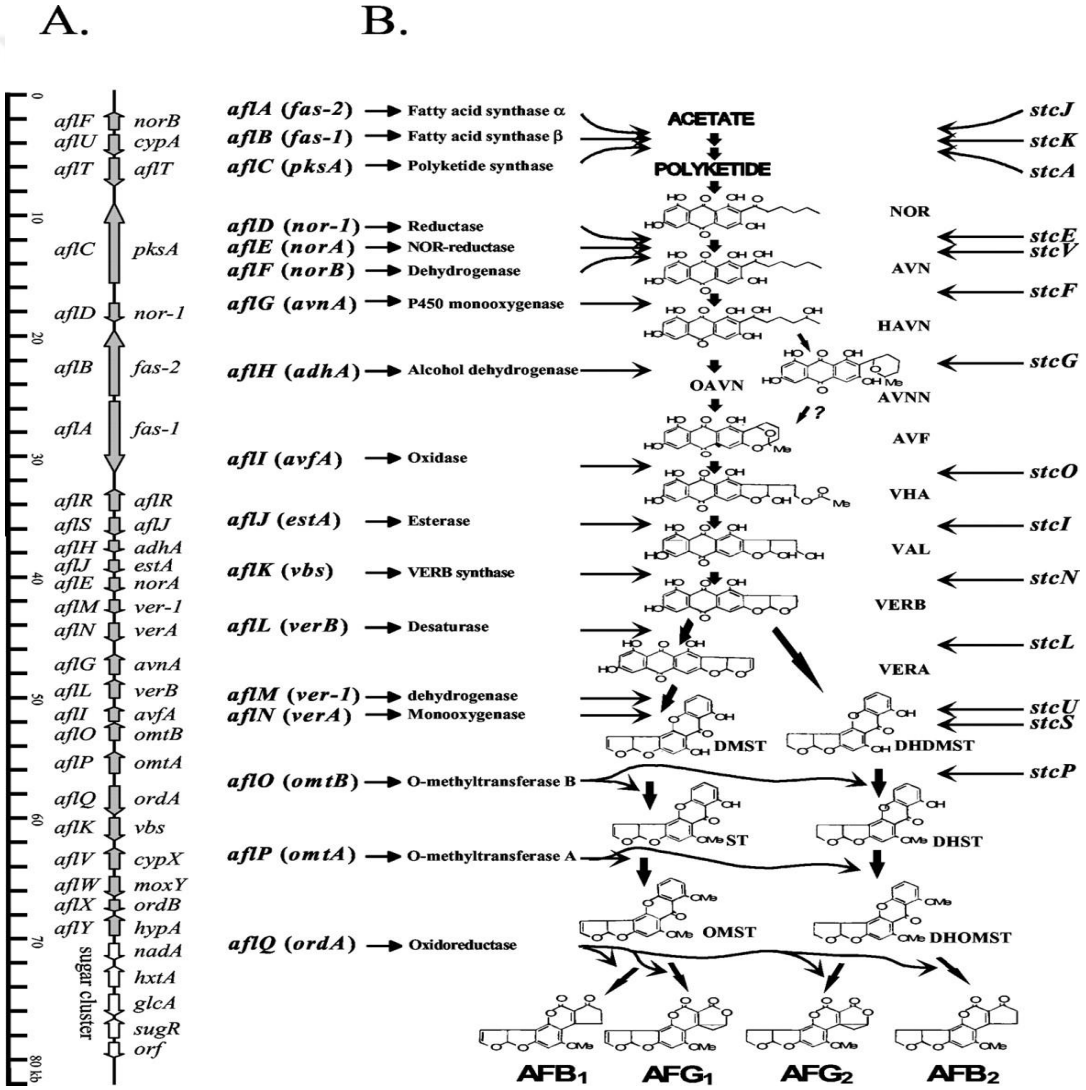
Mikotoksinler funguslar tarafından üretilen insan, hayvan ve bitkilere toksik etkiye sahip sekonder metabolizma ürünleridirMikotoksinlerin canlılar üzerinde alındıkları dozlara ve kişisel dirence bağlı olarak ölümle sonuçlanan akut etkileri olabileceği gibi kanserojen, teratojen, tremorgen, hemorajik, dermatitik, hepatotoksik, nefrotoksik ve nörotoksik etkilerinden de söz edilmektedir (Bennett ve Klich 2003). Dünyadaki ciddi sağlık sorun kaynakları arasında tarım ürünlerinin mikotoksinler ile kontaminasyonu da bulunmaktadır (Varga vd., 2005).

Dünya çapında üretilen tarım ürünlerinin yaklaşık olarak % 25 kadarının funguslar tarafından enfekte edildiği tahmin edilmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, temel gıda ürünlerinin üzerindeki gıda kontaminasyonları dünya çapında çok önemli bir etkiye sahiptir (Bryden, 2007). Mikotoksinler, çok sayıda fungus cinsi tarafından üretiliyor olmasına karşın, *Aspergillus, Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri bu konuda bir adım öne çıkmış görünmektedir (Var vd., 2004).

Bilinen ilk mikotoksikosiz vakası, *Claviceps purpurea* tarafından meydana getirilen ve bazı organlarda nekroz ve kangren ile karakterize "Ergotizm'' zehirlenmesidir. Bu hastalık *Claviceps purpurea* ile bulaşmış olan besin maddelerinin tüketilmesi sonucu ortaya çıkmış ve Orta Çağ Avrupa'sında uzun yıllar "Kutsal Ateş" adıyla anılmıştır. Rusya'nın bazı bölgelerinde nüfusun yaklaşık % 10'undan fazlası, ikinci Dünya Savaşı yıllarında küflü gıdaların tüketilmesi sonucu, bu tip zehirlenmelerden etkilenmiş ve hatta birçok ölüm vakası meydana gelmiştir. Söz konusu yıllarda, birçok ülkede Japonya'dan ithal edilen pirinçlerin tüketimi sonucu benzer vakalara rastlanmıştır (Peraica vd., 1999). Ancak 1960'lı yıllara kadar bütün bu zehirlenmeler önemsiz hastalıklar olarak değerlendirilmiştir. Bu yıllarda İngiltere'de "Turkey X Disease" adı verilen bir hastalığın ortaya çıkmasıyla bu düşünce değişmiştir. Bu hastalıktan dolayı binlerce hindi palazı ölmüş ve yapılan incelemeler neticesinde, hastalığa hindilere protein kaynağı olarak verilen, Brezilya'dan ithal edilen yer fıstığında bulunan toksik bir maddenin sebep olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraları bu konuyla ilgili olarak yapılan detaylı araştırmalar sonucunda bu toksik maddelerin *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından sentezlenen bir bileşik olduğu ortaya

çıkmış ve toksine kendini oluşturan küfün adına istinaden "Aflatoksin" adı verilmiştir (Peraica vd., 1999).

Mikotoksinler arasında ilk akla gelen grup olan aflatoksinler poliketid sınıfına aittir ve büyük bir gen kümesi içinde kodlanmış enzimler tarafından sentezlenmektedir. Aflatoksin biyosentezi başlangıç adımında asetat gerektirir (Şekil 1.1.) ve yağ asidi biyosentezindeki yol izinde poliketit sentetaz (PKS) tarafından başladığı düşünülmektedir. Daha sonraki adımlarda norsoloronik asit (NOR) dönüşümü ile biyosentez yol izi devam ederek aflatoksin B_1 üretilir (Holmes vd., 2008).



Şekil 1.1. Aflatoksin biyosentez yol izi (Trail vd., 1995)

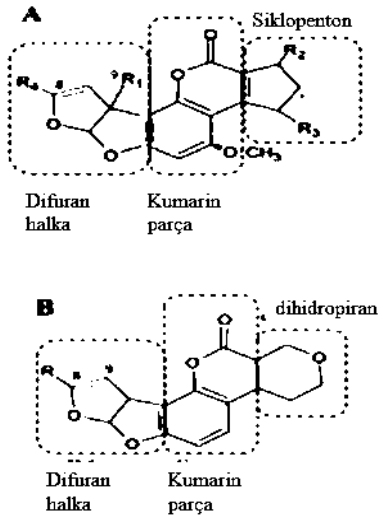
Aflatoksinlerin yüksek seviyelerinin sağlık açısından öneminden dolayı birçok ülke ve uluslararası toplum tarafından çoğunlukla büyük bir problem olarak kabul edilmiş ve yaygın olarak kabul edilebilir aflatoksin seviyeleri milyarda 10 - 20 birim (ppb) sınır konulmuştur. Avrupa Birliği Komisyonu da konuyla ilgili çalışma yapmış ve 1881 / 2006 sayılı komisyon tüzüğünü hazırlamıştır (Anonim, 2006). Pratikte bu limitler aşıldığında sıklıkla ciddi sağlık sorunları ile karşılaşılmıştır (Villers, 2017).

Aflatoksin B_1 2002 yılında uluslararası kanser araştırma ajansı, IARC (International Agency of Research on Cancer) tarafından en zehirli mikotoksin (Grup 1) olarak belirlenmiştir. Diğer mikotoksinler aflatoksin M_1, okratoksin A, fumonisin B ise daha az tehlikeli (Grup 2B) mikotoksinler olarak kabul edilmektedir (IARC, 2002).

Eğer birden fazla mikotoksine maruz kalınırsa bunların sinerjistik etkileri ile çok daha fazla zarar verici olacağı belirlenmiştir ve dahası eğer çoklu mikotokzikozise maruz kalınmışsa her bir toksin seviyesinin ayrı ayrı belirlenmesi etkiyi anlamak için yeterli olmayacaktır (Alassane-Kpembi vd., 2016). AFB_1, AFM_1, OTA, Zearelenon (ZEN), FB_1 ve α - Zearalenol (α – ZOL) gibi mikotoksinlerin *in-vitro* ortamlarda çoğunlukla sinerjistik çalıştığı ve toksik zarar etkilerini artırdıkları belirlenmiştir. Böylece bu mikotoksinlerin hem sitotoksik hem de genotoksik olumsuz etki ve zararlarının arttığı görülmüştür. (Gao vd., 2016)

Aflatoksikozis için en etkileyici örneklerden birisi olarak, Doğu Kenya bölgesinde 2004 yılı Ocak – Temmuz döneminde 317 adet sarılık vakasından 125 tanesinin ölümü kaydedilmiştir. Bu durumun gerekçesinin araştırılması sırasında, bu bölgede toplanan mısırın % 55 kadarının yasal sınır olan 20 µg/kg'ın üzerinde AFB_1 içermiş olduğu belirlenmiştir. Hatta bazı örneklerin 8000 µg/kg değerinden bile yüksek AFB_1 içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Benzer bir olgu yine doğu Kenya bölgesinde 2005 yılı içerisinde 21 Haziran itibariyle kaydedilmiş, 75 vakada 32 ölüm rapor edilmiştir. Yine toplanan mısırların %42 kadarının yasal sınırın üzerinde AFB_1 içermiş olduğu görülmüştür (Shephard,2008).

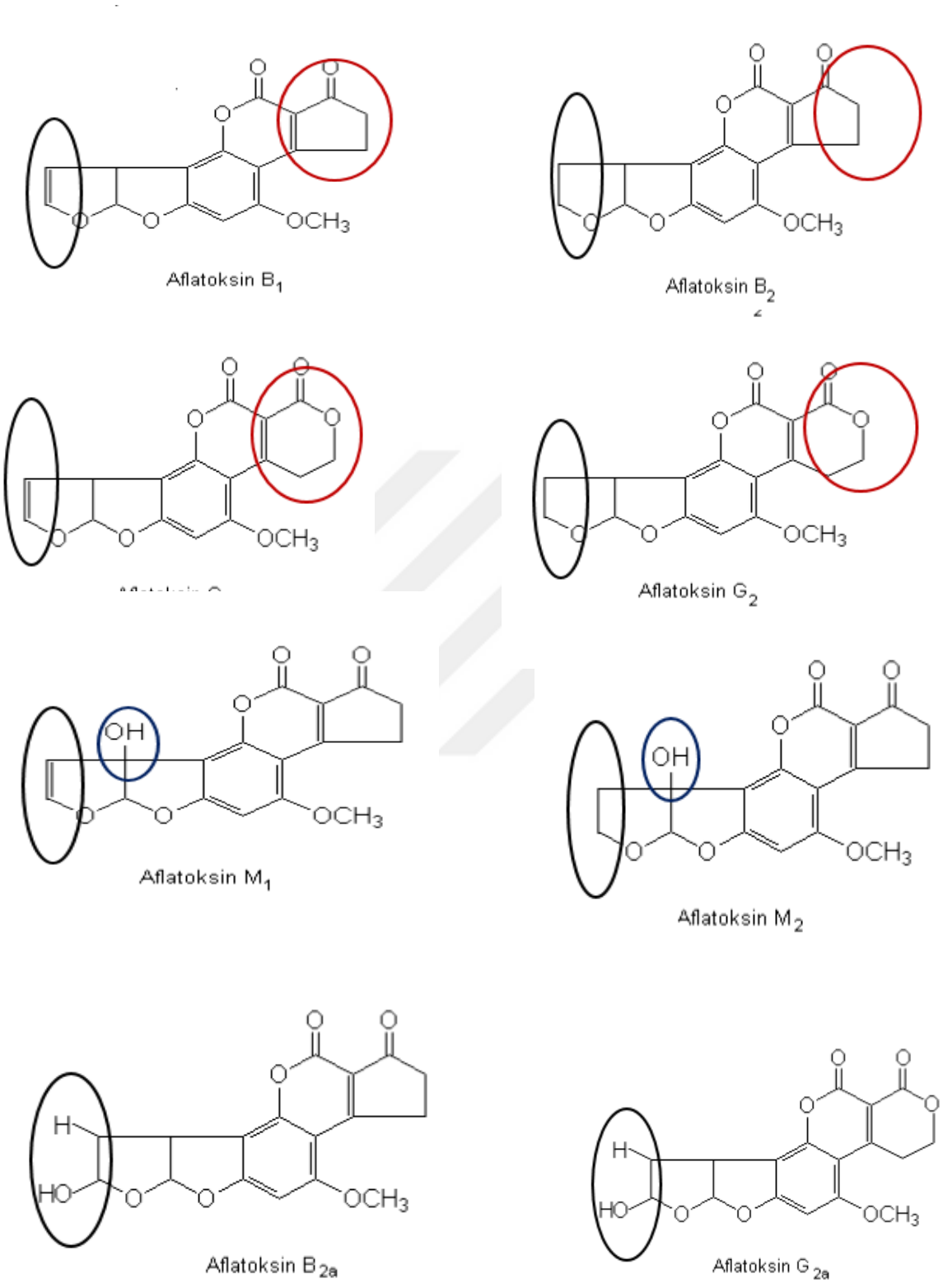
Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmış olup aflatoksin B_1, B_2, G_1 ve G_2 olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B_1 ve B_2'nin mavi, aflatoksin G_1 ve G_2'nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir. Şekil 1.2. ve Şekil 1.3.’ te görüldüğü gibi B toksinleri kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedir (Özkaya vd., 2003).



	AFB_1	AFB_2	AFB2a	AFM_1	AFM_2	AFL	AFQ_1
R1	-H	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H
R2	=O	=O	=O	=O	=O	-OH	=O
R3	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-OH
R4	-H	-H	-OH	-H	-H	-H	-H
C_8-C_9 Bağı	Doymamış	Doymuş	Doymuş	Doymamış	Doymuş	Doymamış	Doymamış

	AFG_1	AFG_2	AFG2a
R	-H	-H	-OH
C_8-C_9 Bağı	Doymamış	Doymuş	Doymuş

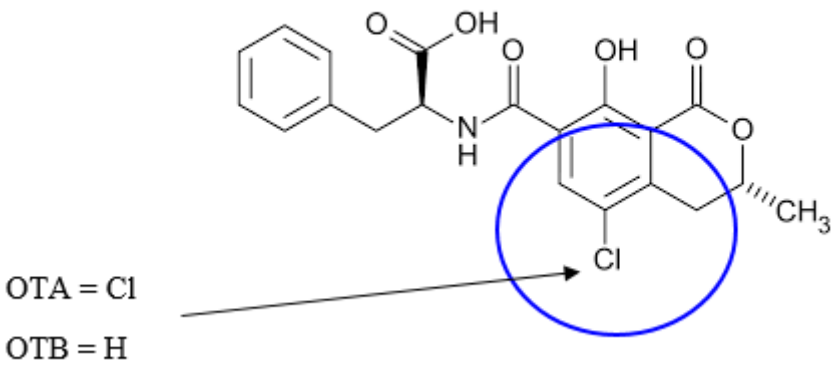
Şekil 1.2. Aflatoksinlerin yapısı ve konfigürasyonları A; AFB, AFM, AFL ve AFQ – B; AFG (Loi vd., 2017)



Şekil 1.3. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapısı (Özkaya vd., 2003)

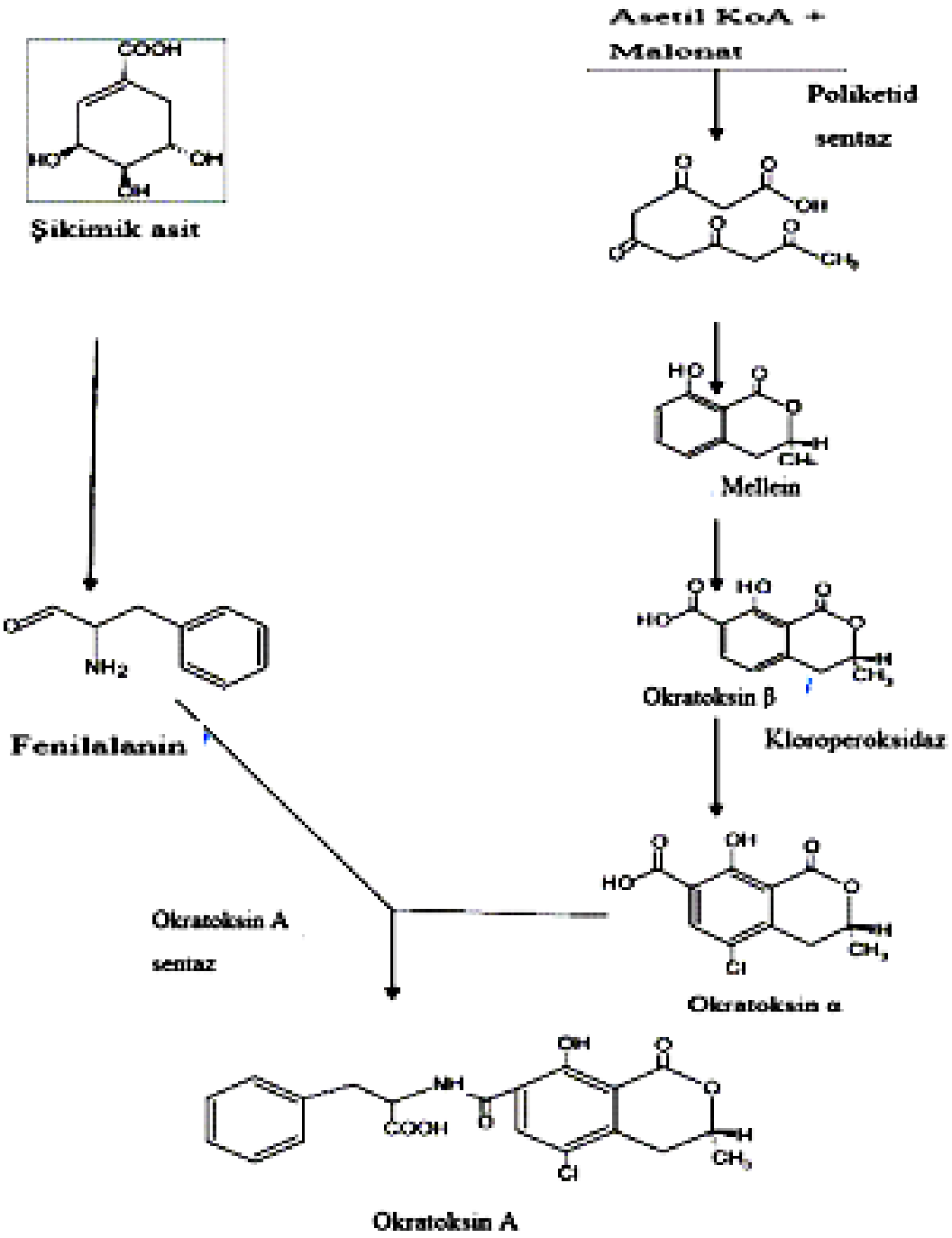
Aflatoksinlerin keşfinden sonra ilk olarak belirlenen en büyük mikotoksin grubunu okratoksinler oluşturur. Bu grubun en toksik bileşiği ise okratoksin A (OTA)' dır (Bragulat vd., 2001). *Aspergillus* sp., *Neopetromyces* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen OTA' nın, yaklaşık olarak 21 tane tür tarafından üretildiği tespit edilmiştir (Wang vd., 2016). Zhang ve arkadaşları (2016), Çinde üzümden izole ettikleri izolatları OTA üretimi açısından taramışlardır. *Aspergillus, Talaromyces* ve *Penicillium* cinslerine ait, okratoksin A üreten yeni fungus türleri teşhis etmişlerdir. Özellikle, daha önce OTA üreticisi olarak hiç bulunmayan türlerden *Talaromyces rugulosus*, *Penicillium commune*, *Penicillium rubens* ve *Aspergillus aculeatus'* un OTA ürettiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2016). *A. nigri* ve *A. carbonarius*' un üzümde OTA üretiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir. *Penicillium* türleri özellikle *P. verrucosum* iyi bir OTA üreticisidir.

Biyosentetik olarak okratoksinler, 8-fenil alanin ile çiftleşmiş bir dihidroizokumarin içeren pentaketitlerdir. Yalnızca okratoksin A ve çok nadir olarak ta onun dekloro analoğu olan okratoksin B gıdalar ve yemlerde bulunmaktadırlar (Şekil 1.4.). Oysa küf cinslerinin kültür filtratlarında metil ve / veya etil esterleri gibi 4 – hidroksi türevleri ve okratoksin B' nin okratoksin α izokumarin çekirdeği gözlemlenir (Pohland vd., 1992).



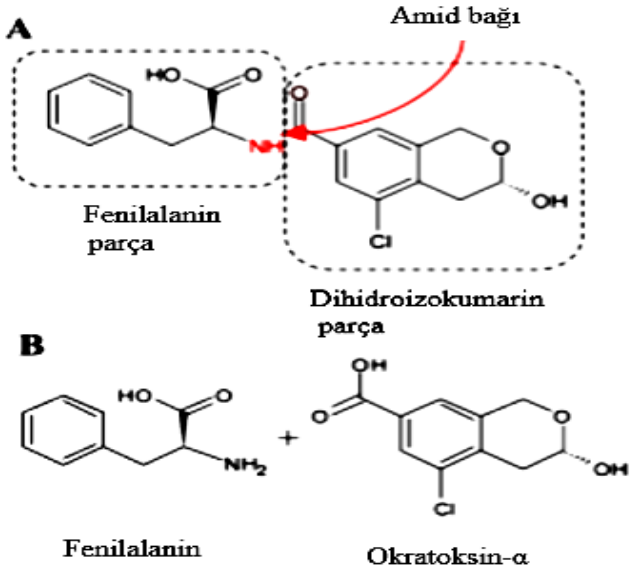
Şekil 1.4. Okratoksinlerin kimyasal yapıları (Pohland vd., 1992)

Şekil 1.5.’ te görüldüğü gibi asetat ve malonattan poliketit sentaz ile pentaketit yoluyla izokumarin oluşurken, şikimik asit yol izi ile oluşan fenil alanin birbirlerine amid bağı ile bağlanarak okratoksin A meydana gelmiştir (Anlı vd., 2008).



Şekil 1.5. Okratoksin biyosentez yol izi (Anlı vd., 2008)

Okratoksinin kimyasal yapısı ve degradasyon ürünleri Şekil 1.6.' da sunulmuştur. Toksin fenilalanin tRNA sentezini rekabetçi bir şekilde önleyebilir ve protein oluşumunu bloke edebilir. Dahası OTA ve DNA kaynaşmasına neden olur. Böylece dolaylı olarak oksidatif DNA hasarına neden olur (Loi vd., 2017). OTA' nın potansiyel nefrotoksik, teratojenik, genotoksik ve karsinojenik özellikleri vurgulanmıştır (Petchkongkaew vd., 2008).



Şekil 1.6. Okratoksinin kimyasal yapısı ve bileşenleri;

A. Okratoksin A; B. Degrade okratoksin A (Loi vd., 2017)

Her iki mikotoksinin moleküler yapılarında kumarin ortak bileşendir. Okratoksin A' da kumarine bağlanmış olan klor (Cl) toksisiteye sebep olurken aflatoksin B_1' de kumarine bağlı iki siklopenton halkalarından birisinin çift bağlı yapısı toksisiteye sebep olur (Heussner ve Bingle, 2015). Bu toksinler Türkiye'de ve dünyada gıda ve yemlerin ekonomik kaybına, insan ve hayvan sağlığının tehlikeye girmesine neden olmaktadır.

Yüksek toksisiteye sahip mikrobiyal metabolitler olan aflatoksin ve okratoksin açısından riskli gıda grupları oldukça geniş bir yelpazeye yayılmaktadır. Gıda ve yemlerde değişik oranlarda aflatoksine ve okratoksine rastlanmaktadır. Aflatoksin ve okratoksin A ile

karşılaşılması muhtemel gıda ve yem maddeleri ile bunların yasal üst sınırları sırası ile Çizelge 1.1. ve Çizelge 1.2.' de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Türk gıda kodeksi aflatoksin risk tablosu ve üst limitleri (Anonim, 2011)

Gıda Maddesi	**Maksimum Aflatoksin Limiti (µg/kg)**		
	B_1	$B_1+B_2+G_1+G_2$	M_1
Fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5,00	10,00	-
Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,00	15,00	-
Tahıllar (karabuğday (Fagopyrum sp.) dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,00	4,00	-
Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan),	5,00	10,00	-
Çiğ süt, ısıl işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,05
Baharatların aşağıdaki türleri için; Kırmızıbiber *(Capsicum* spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiber ve acı akbiber ve karabiber dahil) Hintcevizi / Muskat (*Myristica fragrans*) Zencefil (*Zingiber officinale*) Zerdeçal (*Curcuma longa*)	5,00	10,00	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	-	0,025
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5,00	10,00	0,50

Çizelge 1.2. Türk gıda kodeksi okratoksin A risk tablosu ve üst limitleri (Anonim, 2011)

Gıda Maddesi	**Maksimum Okratoksin A Limiti (µg/kg)**
İşlenmemiş tahıllar	5,00
Tahıldan elde edilen tüm ürünler (doğrudan tüketime sunulan tahıllar ve işlenmiş tahıl ürünleri dahil)	3,00
Kurutulmuş asma meyveleri (kuş üzümü, kuru üzüm ve çekirdeksiz üzüm dahil)	10,00
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,00
Kahve ekstraktı, çözünebilir kahve ekstraktı veya çözünebilir kahve	10,00
Şarap (köpüklü şarap/ şampanya dahil, likör şarapları ve hacmen alkol miktarı en az % 15 olan şaraplar hariç) ve meyve şarapları	2,00
Aromatize şarap, aromatize şarap bazlı içki ve aromatize şarap kokteyli	2,00

Mikotoksin yayılmasında küresel ticaretin önemli bir katkısı vardır. Mikotoksin kontaminasyonu ile her yıl milyarlarca dolar kayıp gerçekleşmektedir (Wu, 2007). Bu kayıpları doğrudan ve dolaylı kayıplar olarak iki grupta kategorize edebiliriz. Doğrudan kayıplar ürün verimlerinin düşmesi, hayvan performansının azalması ve çiftlik hayvancılık üreticilerinin hastalıklarından kaynaklanan maliyetleri ile ilgilidir. Dolaylı kayıpları ise ölçmek oldukça zordur. Fungusit kullanımı ile bağlantılı, pazarlanabilir ürünlerin azalması, yönetimi, sağlık hizmetleri, veterinerlik hizmetleri harcamaları ve degradasyon araştırmalarına harcanan giderler ve yatırımlardır (Wu, 2007).

Bu nedenle yapılan çalışmalar mikotoksin üretici mikroorganizmaların gelişimini durdurmak, mikotoksin üretimini inhibe etmek ve üretilmiş olan mikotoksinleri detoksifiye ve / veya degrade etmek şeklindedir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Mikotoksin miktarlarının azaltılması ile ilgili çeşitli yöntemler mevcuttur. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde öncelikle hammaddenin tarlada gelişimi, hasatı, depolanması, nakliyesi, ürüne işlenmesi ve ürün elde edilmesi aşamalarındaki küf kontaminasyonunun engellenmesi veya en aza indirilmesi önem taşımaktadır. Mikrobiyal kontaminasyonu tarlada kontrol altında tutmak çok güçtür. Ancak, mikrobiyal kontaminasyon ürünün hasatı ve onu izleyen aşamalarda alınacak hijyen ve sanitasyon önlemleri ve bilinçli uygulamalarla büyük ölçüde engellenebilir (Goldblatt ve Dollear, 1977).

Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde ikinci ve daha da önemli adım ise hammadde, ara ürünler ve son ürüne çeşitli şekillerde bulaşan küf / küflerin gelişiminin önlenmesidir. Bu da üretimde iyi bir teknoloji kullanma ve bilinçli uygulamalarla mümkün olabilir. Ancak küflerin yayılım alanlarının çok geniş olması nedeniyle, mikotoksin oluşumunun önlenmesinde büyük güçlükler yaşanmakta ve çoğu kez başarısız kalınabilmektedir (Goldblatt ve Dollear, 1977).

Aflatoksin kontaminasyonunun önlenemediği durumlarda üründen aflatoksinin uzaklaştırılması ve detoksifikasyon amacıyla çok sayıda araştırma yapılmakta ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik birçok yöntem denenmektedir.

1) Fiziksel metodlar; Fiziksel yöntemler arasında, elle veya elektronik yollarla ayıklama işlemlerinden aflatoksin düzeylerini azaltmak için yaygın olarak yararlanılmaktadır (Cheli, 2009). Ham maddelerden yüksek seviyede kontamine olmuş fraksiyonların mekanik olarak uzaklaştırılmasını (ayırma, temizleme, öğütme, boşaltma), ısı uygulaması, radyasyon ve adsorbentlerin kullanımını içerir. Fiziksel ayırma yöntemlerinden elle ayırma yöntemi, rengi değişmiş, bozulmuş, şekli bozuk taneleri ayıklama biçiminde uygulanmaktadır. Ancak bu yöntemin kullanımı daha çok hayvan yemi olarak kullanılacak daneler ile sınırlıdır (Vanhoutte vd., 2016).

Ürünler bir küf kontaminasyonu göstermediği halde önemli düzeylerde mikotoksin içerebilmektedir. Bu nedenle ayıklama ile son üründe başlangıçtakinden düşük aflatoksin düzeylerine ulaşılsa bile, çoğu kez kontaminasyonun tamamı giderilememektedir. Fiziksel dekontaminasyon yöntemlerinden bazıları arasında solvent ile ekstraksiyon, adsorbsiyon ve mikrodalga ile ısıl işlem gibi metodlar incelenmektedir (Park 1993).

Mikotoksin degradasyonu için kullanılan diğer fiziksel yöntemler sıcaklık, pH, radyasyon ve adsorbsiyon olabilir. Yüksek sıcaklık hem enerji maliyetine hem de besin değeri kaybına neden olacaktır. Özellikle protein kaybı yüksek sıcaklıkta çok önemli bir sorun olacaktır. pH değişikliği yüksek miktarlarda ürün elde eden işletmelerde uygulanması oldukça maliyetli ve güç olur. Radyasyon da özel koşullar olmadan uygulanamayan kontrol edilmesi oldukça güç bir degradasyon yöntemidir (Gupta vd., 2009).

Fiziksel giderimde bir yaklaşım olarak bazı adsorbentler kullanılmaktadır. Fakat adsorbentler, zorunlu gıdalar ile antibiyotiklerin spesifik olmayan bir şekilde bağlanmasına neden olmaktadır. Bu bağlanmalar her ne kadar dezavantaj olsa bile son dönemdeki adsorbentlerin kullanımı yaklaşımı umut vaadeden bir yöntemdir (Loi vd., 2016). Pek çok yayında üzerinde durulduğu gibi mineral adsorbentler özellikle kil mineralleri aflatoksinlerin degradasyonunda etkilidir (Deng vd., 2014; Di Gregorio vd., 2014; Vekiru vd., 2015).

Daha önceki çalışmalarda degradasyon ürünleri hakkındaki kısmi bilgi ve besinsel / organoleptik değişiklikler onların güvenilir bir şekilde uygulanmasını sınırlandırmaktaydı (Bretz vd., 2006). Son zamanlarda soğuk plazma, fotoradyasyon, ve mikrodalga gibi yeni stratejiler mikotoksin degradasyon metodları olarak tanıtılmakta ve/veya önerilmektedir (Fanelli vd., 2016).

2) Kimyasal metodlar; alkalin hidroliz (Müller vd., 1983), amonyaklaştırma (Park vd., 1988), ozonlama (Maeba vd., 1988), biyosülfitlerin kullanılması (Altug vd. 1990), peroksidasyon (Fouler vd., 1994) ve asit ile muamele (Aiko vd., 2016) mikotoksin giderimi için test edilmiştir. Fakat bunların gıda ve yemler üzerine uygulanması; ham maddelerin miktarı üzerine negatif etkisi, yüksek masraf, zayıf etkinlik ve toksik olma potansiyelleri nedeniyle sınırlıdır. Yine de kimyasal dekontaminasyon işlemleri içinde amonyaklama

işlemi bazı ülkelerde yasal olarak kabul görmüştür ve bu ülkelerde yem hammaddelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bata ve Lasztity, 1999).

Gıda katkıları ve kimyasal adsorbanlar da, potansiyel dekontaminasyon yöntemleri olarak dikkate alınmaktadır. Tabata ve ark., (1994) çok sayıda gıda katkı maddesini bu yönden incelemiş ve bazılarının gıda maddesine eklenen aflatoksin düzeyini azalttığını gözlemiştir. Diğer taraftan, patulin ve okratoksin A' nın aktif karbonla giderilmesinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Sindirilmeyen bazı adsorban maddeler ise ticari olarak yemlerde kullanılmaktadır. Mikotoksin giderimi amacı ile fiziksel ve kimyasal detoksifikasyon yöntemlerinin birlikte kullanıldığı çalışmalar da yapılmaktadır.

3) Biyolojik metodlar; kararlı haldeki toksinleri yıkma veya deaktive etme yoluyla, daha az toksik ya da zararsız bileşiklere dönüştürme şeklinde metabolize edebilen mikroorganizmaların veya enzimlerin kullanımını içerir. Araştırmaların büyük çoğunluğu mikrobiyolojik degradasyonla ilgilidir. Nadiren fiziksel adsorbsiyon ve enzimatik aktivite olduğu tespit edilmiştir. Mikrobiyolojik degradasyon gerçekleştikten sonra, degradasyon ürünlerinin belirlenmesi ve toksisitesinin değerlendirilmesi oldukça karmaşık bir hal almaktadır. Bu karmaşıklığın nedeni, gerçek bir detoksifikasyonda, özellikle biyotransformasyon enzimlerinin değerlendirilmesinde, her bir reaksiyonun etkili olmamasından kaynaklanmaktadır. Aslında, metabolize mikotoksin ana bileşikten daha büyük toksik özellikler de kazanabilir. Örneğin bir vakada, mayalar tarafından *in vivo* ortamda ZEN biyotransformasyona uğrayarak α - ZOL toksinine indirgenir, aslında α - ZOL, ZEN'den daha östrojeniktir (Böswald, 1995).

Biyolojik ajanlar ve onların enzimleri, çoğunlukla degradasyon başarısı yüksek, çevre dostu ve gıda değerine en az zarar vererek, gıdaların besin kalitesinden sorumlu kimyasal yapısına etkin bir yaklaşımla biyotransformasyon yaparlar. Mikotoksin biyotronsfarmosyonu "bakteriler / mantarlar veya onların enzimleri kullanılarak mikotoksinlerin yıkılması ile toksik olmayan metabolitlere dönüşmesi" olarak tanımlanır (Boudergue vd., 2009).

Aflatoksinin üründen uzaklaştırılması ile ilgili olarak araştırılan farklı yöntemler, belirli derecelerde başarılı bulunmalarına karşın; yeterli detoksifikasyon düzeylerini sağlayamamaları, besin öğelerinde kayıplara neden olmaları ve yüksek maliyet gerektirmeleri gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Bu alanda çalışan birçok araştırıcı; dekontaminasyon için en iyi çözümün, biyolojik detoksifikasyon olacağı, bunun tehlikeli kimyasalların kullanılmasını önleyeceği ve gıda/yemlerde besin değerleri ve yenilebilme özelliklerinde önemli kayıplara neden olmayacağı konusunda birleşmektedir (Karlovsky vd., 2016).

Mikotoksinlerin degradasyonu için biyokatalizör olarak canlı hücrelerin kullanılması maliyet avantajı sağlamaktadır. Özellikle çok adımlı reaksiyonlar gerekliyse ya da zaten endüstriyel prosesler içinde mikroorganizmalar kullanılmaktaysa bu uygulanabilir bir degradasyon yöntemidir (Hassan vd., 2015).

Biyolojik yöntemlerden üzerinde en çok çalışılanlardan biri, mikotoksinin fermantasyon sırasında giderilmesidir. İki farklı çalışmada, zearalenon (ZEN) ve fumonisinle kontamine olmuş mısırlardan etanol eldesi sırasında toksin miktarındaki değişim izlenmiş; her ikisinde de üretilen etanolde toksin bulunmazken, toksinin diğer fraksiyonlarda kaldığı belirlenmiştir (Bennet vd., 1981; Bothast vd., 1992). Bir başka çalışmada da (Sweeney ve Dobson, 1998) bira üretiminde alkol fermantasyonu sırasında, üç *Saccharomyces cerevisiae* suşunun malttaki okratoksin A, fumonisin B_1 ve B_2'yi azalttığı görülmüştür. Ayrıca, üzüm suyunun alkol fermantasyonu sırasında da trikotesenlerin degrade olduğu rapor edilmiştir (Sweeney ve Dobson, 1998).

Mikroorganizmaların çeşitli mikotoksinler üzerine etkisini inceleyen birçok çalışma yapılmış (Motomura vd., 2003; Yehia, 2014; Vanhoutte vd., 2016); okratoksin A' nın rumenden izole edilen 3 bakteri tarafından, diasetoksisirpenol (DAS) ve bir türevinin topraktan izole edilen bir mikrobiyal karışımla, zeralenonun çeşitli maya kültürleri tarafından degrade edildiği görülmüştür. Laktik asit bakterileriyle aflatoksinin uzaklaştırılması ile ilgili olarak yapılan çalışmalardan da olumlu sonuç alındığı bildirilmektedir (Özkaya vd., 2003).

Diğer taraftan, bir dezavantaj olarak mikotoksin kontaminasyonunun çok yüksek seviyede olduğu vakalarda, bu tür mikroorganizmaların büyümesi ve fiziksel gelişimleri azalabilir veya hiç gelişmeyebilir. Dolayısıyla, kayda değer bir dekontaminasyon seviyesine ulaşmadan önce mikroorganizmaların adaptasyonu için daha uzun süre gerektirmektedir (Hassan vd., 2013).

Biyolojik giderim çalışmalarının büyük bir kısmı aflatoksin ve / veya okratoksin degradasyonu, detoksifikasyonu ya da üretiminin inhibisyonu ile ilgilidir. Degrade edici izolatlar, bu izolatların kültür sıvıları ya da izolatlardan elde edilmiş saflaştırılmış enzimler kullanılmıştır (Varga vd., 2005; Motomura vd., 2003; Petchkongkaew vd., 2008; Azab vd., 2005; Guan vd., 2008; Stander vd., 2000). Motomura ve arkadaşları (2003) 19 farklı *Pleurotus ostreatus* izolatında tarama yapmışlar ve hem kültür sıvısı hem de saflaştırılmış enzim kullanarak izolatların degradasyon yeteneğini araştırmışlardır. Çalışmada kültür sıvısını veya saflaştırılmış enzim ile tampondan oluşan bir karışım, standart aflatoksin çözeltisiyle muamele edilmiş ve aflatoksin miktarındaki azalma TLC (ince tabaka kromatografisi) ile kontrol edilmiştir. Kültür sıvısından enzim saflaştırılması için DEAE-Sepharose kolon kullanılmış ve aflatoksin B_1 degrade eden yeni bir enzim belirlenmiştir (Motomura vd., 2003).

Azab ve arkadaşları (2005) 500 civarında besin ve besin katkısını *A. flavus* ve *A. parasiticus* ile aflatoksin B_1 yönünden incelemiş ve bunların içinden kontamine olmuş olanları *Lactobacillus* suşları ile muameleye tabi tutmuşlardır. TLC ile izolatların ürettiği toksin miktarındaki azalma belirlenmeye çalışılmış ve 4 adet *Lactobacillus* suşunun inhibisyonda başarılı olduğu bulunmuştur (Azab vd., 2005).

Akacid$^{®PLUS}$ ile *A. parasiticus* gelişimi ve aflatoksin üretimi inhibisyonu Abyaneh ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Akacid, guanidin bazlı bir polimer olup biyosidal etkiye sahiptir ve çok düşük seviyede insan ve hayvanlarda toksisiteye sahiptir. Akacid benzeri ürünler yüzey ve alanlarda gerçekleşen enfeksiyon hızlı ve kolay biçimde dekontamine ederler. Bu çalışmada sıvı besi ortamında farklı konsantrasyonlarda *A. parasiticus* gelişimi ve aflatoksin üretimi karşılaştırılmıştır. Aflatoksin varlığının belirlenmesi için TLC tekniğinden yararlanılmıştır. Akacid$^{®PLUS}$'ın 48

µl konsantrasyonu ile aflatoksin B_1' in % 100 inhibisyona uğradığı bulunmuştur (Abyaneh vd., 2006).

Aflatoksinin komponentlerinden biri olan kumarin degradasyonunu konu alan çalışmalardan birinde ise Guan ve arkadaşları (2008) tarafından tapir dışkısından izole ve identifiye edilmiş *Stenotrophomonas maltophilia* ve diğer mikroorganizmaların degradasyon yeteneklerine araştırılmış ve 37 °C' de 72 saatlik sıvı kültür süpernantı ile % 82,5 oranında degradasyon sağlanmıştır. Bu çalışmada ısı, pH, iyon ve enzim varlıkları ve çeşitlerinin degradasyon aktivitesine etkisi de incelenmiştir. Sıcaklığa bağlı olarak, 20 ve 30 °C' de % 60 – 64 civarı degradasyon gerçekleşirken 37 °C' de % 79' dur. pH = 8.0' de % 84,8 ile en yüksek, pH = 4.0' te ise % 14,3 ile en düşük degradasyon sağlanmıştır. Ayrıca Mg^{+2} ve Cu^{+2} önemli enzim aktivatörü iken Zn^{+2} inhibitör olarak görev yaptığı anlaşılmıştır. Bunun dışında Proteinaz K, Proteinaz K + SDS ile muamele edildiğinde enzimin yeteneği durmakta veya azalmaktadır. Bu çalışmada degradasyon yeteneğini ölçmek için azalan aflatoksin miktarı HPLC ile belirlenmiştir (Guan vd., 2008).

Schatzmayr ve arkadaşları (2003) farklı maya suşları ile OTA detoksifikasyonu üzerine bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada *Trichosporon* sp.' nin OTA'yı toksik olmayan OTα ve fenil-alanine parçaladığı gösterilmiştir. OTA ve OTα tayini HPLC- FLD ile yapılmıştır.

Bir başka çalışmada ticari hidrolazlar OTA degradasyon yetenekleri açısından taranmıştır. Kullanılan ticari enzimler başta lipaz türevleri, lipozim, ACS vb., ticari ürünlerdir. Bu enzimlerin elde edildiği organizmalar *Rhizopus, Rhizomucor, Pseudomonas, Candida, Penicillium, Aspergillus* gibi organizmalardır. Taramada TLC, degradasyon yeteneğinin belirlenmesinde ise HPLC kullanılmıştır. Yaklaşık 120 dakikada OTA' nın tamamına yakını OTα' ya dönüşmüştür (Stander vd., 2000).

Tayland' ta bir fermente soya fasulyesi ürünü olan Thua-nao' dan izole edilen *Bacillus spp.* ile aflatoksin ve okratoksin degradasyon yeteneği taraması yapılmıştır. Bu çalışmada suşların dual kültür tekniğiyle antagonistik özelliklerine ve inkübasyonla da toksin degradasyon aktivitelerine bakılmıştır (Petchkongkaew vd., 2008). Öncelikle *Bacillus*

spp. ve *A. flavus*; *Bacillus* spp. ve *A. westerdijkiae* dual kültür tekniği ile ekilmiş ve inhibisyon yeteneğine bakılmıştır. Daha sonra ise *Bacillus* spp. ve standart mikotoksinler aflatoksin B_1 ve okratoksin A 1 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu degradasyon değerlerindeki değişim HPLC ile taranmış ve en iyi aktivite veren suşlar belirlenmiştir. HPLC analizinde aflatoksin B_1 için UV detektör kullanılabilirken okratoksin A için flouresan detektör kullanılmıştır. İzolatlardan aflatoksin B_1 degrade edenlerin sayısı oldukça fazla iken, okratoksin A degrade edenlerin sayısı az ama degradasyon yüzdeleri oldukça fazladır (Petchkongkaew vd., 2008).

Bir başka çalışmada ise çemen otu tohumundaki fitokimyasallar ve aflatoksinin gama radyasyon ışınları ile degradasyonu araştırılmıştır. Marketten alınan çemen otu tohumu 2,5 – 3 – 4 – 5 ve 10 KGy radyasyona maruz bırakılmıştır ve radyasyona maruz bırakılmamış bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Toplam aflatoksin Ridascreen® Enzim Immuno Assay kullanılarak belirlenmiş ve miktarı spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda tanımlanmıştır. Sonuç olarak toplam aflatoksin miktarı radyasyon miktarı ile ters orantılı olarak; kontrolde maksimum 10 KGy' de minimum olacak şekilde değişmiştir. Fitokimyasallarda ise belirgin bir değişiklik gözlemlenememiştir. Fitokimyasallar ise bu çalışmada HPLC ile analiz edilmişlerdir (Gupta vd., 2009).

Varga ve arkadaşları (2005), yaptıkları çalışmada filamentli mantarlardan *Rhizopus* ve *Mucor* izolatlarını kullanmışlardır. Bazı izolatların mikotoksinlerden aflatoksin, okratoksin, zearalenon ve patulini degradasyon yeteneği araştırılmıştır. Özellikle *Rhizopus* aflatoksin için aktivite gösteremezken, okratoksin için iyi aktivite göstermiştir. Diğer mikotoksinleri de degrade edebilmiştir. Bu çalışmada *Rhizopus* spor süspansiyonu ve mikotoksin standartları birlikte karanlıkta inkübe edilmiştir. Mikotoksin taraması için, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ve 16. günlerde hem kalitatif hem de kantitatif değerlendirmeye yardımcı olan HPTLC analizi yapılmıştır. Substrat olarak buğdayın kullanıldığı ve mikotoksin üretici suşların *Rhizopus* ile birlikte inoküle edildiği deneyde aflatoksin miktarı HPLC ile belirlenmiştir (Varga vd., 2005).

Garcinia indica Asya, Afrika ve Polinezya' da yayılış gösteren aktif biyomoleküller bakımından zengin poligamik bir ağaçtır. Yapılan bir çalışmada *Garcinia indica* ekstraktı *A.*

flavus inhibisyonu ve aflatoksin B_1 üretimine etkisi bakımından incelenmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri ve aflatoksin B_1 üretim miktarı spektroflorofotometrik olarak ve TLC ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bitkisel ekstrakt 500 ile 1000 ppm' den daha düşük konsantrasyonlarda *A. flavus* üretiminden çok AFB_1 inhibisyonunda daha başarılı oldukları görülmüştür.(Selvi vd., 2003).

Zjalic ve arkadaşları (2006), *Trametes versicolor*' un sahip olduğu β glukan ve glikoproteinin aflatoksin inhibisyon yeteneğini araştırmışlardır. Tohumlar üzerine inoküle edilen *Trametes versicolor* ile aflatoksin üretiminin inhibisyon ilişkisine bakılmıştır. Hem *Trametes versicolor* izolatlarının kültür filtratları hem de liyofilize izolatlara eklenmiş olan ekstrakte edilmiş ekzopolisakkaritler ve glikoproteinler ile muamele edilmiştir. Yapılan deneyde liyofilize kültür filtratları *A. parasiticus* kültürüne uygulanmış ve sırası ile 3, 6 ve 9. günlerde aflatoksin değerleri izlenmiştir. Sonuç olarak görülmüştür ki; en çok etkiyi ekzopolisakkaritler, sonra tripsinlendirilmiş ekzopolisakkaritler ve daha sonra da liyofilize kültür filtratları göstermektedir (Zjalic vd., 2006).

Bitki patojeni olarak bilinen bir şapkalı mantar olan *Armillaria tabescens* (E-20) ile yapılan çalışmada organizmanın 28 $^{\circ}$C' de pH = 6.0 değerliğinde degradasyon yeteneğinin 7.09 nmol dak/mg olduğu anlaşılmıştır. SDS – PAGE ile belirlenen enzim 51.8 kDa olarak tespit edilmiş ve bu enzime patent alınmıştır. Aflatoxin detoxifizyme (ADTZ) enziminin daha sonra ismi Aflatoxin Oxidase (AFO) olarak değiştirilmiştir (Liu vd., 2001).

Proteobakteri grubuna dahil olan *Myxococcus fulvus* ile yapılan bir çalışmada ise 48 saatlik bir inkübasyon süresinde aflatoksin grupları üzerinde degrade edici özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu etki %71,89 ile en çok AFB_1 üzerinde görülmüştür. SDS-PAGE ile belirlenen enzim 32 kDa olarak tespit edilmiş bu enzim Myxobacteria Aflatoxin Degredation Enzyme (MADE) olarak adlandırılmış ve patent alınmıştır (Zhao vd., 2011).

Bazı çalışmalarda *Bacillus spp.* gibi bulunduğu ortamın pH derecesini etkileyen organizmalar kullanılmaktadır. Bu tip organizmaların ortamda yaptığı pH değişikliği ile mikotoksin üretimini etkilemektedir. Çalışmaların bir kısmında ise tek bir organizma araştırılmış veya degradasyon yeteneği olan organizmalar belirlenmiş ancak bu

organizmanın hangi metabolitlerinin degradasyona katkı sağladığı belirlenmemiştir (Petchkongkaew vd., 2008).

Eldeki veriler ışığında, şu ana kadar literatürde tanımlanmış aflatoksin degradasyonu yapan enzimler ve özellikleri şu biçimde sıralanabilir.

AFO; eski adı ADTZ olan bu enzim *Armillariella tabescens*'ten elde edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin % 100 degradasyon sağladığı görülmüştür. Sıçan karaciğerinde *Salmonella typhimurium* ve tavuk embriyolarında yapılan toksisite testlerinde başarılı olduğu görülmüştür (Liu vd., 1998).

Peroxidase; *Armoracia rusticana*'dan (Yaban turpu) elde edilmiştir. Enzim numarası EC 1.11.1.7'dir. Saflaştırılmış enzimin % 42 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir. *Bacillus megaterium*'da yapılan toksisite testlerinde başarılı olduğu görülmüştür (Chitrangada vd., 2000).

Lakkaz; enzim numarası EC 1.10.3.2' dir üç farklı lakkaz türevi *Trametes versicolor*, *Streptomyces coelicor* ve *Pleurotus pulmonarius*' tan elde edilen (lac 2 enzimi) lakkaz türevleri AFB_1 degradasyonunda kullanılmıştır. . Saflaştırılmış enzimin degradasyon başarı oranı % 87 ile 100 arasında değişmektedir. *Salmonella typhimirium*' da yapılan toksisite testinde % 100 başarılı olduğu görülmüştür (Alberts vd., 2009; Loi vd., 2016).

$F420H_2$-bağlı redüktaz; *Mycobacterium smegmatis*' ten elde edilmiştir. Enzim numarası E.C. 1.5.8' dir. AFB_1, AFB_2, AFG_1 ve AFG_2 türü aflatoksinler üzerinde degradasyon yaptığı belirlenmiştir. Ancak degradasyon oranları ve detoksifiye olup olmadıkları belirlenmemiştir (Taylor vd., 2010).

Mn peroksidaz; *Pleurotus ostreatus*' tan elde edilmiştir. Enzim numarası EC 1.11.1.7' dir. Saflaştırılmış enzimin % 90 oranında degradasyon yaptığı belirlenmiştir. Herhangi bir toksisite testi uygulanmamıştır (Yehia, 2014).

Aflatoksin degradasyon enzimi; *Pleurotus ostreatus*' tan elde edilmiştir. Bir enzim koduna sahip değildir. Saflaştırılmış enzimle degradasyon oranı belirlenmemiştir. Ayrıca toksisite testi de yapılmamıştır (Motomura vd., 2003).

MADE (myxobacteria aflatoxin degrading enzyme); *Myxococcus fulvus*' tan elde edilmiştir. Bir enzim kodu yoktur. AFB_1, AFG_1 ve AFM_1 degradasyonunda etkilidir. Kültür filtratında % 72 ve saflaştırılmış enzimde % 97' ye kadar degradasyon yeteneğine sahiptir. Herhangi bir toksisite testi ile araştırılmamıştır (Zhao vd., 2011).

Ery4; *Pleurotus eryngii*' den elde edilmiştir. Enzim numarası EC 1.10.3.2 - CAO79915.1' dir. AFM1 degradasyonunda etkili olduğu görülmüştür. Saflaştırılmış enzimle % 100 oranında degradasyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Herhangi bir toksisite testi ile sorgulanmamıştır (Loi vd., 2017).

Eldeki literatür verileri çok sayıda mikrobiyal türün mikotoksin oluşumunun inhibisyonu ya da degradasyonu amacı ile kullanabilirliğini göstermektedir. Bu verilerden alınan cesaretle tasarlanan bu çalışmanın amacı; aflatoksin B_1 ve okratoksin A için degradasyon yeteneğine sahip makrofungus izolatlarının belirlenmesidir. Böylelikle ileriki çalışmalarda toksin degradasyonu konusunda başarılı enzimlerin gıda güvenliği açısından kullanılmasına katkı sağlanabilecektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Makrofungus İzolatları

Çalışma kapsamında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Fungikültür Laboratuvarında oluşturulmuş bulunan kültür kolleksiyonunda bulunan bazı makrofungus kültürlerinin (Çizelge 3.1.) AFB_1 ve OTA degradasyon etkinlikleri araştırılmıştır.

Çizelge 3.1. AFB_1 ve OTA degradasyon etkinlikleri araştırılan fungus izolatları

OBCC Kodu	**Makrofungus adı**	**OBCC Kodu**	**Makrofungus adı**
02	*Lentinus arcularius*	34	*Lentinus arcularius*
03	*Ganoderma sp.*	36	Tanımlanmamış izolat
04	*Suillus bovinus*	39	*Pholiota sp.*
05	*Tricholoma equestre*	41	Tanımlanmamış izolat
06	*Clavariadelphus truncatus*	1002	*Leucoagaricus pudicus*
18	*Lentinus arcularius*	1004	*Ganoderma carnosum*
19	*Gloeophyllum sepiarium*	1005	*Suillus collitinus*
21	Tanımlanmamış izolat	1006	*Trametes versicolor*
24	*Macrolepiota procera*	1008	*Antrodia serialis*
25	*Trametes versicolor*	1009	*Pleurotus eryngii*
30	*Lentinus arcularius*	1010	*Ganoderma applanatum*
31	*Lentinus arcularius*	1012	*Laetiporus sulphureus*

Çizelge 3.1. AFB_1 ve OTA degradasyon etkinlikleri araştırılan fungus izolatları (devam)

OBCC Kodu	**Makrofungus adı**	**OBCC Kodu**	**Makrofungus adı**
32	*Lentinus arcularius*	1014	*Coprinus comatus*
1015	*Pleurotus ostreatus*	1108	*Coprinus comatus*
1021	*Pleurotus ostreatus*	1109	*Hypholoma fascicularia*
1022	*Pleurotus ostreatus*	1111	Tanımlanmamış izolat
1023	*Schizophyllum commune*	3007	*Lentinus tigrinus*
1025	*Schizophyllum commune*	3501	Tanımlanmamış izolat
1030	*Fomes fomentarius*	3505	Tanımlanmamış izolat
1031	*Pleurotus ostreatus*	5001	*Ganoderma carnosum*
1034	*Pleurotus ostreatus*	5002	*Trametes versicolor*
1035	*Fistulina hepatica*	5004	*Lentinus strigosus*
1047	*Epicoccum nigrum*	5005	*Cerrena unicolor*
1057	*Fomes fomentarius*	5006	*Trametes pubescens*
1067	Tanımlanmamış izolat	5009	*Inonotus hispidus*
1080	Tanımlanmamış izolat	5014	*Trametes hirsuta*
1085	*Coprinus comatus*	5022	*Trametes versicolor*
1086	Tanımlanmamış izolat	5023	*Trametes versicolor*
1087	*Leucoagaricus pudicus*	5024	*Hygrocybe pratensis*
1088	*Coprinus comatus*	5027	*Schizophyllum commune*
1089	Tanımlanmamış izolat	5029	Tanımlanmamış izolat
1095	Tanımlanmamış izolat	5040	*Trametes pubescens*

Çizelge 3.1. AFB_1 ve OTA degradasyon etkinlikleri araştırılan fungus izolatları (devam)

OBCC Kodu	**Makrofungus adı**	**OBCC Kodu**	**Makrofungus adı**
1098	Tanımlanmamış izolat	5048	*Agaricus campestris*
5049	Tanımlanmamış izolat	6035	*Ganoderma lucidium*
5050	Tanımlanmamış izolat	6036	*Pleurotus eryngii*
5055	Tanımlanmamış izolat	6037	*Pleurotus cornucopiae*
5056	Tanımlanmamış izolat	*Ag461	*Pleurotus calyptratus*
5058	Tanımlanmamış izolat	*Ag463	*Pleurotus cornucopiae*
6001	*Lentinus edodes*	*Ag468	*Pleurotus dryinus*
6004	*Lentinus edodes*	*Ag 470	*Pleurotus dryinus*
6007	*Pleurotus eryngi*	*Ag471	*Pleurotus eryngii*
6008	*Pleurotus eryngii*	*Ag472	*Pleurotus ostreatus*
6009	*Pleurotus eryngii*	*Ag475	*Pleurotus ostreatus*
6010	*Pleurotus eryngii*	*Ag476	*Pleurotus ostreatus*
6030	*Pleurotus eryngii*	*Ag477	*Pleurotus ostreatus cv. florida*
6033	*Phanerochaete chrysosporium*	*Ag479	*Pleurotus pulmonarius*
* Ag 461 – Ag 479 arasındaki koda sahip kültürler Dr. Varislav Homolka' dan temin edilmiştir.			

3.1.2. Besiyerleri

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri, aksi belirtilmedikçe besiyeri içeriğinin distile suda çözülüp otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süre işlem görmesi ile steril edilerek kullanılmıştır.

Besiyeri 1 : Yeast Ekstrakt Sukroz (YES) Agar

Sukroz	150,00	g
Yeast ekstrakt	20,00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50	g
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	0,01	g
$Cu\ SO_4.\ 5H_2O$	0,005	g
Agar	15,00	g
Distile su	1000	ml
pH	5,00	

Bu besiyeri *Aspergillus flavus* tarafından aflatoksin üretimi için kullanılmıştır. (Yousefi vd., 2009)

Besiyeri 2 : Potato Dekstroz Malt Pepton (PMP) Besiyeri

Patates dekstroz broth	25,00	g
Malt ekstrakt	10,00	g
Pepton	1,00	g
Distile su	1000	ml
pH	5,50	

Bu besiyerinin kullanım amacı organizmaları modifiye Kirk Broth ile geliştirmeden önce pre-kültür hazırlayarak inokulum elde edilmesidir.

Besiyeri 3 : Kirk Broth

Glikoz	10,00	g
Üre	0,036	g
KH_2PO_4	2,00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50	g
$CaCl_2$	0,099	g
Distile su	1000	ml
pH	5,00	

Bu besiyeri ile geliştirilen makrofunguslardan elde edilen kültür sıvısı toksin giderim potansiyelinin araştırılmasında kullanılmıştır. (Motomura vd., 2003)

Besiyeri 4 : Modifiye Kirk Medium 1

Glikoz	10,00	g
KH_2PO_4	2,00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50	g
$CaCl_2.H_2O$	0,10	g
Üre	0,036	g
Distile su	1000	ml
pH	5,00	

Besiyeri 5 : Modifiye Kirk Medium 1X

Modifiye Kirk Medium 1' e % 0,2 oranında buğday kepeği ilave edilerek hazırlanmıştır.

Besiyeri 6 : Modifiye Kirk Medium 2

Glikoz	10,00	g
KH_2PO_4	2,00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50	g
$CaCl_2.H_2O$	0,10	g
Tiamin	2,00	mg
Pepton	2,00	g
İz element solüsyonu	10,00	ml
Distile su	1000	ml
pH	5,00	

İz element solüsyonu:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0, 10	g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0, 44	g
H_3BO_3	0, 22	g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0, 10	g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0, 032	g

İz element solüsyonu (Devamı):

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0, 032	g
Distile su	1000	ml

Besiyeri 7 : Modifiye Kirk Medium 2X

Modifiye Kirk Medium 2' ye % 0,2 oranında buğday kepeği ilave edilerek hazırlanmıştır.

Besiyeri 8 : Modifiye Kirk Medium 3

Glikoz	10,00	g
KH_2PO_4	2,00	g
$MgSO_4.7H_2O$ 0,5	0,59	g
$CaCl_2.H_2O$	0,10	g
Sodyum asetat	3,30	g
Amonyum tartarat	0,12	g
İz element solüsyonu*	10,00	ml
Distile Su	1000	ml
pH	5,00	

***** İçeriği: Besiyeri 6'da sunulan solüsyon kullanılmıştır.

Besiyeri 9 : Modifiye Kirk Medium 3X

Modifiye Kirk Medium 3' e % 0,2 oranında buğday kepeği ilave edilerek hazırlanmıştır.

Besiyeri 10 : Modifiye Kirk Medium 4

Glikoz	10.00	g
KH_2PO_4	2,00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50	g
$CaCl_2.H_2O$	0,10	g
Yeast ekstrakt	1,00	g
Amonyum tartarat	2,00	g
Soytone	5,00	g
İz element solüsyonu*	10,00	ml
Distile su	1000	ml
pH	5,00	

***** İçeriği: Besiyeri 6'da sunulan solüsyon kullanılmıştır.

Besiyeri 11 : Modifiye Kirk Medium 4X

Modifiye Kirk Medium 4' e % 0,2 oranında buğday kepeği ilave edilerek hazırlanmıştır.

Besiyeri 12 : Modifiye Kirk Medium 5

Glikoz	10,00	g
KH_2PO_4	2,00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,500	g
L-Asparagine	1,00	g
Yeast ekstrakt	0,50	g

Besiyeri 12 : Modifiye Kirk Medium 5 (devamı)

$FeSO_4.H_2O$	0,10	g
Distile su	1000	ml
pH	5,00	

Besiyeri 13 : Modifiye Kirk Medium 5X

Modifiye Kirk Medium 5' e % 0,2 oranında buğday kepeği ilave edilerek hazırlanmıştır.

Besiyeri 4 – Besiyeri 13 aralığındaki besiortamları toksin degradasyonu amacı ile kullanılan makrofungusların üreme ve enzim üretimlerinin arttırılması amacına yönelik olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 14 : Patates Dekstroz Broth (PDB)

Patates Dekstroz	24,00	g
Distile Su	1000	ml

PDB besiyeri DNA ekstraksiyonu yapmadan önce liyofilize edilecek makrofungusların geliştirilmesi için kullanılmıştır.

3.1.3. Çözeltiler

Çözelti 1: Aflatoksin Ekstraksiyon Sıvısı

Formik asit (%1)	20	ml
Diklorometan	40	ml
Etil asetat	60	ml

YES agar besi ortamından *Aspergillus flavus* tarafından üretilen aflatoksinin ekstraksiyonu amacı ile kullanılmıştır. (Shotwell, 1981)

Çözelti 2: Aflatoksin Mobil Faz Çözeltisi

Toluen, etil asetat, formik asit ve distile suyun 100: 80: 18:2 (v:v:v:v) oranlarında karıştırılması ile hazırlanan bu çözelti aflatoksinin ince tabaka kromatografisi çalışmalarında mobil faz olarak kullanılmıştır. (Shotwell, 1981)

Çözelti 3: Sodyum Asetat tamponu Çözeltisi

Sodyum Asetat	0,41	g
Distile su	50,00	ml
pH	5,00	

Hem AFB_1 hem de OTA için inkübasyon ortamı oluşturulurken tampon olarak kullanılmıştır. (Motomura vd., 2003)

Çözelti 4: Bradford Çözeltisi

25 mg Coomasie brillant blue G-250, 12.5 ml % 95 etanolde (v/v) çözündürülüp, 25 ml % 85 fosforik asit (H_3PO_4) (v/v) eklenmiştir. Bu boya çözeltisi 250 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılacağı zaman 5 kere sulandırılmıştır. Whatman no.1 filtreden geçirilerek cam bir şişede, 4 ºC' saklanmıştır. Bu çözelti protein miktar tayininde kullanılmaktadır (Bradford, 1976).

Çözelti 5: Bovin Serum Albümin (BSA) Çözeltisi

BSA'nın 1 mg'ı, 1 ml distile su içinde çözülerek stok BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok BSA çözeltisi distile su ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda protein içeren BSA çözeltileri elde edilimiştir. Bu çözeltiler Bradford yöntemi ile ölçülerek standart eğri oluşturulmuş ve böylece daha sonra ölçülecek olan kültür sıvısı örneklerinin protein miktarlarının belirlenmesi için bu standart eğri hazırlanmıştır. (Bradford, 1976)

Çözelti 6: HPLC - AFB_1 Mobil Faz Çözeltisi

HPLC ile AFB_1 tayininde iki farklı mobil faz kullanılmıştır. Birinci mobil faz % 0.1 asetik asit (v/v) çözeltisi olarak hazırlanmıştır. İkinci mobil faz olarak % 100 metanol kullanılmıştır. HPLC cihazından bu iki çözelti bir gradiyent yöntemi ile kolondan geçerken AFB_1' in affinitesine ve serbest bırakılmasını kontrol etmektedir.

Çözelti 7: HPLC - OTA Mobil Faz Çözeltisi

HPLC ile OTA tayininde iki farklı mobil faz kullanılmıştır. Birinci mobil faz % 0.2 asetik asit (v/v) çözeltisi olarak hazırlanmıştır. İkinci mobil faz olarak % 100 asetonitril kullanılmıştır. HPLC cihazından bu iki çözelti bir gradiyent yöntemi ile kolondan geçerken OTA' nın affinitesine ve serbest bırakılmasını kontrol etmektedir.

Çözelti 8: FPLC Tampon Çözeltileri

Bis. Tris çözeltisi 50 mM ve pH = 5.5 değerinde bir Tampon A çözeltisi hazırlanmıştır. Tampon A çözeltisi içinde 1 M NaCl çözülerek Tampon B çözeltisi hazırlanmıştır. Bu iki farklı tampon bir gradient oluşturarak FPLC kolonunda yürütülmüştür. Tampon A proteinlerin kolona bağlanmasında, Tampon B ise proteinlerin kolondan serbest kalmasında görev almaktadır.

Çözelti 9: Fiksasyon Çözeltisi

Metanol % 50 (v/v) ve asetik asit % 7 (v/v) çözeltileri birlikte proteinleri SDS – PAGE jeline sabitlemek için kullanılır.

Çözelti 10: Boyama Çözeltisi:

Coomassie Blue G 250 % 0.04 (v/v) ve % 3.5 Perklorik asit (w/v) ile hazırlanmıştır. Boyama çözeltisi SDS – PAGE jelinin boyanması için kullanılmıştır. Boyama aşamasından sonra jel ile beraber protein bantlar da boyanmıştır.

Çözelti 11: Temizleme Çözeltisi

Distile su ile hazırlanan % 5 asetik asit çözeltisi (v/v) boyanmış SDS – PAGE jelini temizlemek için kullanılır.

Çözelti 12: Ayırma Jeli

Akrilamid' den 3,73 ml 30 % (w/v), Bis (N,N´-Metilen-Bisaklamid)' den 1,15 ml % 1 (w/v), Tris/HCl, pH 8,8' den 2,0 ml 1,5 M, distile su 1.04 ml, SDS 80 µl 10 % (w/v), TEMED 5,3 µl ve APS 53 µl karışımından oluşan ayırma jeli elektroforez esnasında protein bantların birbirinden ayrılmasını sağlar.

Çözelti 13: Yükleme Jeli

Akrilamid' den 0,76 ml 30 % (w/v), Bis (N,N´-Metilen-Bisaklamid)' den 0,52 ml % 1 (w/v), Tris/HCl, pH 6,8' den 1,0 ml 0,5 M, distile su 1,71 ml, SDS 40 µl 10 % (w/v), TEMED 2,7 µl ve APS 27 µl karışımından oluşan yükleme jeli elektroforez öncesinde protein örneklerinin bu jeldeki kuyucuklara yüklenmesini sağlar.

Çözelti 14: Bromphenol Blue

Örnekleri yüklemek için hazırlanan çözeltidir. 2.0 mg Bromphenol blue 10 ml bidistile suda çözülmüştür.

Çözelti 15: IEF Örnek Yükleme Çözeltisi

FPLC' den elde edilen protein içeren sıvı pH = 5,5 değerinde ve 50 mM olan Bis. Tris ile 60 ml' ye tamamlanır ve % 1 oranında (v/v) pH = 3 – 10 taşıyıcı amfolitler ilavesi ile IEF' e yüklenecek örnek çözeltisi hazırlanır.

Çözelti 16: NaOH Çözeltisi

NaOH' ten 2 gr NaOH' in 500 ml distile suda çözülmesi ile hazırlanmıştır. IEF cihazında kullanılmıştır.

Çözelti 17: H_3PO_4 Çözeltisi

500 ml distile suda 4,9 gr H_3PO_4 çözülmesi ile hazırlanmıştır. IEF cihazında kullanılmıştır.

Çözelti 18: Artemia İnkübasyon Sıvısı

NaCl' ün distile suda % 3 oranında çözülmesiyle (w/v) hazırlanmıştır. *Artemia* (brine shrimp) yumurtalarının geliştirilmesi için kullanılır.

3.1.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kullanım Alanlarıb

Çalışma kapsamında çözeltiler haricinde kullanılan bazı kimyasal maddeler ve kullanım alanları Çizelge 3.2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım alanları

Kimyasal Madde	**Kullanım Alanı**
Metanol	AFB_1 ve OTA'nın çözünmesi
Kloroform	Toksinlerin ekstraksiyonu DNA izolasyonu ve tanmlanması
Etil asetat	Toksinlerin ekstraksiyonu
Aflatoxin Mix 4 solution 20 µl (Sigma)	Üretilen toksinin belirlenmesinde marker
AFB_1 (Sigma)	Degradasyon çalışmalarında standart olarak
OTA (Sigma)	Degradasyon çalışmalarında standart olarak
CTAB - Cetil trimethyl ammonium bromide	DNA izolasyonu
Etanol	DNA izolasyonu
Sodyum klorid	DNA izolasyonu
Tris (hidroksi-metil) aminometan	DNA izolasyonu
Titriplex III – Etilen-dinitrilotetraasetik asit disodyum salt di hidrat	DNA izolasyonu
TAE (Tris – Asetat – EDTA)	DNA izolasyonu
Sodyum hidroksit	DNA izolasyonu
Hidroklorik asit	DNA izolasyonu
Agaroz	DNA izolasyonu

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Bu bölümde çalışma kapsamında kullanılan bazı cihazlardan ve özelliklerinden bahsedilmiştir.

3.1.5.1. HPTLC

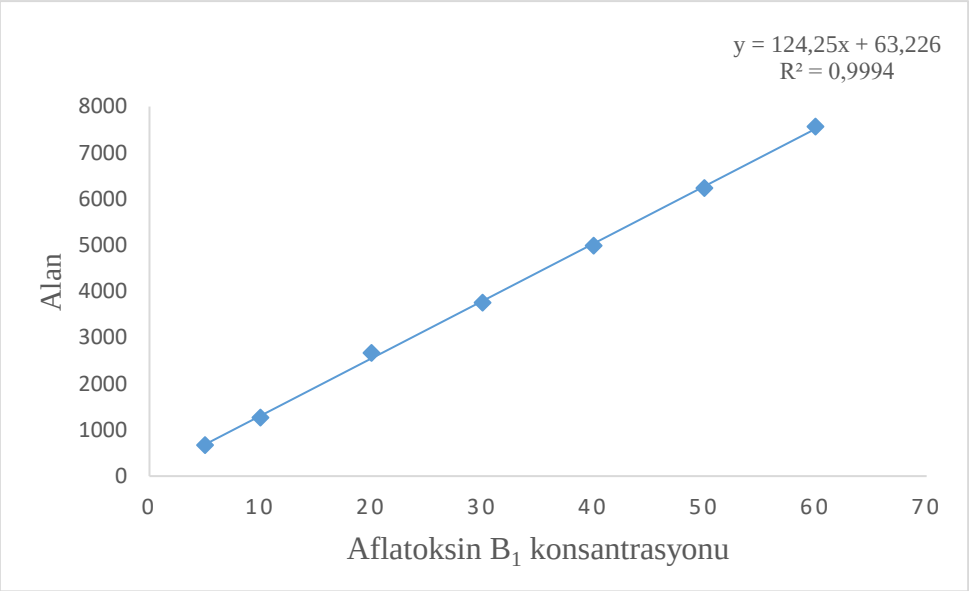
Bu cihaz, en yüksek toksin degradasyonu sağlayan makrofungus izolatlarının belirlenmesi amacı ile yarı-kantitatif bir veri elde etmek amacı ile kullanılmıştır. İnce tabaka kromotografisi ile AFB_1 ve OTA yürütüldükten sonra plakalar üzerinde UV ışıma veren benekler oluşmaktadır. Oluşan bu benekler UV ışık altında gözlemlebilir ve kalitatif bir sonuç verir. Bu beneklerin az ya da çok ışıma vermesini bir UV dedektör ile ölçerek yarı – kantitatif sonuç elde edilebilir

Şekil 3.1. 'deki HPTLC cihazının işlevi TLC plakaların üzerindeki UV ışımaları dedektör ile ölçerek sayısal bir sonuç sunmasıdır. Her ne kadar HPLC cihazı kadar duyarlı olmasa da çok sayıda örneğin bir plakada yürütülmesi ve kısa sürede sonuç alınması bu cihazın önemli bir avantajıdır.



Şekil 3.1. HPTLC cihazı

HPTLC cihazının toksin ölçümünde tutarlı bir ölçüm yapıp yapmadığını anlamak üzere farklı konsantrasyonlarda aflatoksin B_1 ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümler sonucu bir standart eğri çıkarılmıştır. Çıkarılan standart eğri şekil 3.2. de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. HPTLC standart eğrisi

3.1.5.2. HPLC

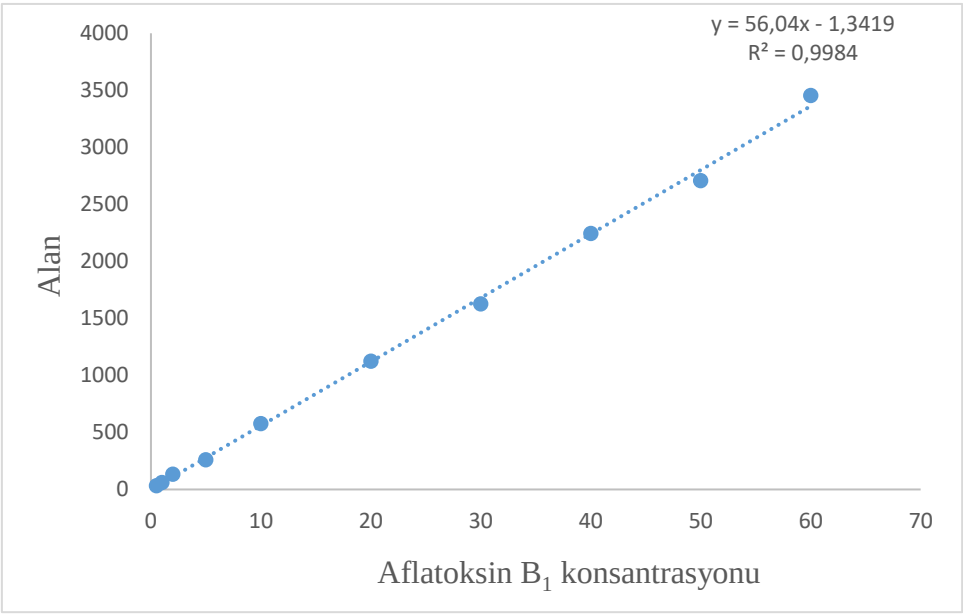
Laboratuvarlarda en yaygın olarak kullanılan kromotografik ayırma cihazıdır. Şekil 3.3.' teki HPLC cihazının çalışma prensibi ayrıştırılacak olan maddelerin bir kolondan geçerken bu kolona bağlanma yeteneklerine göre birbirinden ayrıştırılmasıdır.

Bunun için genellikle bir kolon (katı faz) ve bir veya birkaç mobil faz (sıvı faz) kullanılır. Kolon dolgu maddesi ve hedef metabolit affinite ilişkisi ile hedef metabolitin çözünürlüğü dikkate alınarak mobil faz akışı; isoarktik (sabit) veya graident (çoklu mobil fazın değişen oranlarında) olabilir.

HPLC cihazı ile yapılan ölçümlerin hesaplanması için bir standart eğri çıkarılmıştır (Şekil 3.4.). Bunun için farklı konsantrasyonlarda toksinler ölçülmüştür.

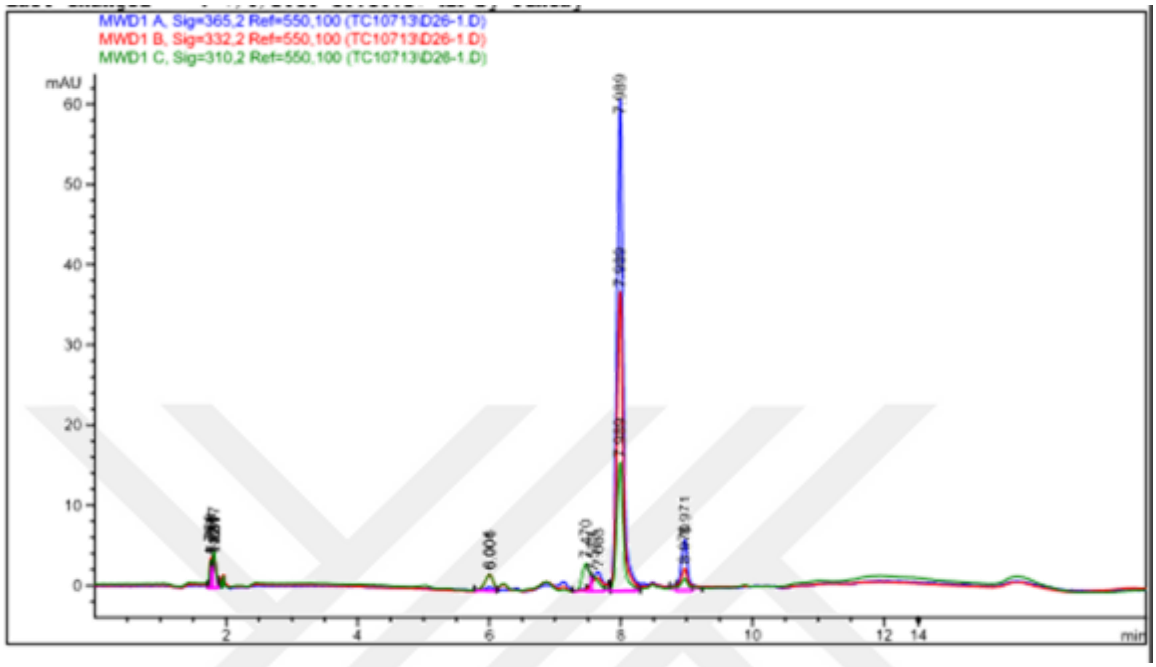


Şekil 3.3. HPLC cihazı



Şekil 3.4. HPLC standart eğrisi

HPLC cihazı ile farklı konsantrasyonlarda ölçülmesi sonucu aflatoksin B_1 grafikleri elde edilmiştir. Elde edilen bu grafik şekil 3.5.' te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. HPLC kromotogramı

3.1.5.3. Spektrofotometre

Spektrofotometre cihazı ışık absorbansına bağlı olarak miktar tayini yapmaktadır.



Şekil 3.6. Spektrofotometre

Şekil 3.6.’ daki spektrofotometre cihazı makrofungus izolatlarının derin kültür koşullarında ürettiği enzim aktivitesi ve protein miktarının tayin edilmesi amacı ile kullanılmıştır.

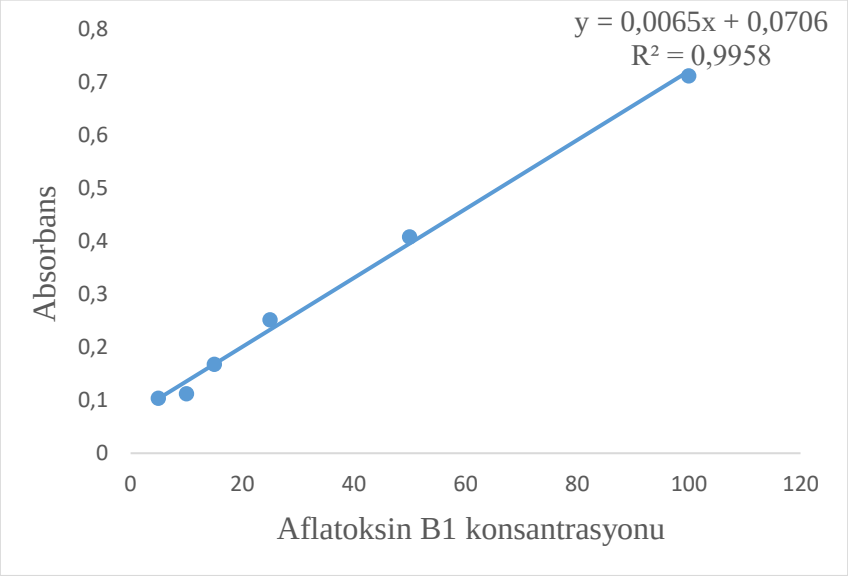
3.1.5.4. Mikroplate okuyucu

Şekil 3.7.’ deki mikroplate okuyucu toksinlerin miktar ve degradasyonunun tayini amacı ile kullanılmıştır.



Şekil 3.7. Mikroplate okuyucu

Mikroplate okuyucu tarafından toksin ölçümü yapılırken farklı konsantrasyonlarda toksinler ölçülmüştür. Elde edilen ölçüm sonucunun doğruluğunu kontrol etmek için standart eğri çıkarılmıştır (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Mikroplate okuyucu standart eğri grafiği

3.1.5.5. FPLC

Bu çalışmada HiTrap Q HP kolon ile Ion excange (Anion) tekniği kullanılmıştır. Böylelikle proteinlerin anyon etkileşimlerinden faydalanılarak kolona tutunmaları ve farklı iyon değerlerine göre kromotografik olarak ayrıştırılmaları sağlanmıştır.

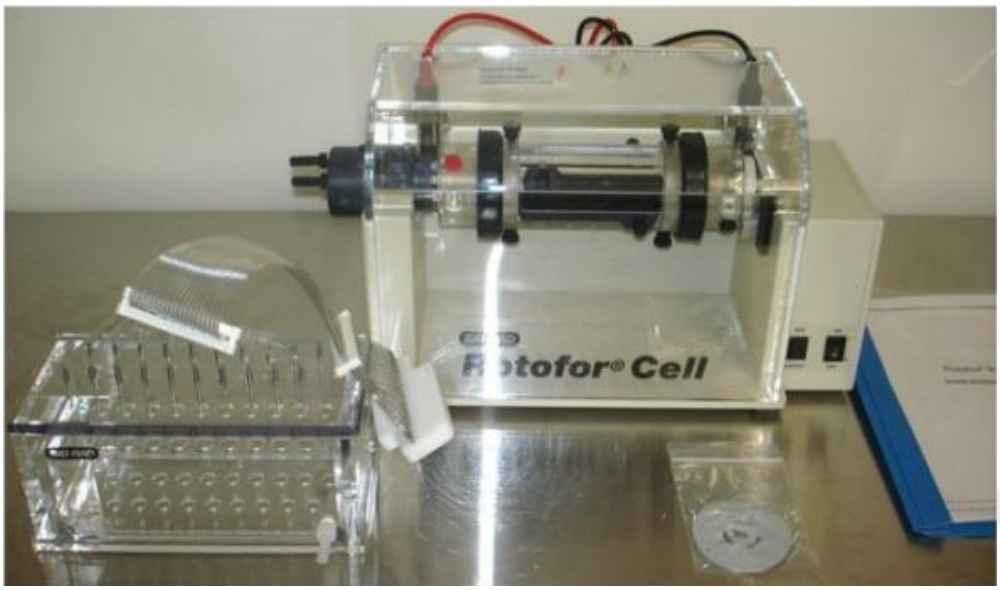


Şekil 3.9. FPLC cihazı

Şekil 3.9.’ daki FPLC cihazı ile makrofungus izolatın kültür sıvısı proteinlerinin ön ayrıştırılması yapılmıştır.

3.1.5.6. IEF

Şekil 3.10.’ daki IEF cihazı, ön FPLC ile kısmen ayrıştırılmış protein fraksiyonlarının daha fazla ayrıştırılması için kullanılmıştır.



Şekil 3.10. IEF cihazı

3.2. Yöntem

3.2.1. Toksin Degrade Eden Fungus İzolatlarının Belirlenmesi

Çalışmanın ilk aşaması olarak aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonu yapabilme yeteneğine sahip olan fungus izolatlarını belirlemek üzere bir tarama çalışması gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Toksin eldesi ve kullanılacak AFB_1 belirlenmesi

Tarama çalışmasında kullanılan okratoksin A, Sigma Aldrich firmasından 32937 kodlu ürün olarak temin edilmiştir.

Aflatoksin B_1 toksini ise, toksin ürettiği onaylanmış olan yabani *Aspergillus flavus* suşunun YES Agar besi ortamına inoküle edilerek 25 °C'de 8 gün büyütülmesi ile üretilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda üzerinde fungus büyümüş olan besi ortamından kesilen 6 mm çapında 60 adet besiyeri diski 10 ml ekstraksiyon sıvısı ile 30 dakika sonikasyona maruz bırakılmıştır. Sonikasyon süresinin sonunda 4000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir (Alberts vd., 2006). Santrifüjden sonra süpernatant kısmı alınarak 8000 rpm' de 5 dk daha santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı çeker ocakta tüpler içinde uçuncaya kadar bekletilmiştir. Daha sonra tüplere 4 ml metanol ilave edilmiş ve vorteks ile hafifçe karıştırılmıştır. Metanolde çözünmüş olan AFB_1 13000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra TLC plaklarına yükleme yapılmıştır. Bunun için plakanın üzerine 1,5 cm ara ile her noktaya 40 µl ekstrakte edilmiş AFB_1 spotlanmıştır. İlk noktaya 20 µl standart aflatoksin karışımı marker olarak spotlanmıştır. Spotlama işleminden sonra plaka, içinde hareketli faz TEF olan TLC tankına alınmıştır. TLC tankında mobil faz 35 dakika silika plaka üzerinde yürütülmüştür. Tanktan çıkarıldıktan sonra kuruması beklenilen TLC plakaları UV kabine alınmış ve burada marker toksinde AFB_1 ile aynı Rf değerine sahip olan bantlar kesilmiş ve tüplere aktarılmıştır. Tüpe aktarılan silika 4 ml kloroformda çözünmüştür. TLC plakaları ile yeniden saflık kontrolü yapılmıştır.

AFB_1 ekstraksiyon sıvısı sırasıyla altı farklı ependorf tüpe 0,3 – 1 – 1,5 – 3 – 7 ve 10 µl' lik hacimlerde aktarılmıştır. Her bir ependorfun üzeri Kirk Broth Besi Ortamı ile son hacmi 1000 µl olacak şekilde tamamlanmıştır. Daha sonra bu karışıma 500 µl kloroform ilave edilmiştir. Vorteks ile kısa süre hafifçe karıştırılmıştır (Alberts vd., 2006). Karışım 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş, çökelti başka bir tüpe alınmış ve içindeki kloroform uçuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüpteki toksin kalıntısı 200 µl kloroform ile yeniden çözülmüş ve hafifçe vorteksle karıştırılmıştır. Çözeltilerin 20 µl'lik bölümleri TLC plakalarına spotlanmış ve TLC plakası UV lamba altında gözlenmiştir (Alberts vd., 2006).

3.2.1.2. Toksin giderici izolatların belirlenmesi

Kültür koleksiyonunda yer alan makrofungus izolatlarından toksin giderici özelliği olanların belirlenmesi amacı ile , izolatlar üretildikten sonra degradasyon oranı HPTLC ile belirlenmiş ve HPLC ile onaylanmıştır.

A. Fungus izolatlarının üretilmesi

Toksin degradasyon oranı araştırılacak olan fungus izolatları PDA besiyerinde 28 °C de üretilerek aktiflenmiştir. Fungal koloninin aktif üreme gösteren koloni sınırlarındaki bölgelerden alınan 6 mm çapıdaki misel diskleri sıvı PMP besiyerinin inokülasyonu amacı ile kullanılmıştır. Her 100 ml'lik PMP besiyerine 6 disk olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve 5 gün boyunca üremeye bırakılmıştır. Üreme sonunda oluşan pelletler homojenizatör ile 100 ml distile suda homojen hale getirilmiştir. Her 250 ml' lik erlende bulunan 100 ml' lik Kirk Broth besi ortamına distile suda homojenize edilmiş misel süspansiyonundan 5 ml ilave edilmiştir. Organizmalar 28 °C' de 10 gün 125 rpm koşullarında inkübe edilmiştir. Filtre kağıdı (Whatman 0,45 µm) ile hasat edilen kültür sıvısı tarama çalışması için kullanılmıştır.

B. Degradasyon oranının belirlenmesi

AFB_1 degradasyon oranının belirlenmesi için 2 ml' lik ependorf tüplere 493 µl kültür sıvısı ve 7 µl AFB_1 çözeltisi ile 500 µl sodyum asetat tamponu eklenmiştir. OTA için de yine 2 ml' lik tüplere 485µl kültür sıvısı ve 15 µl OTA standart çözeltisi ile 500 µl sodyum asetat tamponu eklenmiştir. Her iki toksin için oluşturulan reaksiyon karışımları 25 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 500 µl kloroform ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Daha sonra vorteks ile hafifçe karıştırılıp 1500 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra alt fazdaki kloroform içeren tabaka başka bir tüpe alınmış ve oda sıcaklığında kloroform uçuncaya kadar beklenmiştir. Tüpteki kalıntılar 200 µl kloroform ile yeniden çözülmüş ve vorteks ile hafifçe karıştırılmıştır.

Degradasyon oranlarının tayini için son çözeltilerin 20 µl'lik bölümleri TLC plakalarına spotlanmıştır. TLC plakası UV lamba altında gözlenmiştir. Daha sonra plakalar

HPTLC cihazında okunmuştur. AFB_1 taramasında kullanılan plakalar 365 nm dalga boyundaki ışıkta, OTA taramasında kullanılan plakalar ise 312 nm dalga boyundaki ışıkta gözlenmiş ve ışıma veren alan ölçülmüştür. Sonuç olarak, organizmaların kültür sıvısı ile muanele edilen ve edilmeyen toksin benekleri karşılaştırılarak her iki toksinin degradasyon oranı tayin edilmiştir. (Baek vd., 2014)

C. Degradasyon oranının onaylanması

HPTLC cihazı ile yüksek oranda degradasyon verdiği belirlenen fungus izolatlarının toksin degradasyon oranları HPLC aracılığı ile onaylanmıştır. Bu amaçla, HPTLC için gerçekleştirilen tüm çalışmalar aynı biçimde tekrarlanmıştır. Sadece son çözücü olarak kloroform yerine metanol kullanılmıştır. Daha sonra hafifçe vorteks ile karıştırılıp 1500 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst fazdaki etil asetat içeren tabaka başka bir tüpe alınmış ve oda sıcaklığında etil asetat uçuncaya kadar beklenmiştir. Tüpteki kalıntılar 200 µl metanol ile yeniden çözülmüş ve hafifçe vorteksle karıştırılmıştır. Elde edilen çözeltilerin 20 µl'lik bölümleri HPLC cihazına enjekte edilmiş ve AFB_1 için 365 nm dalga boyunda UV dedektör ile ölçümü yapılmıştır.

OTA için ise 312 nm ex (excitation = Uyarma) ve 333 em (emission = yayma) dalga boyunda flouresan dedektör ile ölçümü yapılmıştır. AFB_1 ölçümü için gradient, OTA ölçümü için isocratic (Sabit) mobil faz akışı sağlanmıştır. AFB_1 ölçümü için kolon sıcaklığı olarak oda sıcaklığı, OTA ölçümü ise 40 °C kullanılmıştır. Standart olarak ticari AFB_1 ve OTA da çalışmaya dahil edilmiştir. Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.' te AFB_1 ve OTA ölçümü için kullanılan HPLC koşulları belirtilmiştir (Varga vd., 2005).

Çizelge 3.3. AFB_1 Ölçümü için HPLC Koşulları

HPLC	Hp 1050 HPLC system Ti series
Dedektör	UV dedector (365 nm)
Kolon	150 mm x 4.6 mm C18 Gemini Phenomenex, 5 µm particle
Akış Hızı (ml/min)	1
Kolon Sıcaklığı (°C)	25
Enjeksiyon Hacmi (µl)	20
Mobil Faz	Asetik asit % 0,1 ve Metanol %100

Çizelge 3.4. OTA Ölçümü için HPLC Koşulları

HPLC	LC – 10 AT Shimadzu / SCL – 10 VP Controller Shimadzu
Dedektör	Flouresan dedector (312 - 333 nm)
Kolon	250/4 Nucleodor C18 Gravity 5 µm particle Macherey - Nagel
Akış Hızı (ml/min)	1
Kolon Sıcaklığı (°C)	40
Enjeksiyon Hacmi (µl)	20
Mobil Faz	Asetik asit % 0,2 ve Asetonitril %100

3.2.2. Aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonunun optimize edilmesi

İlk aşamada seçilen fungus izolatları ile aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonunun gerçekleşebileceği en iyi besinsel ve çevresel koşulları belirlemek üzere ardışık çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Enzim üretimi için uygun besiyeri seçimi

PDA besiyeri üzerinde üretilen fungus kültürlerinin aktif üremenin gerçekleştiği koloni sınırlarından her biri 6 mm çapında misel diskleri çıkarılmıştır. İnokülasyon, her bir 100 ml'lik PMP besiyerine 6 disk olacak şekilde yapılmıştır. Fungus izolatları 5 gün boyunca inkübe edildikten sonra hasat edilen fungal miselyumlar homojenize edilerek inokülant olarak kullanılacak olan misel süspansiyonu hazırlanmıştır.

Tarama çalışmasında kullanılan Kirk Broth'un 5 farklı modifiye versiyonu ve her bir modifiye versiyonun buğday kepeği ilave edilmiş versiyonları X kodu eklenerek hazırlanmıştır. (MKM 1, MKM 1X, MKM 2, MKM 2X, MKM 3, MKM 3X, MKM 4, MKM 4X, MKM 5 ve MKM 5X) Her besiyeri tipinden 250 ml'lik erlenlere 100'er ml olarak dağıtılmıştır. Homojenize edilmiş pelletler ile %5 oranında inoküle edilen besiyerleri 28 °C inkübasyon sıcaklığı ve 125 rpm çalkalama hızında 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Whatman filtre kağıdı ile filtre edilen kültür sıvıları daha sonra enzim aktivitesi ve protein miktarlarının ölçümü için -18 °C'de saklanmıştır.

3.2.2.2. İstatistiksel deney tasarımı ile optimizasyon

Aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonu için en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla önce besiyeri içeriği ve çevresel koşulların AFB_1 ve OTA degradasyonu üzerindeki etkileri daha sonra da bu değişkenlerin hangi düzeyde iken etkili oldukları belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.2.3. Plackett Burman deney tasarımı

AFB_1 ve OTA degradasyonu bakımından başarılı olan makrofungus izolatlarının bu yeteneklerine etki eden olası besiyeri içeriği ve çevresel koşullar içerisinden degradasyon oranını en fazla artıran değişkenleri belirlemek üzere Plackett – Burman deney tasarımı uygulanmıştır (Plackett ve Burman, 1946). Plackett – Burman tasarımı ile besiyeri içeriği ve çevresel koşulların iki farklı seviyesi kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan değişkenler ve seviyeleri Çizelge 3.5.' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Plackett-Burman deney tasarımı ile etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri

Değişken Kodu	Değişkenler		Düşük Değer (- 1)	Yüksek Değer (+ 1)
X_1	Karbon kaynağı (%)	Glukoz	0	2
X_2		Fruktoz	0	2
X_3		Sukroz	0	2
X_4		Laktoz	0	2
X_5		Nişasta	0	2
X_6	Azot kaynağı (%)	Yeast ekstrakt	0	0.2
X_7		Meat ekstrakt	0	0.2
X_8		Soy Pepton	0	0.2
X_9		Kazein	0	0.2
X_{10}	İlave substrat (%)	Buğday kepeği	0	0.2
X_{11}	İnkübasyon Sıcaklığı ($^{\circ}$C)		25	30
X_{12}	Besiyeri Başlangıç pH değeri		4	6
X_{13}	Karıştırma hızı (rpm)		100	150
X_{14}	İnokulum miktarı (%)		2.5	7.5
X_{15}	İnkübasyon süresi (gün)		8	12

Plackett – Burman tasarımı ile (n) sayıdaki deney ile (n-1) adet değişkenin etkisi araştırılmaktadır. AFB_1 ve OTA degradasyonunda başarılı olan her iki izolat için 15 değişkenin etkisinin araştırılması kararlaştırılmıştır. Bu amaç için seçilen 15 değişkenin, AFB_1 ve OTA degradasyonu üzerine etkileri Çizelge 3.6.' da gösterilen tasarım kullanılarak 16 deneme ile araştırılmıştır.

Çizelge 3.6. AFB_1 ve OTA degradasyonu için kullanılan Plackett – Burman deney tasarımı

Değişken / Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}
1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
2	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1
3	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
4	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
5	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1
6	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1
8	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1
9	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1
10	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1
12	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1
13	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1
14	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
15	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

3.2.2.4. Response Surface tasarımı

Plackett - Burman tasarımından elde edilen sonuçlar ile, AFB_1 ve OTA degradasyonu üzerine en fazla etki gösteren değişkenler seçilmiştir. Response Surface tasarımı ise belirlenen bu değişkenlerin hangi miktar/konsantrasyonda en etkili olduğunu belirlemek için kullanılmıştır.

Yapılan çalışmada Plackett – Burman deney tasarımından elde edilen sonuçlar ile hem AFB_1 degradasyonu için hem de OTA degradasyonu için Box-Behnken deney tasarımının uygulanması kararlaştırılmıştır. Plackett – Burman deney tasarımından elde edilen sonuçlara göre belirlenen değişkenler ve seviyeleri belirlenerek Response Surface parametreleri seçilmiştir. (Çizelge 3.7.) Bu parametrelere göre 3 seviye olarak tasarlanan Box-Benhken deney tasarımı ise Çizelge 3.8.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Response Surface deney tasarımı ile etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri

Değişken kodu	Değişkenler	Seviyeler		
		- 1	0	+ 1
X_3	Sukroz (%)	1	2	3
X_6	Yeast Ekstrakt (%)	0.1	0.2	0.3
X_{10}	Buğday kepeği (%)	0.1	0.2	0.3
İnkübasyon Sıcaklığı ($^{\circ}$C)		28		
Besiyeri Başlangıç pH		5		
Karıştırma hızı (rpm)		125		
İnokulum miktarı (%)		7.5		
İnkübasyon süresi (gün)		12		

Çizelge 3.8. Response Surface Deney Tasarımı

Değişken / Deneme	X_3 (Sukroz; %)	X_6 (Yeast Ekstrakt; %)	X_{10} (Buğday kepeği; %)
1	0	+1	+1
2	0	0	0
3	-1	0	-1
4	0	0	0
5	-1	-1	0
6	0	-1	-1
7	0	0	0
8	0	+1	-1
9	+1	+1	0
10	-1	+1	0
11	0	0	0
12	+1	0	+1
13	+1	0	-1
14	-1	0	+1
15	0	-1	+1
16	+1	-1	0
17	0	0	0

Response Surface yöntemi analizlerinde aşağıdaki kuadratik eşitlik kullanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2$$

Burada Y (yanıt) beklenilen tepki, β_0 sabit terim, β_{ii} kareli terimlerin katsayısı, β_{ij} ikili etkileşimlerin katsayısı ve x_i açıklayıcı (bağımsız) değişkenlerin kodlanmış değerleridir.

3.2.3. Toksisitenin belirlenmesi

Toksinlerin degradasyon öncesi ve sonrasındaki toksisite oranlarının belirlenebilmesi amacı ile çok bilinen *Artemia salina* testi kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle deney hayvanı olarak kullanılmak üzere *Artemia salina* larvası üretilmiştir. Distile su ile hazırlanan % 3' lük tuzlu su çözeltisine yaklaşık 100 mg *Artemia salina* (Brine shrimp) yumurtası ilave edilmiştir. Yumurtaların inoküle edildiği bu çözelti bir üretim kabına alınarak 24 saat 28 °C etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.11.; Harwig ve Scott, 1971) Üretim kabında 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda suda *Artemia salina* hareketlerinden inkübasyonun başarılı olduğu ve yumurtalardan ergin bireylerin çıktığı anlaşılmıştır.



Şekil 3.11. *Artemia salina* yumurtalarının inkübasyon düzeneği

In vivo toksisite testinde, degradasyona uğramayan AFB_1 ve OTA'nın *Artemia salina* larvaları için yüksek toksik etki ve mortalite göstermesi, AFB_1 ve OTA degrade olduktan

sonra toksisitenin azalması ve *Artemia salina* ölüm oranlarında bir düşüş gerçekleşmesi beklenmektedir.

Bu çalışmada deney grupları olarak fungal izolatların kültür sıvıları tarafından degrade edilmiş ve edilmemiş AFB_1 ve OTA çözeltileri (100 µg/ml) *Artemia salina*'nın yaşam ortamına ilave edilmiştir. Negatif kontrol çözeltileri olarak % 3' lük tuzlu su çözeltisi (Kontrol 1) ve kontrol 1 içinde %1 oranında eklenmiş metanol çözeltisi (Kontrol 2) kullanılmıştır. Pozitif kontrol çözeltisi olarak ise kontrol 1 içinde % 0.1 oranında çözünmüş potasyum dikromat çözeltisi (Kontrol 3) kullanılmıştır. *Artemia salina* gelişimini kontrol 1' deki ile aynı koşullarda gerçekleştirdiği için bu ortamda meydana gelen larva ölümlerinin toksin kaynaklı olmadığı kabul edilmiştir. Toksinler metanol içinde çözülerek *Artemia salina*' nın gelişim ortamına eklendiği için kontrol 2' de meydana gelen ölümler de metanol etkisinden kaynaklanan ölüm oranları olarak kabul edilmiştir. Kontrol 3' te potasyum dikromat *Artemia salina* için toksik etki oluşturduğundan inkübasyon sonunda organizmaların tamamının ölmesi beklenmektedir.

Deney ve kontrol grupları için gerçekleştirilen çalışmalar 3 paralel olarak uygulanmıştır. Her petriye 10 adet *Artemia* larvası aktarılarak 28 $^{\circ}$C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 6. ve 24. saatlerinde sayım yapılarak canlı ve ölü *Artemia* sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler mortalite ve toksisite oranlarının belirlenebilmesi amacı ile kullanılmıştır.

Kontrol 1' den farklı olarak kontrol 2' de metanol bulunmaktadır. Bu nedenle kontrol 2' de deney grubu ile toksin dışında eşit koşullar mevcuttur. Hesaplama yapılırken kontrol grubu olarak kontrol 2 kullanılmıştır.

Mortalite oranı hesaplanırken aşağıdaki formülü kullanılır.

M = (n – deney grubundaki canlı *Artemia* sayısı) / n x 100

M = Mortalite oranı (%)

n = Kontrol 2' deki canlı *Artemia* sayısı

3.2.4. Protein saflaştırma çalışmaları

Degradasyondan sorumlu enzimleri fazla miktarda üretebilmek için, protein üretiminde en başarılı olduğu bilinen modifiye Kirk broth (4X) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri, 250 ml hacmindeki erlenlere 100'er ml olacak biçimde dağıtılmıştır. Hazırlanan erlenlere inokülant olarak, homojenize edilmiş pelletler %5 oranında aktarılmıştır. İnoküle edilen besiyerleri 125 rpm ve 28 ˚C'de 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra filtre kağıdı ile süzülen kültür sıvıları kullanılıncaya kadar –18 ºC' de saklanmışlardır.

Kültür sıvıları, kullanılacakları zaman oda sıcaklığında bekletilerek çözünmüşlerdir. Kültür sıvıları çözündükten sonra + 4 ˚C'de 10.000 rpm'de santrifüj edilerek polisakkarit fraksiyonları uzaklaştırılmıştır. Kültür sıvısı 0,45 µm por çaplı filtre ile filtrasyona tabii tutulmuştur. Kültür sıvısı 10,000 MWCO ultrafiltrasyon tüpünde 4500 rpm'de + 4 ˚C'de 10 kat filtre edilmiştir. Filtrasyon sonucu elde edilen sıvı + 4 ˚C'de saklanmıştır.

FPLC ile protein saflaştırma

Elli mM derişimde bis. Tris tamponu (pH = 5.5) hazırlanmış ve tampon A olarak isimlendirilmiştir. Aynı tampon ile 1 M NaCl çözeltisi hazırlanarak tampon B olarak kodlanmıştır. Her iki tampon da 0,45 µm por çapındaki filtre ile filtrasyona tabii tutulmuştur. Kültür sıvısı ile tampon A 50:50 oranlarında karıştırılmıştır. Hazırlanan kültür sıvısı, Gradiyent akış olarak programlanan FPLC'ye enjekte edilmiş, fraksiyonlar otokollektör ile toplanmıştır. Elde edilen fraksiyonlar kullanıncaya kadar alüminyum folyo ile kaplanmış şişelerde + 4 ˚C'de soğuk odada korunmuştur.

Fraksiyonların içerdiği proteinlerin molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yapılmıştır. Örnekler yükleme boyası ile toplamda 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra kaynayan suda 5 – 10 dakika bekletilerek boyanın proteinler tarafından bağlanması sağlanmıştır. Örnekler kuyulara pipetlenmiştir. İlk kuyucuğa marker yüklenmiştir. Elektroforez değerleri 120 volt ve 1 saat olarak ayarlanmıştır. Elektroforezin yürütülmesi markerin aşağıya indiğinin görülmesi ile sonlandırılmıştır.

Fiksasyon sıvısı ile 15 – 20 dakika inkübe edilen jel, boyama çözeltisi ile 30 – 180 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra temizleme çözeltisi ile 5 – 15 dakika muamele edilerek bantlar belirginleştirilmiştir.

3.2.4.2. Degradasyon yapması beklenen enzimlerin aktivite ve degradasyon ilişkisi

FPLC ile ayrıştırılan proteinler için enzim aktivite testi ve AFB_1 degradasyon testi yapılmıştır. Böylece degradasyondan sorumlu olan enzimin tanımlanması amaçlanmıştır.

Mangan peroksidaz ve lakkaz için her kuyucuğa tampon ve substratlar konulmuştur. Lakkaz için 240 µl sodyum asetat, 30 µl ABTS ve 30 µl kültür sıvısı eklenmiştir. Mangan peroksidaz için 180 µl Na-tartarat, 15 µl DMP, 15 µl $MnSO_4$, 30 µl H_2O_2 ve 30 µl kültür sıvısı eklenmiştir. AFB_1 degradasyonu ölçümü için herhangi bir ekstraksiyon yapmaksızın 150 µl kültür sıvısı doğrudan mikroplate kuyucuklarına konulmuştur. Daha sonra her kuyucuğa eşit miktarda 150 µl Na – Asetat tampon çözelti ilave edilmiştir. Ayrıca 15 µl standart AFB_1 ilave edilmiş, Mikroplate okuyucu 28 $^{\circ}$C ve AFB_1 için 365 nm UV dalga boyuna ve okuma süresi 1 saat olarak ayarlanmıştır. Kontrol olarak inkübe edilmemiş standart modifiye Kirk Broth kültür sıvısı kullanılmıştır. 1 saatlik okuma sonunda elde edilen değişim değerleri ile % degradasyon belirlenmiştir.

3.2.4.3. IEF ile protein saflaştırma

FPLC'den alınan örneklerden AFB_1 degradasyonu yapan fraksiyon, daha sonra IEF ile kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bunun için önce FPLC'de kullanılan tampon çözelti ile kullanılacak olan örnekler 50 – 60 ml'e tamamlanmıştır. Daha sonra 0.5 ml pH = 3 – 10 taşıyıcı amfolitler örneğe ilave edilmiştir. Rotofor cell ile 3 saatlik bir elektroforez gerçekleştirilerek renk gradiyenti oluşumu gözlenmiştir. Ayrıştırılacak örnek 24 fraksiyona ayrılmıştır. Yeniden SDS – PAGE ve her fraksiyonun pH değerinin ölçülmesi ile beraber bir degradasyon testi daha yapılmıştır.

AFB_1 degradasyonundan sorumlu proteini belirlemek için, IEF fraksiyonlarından alınan 150 µl protein çözeltisi, ekstraksiyon yapılmaksızın doğrudan mikroplate

kuyucuklarına konulmuştur. Daha sonra her kuyucuğa eşit miktarda 150 µl sodyum asetat tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımına 15 µl standart AFB_1 ilave edildikten sonra, mikroplate okuyucu 28 °C ve 365 nm dalga boyuna ayarlanmış ve reaksiyonun absorbansı 1 saat boyunca izlenerek AFB_1 degradasyon oranı belirlenmiştir. Kontrol olarak 50 mM Bis. Tris çözeltisi (pH = 5,5) kullanılmıştır.

Tüm çalışmalar üç paralel halinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar, ortalama ± standart sapma biçiminde ifade edilmiştir.

3.2.5. Yüksek toksin degradasyonuna neden olan izolatların tanımlanması

Çalışmanın bu aşaması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bilim dalı doktora öğrencisi Ayşe Betül Karaduman tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle seçilen organizmalar ait miseller PDB besiyerine iğne öze yardımıyla aktarılmıştır. Kültürler, 28 °C' de 100 rpm' de 1 hafta süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda filtrasyon ilşe hasat edilen pelletler, steril distile su ile yıkanarak, liyofilize edilmiştir.

DNA ekstrakte etmek için, yeteri kadar liyofilize pellet, steril kürdan yardımıyla mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak toz hale getirilmiştir. Örnek üzerine 500 µl CTAB Buffer (pH 7.5) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Mikrosantrifüj tüpü 65 ˚C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Yine aynı tüpe 500 µl kloroform eklenmiş ve tüp ters düz edilerek 5 dk 14.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Sulu faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 500 µl kloroform ekleme ve tüp ters düz edilerek 5 dk 14.000 rpm' de santrifüj edilme işlemi ile sulu faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılma işelmleri tekrarlanmıştır.

Bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sulu fazın 2 katı kadar hacimde (700 µl) %96' lık soguk (-20˚C) etanol eklenmiştir. DNA' nın prespitasyonu için 1 gece boyunca -20˚C' de bekletilmiştir. 4 ˚C' de 14.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Kültür sıvısı dikkatli bir şekilde atılmış ve pellet üzerine 500 µl soguk (-20˚C) %70' lik etanol ilave edilmiştir. 14.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiş ve dikkatli bir sekilde

kültür sıvısı atılarak pellet kurutulmuştur. Kurutulan pellet 50 µl Tris-EDTA Buffer (pH 8.0)' da çözülerek -20˚C' de saklanmıştır.

Çizelge 3.9. PCR Koşulları

	Sıcaklık (˚C)	Süre	Döngü Sayısı	Reaksiyon Tüpü İçeriği ve Hacmi (µl) -Finnzymes Taq Polimeraz-		
Başlangıç denatürasyonu	94	4 dk			1 x	x
Denatürasyon 1	94	30 sn	x 35	PCR Buffer	5	
Bağlanma 1	56	55 sn		MQ	38,5	
Uzama 1	72	30 sn		$MgCl_2$ (50 mM)	2	
Denatürasyon 2	-	-		dNTP	1	
Bağlanma 2	-	-		Primer 1 (ITS 1)	1	
Uzama 2	-	-		Primer 2 (ITS 4)	1	
Son uzama	72	10 dk		Taq DNA Polimeraz	0,5	
				Kalıp DNA	1	
				Toplam	50	

Agaroz jel ile elektroforez yaparken 1X TAE ile % 1 oranında agaroz jel hazırlanmıştır. TAE – agaroz karışımı hazırlandıktan sonra erlendeki sıvı seviyesi işaretlenmiş ve mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Jel bir miktar soğuduktan sonra içerisine DNA işaretleyici boya ilave edilmiş ve tanka dökülerek taraklar yerleştirilmiştir.

Donmuş agaroz jele örnekler yüklenirken, her örnek jel yükleme boyası ile tek tek karıştırılarak yüklenmiştir. Jel ve yüklenen DNA miktarına göre uygun gerilim ve sürede elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR kit protokolüne uygun olarak DNA'nın bir bölgesi çoğaltılmıştır. Bu çoğaltma işlemi gerçekleştirilirken Çizelge 3.9.' daki koşullara uygun programlanmıştır.

PCR ile çoğaltılan DNA jel ekstraksiyon kiti ile ekstrakte edilmiştir. Bir mikrosantrifüj tüpünde PCR ürünü, 100 µl "Binding buffer" ile karıştırılmıştır. Bu karışım "Purification column" a aktarılmış ve 5dk beklenmiştir. 1 dk, 10.000 g' de santrifüj edilmiştir. "Collection tube" boşaltılarak, kolona 750 µl Wash Buffer eklenmiştir. 1 dk, 10.000 g' de santrifüj edilmiştir. "Collection tube" bosaltılmış ve 2 dk, 10.000 g' de santrifüj edilmiştir.

"Collection tube" atılmış ve yerine temiz bir mikrosantrifüj tüpü koyulmuştur. Kolona PCR ürünü hacmi kadar "Elution buffer" eklenmiş ve 5 dk beklenmiştir. 1 dk 10.000 g' de santrifüj edilmiş ve "Purification column" atılmıştır. Mikrosantrifüj tüpü -20 ˚C' de saklanmıştır. İzole edilen DNA dizi analizi ve genetik identifikasyon için kullanılacaktır.

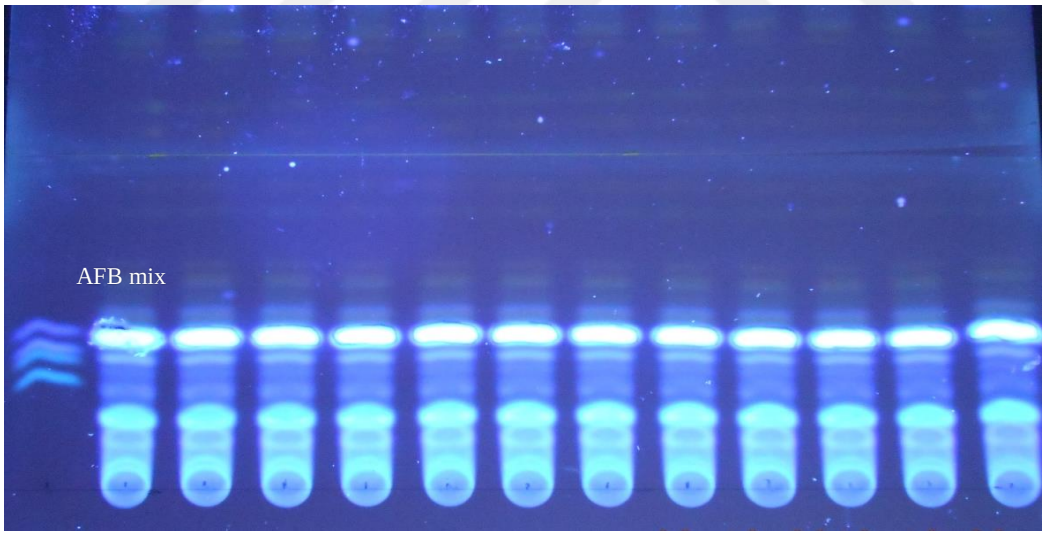
İzole edilen ve saflaştırılan DNA örnekleri ile ITS1 ve ITS4 bölgelerine uygun primerlerle PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmiş, agaroz jelde kontrol edilmiş ve İontek ve MOBAM kuruluşlarından hizmet alımı yolu ile dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizilerin BLAST analizi gerçekleştirilerek GENBANK ta depolanmış ve erişim numaraları alınmış dizilere benzerlik oranları belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Toksin Degrade Eden Fungus İzolatlarının Belirlenmesi

4.1.1. Toksin eldesi ve kullanılacak AFB_1 miktarının belirlenmesi

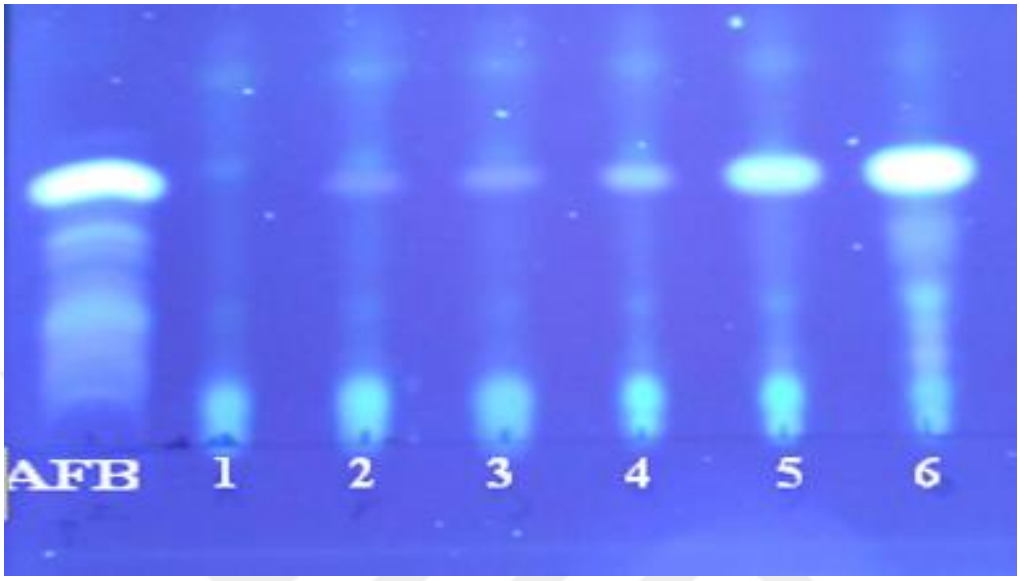
Aspergillus flavus tarafından üretilen ve ekstrakte edilen total toksin TLC plakaları üzerinde yürütülerek gözlemlenmiştir. Bu arada Aflatoxin Mix 4 solution marker olarak kullanıldığı için hangi bandın hangi aflatoksin türevi olduğu Rf değerlerinden anlaşılmaktadır. En büyük Rf değerine sahip ve en parlak bantlar aflatoksin B_1'e aittir. Şekil 4.1 ' de 365 nm dalga boyu UV ışıkta, preperatif silika jel plakaya spotlanmış olan ekstraksiyon sıvısındaki AFB_1 görülmektedir. Silika jel plakanın 1. spotu standart aflatoksin miks 4' tür. Daha sonra aflatoksin B_1 bantları cam silika plakalardan kazınarak ekstrakte edilmiş ve tarama çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *A. flavus* tarafından üretilen AFB_1

HPTLC koşullarında degradasyon çalışmalarının verimli biçimde sürdürülebilmesi için öncelikle uygun ışıma elde etmek gerekmektedir. Bu nedenle, TLC plakası üzerinde elde edilen ekstraktlardan farklı miktarlarda ekstrakt spotlanarak yürütüldükten sonra görünebilirliği en iyi olan miktar belirlenmek istenmiştir. Şekil 4.2. de sunulan beneklerden

5 numaralı olanı (0,8 µg / ml derişim) ile en uygun parlaklık elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamasında bu konsantrasyonda AFB_1 kullanılmıştır.



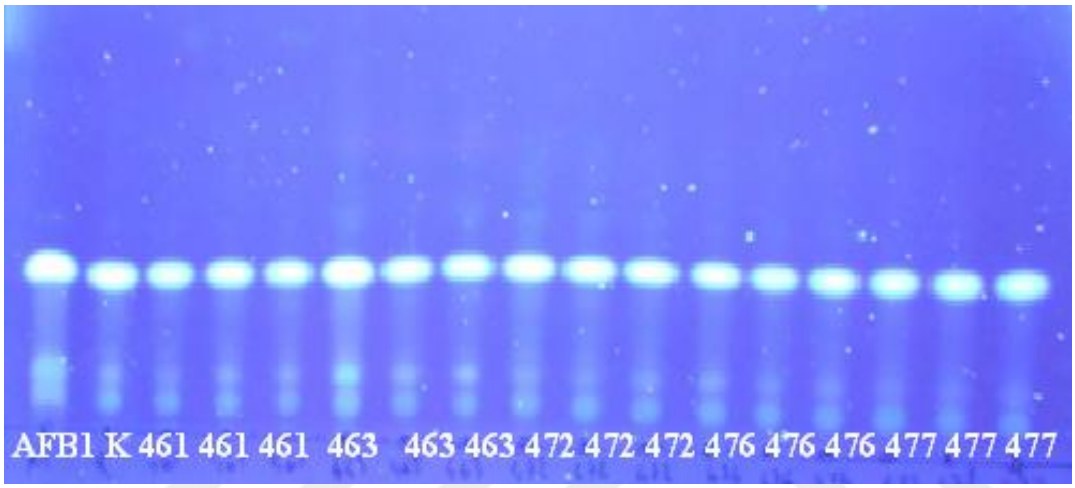
Şekil 4.2. TLC plakalarına uygulanacak AFB_1 miktarının belirlenmesi (**1:** 0,05 µg / ml; **2:** 0,1 µg / ml; **3:** 0,2 µg / ml; **4:** 0,4 µg / ml; **5:** 0,8 µg / ml ve **6:** 1,2 µg / ml)

4.1.2. Toksin giderici fungus izolatlarının tayini

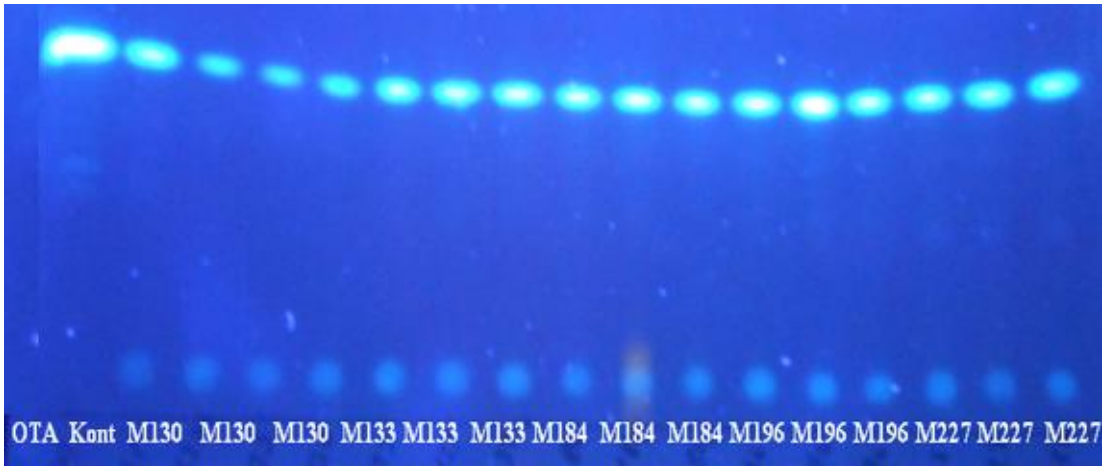
Çok sayıda fungus izolatının AFB_1 ve OTA giderim potansiyelini hızlı biçimde tayin edebilmek için semikantitatif bir yöntem olan HPTLC kullanılmıştır. HPTLC' nin en önemli avantajlarından bir tanesi TLC plakalarının uzun süre saklanabilmesidir. Diğer bir avantajı ise HPLC ile belirleme yöntemine göre daha ucuz bir yöntem olmasıdır. Bu nedenle daha az maliyetle daha çok sayıda örnek ölçümüne olanak sağlayacaktır. Bunun dışında pratik bir yöntem olup aynı anda çok sayıda örnek birlikte okunabilmektedir. HPLC ile yapılan ölçümlerde ise her seferinde yalnız bir örnek okunabilmektedir. Örnekler okunurken kolondan metabolitin geçmesi ve yeni örneğe kolonun hazırlanması zaman almaktadır. Bu örneklerin paralellerinin de olduğu göz önüne alınırsa çok fazla zaman kaybı olacaktır.

Her ne kadar HPLC ölçüm duyarlılığı diğer yöntemlerden çok daha iyi olsa da HPTLC yöntemi de paralel bir duyarlılığa sahiptir. Fakat HPTLC yine de semikantitatif bir yöntemdir.

Çeşitli fungus izolatlarının AFB_1 ve OTA giderimleri sırası ile 365 ve 312 nm dalga boyundaki UV lamba altında gözlemlenerek, Şekil 4.3. ve Şekil 4.4' te ifade edilmiştir.



Şekil 4.3. Fungus kültür sıvıları ile AFB_1 yıkımının İTK ile belirlenmesi



Şekil 4.4. Fungus kültür sıvıları ile OTA yıkımının İTK ile belirlenmesi

Her organizma için elde edilen AFB_1 ve OTA degradasyon oranları Çizelge 4.1.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Fungus izolatlarının HPTLC ile belirlenen AFB_1 ve OTA giderim oranları

OBCC Kodu	**Makrofungus türü**	**AFB_1 Degradasyonu (%)**	**OTA Degradasyonu (%)**
Ag461	*Pleurotus calyptratus*	30,00±0,32	29,00±0,18
Ag463	*Pleurotus cornucopiae*	48,39±0,78	22,00±0,15
Ag468	*Pleurotus dryinus*	62,50±0,21	42,30±0,36
Ag470	*Pleurotus dryinus*	43,35±0,54	53,81±0,74
Ag471	*Pleurotus eryngii*	10,18±0,08	15,00±0,11
Ag472	*Pleurotus ostreatus*	29,00±0,18	48,21±0,51
Ag475	*Pleurotus ostreatus*	23,18±0,12	26,00±0,24
Ag476	*Pleurotus ostreatus*	45,00±0,21	13,00±0,18
Ag477	*Pleurotus ostreatus cv. florida*	33,00±0,32	18,00±0,13
Ag479	*Pleurotus pulmonarius*	30,50±0,25	38,00±0,36
02	*Lentinus arcularius*	13,41±0,09	38,62±0,34
03	*Ganoderma* sp.	14,70±0,09	0,00±0,00
04	*Suillus bovinus*	22,72±0,25	46,72±0,58
05	*Tricholoma equestre*	22,55±0,15	27,08±0,21
06	*Clavariadelphus truncatus*	22,00±0,15	2,00±0,01
18	*Lentinus arcularius*	12,85±0,07	24,17±0,16
19	*Gleophyllum sepiarium*	13,45±0,08	54,82±0,85
21	Tanımlanmamış izolat	20,66±0,16	19,29±0,17
24	*Macrolepiota procera*	15,04±0,14	34,92±0,23
25	*Trametes versicolor*	35,00±0,21	56,00±0,54
30	*Lentinus arcularius*	11,16±0,06	2,05±0,03

Çizelge 4.1. Fungus izolatlarının HPTLC ile belirlenen AFB_1 ve OTA giderim oranları (devam)

OBCC Kodu	**Makrofungus türü**	**AFB_1 Degradasyonu (%)**	**OTA Degradasyonu (%)**
31	*Lentinus arcularius*	29,39±0,25	30,22±0,27
32	*Lentinus arcularius*	4,00±0,03	15,00±0,36
34	*Lentinus arcularius*	15,75±0,12	27,72±0,24
36	Tanımlanmamış izolat	0,00±0,00	49,34±0,38
39	*Pholita* sp.	22,00±0,14	22,00±0,27
41	Tanımlanmamış izolat	42,37±0,51	32,96±0,26
1002	*Leucoagaricus pudicus*	31,10±0,30	21,91±0,28
1004	*Ganoderma carnosum*	53,00±0,55	53,00±0,66
1005	Tanımlanmamış izolat	43,10±0,54	31,40±0,24
1006	*Trametes versicolor*	28,00±0,36	14,56±0,21
1007	*Fomes fomentarius*	15,00±0,08	30,57±0,23
1008	*Antrodia serialis*	42,70±0,32	35,00±0,27
1010	*Ganoderma applanatum*	32,00±0,27	31,52±0,21
1012	*Laetiporus sulphureus*	29,52±0,26	48,16±0,54
1014	*Coprinus comatus*	24,96±0,25	24,00±0,12
1015	*Pleurotus ostreatus*	29,60±0,23	59,00±0,13
1021	Tanımlanmamış izolat	28,41±0,21	13,35±0,03
1022	*Pleurotus ostreatus*	20,70±0,17	69,83±0,84
1023	*Schizophyllum commune*	46,90±0,32	62,00±0,43
1025	*Schizophyllum commune*	7,63±0,03	53,57±0,41
1030	*Fomes fomentarius*	26,40±0,18	19,35±0,13
1034	*Pleurotus ostreatus*	30,00±0,17	3,88±0,03

Çizelge 4.1. Fungus izolatlarının HPTLC ile belirlenen AFB1 ve OTA giderim oranları (devam)

OBCC Kodu	**Makrofungus türü**	**AFB_1 Degradasyonu (%)**	**OTA Degradasyonu (%)**
1035	*Fistulina hepatica*	38,80±0,23	56,00±0,51
1047	*Epicoccum nigrum*	51,21±0,51	40,49±0,54
1048	*Suillus collitinus*	25,15±0,20	4,34±0,03
1067	Tanımlanmamış izolat	5,56±0,03	59,87±0,74
1080	Tanımlanmamış izolat	24,23±0,11	13,30±0,17
1085	*Coprinus comatus*	46,90±0,18	27,47±0,61
1086	Tanımlanmamış izolat	41,20±0,40	46,19±0,37
1087	*Leucoagaricus pudicus*	46,38±0,34	33,09±0,26
1088	*Coprinus comatus*	24,03±0,74	40,65±0,34
1089	Tanımlanmamış izolat	55,50±0,64	2,32±0,03
1095	Tanımlanmamış izolat	24,74±0,14	55,01±0,67
1098	Tanımlanmamış izolat	26,40±0,12	25,31±0,21
1108	*Coprinus comatus*	10,82±0,08	30,93±0,37
1109	*Hypholoma fascicularia*	16,90±0,06	24,95±0,36
1110	*Pleurotus ostreatus*	35,40±0,21	49,00±0,38
3007	*Lentinus tigrinus*	40,25±0,36	20,77±0,61
3501	Tanımlanmamış izolat	13,75±0,06	14,35±0,11
3505	Tanımlanmamış izolat	10,00±0,17	31,00±0,23
5001	*Ganoderma carnosum*	27,00±0,16	11,07±0,05
5002	*Trametes versicolor*	50,00±0,80	6,50±0,17
5004	*Lentinus strigosus*	67,00±0,08	35,80±0,13
5005	*Cerrena unicolor*	10,75±0,09	8,10±0,11

Çizelge 4.1. Fungus izolatlarının HPTLC ile belirlenen AFB1 ve OTA giderim oranları (devam)

OBCC Kodu	**Makrofungus türü**	**AFB_1 Degradasyonu (%)**	**OTA Degradasyonu (%)**
5006	*Trametes pubescens*	48,90±0,56	20,25±0,54
5009	*Inonotus hispidus*	46,00±0,37	42,00±0,32
5014	*Trametes hirsuta*	40,95±0,39	21,47±0,29
5022	*Trametes versicolor*	24,72±0,32	16,01±0,22
5023	*Trametes versicolor*	46,00±0,34	17,01±0,24
5024	*Hygrocybe pratensis*	59,90±0,40	49,00±0,30
5027	*Schizophyllum commune*	29,95±0,17	25,66±0,19
5029	Tanımlanmamış izolat	25,18±0,13	0,00±0,15
5040	*Trametes pubescens*	43,50±0,41	36,45±0,33
5048	*Agaricus campestris*	47,11±0,12	63,15±0,08
5049	Tanımlanmamış izolat	37,00±0,31	18,00±0,04
5050	Tanımlanmamış izolat	44,00±0,23	49,00±0,31
5055	Tanımlanmamış izolat	25,03±0,21	39,58±0,29
5056	Tanımlanmamış izolat	26,93±0,23	42,84±0,42
5058	Tanımlanmamış izolat	43,19±0,29	51,05±0,60
6001	*Lentinus edodes*	67,00±0,97	37,00±0,28
6004	*Lentinus edodes*	46,00±0,37	24,00±0,19
6007	*Pleurotus eryngi*	47,00±0,10	0,60±0,01
6008	*Pleurotus eryngii*	14,00±0,03	26,00±0,21
6009	*Pleurotus eryngii*	10,66±0,23	25,00±0,20

Çizelge 4.1. Fungus izolatlarının HPTLC ile belirlenen AFB1 ve OTA giderim oranları (devam)

OBCC Kodu	**Makrofungus türü**	**AFB_1 Degradasyonu (%)**	**OTA Degradasyonu (%)**
6010	*Pleurotus eryngii*	15,00±0,12	16,00±0,11
6030	*Pleurotus eryngii*	61,50±0,41	15,00±0,40
6033	*Phanerochaete chrysosporium*	34,00±0,27	9,57±0,08
6035	*Ganoderma lucidum*	14,00±0,11	13,00±0,17
6036	*Pleurotus eryngii*	22,00±0,21	35,00±0,50
6037	*Pleurotus cornucopiae*	33,56±0,27	43,87±0,51

İzolatlardan 8 tanesi (Ag468, OBCC 1004, 1047, 1089, 5002, 5004, 5024, 6001) % 50' den fazla AFB_1 degradasyonu yaparken bunlardan degradasyon oranı en yüksek olan OBCC 5004 kodlu *Lentinus strigosus* ve 6001 kodlu *Lentinus edodes*' tir. İzolatlardan 13 tanesi (Ag470, OBCC 19, 25, 1004, 1015, 1022, 1023, 1025, 1035, 1067, 1095, 5048, 5058) % 50' den fazla OTA degradasyonu yaparken bunlardan degradasyon oranı en yüksek olan OBCC 1022 kodlu *Pleurotus ostreatus* ile daha sonra OBCC 5048 kodlu *Agaricus campestris*' tir.

İzolatlardan OBCC 36 kodlu tanımlanmamış olanı hiç AFB_1 degradasyonu yapmamışken % 49,34 OTA degradasyonu gerçekleştirmiştir. OBCC 03 kodlu *Ganoderma* sp. ise hiç OTA degradasyonu yapmamış aynı zamanda sadece % 14,70 AFB_1 degradasyonu gerçekleştirmiştir. Tarama sonucunda gözlemlenmiştir ki bazı organizmaların AFB_1 ve OTA degradasyon yüzde değerleri birbirine yakındır.

HPTLC ile yapılan degradasyon ölçümlerinde toksin degrade etmesi için inkübasyona bırakılan kültür sıvıları ile kontrol grubu olarak herhangi bir organizma geliştirilmemiş besi ortamı karşılaştırılmıştır. Kültür sıvısı içeriğinde bulunan enzimlerden

kaynaklanan degradasyon, organizma geliştirilmemiş kontrol grubunun besiyerindeki ekstraksiyon işlemi sırasında oluşan kayıpları dikkate alınarak hesaplanmıştır.

HPTLC ile elde edilen sonuçlar, çok sayıda araştırıcı tarafından kullanımış olan HPLC yöntemi ile de onaylanmak istenmiştir. Bu amaçla her iki toksini en yüksek derecede giderdiği belirlenen onar adet fungus izolatı seçilmiştir.

4.1.3. Degradasyon oranının onaylanması

Tarama çalışmasında organizmaların semikantitatif HPTLC yöntemi ile belirlenmiş olan toksin degradasyon değerlerinden başarılı izolatların seçimi amacı ile yararlanılmıştır. Yine de, seçilen izolatlar için elde edilen degradasyon değerlerinin daha yüksek hassasiyete sahip olan bir yöntem olan HPLC ile onaylanması uygun görülmüştür. Bu amaçla HPTLC ile AFB_1 ve OTA degradasyon oranı en yüksek 10 organizma tercih edilmiş ve bu izolatların toksin giderim oranları HPLC ile de sorgulanmıştır. AFB_1 ve OTA giderimi için HPTLC ve HPLC ile elde edilen giderim verileri sırası ile Çizelge 4.2 ve 4.3. te karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.2. HPLC ve HPTLC ile AFB_1 degradasyon oranlarının (%) karşılaştırılması

OBCC Kodu	HPLC	HPTLC
1047	53,18	51,21
5002	57,92	50,00
5004	66,73	67,00
5006	58,40	48,90
5024	47,76	59,90
5048	53,93	47,11
6030	55,98	61,50
Ag463	61,49	48,39
Ag468	54,99	62,50

Çizelge 4.3. HPLC ve HPTLC ile OTA degradasyon oranlarının (%) karşılaştırılması

OBCC Kodu	HPLC	HPTLC
19	47,44	54,82
1015	38,40	59,00
1022	46,99	69,83
1023	43,49	62,00
1035	45,37	56,00
1057	36,44	53,72
1067	51,58	59,87
1095	48,91	55,01
5048	56,01	63,15
Ag470	43,50	53,81

Çizelge 4.2.' de AFB_1 degradasyon oranı en yüksek 10 izolatın HPTLC ve HPLC ile elde edilen degradasyon oranlarının benzerlik gösterdiği görülmektedir. Her iki ölçüm yöntemi ile en yüksek AFB_1 degradasyon oranı OBCC 5004 kodlu izolat ile elde edilmiştir. Bu nedenle, araştırmanın daha sonraki aşamalarına bu izolat ile devam edilmiştir.

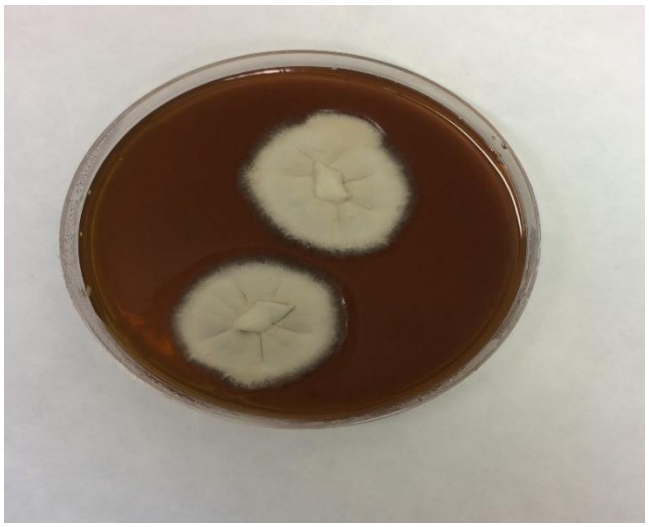
Her ne kadar AFB_1 için hem HPLC hem de HPTLC ile yapılan ölçümlerde OBCC 5004 kodlu *Lentinus strigosus* izolatının en yüksek giderime sahip olduğu belirlenmiş olsa da; OTA için HPTLC ve HPLC ile aynı organizma üzerinde uzlaşılmamıştır. HPTLC ve HPLC ile en yüksek degradasyon oranları sırası ile OBCC 1022 kodlu *Pleurotus ostreatus* ve OBCC 5048 kodlu *Agaricus campestris* ile %69,83 ve %56,01 bulunmuştur. Bu durumun nedeninin OTA degradasyonunun HPTLC ile belirlenmesi sırasında cihazdan kaynaklanan bir kısıtlama olduğu düşünülmektedir. HPTLC' de UV dedektör ile çalışabilme olanağı var iken floresan dedektör kullanılamamıştır. Oysa, yapılan pek çok çalışmada OTA ölçümü için floresan dedektörlü HPLC tercih edilmiştir (Petchkongkaew, 2008; Cozzi vd., 2013; Heussner, ve Bingle, 2015). Bu nedenle OTA tayininde ortaya çıkan farklılığının nedeninin

HPTLC ve HPLC ile gerçekleştirilen tayinler sırasında aynı dedektörlerin kullanılamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Aflatoksin B_1 ve okratoksin A degradasyonunda en başarılı organizmalar olarak sırası ile OBCC 5004 *Lentinus strigosus* ve OBCC Agaricus campestris belirlenmiştir. Bu izolatların petri plaklarındaki morfolojik özellikleri sırası ile şekil 4.5. ve şekil 4.6.' da görülmektedir.



Şekil 4.5. OBCC 5004 kodlu *Lentinus strigosus*



Şekil 4.6. OBCC 5048 kodlu *Agaricus campestris*

Çizelge 4.4.' te farklı makrofungus türlerinden elde edilen kültür sıvıları ya da enzimler kullanılarak aflatoksin B_1 ve okratoksin A biyodegradasyon değerleri sunulmuştur.

Elde edilen veriler aflatoksin B1 gideriminin % 67 – 100 sınırları arasında, okratoksin A gideriminin ise % 50 – 100 aralığında gerçekleştiğini göstermektedir. Çok sayıda fungal türün % 90 dan yüksek giderime sahip olması geleceğe yönelik çalışmalar açısından oldukça ümit verici bir durum olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların literatür verilerine göre nispeten düşük olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. Mikotoksin degradasyonunda etkili makrofunguslar ve degradasyon oranları

Tür Adı	Enzim	Toksin	Degradasyon (%)	Referans
Armillaria tabescens	Oksidaz	AFB_1	100	Liu vd., 1998
Trametes versicolor	Lakkaz		87	Albert vd., 2009
Pleurotus ostreatus	Mangan peroksidaz		90	Yehia, 2014
Pseudomonas sp.	-*		83	Sangare vd., 2014
Lentinus strigosus	-		67	Bu çalışma
Yarrowia lipolytica	-	OTA	95	Yang, vd., 2016
Phaffia rhodozyma	-		95	Peteri vd., 2007
Bifidobacterium longum	-		50	Fuchs vd., 2008
Aspergillus sp.	-		100	Varga vd., 2000
Agaricus campestris	-		56	Bu çalışma

* Degradasyondan sorumlu olan enzim bilinmemektedir.

4.2. Aflatoksin B_1 ve Okratoksin A Degradasyonunun Optimize Edilmesi

4.2.1. Enzim üretimi için uygun besiyeri seçimi

Çizelge 4.5. Toksin giderimi için seçilen fungus izolatlarının Modifiye Kirk besiyerinde ligninolitik enzim aktivite değerleri (U/L)

Enzim Aktivitesi (U/L)			Lakkaz	Mangan Peroksidaz	Mangan-Bağımsız Peroksidaz	Lignin Peroksidaz
		Besiyeri				
İzolat Kodu	OBCC 5004	1	67,54	2438,70	3034,65	0
		1x	112,32	3732,64	5871,50	0
		2	97,36	2866,62	3264,30	0
		2x	146,80	3974,22	5936,85	0
		3	116,25	4114,82	3364,90	0
		3x	192,56	6226,96	6012,40	0
		4	121,45	4238,48	3846,35	0
		4x	231,50	6723,33	6373,30	0
		5	218,38	4214,28	3242,25	0
		5x	221,26	6316,16	5368,20	0
	OBCC 5048	1	17,64	167,74	182,20	0
		1x	24,38	213,49	204,45	0
		2	12,64	153,62	186,40	0
		2x	16,76	202,34	208,70	0
		3	11,45	136,42	198,85	0
		3x	13,73	183,38	214,75	0
		4	18,84	197,86	232,50	0
		4x	26,83	243,94	252,65	0
		5	19,64	187,84	218,35	0
		5x	23,38	236,65	242,60	0

Tarama aşamasında seçilen organizmalar bu çalışmada literatürde kullanılan farklı besi ortamlarında üretilmiştir. Daha sonra bu organizmaların enzim aktiviteleri ve protein değerleri karşılaştırılmıştır. En yüksek enzim aktivitesinin 4X kodlu besiyeri (4 numaralı modifiye Kirk Broth besi ortamına % 0,2 buğday kepeği eklenerek elde edilen) olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.5.' te organizmaların Modifiye Kirk 4X besiyerinde ürettiği enzim aktiviteleri görülmektedir.

Yüksek enzim aktivitesine olanak sağlayan bu besi ortamının aynı zamanda süpernantında diğer besi ortamlarına göre daha yüksek protein üretildiği de görülmüştür. OBCC 5004 ve OBCC 5048 kodlu organizmaların kültür sıvılarında bulunan protein miktarları 0,90 ve 1,21 mg/ml olarak belirlenmiştir.

4.2.2. İstatistiksel Deney Tasarımı ile Optimizasyon

Seçilen makrofungus suşlarının AFB_1 ve OTA degradasyonu için en uygun üretim koşullarının belirlenmesi amacı ile Plackett-Burman (PB) ve Response Surface (RSM) deney tasarımları kullanılmıştır. Özet olarak Plackett–Burman deney tasarımı ile AFB_1 ve OTA degradasyonunu arttıran kültürel ve besinsel koşullar (karbon kaynağı tipi, azot kaynağı tipi, karıştırma hızı vb.) seçilmiş, Response Surface tasarımı ile de bu değişkenlerin etkin değerleri belirlenmiştir.

4.2.2.1. Aflatoksin B_1 Degradasyonunun İstatistiksel Deney Tasarımı ile Optimize Edilmesi

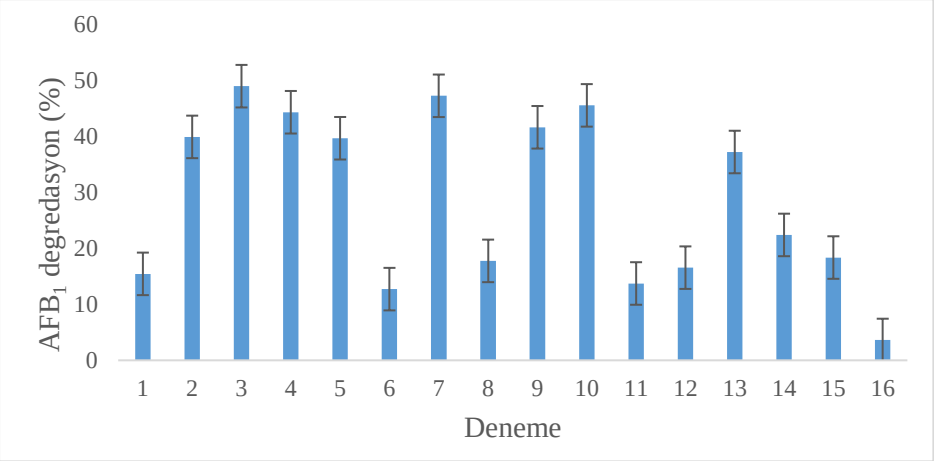
A. Plackett Burman deney tasarımı

OBCC 5004 kodlu makrofungus izolatı tarafından AFB_1 degradasyonuna etki eden besiyeri içeriği ve çevresel etkenlerin etkisinin belirlenmesi için yapılan Plackett Burman deney tasarımı için 15 değişken ile 16 farklı deneme tasarlanmıştır. her deneme grubu için elde edilen degradasyon oranları çizelge 4.6.' da ifade edilmiştir.

Çizelge 4.6. OBCC 5004 kodlu izolatın AFB_1 degradasyonu ile ilgili PB Deney Tasarımı sonuçları

Değişken / Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	Yıkım (%)
1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	15,46
2	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	39,95
3	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	49,02
4	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	44,36
5	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	39,71
6	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	12,73
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	47,3
8	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	17,78
9	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	41,67
10	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	45,59
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	13,74
12	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	16,57
13	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	37,25
14	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	22,42
15	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	18,38
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3,64

Yapılan çalışmada en yüksek degradasyon oranının % 49,02 ile 3 numaralı denemede gerçekleştiği belirlenmiştir. En düşük degredasyon oranı ise % 3,64 ile 16 numaralı denemede elde edilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. OBCC 5004 kodlu izolatın Plackett-Burman deney tasarımında aflatoksin B_1 degradasyon oranları

İstatistiksel paket program kullanılarak aflatoksin degradasyonu üzerine olumlu ve olumsuz yönde etki eden bağımsız değişkenlerin analizi yapılmıştır. Çizelge 4.7. OBCC 5004 izolatının AFB_1 degradasyonu ile ilgili PB deney tasarımının regresyon analiz sonuçlarını ve değişkenlerin etkinlik düzeylerini içermektedir. Çizelgede pozitif (+) değer ile ifade edilen durum değişkenin üst düzeyinin, negatif (-) değer ile ifade edilen durum ise değişkenin alt düzeyinin etkili olduğunu ifade etmektedir. Regresyon katsayılarının incelenmesi ile X_{12} (Besiyeri başlangıç pH' sı) dışındaki tüm değişkenlerin AFB_1 degradasyonu üzerine pozitif katsayı ile etki ettiği görülmektedir. Çizelge incelendiğinde X_1, X_2, X_3, X_6, X_{10}, X_{14} ve X_{15} değişkenlerinin etkilerinin 0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), diğer değişkenlerin etkilerinin ise düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). AFB_1 degradasyon etkinlik değeri hesaplanırken değişken katsayıları X_{12} dışında pozitif etki etmektedir.

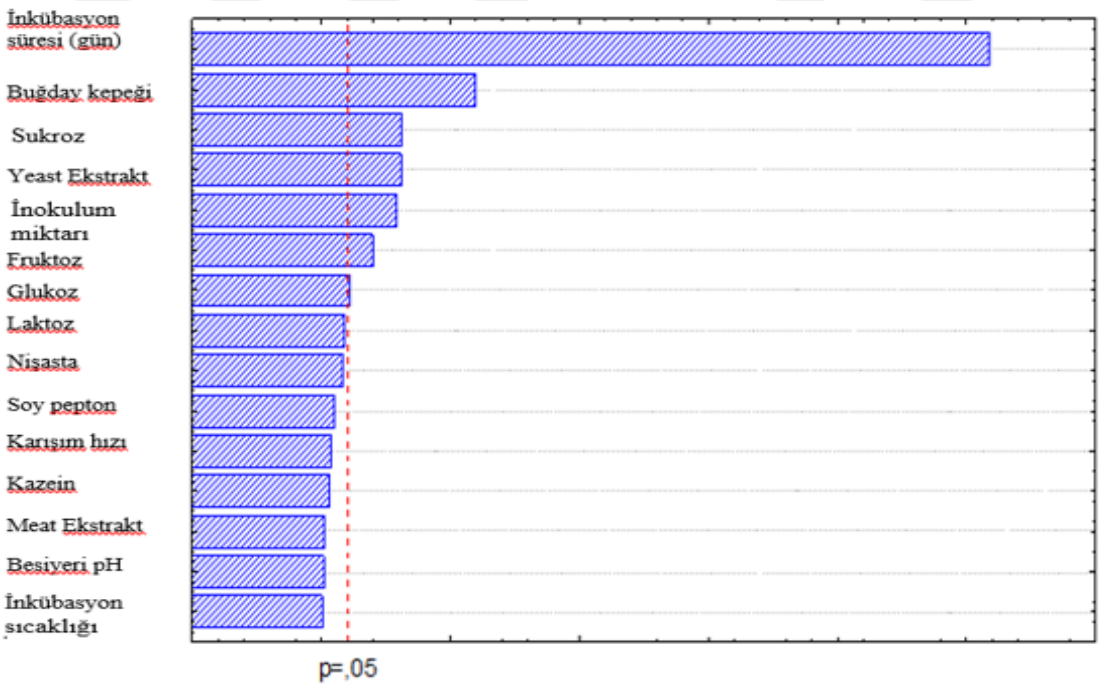
Çizelge 4.7. OBCC 5004 izolatının AFB_1 degradasyonu ile ilgili PB deney tasarımı regresyon analiz sonuçları

	Regr. Coefficients; Var.:AFB1; R-sqr=,98934; Adj:,98434 15 Factor Screening Design; MS Residual=3,507396 DV: AFB1					
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(32)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	29,09813	0,270316	107,6448	0,000000	28,54751	29,64874
(1)Var1	0,59396	0,270316	2,1973	0,035357	0,04334	1,14457
(2)Var2	1,06979	0,270316	3,9576	0,000395	0,51918	1,62041
(3)Var3	1,67729	0,270316	6,2049	0,000001	1,12668	2,22791
(4)Var4	0,48271	0,270316	1,7857	0,083626	-0,06791	1,03332
(5)Var5	0,45646	0,270316	1,6886	0,101018	-0,09416	1,00707
(6)Var6	1,66771	0,270316	6,1695	0,000001	1,11709	2,21832
(7)Var7	0,05646	0,270316	0,2089	0,835881	-0,49416	0,60707
(8)Var8	0,28896	0,270316	1,0690	0,293083	-0,26166	0,83957
(9)Var9	0,18104	0,270316	0,6697	0,507827	-0,36957	0,73166
(10)Var10	3,24354	0,270316	11,9991	0,000000	2,69293	3,79416
(11)Var11	0,00812	0,270316	0,0301	0,976208	-0,54249	0,55874
(12)Var12	-0,04979	0,270316	-0,1842	0,855020	-0,60041	0,50082
(13)Var13	0,20938	0,270316	0,7746	0,444288	-0,34124	0,75999
(14)Var14	1,57021	0,270316	5,8088	0,000002	1,01959	2,12082
(15)Var15	14,00896	0,270316	51,8244	0,000000	13,45834	14,55957

Plackett – Burman deney tasarımı ile OBCC 5004 izolatı tarafından aflatoksin B1 degradasyonunu arttırmak için kullanılan her değişkenin AFB_1 degradasyonu üzerindeki etki katsayısı değerleri aşağıdaki formül ile gösterilmektedir. Burada yüksek katsayıya ve pozitif değere sahip olan değişkenler degradasyon oranında artışa neden olmaktadır.

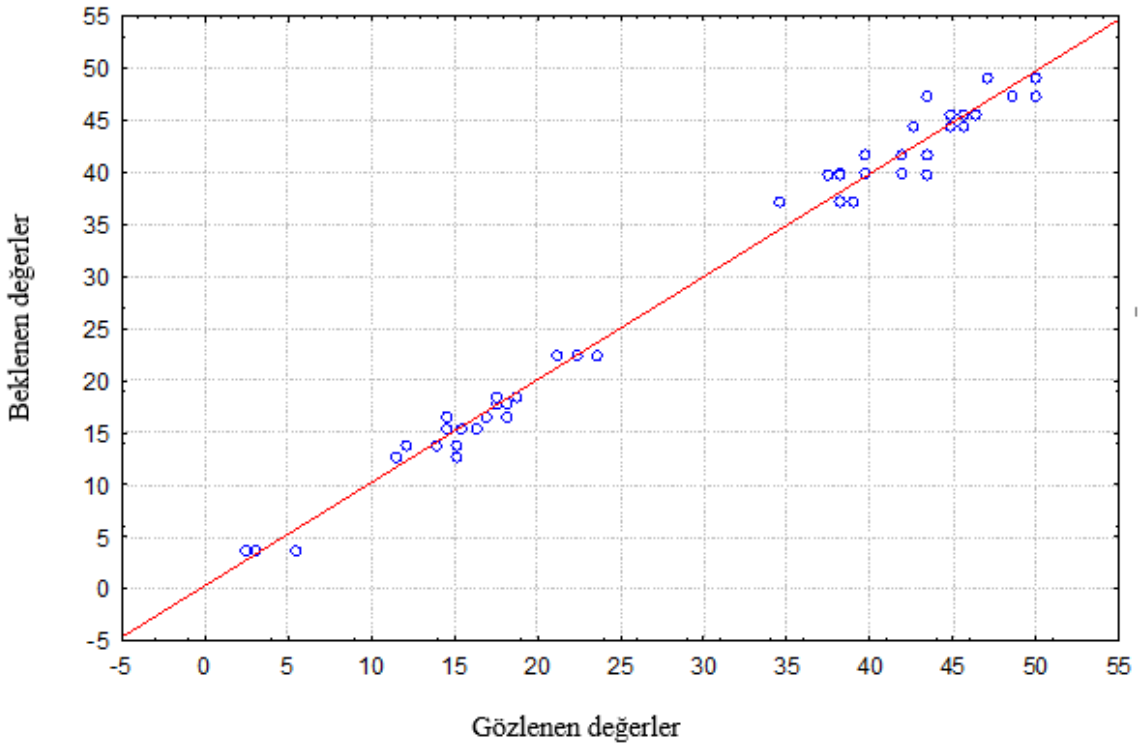
$$\text{Aflatoksin degradasyonu (\%)} = 29{,}098 + 0{,}594_{\text{Glukoz}} + 1{,}069_{\text{Fruktoz}} + 1{,}677_{\text{Sukroz}} + 0{,}483_{\text{Laktoz}} + 0{,}456_{\text{Nişasta}} + 1{,}668_{\text{Yeast ekstrakt}} + 0{,}056_{\text{Meat ekstrakt}} + 0{,}289_{\text{Soy Pepton}} + 0{,}181_{\text{Kazein}} + 3{,}244_{\text{Buğday kepeği}} + 0{,}008_{\text{Sıcaklık}} - 0{,}049_{\text{ pH}} + 0{,}209_{\text{Karıştırma hızı}} + 1{,}57_{\text{İnokulum miktarı}} + 14{,}009_{\text{İnkübasyon süresi}}$$

Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen veriler besiyerine eklenecek olan karbon kaynaklarından sukroz ve fruktozun aflatoksin B_1 degradasyonunu anlamlı ve yüksek bir etki değerine sahip olduğunu ifade etmektedir. Azot kaynakları arasında ise bu amaçla en fazla tercih edilecek olan yeast ekstrakt olarak belirlenmiştir. Ayrıca besiyerine inoküle edilen fungus oranının da yüksek ve anlamlı bir etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Yine de en yüksek katsayıya sahip değişkenler inkübasyon süresi ve buğday kepeği olarak görülmektedir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.8. Plackett-Burman tasarımında kullanılan değişkenlerin AFB_1 degradasyonuna etki düzeylerini ifade eden Pareto grafiği

Plackett – Burman deney tasarımına göre yapılan AFB_1 degradasyon çalışmasında istatistiksel olarak beklenen degradasyon oranları ile gözlenen degradasyon oranları arasındaki korelasyon Şekil 4.9.' da gösterilmiştir. Bu grafiğe göre beklenen degradasyon oranlarının gözlenen degradasyon oranları ile uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.9. Plackett – Burman deney tasarımı için beklenen ve gözlenen AFB_1 degradasyon oranı değerleri

Plackett Burman deney tasarımı sonucu elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda OBCC 5004 izolatı tarafından aflatoksin B_1 degradasyonuna katkısı en fazla olan değişkenlerden karbon kaynağı olarak sukroz, azot kaynağı olarak yeast ekstrakt ve katkı maddesi olarak buğday kepeği response surface yönteminde etkin düzey konsantrasyonları belirlenmek üzere seçilmiştir.

B. Response Surface tasarımı

Plackett – Burman tasarımı ile yapılan AFB_1 degradasyonu değişkenlerinin etkinlik oranlarını belirleme çalışmalarında en etkin değişkenler olarak sukroz, yeast ekstrakt ve buğday kepeği belirlenmiştir. Bu üç değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının aflatoksin B_1 degradasyonuna etkisi araştırılmıştır. Bu değişkenlerin OBCC 5004 izolatı tarafından aflatoksin B_1 degradasyonu üzerine en etkili değerlerini bulmak için hazırlanan Response Surface / Box-Behnken deney tasarımı sonucunda farklı denemelerde elde edilen degradasyon oranları Çizelge 4.8.' da sunulmuştur.

Çizelge 4.8. OBCC 5004 izolatı ile Response Surface Deney Tasarımında gözlenen ve beklenen AFB_1 degradasyon oranları

Değişken / Deneme	X_3 (Sukroz)	X_6 (Yeast Ekstrakt)	X_{10} (Buğday kepeği)	Aflatoksin Degradasyonu (%)	
				Beklenen	Gözlenen
1	0	+1	+1	48,61	47,56
2	0	0	0	43,02	44,00
3	-1	0	-1	39,28	38,67
4	0	0	0	43,02	43,11
5	-1	-1	0	38,22	37,78
6	0	-1	-1	37,17	38,23
7	0	0	0	43,02	42,22
8	0	+1	-1	42,83	42,22
9	+1	+1	0	44,44	44,89
10	-1	+1	0	45,44	46,67
11	0	0	0	43,02	43,11
12	+1	0	+1	46,50	47,11
13	+1	0	-1	40,72	40,89
14	-1	0	+1	45,94	45,78
15	0	-1	+1	43,83	44,44
16	+1	-1	0	41,22	40,00
17	0	0	0	43,02	42,67

OBCC 5004 izolatının elde edilen AFB_1 degradasyon oranlarının varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.9' da verilmiştir. Çizelge incelendiğinde sadece yeast ekstrakt ve buğday kepeğinin doğrusal etkileri anlamlı görülmektedir.

Çizelge 4.9. OBCC 5004 izolatının AFB_1 degradasyonu açısından response surface deney tasarımı varyans ve regresyon analiz sonuçları

Factor	Regr. Coefficients; Var.:Aflatoksin Yıkımı (%) ; R-sqr=,78959; Adj:,7434 3 factors, 1 Blocks, 51 Runs; MS Residual=2,731097 DV: Aflatoksin Yıkımı (%)					
	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(41)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	43,02200	0,426700	100,8249	0,000000	42,16026	43,88374
(1)Sukroz (%)(L)	0,50000	0,337336	1,4822	0,145933	-0,18126	1,18126
Sukroz (%)(Q)	-0,34517	0,464986	-0,7423	0,462127	-1,28422	0,59389
(2)Yeast Ekstrakt (%)(L)	2,61125	0,337336	7,7408	0,000000	1,92999	3,29251
Yeast Ekstrakt (%)(Q)	-0,34433	0,464986	-0,7405	0,463202	-1,28339	0,59472
(3)Buğday kepeği (%)(L)	3,11042	0,337336	9,2205	0,000000	2,42915	3,79168
Buğday kepeği (%)(Q)	0,43400	0,464986	0,9334	0,356098	-0,50506	1,37306
1L by 2L	-1,00083	0,477065	-2,0979	0,042120	-1,96429	-0,03738
1L by 3L	-0,22250	0,477065	-0,4664	0,643403	-1,18595	0,74095
2L by 3L	-0,22167	0,477065	-0,4646	0,644643	-1,18512	0,74179

Her değişkenin OBCC 5004 izolatı tarafından AFB_1 degradasyon oranları üzerine Box-Behnken deney tasarımı ile elde edilen etkisi, aşağıdaki formül ile gösterilmektedir.

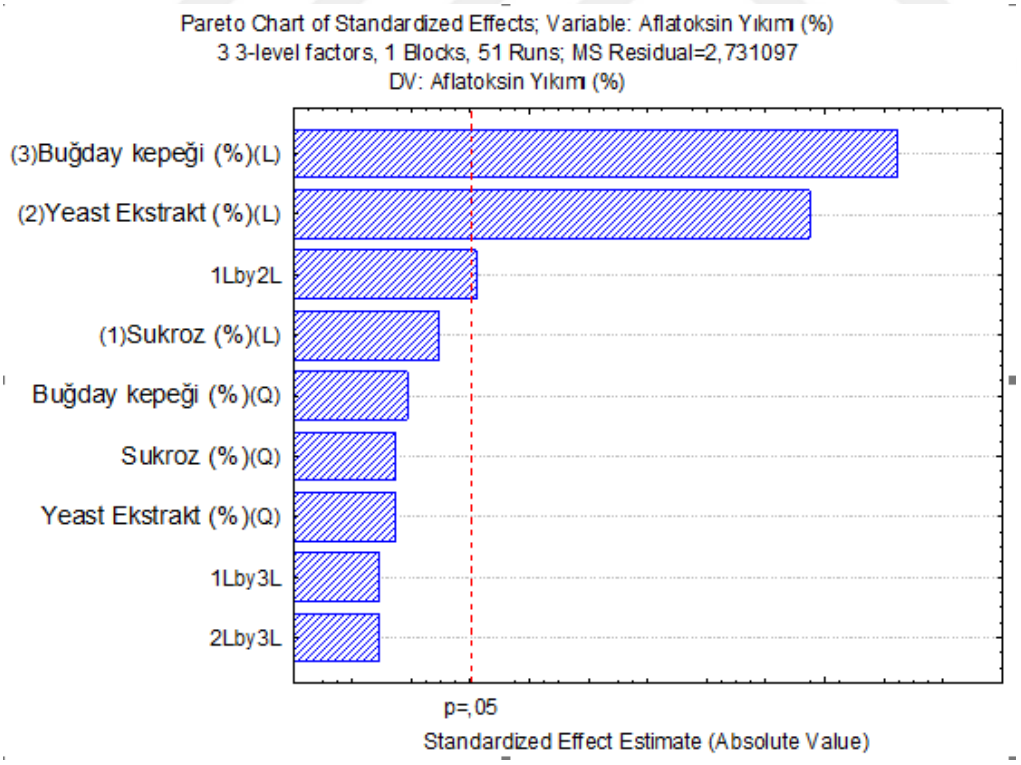
$$\text{Aflatoksin degradasyonu (\%)} = 43{,}022 + 0{,}500_{\text{Sukroz}} - 0{,}345_{\text{Sukroz}}^2 + 2{,}611_{\text{Yeast ekstrakt}} - 2{,}611_{\text{Yeast ekstrakt}}^2 + 3{,}110_{\text{Buğday kepeği}} + 0{,}434_{\text{Buğday kepeği}}^2$$

Cevap yüzey yönteminde, OBCC 5004 izolatı ile AFB_1 degradasyonu varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.10.' da sunulmuştur. Çizelgede sunulan veriler incelendiğinde OBCC 5004 izolatının aflatoksin B_1 degradasyonuna ilişikin önerilen modelin anlamlı olduğu Lack of fit sınamasından ($F=17{,}10$; $p<0{,}01$) anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.10. OBCC 5004 izolatı tarafından aflatoksin degradasyonunun model uyumuna ilişkin varyans analizi sonuçları

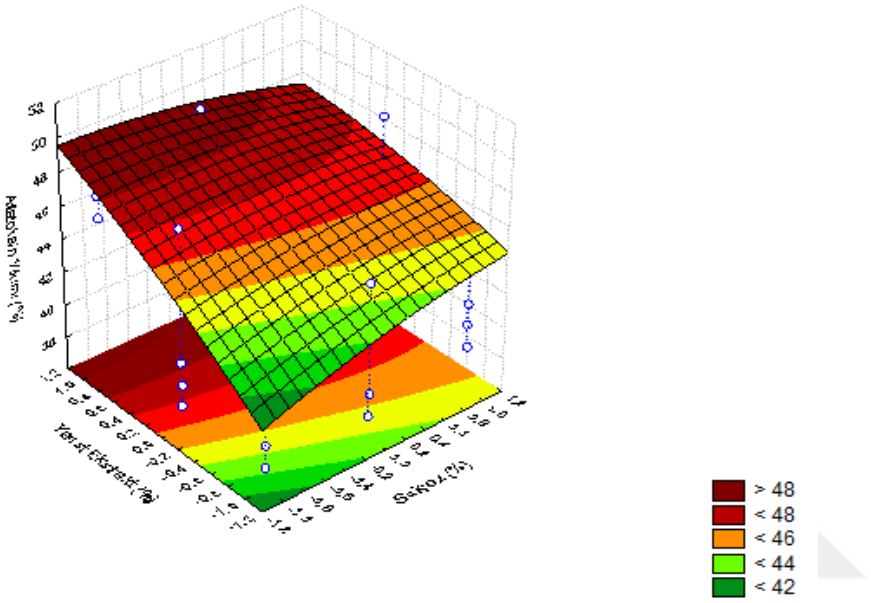
Değişim kaynağı	Kareler toplamı (SS)	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler ortalaması	F	p
Model	420,20	9	46,69	17,10	< 0,01
Hata	111,98	41	2,73		
Toplam	532,18	50			
Belirlilik katsayısı (R^2) = 0,79					

Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin OBCC 5004 izolatı tarafından AFB_1 degradasyonu üzerine etkisinin anlamlılık ve büyüklüğünü ifade eden Pareto grafiği Şekil 4.12.' de sunulmuştur. Elde edilen veriler buğday kepeği ve yeast ekstrakt' ın OBCC 5004 izolatı tarafından AFB_1 degradasyonu üzerine doğrusal etkilerinin p= 0,05 düzeyinde anlamlı olduğunu ifade etmektedir.

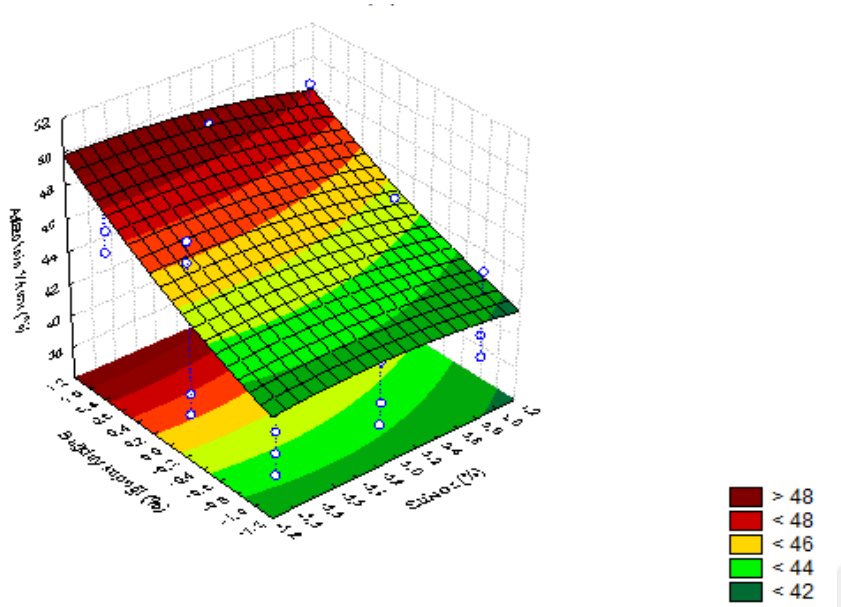


Şekil 4.10. Response surface deney tasarımında kullanılan değişkenlerin OBCC 5004 izolatı tarafından AFB_1 degradasyonu üzerine etkisi

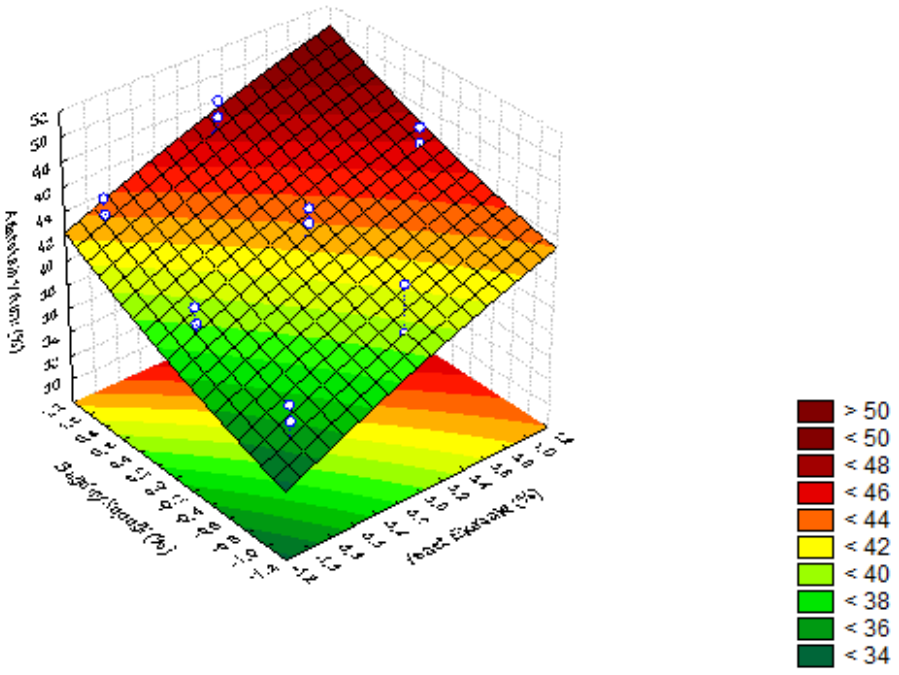
Şekil 4.13 – 4.15’ de aflatoksin B_1 degradasyonunda etkili olan değişkenlerin (sukroz, yeast ekstrakt ve buğday kepeği) birbirleri ile olan ilişkileri ve degradasyona etkileri üç boyutlu grafiklerde ifade edilmiştir. Değişkenlerden birinin miktarı sabit tutularak diğer iki değişkenin etkileşimleri sonucu olası aflatoksin B_1 degradasyonu belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Response surface tasarımında AFB_1 degradasyonu üzerine yeast ekstrakt ve sukroz’ un karşılıklı etkileşimi (buğday kepeği 3 g/L alınmıştır)

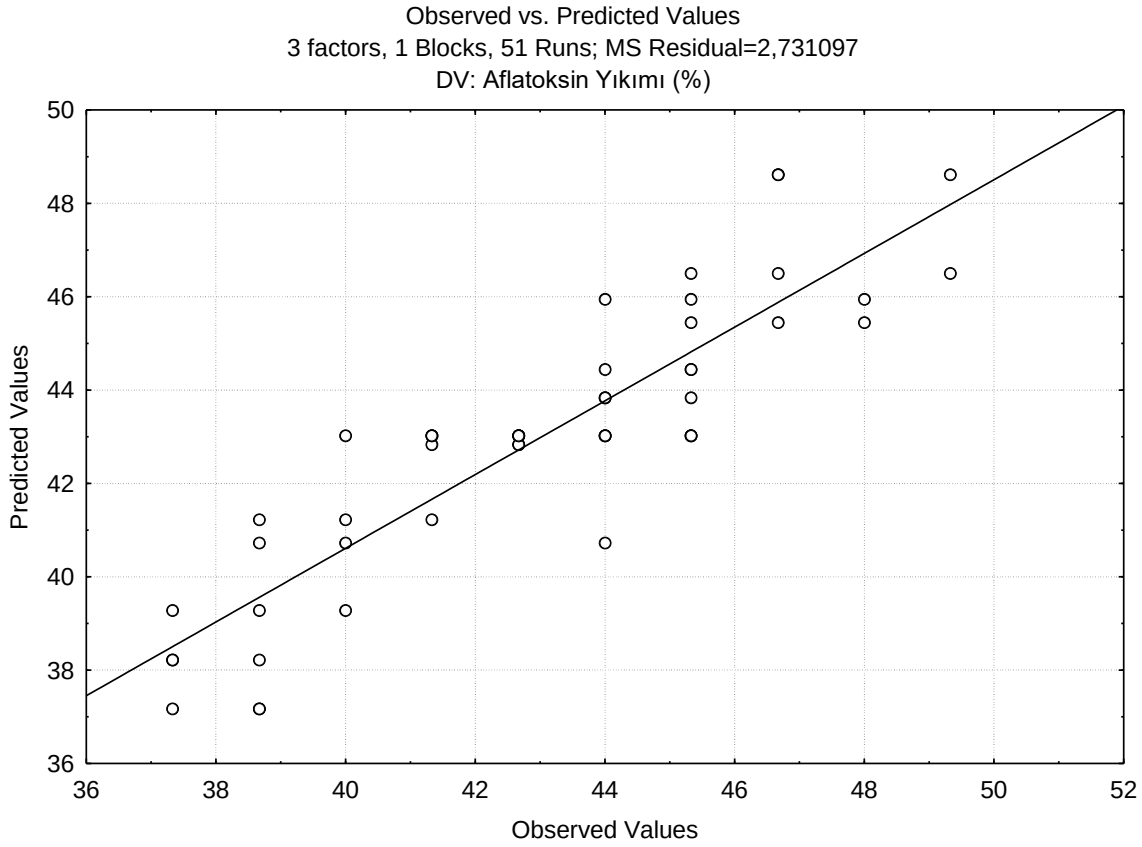


Şekil 4.12. Response surface tasarımında AFB_1 degradasyonu üzerine buğday kepeği ve sukroz' un karşılıklı etkileşimi (yeast ekstrakt 3 g/L alınmıştır)



Şekil 4.13. Response surface tasarımında AFB_1 degradasyonu üzerine buğday kepeği ve yeast ekstrakt' ın karşılıklı etkileşimi (sukroz 10 g/L alınmıştır)

Sonuç olarak, besi ortamında yeast ekstrakt ve buğday keğeğinin miktarı arttıkça ve aynı zamanda sukroz miktarı azaldıkça AFB_1 degradasyon oranı artmaktadır. Cevap yüzey yöntemi ile AFB_1 degradasyon oranlarında gözlenen ve istatiksel olarak beklenen sonuçlar arasındaki ilişki Şekil 4.16.' da sunulmuştur. Şekil 4.16 ve Çizelge 4.10 da sunulan bulguların birlikte incelenmesi sonucunda, önerilen modelin elde edilen sonuçları % 79 oranında açıklayabildiği görülmektedir.



Şekil 4.14. Response surface deney tasarımı ile OBCC 5004 izolatı tarafından AFB_1 degradasyonunda beklenen ve gözlenen sonuçlar arasındaki ilişki

Response surface deney tasarımı ile elde edilen verilerin analizi sonucunda OBCC 5004 izolatının AFB1 degradasyonu için kullanılan besiyeri bileşenleri sukroz % 1 yeast ekstrakt % 0,3, buğday keğeği % 0,3 optimal olarak belirlenmiştir.

4.2.2.2. Okratoksin A Degradasyonunun İstatistiksel Deney Tasarımı ile Optimize Edilmesi

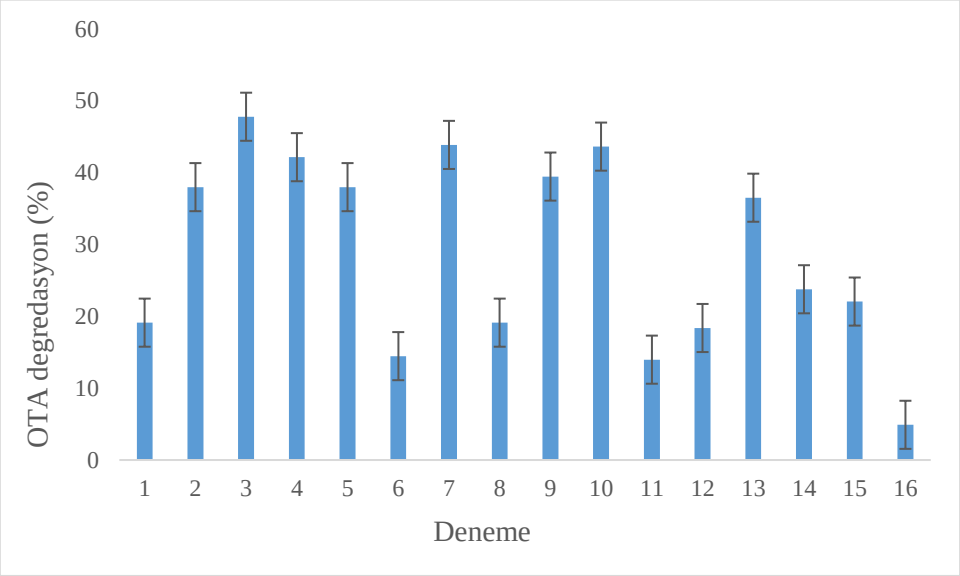
A. Plackett Burman deney tasarımı

OBCC 5048 kodlu makrofungus izolatı tarafından OTA degradasyonuna etki eden besiyeri içeriği ve çevresel etkenlerin etkisinin belirlenmesi için yapılan Plackett Burman deney tasarımının sonucunda elde edilen degradasyon oranları çizelge 4.11.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu ile ilgili PB Deney Tasarımı Sonuçları

Değişken / Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	Yıkım (%)
1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	19,12
2	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	37,99
3	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	47,79
4	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	42,16
5	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	37,99
6	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	14,46
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	43,87
8	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	19,12
9	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	39,46
10	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	43,63
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	13,97
12	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	18,38
13	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	36,52
14	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	23,77
15	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	22,06
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,9

Yapılan çalışmada en yüksek degradasyon oranının % 47,79 ile 3 numaralı denemede gerçekleştiği belirlenmiştir. En düşük degredasyon oranı ise % 4,9 ile 16 numaralı denemede görülmüştür (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. OBCC 5048 izolatının Plackett-Burman deney tasarımında okratoksin A degredasyon oranları

OTA degradasyonuna etki eden besiyeri içeriği ve çevresel etkenlerin etkisinin belirlenmesi için yapılan Plackett Burman deney tasarımının sonuçları istatistiksel olarak analiz edildiğinde değişkenlerin etkinlik değerleri Çizelge 4.12.' de gösterilmiştir. Etkinlik hesaplaması yapılırken X_{11} ve X_{13} dışındaki değişkenler dışındaki tüm değişkenlerin pozitif katsayı ile etki ettiği görülmektedir.

Çizelge 4.12. OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu ile ilgili PB deney tasarımı regresyon analiz sonuçları

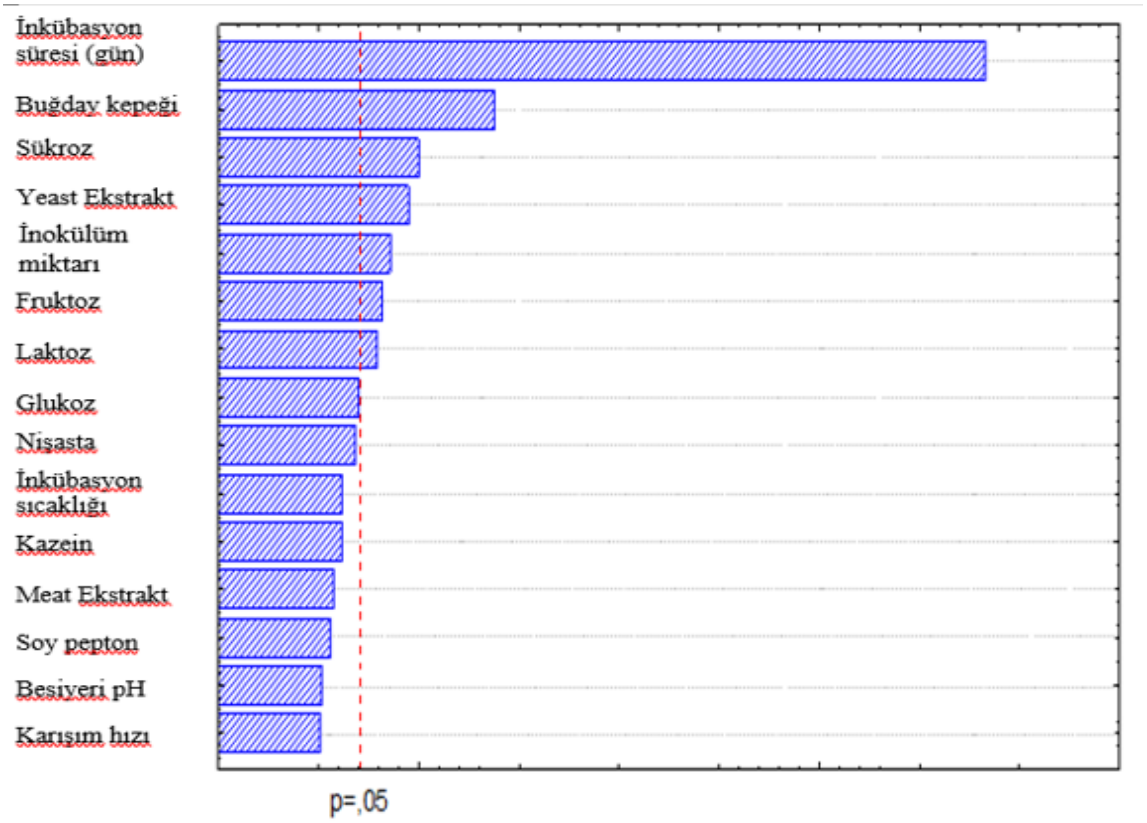
Factor	Regr. Coefficients; Var.:OTA; R-sqr=,97551; Adj:,96402 15 Factor Screening Design; MS Residual=6,332954 DV: OTA					
	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(32)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	29,07500	0,363231	80,04555	0,000000	28,33512	29,81488
(1)Var1	0,73625	0,363231	2,02695	0,051067	-0,00363	1,47613
(2)Var2	1,16417	0,363231	3,20503	0,003056	0,42429	1,90404
(3)Var3	1,80708	0,363231	4,97503	0,000021	1,06721	2,54696
(4)Var4	1,07250	0,363231	2,95267	0,005860	0,33262	1,81238
(5)Var5	0,67375	0,363231	1,85488	0,072847	-0,06613	1,41363
(6)Var6	1,62375	0,363231	4,47030	0,000092	0,88387	2,36363
(7)Var7	0,27583	0,363231	0,75939	0,453178	-0,46404	1,01571
(8)Var8	0,21417	0,363231	0,58962	0,559588	-0,52571	0,95404
(9)Var9	0,42875	0,363231	1,18038	0,246549	-0,31113	1,16863
(10)Var10	3,18583	0,363231	8,77083	0,000000	2,44596	3,92571
(11)Var11	-0,42917	0,363231	-1,18153	0,246100	-1,16904	0,31071
(12)Var12	0,06167	0,363231	0,16977	0,866258	-0,67821	0,80154
(13)Var13	-0,03125	0,363231	-0,08603	0,931976	-0,77113	0,70863
(14)Var14	1,28708	0,363231	3,54343	0,001238	0,54721	2,02696
(15)Var15	12,10125	0,363231	33,31560	0,000000	11,36137	12,84113

Çizelge incelendiğinde X_1, X_2, X_3, X_4, X_6, X_{10}, X_{14} ve X_{15} değişkenlerinin etkilerinin 0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), diğer değişkenlerin etkilerinin ise anlamlı olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Şekil 4.14' a göre OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonunda X_4, X_5, X_7, X_8, X_9, X_{11}, X_{12} ve X_{13} değişkenlerinin etkililiği anlamlı olmazken diğer değişkenlerin üst düzeyleri etkili olmuştur. PB deney tasarımı ile oluşturulan besi ortamlarından elde edilen kültür sıvısının buğday kepeği katkısının ve inkübasyon zamanının etkisinin çok fazla olduğu görülmüştür.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda değişkenlerin okratoksin A degradasyonu üzerine etki boyutları katsayılarla ifade edilerek veriler formülize edilmiş ve aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir.Burada yüksek katsayıya sahip olan değişkenler degradasyonu daha çok etkilemektedir.

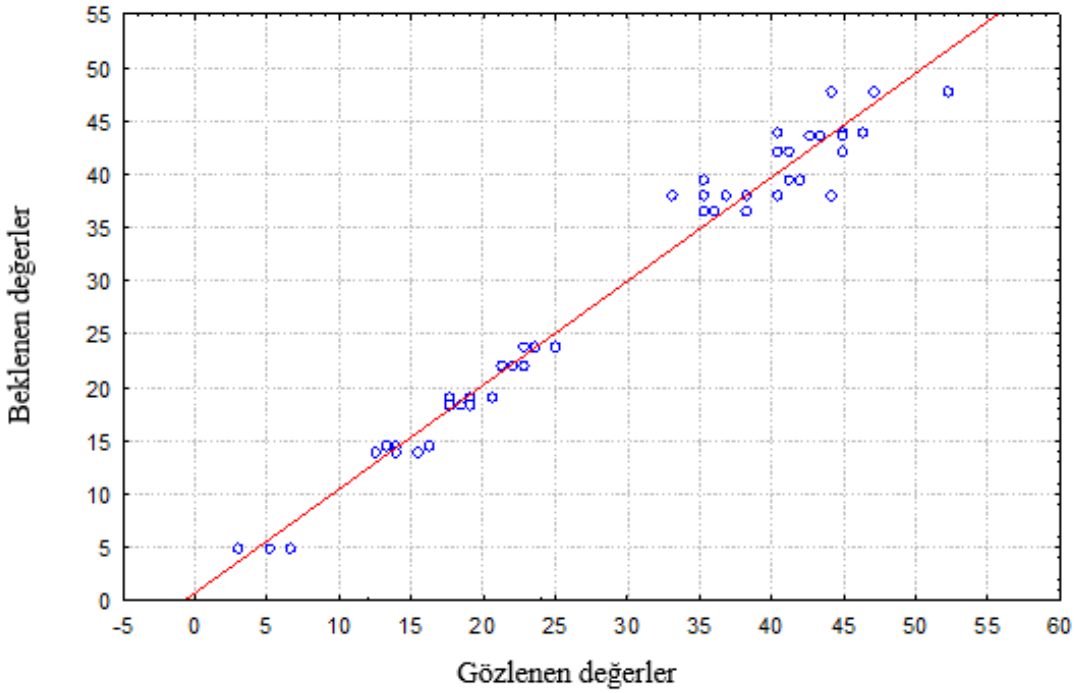
$$\text{Okratoksin degradasyonu (\%)} = 29{,}075 + 0{,}736_{\text{Glukoz}} + 1{,}164_{\text{Fruktoz}} + 1{,}807_{\text{Sukroz}} + 1{,}073_{\text{Laktoz}} + 0{,}674_{\text{Nişasta}} + 1{,}624_{\text{Yeast ekstrakt}} + 0{,}276_{\text{Meat ekstrakt}} + 0{,}214_{\text{Soy Pepton}} + 0{,}429_{\text{Kazein}} + 3{,}186_{\text{Buğday kepeği}} - 0{,}429_{\text{Sıcaklık}} + 0{,}062\ \text{pH} - 0{,}031_{\text{Karıştırma hızı}} + 1{,}287_{\text{İnokulum miktarı}} + 12{,}101_{\text{İnkübasyon süresi}}$$

Plackett-Burman deney tasarımı ile okratoksin A degradasyonu üzerine karbon kaynağı olarak sukroz, fruktoz ve laktoz sırasıyla etki etmektedir. Azot kaynağı olarak ise yeast ekstrakt yüksek ve anlamlı düzeyde etki etmektedir. İnkübasyon süresi ve besiyerine ilave buğday kepeği eklenmesinin OBCC 5048 tarafından okratoksin A degradasyonuna en yüksek derecede ve anlamlı olarak etki ettiği anlaşılmaktadır. Bu veriler Şekil 4.16' da ifade edilen Pareto grafiği ile de doğrulanmaktadır.



Şekil 4.16. Plackett-Burman tasarımında kullanılan değişkenlerin OTA degradasyonuna etki düzeylerini ifade eden Pareto grafiği

Plackett – Burman deney tasarımına göre yapılan OTA degradasyon çalışmasında istatistiksel olarak beklenen degradasyon oranları ile gözlenen degradasyon oranları arasındaki korelasyon Şekil 4.17.' de grafikte gösterilmiştir. Bu grafiğe göre beklenen degradasyon oranlarının gözlenen degradasyon oranları ile uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.17. Plackett – Burman deney tasarımı için beklenen ve gözlenen OTA degradasyon oranı değerleri

Plackett Burman deney tasarımı sonucu elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda *Agaricus campestris* OBCC 5048 izolatı tarafından okratoksin A degradasyonuna katkısı en fazla olan değişkenlerden karbon kaynağı olarak sukroz, azot kaynağı olarak yeast ekstrakt ve katkı maddesi olarak buğday kepeği response surface yönteminde etkin düzey konsantrasyonları belirlenmek üzere seçilmiştir.

B. Response Surface tasarımı

Placket-Burman deney tasarımıyla OBCC 5048 izolatı tarafından OTA degradasyonu üzerine etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunan sukroz, yeast ekstrakt ve buğday kepeği değişkenlerinin etkin konsantrasyonlarının ve birbiri ile etkileşimlerinin belirlenmesi için response surface yöntemi kullanılmıştır. Response surface deney tasarımı sonucunda farklı denemelerde görülen degradasyon oranları Çizelge 4.13.' te verilmiştir.

Çizelge 4.13. OBCC 5048 izolatı ile Response Surface Deney Tasarımında gözlenen ve beklenen OTA degradasyon oranları

Değişken / Deneme	X_3 (Sukroz)	X_6 (Yeast Ekstrakt)	X_{10} (Buğday kepeği)	OTA Degradasyonu (%)	
				Beklenen	Gözlenen
1	0	+1	+1	46,22	45,78
2	0	0	0	40,67	41,29
3	-1	0	-1	40,89	39,55
4	0	0	0	41,78	41,29
5	-1	-1	0	37,78	38,67
6	0	-1	-1	36,00	36,44
7	0	0	0	42,22	41,29
8	0	+1	-1	40,89	41,33
9	+1	+1	0	45,33	44,44
10	-1	+1	0	41,78	42,67
11	0	0	0	40,00	41,29
12	+1	0	+1	45,33	46,67
13	+1	0	-1	40,00	40,44
14	-1	0	+1	44,44	44,00
15	0	-1	+1	43,11	42,67
16	+1	-1	0	41,33	40,44
17	0	0	0	41,33	41,26

OBCC 5048 izolatının elde edilen OTA degradasyon oranlarının varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.14’ de sunulmaktadır. Çizelge incelendiğinde sukroz, yeast ekstrakt ve buğday kepeğinin doğrusal etkileri anlamlı görülmektedir.

Çizelge 4.14. OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu açısından response surface deney tasarımı varyans ve regresyon analiz sonuçları

Factor	Regr. Coefficients; Var.OKRATOKSİN; R-sqr=,73794; Adj:,68041 3 3-level factors, 1 Blocks, 51 Runs; MS Residual=2,649591 DV: OKRATOKSİN					
	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(41)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	41,19933	0,420285	98,02715	0,000000	40,35055	42,04812
(1)(Sukroz; %)(L)	0,88958	0,332264	2,67734	0,010624	0,21856	1,56060
(Sukroz; %)(Q)	0,73242	0,457995	1,59918	0,117459	-0,19252	1,65736
(2)(Yeast Ekstrakt; %)(L)	2,00000	0,332264	6,01930	0,000000	1,32898	2,67102
(Yeast Ekstrakt; %)(Q)	-0,37675	0,457995	-0,82261	0,415490	-1,30169	0,54819
(3)(Buğday kepeği; %)(L)	2,66708	0,332264	8,02699	0,000000	1,99606	3,33810
(Buğday kepeği; %)(Q)	0,73408	0,457995	1,60282	0,116652	-0,19086	1,65902
1L by 2L	0,00000	0,469893	0,00000	1,000000	-0,94897	0,94897
1L by 3L	0,44417	0,469893	0,94525	0,350068	-0,50480	1,39313
2L by 3L	-0,44500	0,469893	-0,94702	0,349175	-1,39397	0,50397

Kullanılan her bir değişkenin OBCC 5048 izolatı tarafından elde edilen OTA degradasyon oranları etkinlik değerleri aşağıdaki formül ile gösterilmektedir.

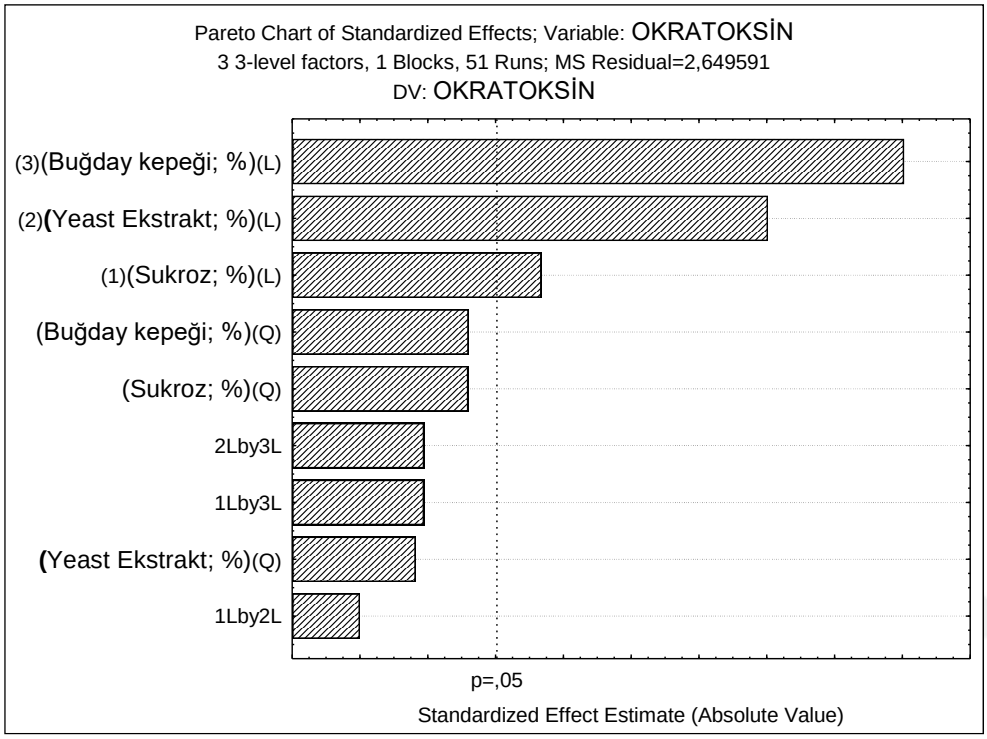
$$\text{Okratoksin degradasyonu (\%)} = 41{,}199 + 0{,}890_{\text{Sukroz}} - 0{,}732_{\text{Sukroz}}^{2} + 2{,}000_{\text{Yeast ekstrakt}} - 0{,}377_{\text{Yeast ekstrakt}}^{2} + 2{,}660_{\text{Buğday kepeği}} + 0{,}734\,_{\text{Buğday kepeği}}^{2}$$

Cevap yüzey yöntemi ile OBCC 5048 izolatı tarafından OTA degradasyonu varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.15.' de sunulmuştur. Çizelgede sunulan veriler Lack of fit sınaması verileri ($F=17{,}10$; $p<0{,}01$) incelendiğinde OBCC 5048 kodlu izolatın okratoksin A degradasyonuna ilişkin önerilen modelin anlamlı olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.15. OBCC 5048 izolatı tarafından aflatoksin degradasyonunun model uyumuna ilişkin varyans analizi sonuçları

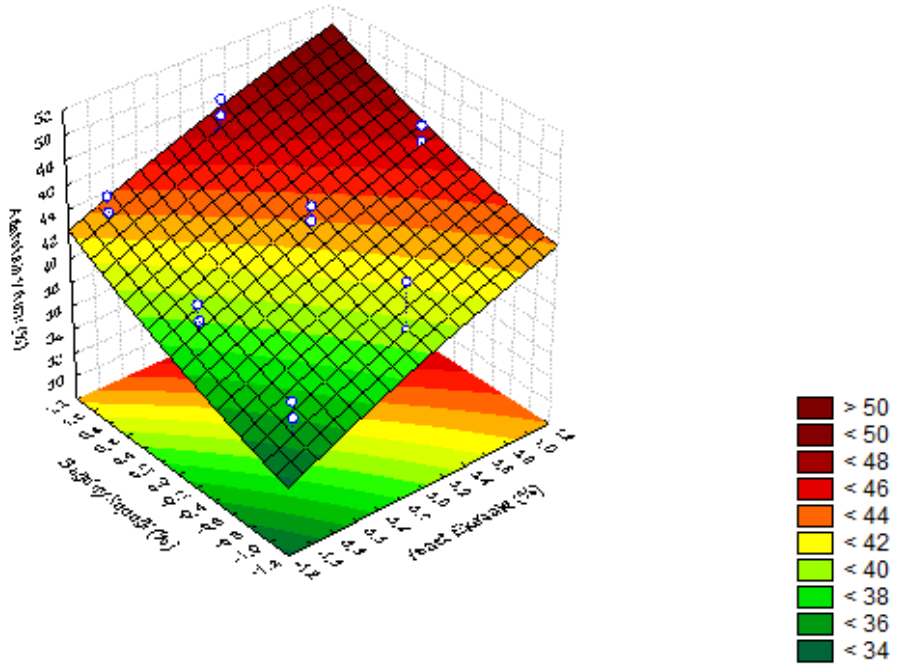
Değişim kaynağı	**Kareler toplamı (SS)**	**Serbestlik derecesi (SD)**	**Kareler ortalaması**	**F**	**p**
Model	305,90	9	33,99	12,83	< 0,01
Hata	108,63	41	2,65		
Toplam	414,53	50			
Belirlilik katsayısı (R^2) = 0,74					

Response surface yönteminde kullanılan değişkenlerin OBCC 5048 izolatı tarafından OTA degradasyonu üzerine etkisinin anlamlılık ve büyüklüğünü ifade eden Pareto grafiği Şekil 4.20.' de sunulmuştur. Elde edilen veriler OBCC 5048 izolatı tarafından OTA degradasyonu üzerine buğday kepeği, yeast ekstrakt ve sukroz' un doğrusal etkilerinin p= 0,05 düzeyinde anlamlı olduğunu göstermektedir.

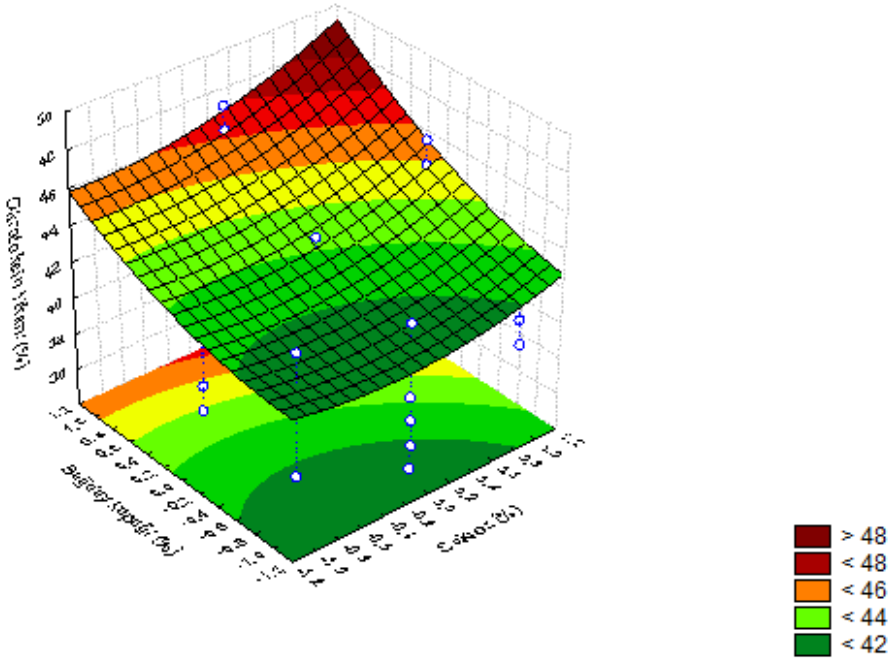


Şekil 4.18. Response surface deney tasarımında kullanılan değişkenlerin OBCC 5048 izolatı tarafından OTA degradasyonu üzerine etkisi

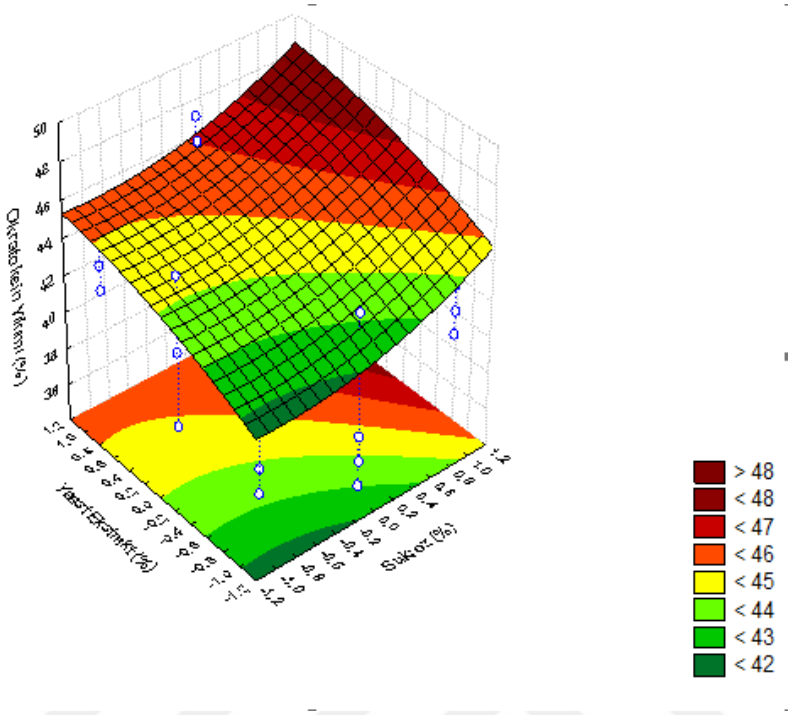
Okratoksin A degradasyonunda etkili olan değişkenlerden sukroz, yeast ekstrakt ve buğday kepeğinin okratoksin A degradasyonuna birlikte etki analizlerini ifade eden grafikler şekil 4.19. – 4.21.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Response surface tasarımında OTA degradasyonu üzerine yeast ekstrakt ve buğday kepeğinin karşılıklı etkileşimi (sukroz kepeği 30 g/L alınmıştır)



Şekil 4.20. Response surface tasarımında OTA degradasyonu üzerine buğday kepeği ve sukroz' un karşılıklı etkileşimi (yaest ekstrakt kepeği 3 g/L alınmıştır)

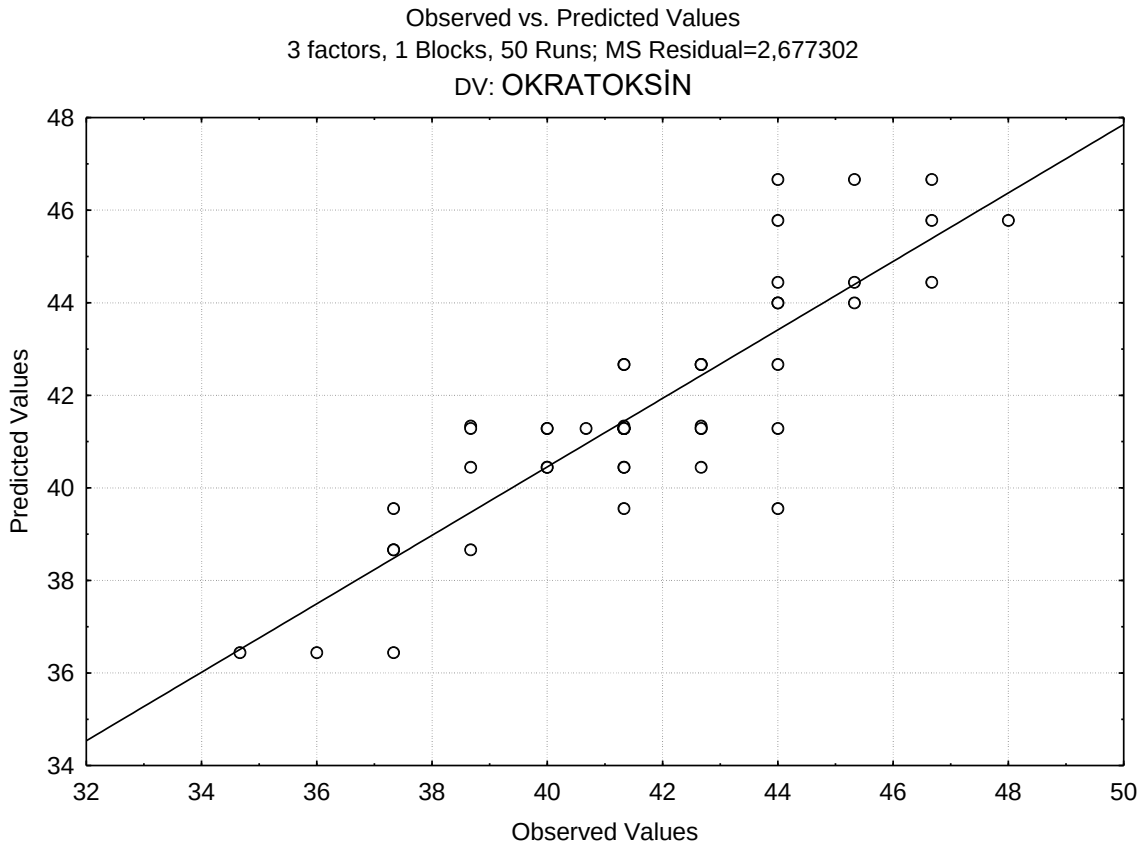


Şekil 4.21. Response surface tasarımında OTA degradasyonu üzerine sukroz ve yeast ekstrakt' ın karşılıklı etkileşimi (buğday kepeği 3 g/L alınmıştır)

Besi ortamında yeast ekstrakt ve buğday kepeğinin miktarı arttıkça OTA degradasyon oranı artmaktadır. Besi ortamında buğday kepeği miktarı arttıkça ve bununla beraber aynı zamanda sukroz miktarı da arttıkça OTA degradasyon oranı artmaktadır.

OTA degradasyonu için yaptığımız optimizasyon çalışmasında ise her üç grafikte de sukroz, yeast ekstrakt ve buğday kepeği miktarları arttıkça OTA degradasyon oranları artmaktadır.

Şekil 4.24, cevap yüzey yöntemi ile gözlenen ve istatistiksel olarak beklenen OTA degradasyon oran sonuçları arasındaki ilişkiyi ifade etmektedir. Şekil 4.24 ve Çizelge 4.15 te sunulan bulgular, önerilen modelin elde edilen sonuçları % 74 oranında açıklayabildiğini önermektedir.



Şekil 4.22. Response surface deney tasarımı ile OBCC 5048 izolatı tarafından okratoksin degradasyonunda beklenen ve gözlenen sonuçlar arasındaki ilişki

Response surface deney tasarımı ile elde edilen OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu verilerin analizi sonucunda için kullanılan besiyeri bileşenleri sukroz % 3 yeast ekstrakt % 0,3, buğday keğeği % 0,3 optimal olarak belirlenmiştir. AFB_1 ve OTA degradasyonu için en iyi besiyeri içerikleri çizelge 4.16.' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Response Surface Metodu ile yapılan istatistiksel çalışma sonucu en uygun besiyeri içeriği ve çevresel koşulları

KOŞUL GRUBU	ETKEN	TOKSIN		BIRIM
		AFB_1	OTA	
BESİNSEL KOŞULLAR	Sukroz	10,00	30,00	g
	Yeast Ekstrakt	3,00		g
	Buğday Kepeği	3,00		g
	KH_2PO_4	2,00		g
	$MgSO_4.7H_2O$	0,50		g
	$CaCl_2.H_2O$	0,10		g
	Amonyum tartarat	2,00		g
	Soytone	5,00		g
	İz element solüsyonu	10,00		ml
	Distile Su	1000		ml
ÇEVRESEL KOŞULLAR	İnkübasyon Sıcaklığı	28		°C
	Besiyeri Başlangıç pH değeri	5.00		pH
	Karıştırma hızı	125		rpm
DİĞER KOŞULLAR	İnokulum miktarı	7.5		%
	İnkübasyon süresi	12		gün

Optimizasyon çalışmaları bize göstermektedir ki besiyeri içerikleri modifiye edildikçe degradasyon oranları da artabilmektedir. Optimize edilmemiş kontrol grubu ile optimize edilmiş deney grupları arasında degradasyon oranları farklılık göstermektedir.

Optimize edilen deney grubundaki besiyeri içeriği ve koşulları ile sağlanan degradasyon oranı AFB_1 için % 7 oranında bir artış göstermektedir. OTA degradasyonunda ise optimizasyondan sonra degradasyon oranı % 8 oranında artmaktadır. Yapılan bu çalışmada besi ortamı içeriği sukroz, buğday kepeği ve yeast ekstrakt bakımından karşılaştırılmıştır.

Kong ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada AFB_1 giderimine etki eden çevresel etkenleri Plackett Burman ve Response Surface metodu ile araştırmışlar ve sıcaklık 23,2 °C; pH 7,17; sıvı hacmi 24,6 ml/100 ml; inokulum oranı % 10; çalkalama hızı 180 rpm ve inkübasyon süresi 81,9 saat olarak belirlemişlerdir. Bu şartlar altında *R. erythropolis'* in AFB_1 degradasyon etkinliği %28,7' den %95,8' e çıkmaktadır (Kong vd., 2012).

Ibrahim ve Jalab (2014) sıcaklık, pH, inokulum miktarı, çalkalama hızı, sıvı hacmi ve inkübasyon zamanı olmak üzere 6 değişkenin AFB_1 degradasyonu üzerine etkinliklerini araştırmışlardır. Değişkenlerin en verimli etkinliğini tasarladıklarında % 90,6 oranında AFB_1 degradasyonu yapabileceklerini belirlemişlerdir.

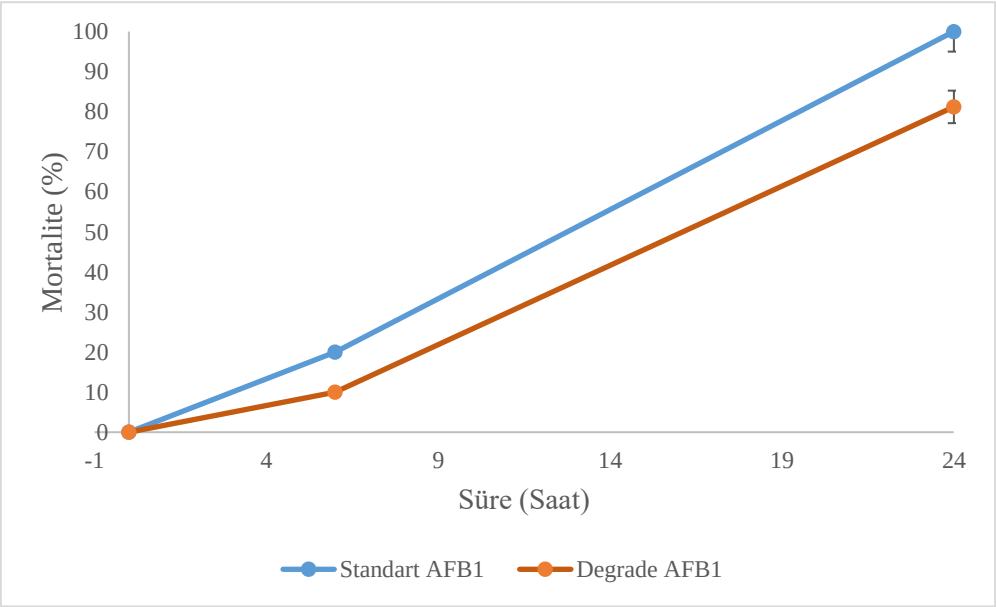
Yapılan bir yüksek lisans tez çalışmasında da AFB_1 degradasyonuna etki eden etmenlerin etkinlik verimlikleri araştırılmıştır. Değişken olarak sıvı hacmi, çalkalama hızı, pH, sıcaklık ve inokulum miktarı seçilmiştir. Besiyeri içeriği olarak glikoz ve pepton etkinliği araştırılmıştır. Sırasıyla sıvı hacmi, çalkalama hızı ve sıcaklık etkin bir yeterlilik gösterirken diğer değişkenlerin AFB_1 degradasyonunda kayda değer bir etkisi yoktur (Doğan, 2015).

Kong ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada 81,9 saatlik bir aflatoksin B_1 degradasyonunda %28,7 oranında bir başarı elde ederken yaptıkları optimizasyon çalışmasında %95,8'e çıkarılmıştır. Bizim çalışmamızda ise yalnızca bir saatlik bir inkübasyonla %60 civarında aflatoksin B_1 degradasyonu sağlanmıştır.

Fuchs ve arkadaşları (2008) *Bifidobacterium animalis* ile yaptıkları okratoksin A degradasyonu çalışmasında %95 oranında bir giderim elde ederken, Cozzi ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada *Lobesia botrana* (bağ güvesi)' nın biyokontrolü için kullandıkları *Beauveria bassiana* ile %80 oranında bir degradasyon sağlamıştır. Peteri ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada astaksantin üreten mayalar tarafından %90' dan fazla okratoksin A degradasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada ise elde edilen en yüksek okratoksin A degradasyon oranının %47,79 olduğu görülmektedir. Bu durum, çalışmamızda kullandığımız OBCC 5048 izolatının sözü edilen diğer mikrobiyal izolatlar kadar etkin bir degradasyon gereçekleştiremediğini ifade etmektedir.

4.4. Toksisitenin Belirlenmesi

AFB_1 degradasyonu sonucunda kültür sıvısının toksisite miktarındaki değişimi belirlemek üzere *Artemia salina* ile toksisite testi yapılmıştır. Daha sonra degrade olmuş ve olmamış AFB_1 çözeltisinden kaynaklanan zamana bağlı *Artemia salina* ölüm oranları belirlenmiştir. Şekil 4.23.' te deney ve kontrol gruplarına ait mortalite oranları gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Standart ve degrade edilmiş AFB_1 ile inkübe edilen *Artemia* larvalarının saatlere göre mortalite grafiği

Yapılan toksisite testinde, OBCC 5004 kültür sıvısı ile işlem görmemiş olan standart AFB_1 ile inkübe edilen *Artemia* larvalarından ilk 6 saatte 2,00 ± 0,82 kadarının öldüğü görülmektedir. Aynı grupta 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda *Artemia* larvalarının tamamının öldüğü gözlenmiştir.

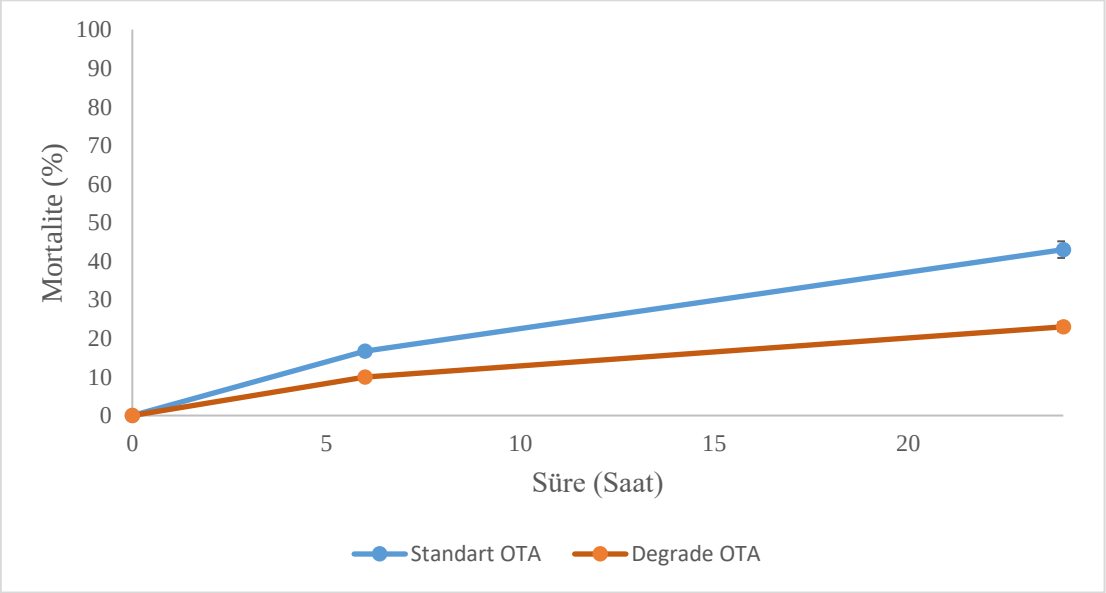
Buna karşın kültür sıvısında inkübasyona bırakılarak degradasyona uğrayan AFB_1' in ise daha az sayıda *Artemia* larvalarının ölümüne neden olduğu görülmüştür. İlk 6 saatte yalnızca 1,00 ± 0,82 *Artemia* larvası ölmüşken 24 saatlik bekleme süresinin bitiminde 8,33 ± 0,47 *Artemia* larvasının öldüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.17).

. Çizelge 4.17. Degrade edilmiş ve edilmemiş AFB_1' in zamana bağlı toksisitesi

Saat	AFB_1	Degrade edilmiş AFB_1
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	2,00 ± 0,82	1,00 ± 0,82
24	10,00 ± 0,00	8,33 ± 0,47

Bu toksisite testi degrade olan AFB_1' in toksisite değerinde yaklaşık %20 oranında bir azalma olduğunu göstermiştir.

OBCC 5048 izolatının OTA degradasyonu ile detoksifikasyon sağlama potansiyeli, degrade olmuş ve standart OTA' nın neden olduğu zamana bağlı ölüm oranları ile belirlenmiştir. Şekil 4.24.' te standart OTA ile mortalite oranları gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Standart ve degrade edilmiş OTA ile inkübe edilen *Artemia* larvalarının saatlere göre mortalite grafiği

OTA ile yapılan toksisite testinde, herhangi bir kültür sıvısı ile işlem görmemiş toksinin ilk 6 saatte 1,67 ± 0,47 *Artemia* larvasını öldürdüğü görülmüştür. Toksin ile 24 saatlik bir inkübasyondan sonra ise 4,33 ± 0,47 *Artemia* larvalarının öldüğü tespit edilmiştir. OTA OBCC 5048' in kültür sıvısı ile muamele edildiğinde ve larvalar inkübasyona bırakıldığında 1,00 ± 0,47 ölüm belirlenmiş ve 24 saatlik sürecin sonunda ise 2,33 ± 0,82 *Artemia* larvasının öldüğü görülmüştür. Bu toksisite testi bize degrade olan OTA' nın toksisite değerinde yaklaşık % 60 oranında bir azalma olduğunu göstermiştir.

AFB_1 ve OTA her ikisinin de standart çözeltileri *Artemia* üzerine toksik etki yapmaktadır. Bu etki zamana bağlı olarak artan miktarlarda bir toksik etkidir. AFB_1 standartı için 24 saatte tamamının ölümüne sebep olan toksik etki, OTA için 24 saatte yarısına yakınının ölümüne sebep olan bir toksik etkiye sahiptir. Standart ve degrade olmuş OTA' nın karşılaştırmalı *Artemia* ölüm oranları Çizelge 4.18.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.18. Degrade edilmiş ve edilmemiş OTA' nın zamana bağlı toksisitesi

Saat	OTA	Degrade edilmiş OTA
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	1,67 ± 0,47	1,00 ± 0,47
24	4,33 ± 0,47	2,33 ± 0,82

Hem AFB_1' in hem de OTA' nın degradasyona uğradıktan sonra toksisitesinde bir azalma olduğu görülmektedir. Bu azalma AFB_1' de daha düşük OTA' da ise daha yüksek seviyededir. Bu toksisite testinde görülmektedir ki AFB_1 her ne kadar yüksek miktarda bir degradasyona uğrasa da beklenen miktarda bir detoksifikasyon göstermemektedir. Bunun nedeni AFB_1' in yıkımından daha az toksik olan bir son ürün oluşmuş olması olabilir. Yine aynı şekilde OTA için yapılan toksisite testinde de zaten OTA' nın AFB_1' e göre daha az toksik olduğu görülmüştür. Fakat AFB_1' den farklı olarak OTA' nın degradasyonundan sonra beklenen miktarda bir detoksifikasyon gerçekleştiği görülmüştür.

Iram ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada, *Ocimum basilicum* ve *Cassia fistula* (fesleğen ve sinameki) bitkilerinin dal ve yapraklarından elde ettikleri ekstraktları aflatoksin B_1 ve B_2 degradasyonu amacı ile kullanmışlardır. Degradasyondan sonra ortaya çıkan detoksifikasyon oranını belirlemek için *Artemia* ile detoksifikasyon testi yapmışlardır. İşlem görmemiş aflatoksin %91,7 mortalite oranına sahipken bitki ekstraktı ile degradasyona uğramış olan aflatoksinde %22,5 oranında mortalite görülmüştür.

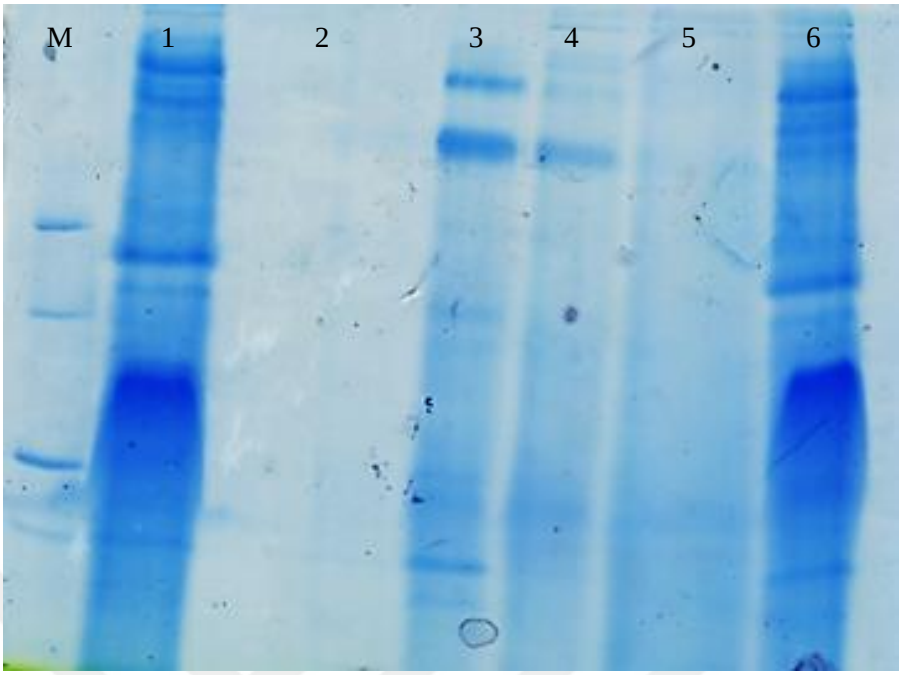
Aflatoksinlerin mikrobiyal detoksifikasyonu ile ilgili olarak bilinen ilk çalışmasını Ciegler ve arkadaşları (1966) yapmışlardır. Bu detoksifikasyon çalışmasında mayalar, küfler, bakteriler, aktinomisetler, algler ve fungusların aflatoksin degradasyon yetenekleri taranmıştır. Yalnızca bir bakterinin (*Flavobacterium aurantiacum*) degradasyon yaptığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada ördek yavruları ile detoksifikasyon testi yapılmıştır.

Vidyasagar ve arkadaşlarına göre (1997) toksik etkiye sahip olan bu aflatoksinler bu özelliklerini özellikle difuran halkasındaki C_8 – C_9 bağından almaktadırlar. Özellikle buradaki epoksit oluşumu DNA'da N7 – Guanin bağı oluşturarak mutasyona neden olmakta ve kanserojenik etki göstermektedir. Bu nedenle çeşitli oksidazlar bu formu bozabilirlerse aflatoksinin detoksifikasyonuna neden olmaktadırlar.

4.5. Protein Saflaştırma Çalışmaları

4.5.1. FPLC ile protein saflaştırılması

AFB_1 degradasyonunda başarılı olduğu belirlenen OBCC 5004 kod numaralı izolat modifiye Kirk besiyerinde geliştirildikten sonra FPLC ile bir protein saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25.' te ilk aşamada elde edilen ayrıştırılmış 6 fraksiyon ve bir marker SDS – PAGE ile yürütülerek içerdiği proteinler görüntülenmiştir.



Şekil 4.25. OBCC 5004 kültür sıvısının FPLC sonrası SDS – PAGE bantları (M: Marker, 1-6: Fraksiyonlar)

Şekilde ilk kuyucuk marker, diğer 6 kuyucuk ayrıştırılmış ve fraksiyonlarda toplanmış proteinlerdir. Bir numaralı fraksiyon FPLC ile kolondan geçerken kolona bağlanmayan proteinleri içerir ve diğer fraksiyonlara göre daha yoğun bir protein içeriğine sahiptir. Hemen sonrasında bağlanma gerçekleştiği için 2 numaralı fraksiyonda bir protein içeriği görülememiştir. Gradiyent yürütme gerçekleştiği için 3, 4 ve 5 numaralı fraksiyonlarda bağlandıları kolondan kopan proteinler görülmektedir. Son fraksiyonda ise kolon yüksek tuz içeren mobil fazla yıkandığı için bağlı olan proteinlerin tamamı çözünmüştür. Bu nedenle son fraksiyonda yüksek bir protein içeriğine sahiptir.

4.5.2. FPLC ile ayrıştırılan proteinlerin enzim AFB_1 degradasyon ilişkileri

AFB_1 degrade eden enzimin mangan peroksidaz ve / veya lakkaz olup olmadığını anlamak üzere FPLC ile 6 fraksiyona ayrıştırılan proteinlerin hem mangan peroksidaz hem de lakkaz aktivitelerine bakılmıştır. Ayrıca bu altı fraksiyonun AFB_1 degradasyon oranları

da belirlenerek enzim aktivitesi ve AFB_1 degradasyonu arasındaki ilişki varlığı sorgulanmıştır. Bu aktivite ve degradasyon değerleri Çizelge 4.19.' da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 19. MnP ve Lakkaz aktiviteleri ile AFB_1 degradasyon değerleri karşılaştırılması

Fraksiyon Numarası	MnP (Maksimum V*)	Lakkaz (Maksimum V)	AFB_1 Degradasyonu (%)
1	129,846	78,314	4,55
2	2,615	3,428	3,64
3	2,308	3,647	0,00
4	35,846	125,764	10,91
5	3,231	2,312	7,27
6	5,231	4,246	54,55

* Maksimum V (Enzim tepkime hızı)

FPLC' den saflaştırılan 1 numaralı fraksiyon en yüksek mangan peroksidaz aktivitesine sahipken, 4 numaralı fraksiyon en yüksek lakkaz aktivitesine sahiptir. Buna karşın değerlendirilen 6 fraksiyon içinde en yüksek AFB_1 degradasyon oranına sahip olan, 6 numaralı fraksiyondur. Bu sonuç AFB_1 degradasyon yapma yeteneğine sahip olan enzimin 6 numaralı fraksiyonda bulunan bir protein olduğunu ve ayrıca mangan peroksidaz ve lakkaz dışında farklı bir enzim olduğunu düşündürmektedir.

4.5.3. IEF ile protein saflaştırılması

FPLC ile yapılan saflaştırma çalışmasından sonra enzim aktivite ve AFB_1 degradasyon çalışmaları yapılmış ve 6 numaralı fraksiyonun degradasyon yeteneğine sahip enzimi içerdiği görülmüştür. Daha sonra 6 numaralı fraksiyon IEF ile saflaştırılarak AFB_1 degrade eden enzim elde edilmeye çalışılmıştır. IEF ile elde edilen 24 fraksiyon AFB_1

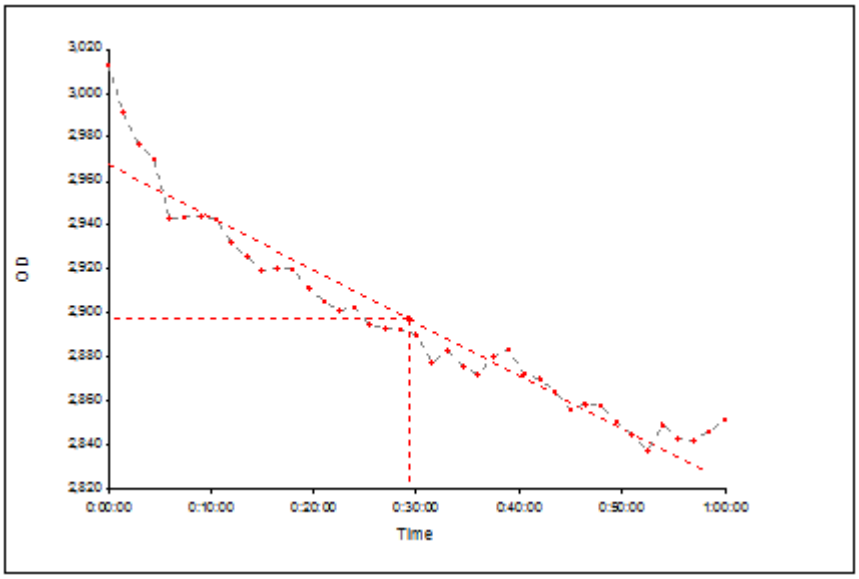
degradasyon testine tabi tutulmuştur. Elde edilen degradasyon sonuçları Çizelge 4.20 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. IEF'ten hasat edilen fraksiyonların AFB_1 degradasyonu

Fraksiyon No	AFB_1 Degradasyonu (%)	Fraksiyon No	AFB_1 Degradasyonu (%)
1	27,59	13	0,69
2	68,97	14	2,76
3	34,48	15	1,38
4	27,59	16	3,45
5	6,90	17	5,52
6	10,34	18	3,10
7	4,14	19	3,10
8	4,14	20	2,76
9	1,72	21	4,14
10	29,31	22	4,83
11	1,03	23	27,59
12	1,03	24	10,34

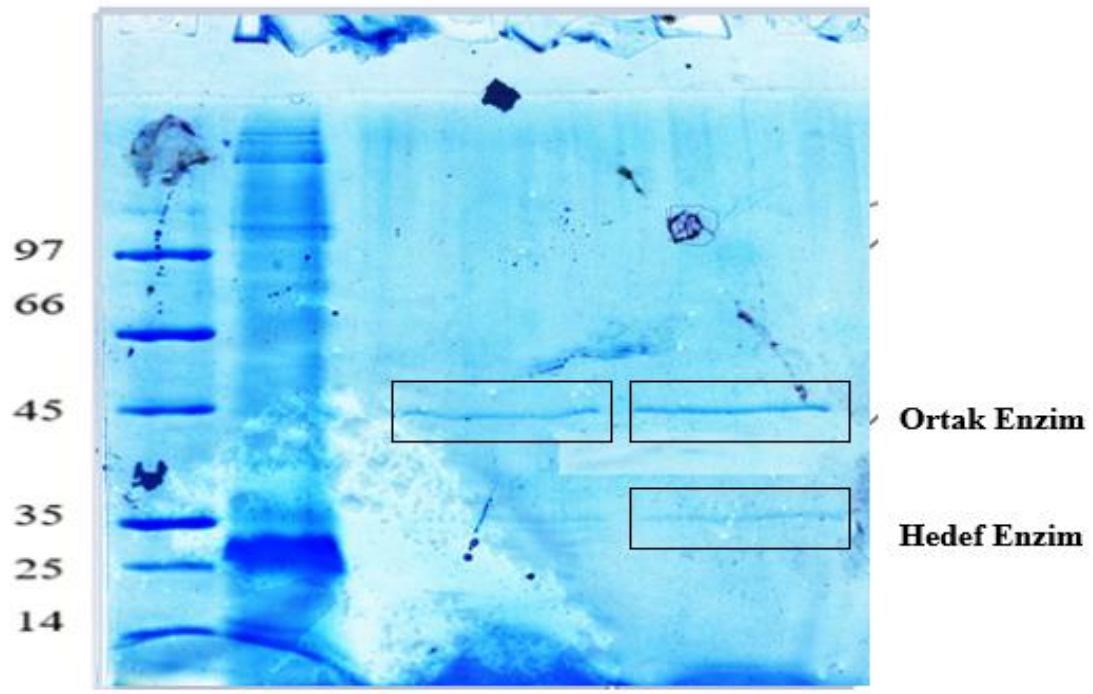
Ayrıştırılan proteinlerden en iyi AFB_1 degradasyonunu yaklaşık % 69 oranı ile 2 numaralı fraksiyon gerçekleştirmektedir. Diğer fraksiyonların hepsi % 0 – 34 aralığında degradasyona neden olmaktadır.

İki numaralı fraksiyona ait enzim, aflatoksin B_1 giderimi için 1 saatlik inkübasyona bırakılmış ve mikroplate okuyucu ile izlenmiştir. Yapılan 1 saatlik inkübasyonun ardından elde edilen degradasyon grafiği şekil 4.26.' da verilmiştir.



Şekil 4.26. IEF ile saflaştırılan enzimin AFB_1 degradasyon grafiği

Absorbans değerinde bir saatlik süre içerisinde zamana bağlı olarak doğrusal bir azalma gerçekleşmiştir. Bu değişim aflatoksin B_1 degradasyon oranını ifade etmektedir. IEF sonucunda saflaştırılan ve % 69 oranında degradasyon yeteneğine sahip olan fraksiyonun içerdiği proteinleri görmek için SDS – PAGE yapılmıştır. SDS – PAGE ile sırasıyla marker, FPLC' den elde edilen fraksiyonlardan 6 numaralı fraksiyon ve IEF ile elde edilen fraksiyonlardan 1 ve 2 numaralı fraksiyonlar yürütülmüştür. Elde edilen protein bantları Şekil 4.27.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. IEF Sonrası SDS-PAGE ile degradasyon yapan enzimin görüntülenmesi (M: Marker, F: FPLC 6 numaralı fraksiyon, 1-2: IEF 1 ve 2 numaralı fraksiyonlar)

Elde edilen bu fraksiyonlardan 1 ve 2 numaralıların protein bantları şekil 4.27.' de görülmektedir. Her iki fraksiyonda da 45 kDa' luk protein bant bulunurken, 2 numaralı fraksiyonda ayrıca 38 kDa' luk bir bant daha vardır. Bu 2 numaralı fraksiyonda %69 oranında toksin degradasyonu olduğu için 38 kDa'luk enzim aflatoksin B_1 degradasyonundan sorumlu enzimdir.

Aflatoksin degradasyonunda başarılı olduğu bulunmuş, bilinen bazı enzimler ve sonradan keşfedilen bir kaç enzim mevcuttur. Bu enzimler AFO (eski adıyla ADTZ) (Liu vd., 1998), yaban turbu peroksidaz (Chitrangada ve Mishra, 2000), Lakkaz türevleri (Albert vd., 2009; Loi vd., 2016), $F_{420}H_2$-bağlı redüktaz (Taylor vd., 2010), Mn-Peroksidaz (Yehia, 2014), aflatoksin degradasyon enzimi (Motomura vd., 2003), MADE (Zhao vd., 2011) ve Ery4 (Loi vd., 2017) olarak başlıca literatüre geçmiştir.

Beyaz çürükçül bir mantar türü olan *Lentinus strigosus*' un lakkaz ve mangan peroksidaz enzimlerini ürettiği bilinmektedir. Ligninolitik aktiviteye sahip olan beyaz çürükçül mantarlar aynı zamanda boya gideriminde de kullanılmaktadırlar. Aromatik karbon halka yapısına sahip boyaların fungal enzimler tarafından giderilmesi, toksinlerin de giderilebileceğini düşündürmektedir. Ancak yapılan çalışmada *Lentinus strigosus*' un ürettiği lakkaz ve mangan peroksidaz enzimlerinin aflatoksin B_1 degradasyonunda etkili olmadığı anlaşılmıştır. Buna rağmen aflatoksin B_1 degradasyonundan sorumlu olan enzim tanımlanamamıştır. Bundan sonraki çalışmalar toksini degrade eden bu enzimin identifikasyonu yönünde ilerleyecektir.

4.6. Yüksek Toksin Degradasyonuna Neden Olan İzolatların Belirlenmesi

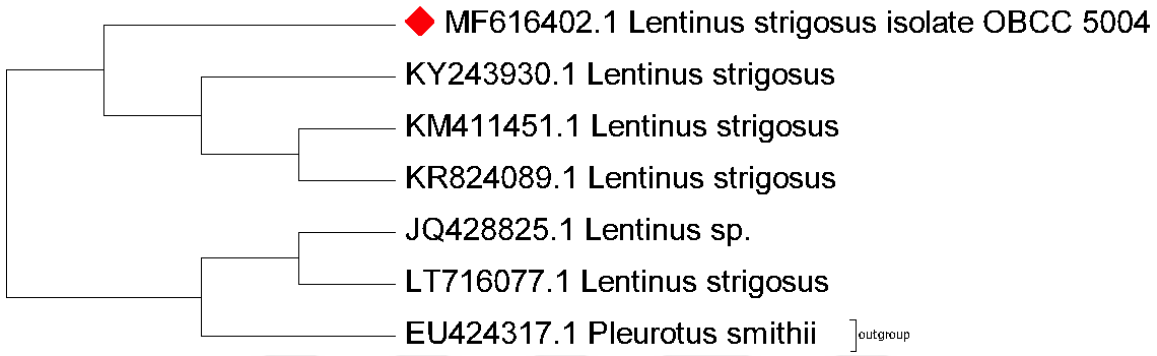
Yüksek oranda aflatoksin B_1 ve OTA degradasyonuna neden olan OBCC 5004 ve OBCC 5048 kod numaralı izolatların moleküler yöntemlere dayalı identifikasyonu, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Fungikültür Laboratuvarı olanakları kullanılarak doktora öğrencisi Ayşe Betül Karaduman tarafından yapılmıştır.

OBCC 5004 kodlu makrofungusun ITS1 bölge dizilemesi yapılmış ve nükleotit baz dizisi belirlenmiştir. Belirlenen gen dizisi aşağıdaki gibidir.

CCTTGCTCATTCCAATTCTTACACCTCTGTGCACTTAACATGGGCTGGTCGTAG
CTTTTGTCTTGCTTCACTGTGAGACGGGCTTTGACCTGCCTGTGGTTACTCTACA
AACACTTTAAAGTATTAGAATGTAACATCGCGGATAATAAACGCATCTTATAC
AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGTAT
TCTCAATTCTCTAAATCTTTGCGGATTTGGATGAATTGGATGTGGAGGTTTATT
GCTGGCGACTATCCTTCTGGATCTGTGTCCGGCTCCTCTGAAATAAATTAGCAG
GAATGTTGCCGTGCCAACCTCAGTGTGATAATTATCTGCGCTGTTGTTGCTCAG
CAAAATATATGTTCTTGCTTCTAATCGTCTTCGGACAATTT

Gen bankasına daha önceden yüklenmiş diğer izolatlarla OBCC 5004 kodlu izolatın benzerlik yüzdeleri ve diğer izolatların erişim numaraları aşağıda verilmiştir.

OBCC 5004 kodlu izolatnın KU761236.1 ve LT716077.1 erişim numarasına sahip *Lentinus strigosus* suşları ile %100 benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Şekil 4.28.' de OBCC 5004 kodlu *Lentinus strigosus* izolatının evrimsel akrabalık ilişkilerini gösteren dendogram verilmiştir.



Şekil 4.28. OBCC 5004 kodlu izolatın evrimsel akrabalık dendrogramı

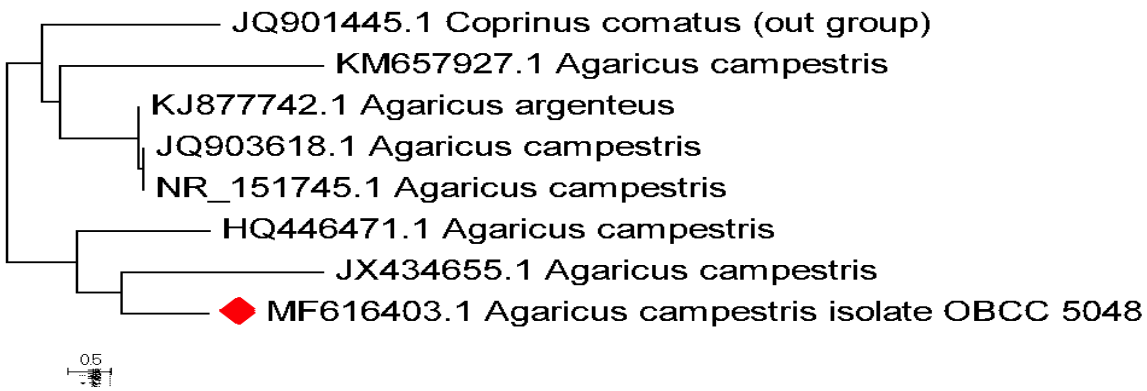
Sonuç olarak OBCC 5004 kodlu izolat *Lentinus strigosus* olarak identifiye edilmiş olup Genbank' ta MF616402 erişim numarası ile depolanmıştır.

OBCC 5048 kodlu makrofungus izolatının da ITS1 bölge dizilemesi yapılmış ve nükleotit baz dizisi belirlenmiştir. Belirlenen gen dizisi aşağıdaki gibidir.

AGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTTGGAGCATGTGCACACCTGTTTGGATTTCATT
TTCATCCACCTGTGCACCTATTGTAGTCTTTGGTTTGGGTATTGAGGAAGTGGT
CAGCCTATCAGCATTTGCTGGATGTGAGGAGTTTGCAGTGTGAAAGCATTGCT
GTCCTTTACTTGGCCATGGAGTCTTTTGCCTACCAGAGTCTATGTCATTCATTAT
ACCCTGTCGAATGTTATCGAATGTCGTTACATGGGCTTTCATGCCTATGAAAAT
TATAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTACTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGT
CATTAAATTCTCAACTCTCTTATACTTTGTTGTATAGGAGGGCTTGGATTGTGG

AGGTTTGCTGGCAACTTGTTTGTGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAAC
CGTTTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAAACTATCTACACTGGCGAGGGGATTG
CTCTCTGTGTTGTTCAGCTTCTAATCGTCTCAGTTTGAGACAACTTTTGAATACT
TGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT

Gen bankasına daha önceden yüklenmiş diğer izolatlarla OBCC 5048 kodlu izolatın benzerlik yüzdeleri ve diğer izolatların erişim numaraları aşağıda verilmiştir. OBCC 5048 kodlu izolat, JQ903618.1, HQ446471.1 ve JX434655.1 erişim numaraları ile depolanmış bulunan *Agaricus campestris* suşlarına ait dizilere %99 benzerliğe sahiptir. OBCC 5048 kodlu izolat olan *Agaricus campestris' i*n akrabalık ilişkilerini gösteren dendrogram şekil 4.29.' da verilmiştir.



Şekil 4.29. OBCC 5048 kodlu izolatın evrimsel akrabalık dendrogramı

Eldeki veriler ışığında OBCC 5048 kodlu izolatın *Agaricus campestris* türüne ait bir izolat olduğu kararına varılmış ve bu izolata ait dizi Genbank' ta MF616403 erişim numarası ile depolanmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada 100 kadar fungus izolatı mikotoksin degradasyon yeteneği bakımından taranmış ve AFB_1 ve OTA degradasyonunda en başarılı olduğu görülen birer fungus izolatı, sırası ile *Lentinus strigosus* ve *Agaricus campestris,* araştırmanın sonraki aşamaları için seçilmiştir. OBCC 5004 kod numaralı *Lentinus strigosus* izolatı 1 saatlik inkübasyon sonucu % 67 oranında AFB_1 degradasyonu gerçekleştirirken, OBCC 5048 kod numaralı *Agaricus campestris*' in neden olduğu OTA degradasyonu % 56 oranına ulaşmıştır. Literatürde bu fungus türlerine ilişkin bir kayıt bulunmamakta ve bu çalışma ile bahsedilen fungus türlerinin AFB_1 ve OTA degradasyonunda başarılı olabileceğine ilişkin ilk veri sunulmuş olmaktadır. Bu durumun mikotoksin biyodegradasyonuna ilişkin sonraki çalışmalara ivme kazandıracağı umulmaktadır.

Çalışmanın ikinci aşaması olarak degradasyona etki eden besiyeri bileşenleri ve çevresel koşulların etkinliği araştırılmıştır. Besiyeri içeriğine ilave edilen buğday kepeği ve yeast ekstraktın miktarı ile her iki toksinin biyodegradasyonu arasında bir pozitif korelasyon olduğu açık biçimde görülmektedir. Sukroz miktarındaki değişim ise AFB_1 ve OTA degradasyonuna sırası ile negatif ve pozitif biçimde yansımaktadır. Besiyerindeki karbon ve azot arasındaki oranın değişimi fungusların sekonder metabolizmaya girişini hızlandırma yönünde etki etme potansiyeline sahiptir. Bu besiyeri bileşenlerinin mikotoksin biyodegradasyonuna etkisinin her bir fungus türünde farklı biçimde etki edebileceği varsayılmaktadır. Beyaz çürükçül bir fungus türü olan *Lentinus strigosus*' un ligninolitik enzimlerinin ifade edilmesinin artması bir seçenek olabilir.

Araştırmanın diğer bir aşamasında mikotoksin biyodegradasyonundan sorumlu enzimlerin ayrılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. FPLC ile yapılan ilk saflaştırmadan sonra enzim aktivite testi yapılmış, 6 fraksiyondan lakkaz ve mangan peroksidaz enzimlerine sahip olan 1 ve 4 numaralı fraksiyonların AFB_1 degradasyonu konusunda başarısız iken düşük enzim aktivitesine sahip olan 6 numaralı fraksiyonun AFB_1 degradasyonu konusunda çok daha başarılı olduğu görülmüştür. Düşük miktarda bile olsa 1 numaralı fraksiyon genellikle kolona tutunamayan proteinleri de içerebileceği ve bu nedenle

burada çok fazla protein bulunabileceği varsayılmıştır. Yapılan SDS-PAGE ile bu fraksiyonlardaki proteinler gözlemlenmeye çalışılmıştır. FPLC' den elde edilen 1 ve 6 numaralı fraksiyonların en yoğun protein bandına sahipken 2 ve 5 numaralı fraksiyonların en düşük protein bandına sahip oldukları görülmüştür. FPLC' den elde edilen 6 numaralı fraksiyonun bu kadar yoğun protein bandına sahip olmasının nedeni yüksek affinite kabiliyetine sahip proteinlerin, gradiyent FPLC metodunda en yüksek NaCl tampon konsantrasyonunda serbest kalmaları sonucu bütün proteinlerin bu fraksiyonda toplanmasından kaynaklı olabilir. Bu nedenle bu fraksiyonun başka bir kolon ve yöntemle yeniden yürütülmesi daha spesifik bir ayrıma neden olabileceği düşünülmektedir. Ancak saflaştırma çalışmalarında adım sayısının artması hem zaten az olan protein miktarının daha da azalmasına hem de enzim aktivitesinin düşmesine ya da kaybolmasına neden olma olasılığı söz konusudur. Bu yüzden çok miktarda FPLC ürünü elde edilmiş ve buradan seçilen 6 numaralı fraksiyonlar bir araya toplanmıştır. Daha sonra bu FPLC fraksiyonları başarılı bir saflaştırma yöntemi olan IEF ile ayrıştırılmıştır.

Çalışmanın sonraki basamağında degradasyon sonucu mikotoksinlerin toksisitesinde bir azalma olup olmadığı sorgulanmıştır. Literatürde var olan birçok raporda mikotoksinlerin degradasyona uğramasına karşın toksisitesinin devam ettiği görülebilmektedir. Hatta bazen degradasyonun son ürünü olarak açığa çıkan bileşikler daha toksik te olabilir. Bu çalışmada kullanılan toksisite testinde *Artemia salina* (Brine shrimp) kullanılmıştır. *Artemia* larvaları zamana bağlı olarak kültür sıvısı ile işlem görmüş ve işlem görmemiş mikotoksinlere maruz bırakılmıştır. Aflatoksin B_1 biyodegradasyona uğradıktan sonra yaklaşık olarak %20' lik bir toksisite kaybı gösterirken okratoksin A ise biyodegradasyondan sonra %60' lık bir toksisite kaybı göstermiştir. Bu sonuçlar okratoksin A'nın *Agaricus campestris* tarafından degradasyonu sonucu gerçekleştirilen detoksifikasyonun oldukça tatmin edici seviyede olduğunu göstermektedir. Ancak aflatoksin B_1' in *Lentinus strigosus* tarafından yıkımı sonucunda gerçekleşen detoksifikasyonun istenen oranlardan oldukça uzak olduğu görülmektedir. Bu nedenlerle uygulamaya taşınma açısından *Agaricus campestris* izolatının daha yüksek potansiyele sahip olduğu, diğer taraftan *Lentinus strigosus* ile aflatoksin B_1 yıkımının bu hali ile önerilebilirlikten uzak olduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın en son basamağında, biyodegradasyonda etkili olan fungal izolatların identifikasyonlarının moleküler yöntemler aracılığı ile onaylanması konusunda odaklanılmıştır. Okratoksin A ve aflatoksin B_1 degradasyonunda en başarılı organizmalar olan OBCC 5048 ve OBCC 5004 kodlu izolatların ITS bölge dizilemesi uygulanmıştır. Elde edilen nükleotit dizisi genbanktaki diğer organizmaların nükleotit dizileri ile karşılaştırılmıştır. OBCC 5004 kodlu izolat *Lentinus strigosus* ile %100 benzerlik göstermişken, OBCC 5048 kodlu izolat ise *Agaricus campestris* ile %99 benzerlik göstermiştir. Elde edilen veriler literatürde bu organizmaların okratoksin A ve aflatoksin B_1 degrade ettiği ile ilgili bir bilgi bulunmaması nedeni ile bilimsel bilgi birikimine katkı sağlama iddiasındadır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada yüze yakın fungal izolat okratoksin A ve aflatoksin B_1 degradasyon potansiyellerini belirlemek amacı ile taranmıştır. Her iki mikotoksin için diğerlerinden daha yüksek degradasyon kapasitesine sahip organizmalar seçilmiş ve optimum biyodegradasyon koşulları belirlenmiştir. Toksinlerin detoksifiye olma oranları belirlenmiş ve aflatoksin B_1' in degradasyonundan sorumlu enzim görüntülenmiştir.. Eldeki verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda, gelecekte gerçekleştirilecek çalışmaların; tarama aşamasında degradasyon gösteren diğer izolatlara yönelik benzer çalışmaların gerçekleştirilmesi, *Lentinus strigosus* ve *Agaricus campestris*' in toksin degradasyonundan sorumlu enzimlerin identifikasyon ve karakterizasyonu, detoksifikasyonu oranının arttırılması ve sonuç olarak çalışılan mikotoksinlerin risk yarattığı alanlarda uygulamaya taşınabilirliğinin sınanması yönlerinde boyutlandırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aiko, V., Edamana, P., Mehta, A., 2016, Decomposition and detoxification of aflatoxin B_1 by lactic acid journal of Science Food Agriculture, 96, 1959–1966.

Alassane-Kpembi, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O., Oswald, I.P., 2016 Mycotoxinsco-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies, Critical Review in Microbiology, 57(16), 3489-3507

Alberts, J.F., Engelbrecht, Y., Steyn, P.S., Holzapfel, W.H., Van Zyl, W.H., 2006, Biological degradation of aflatoxin B_1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures, International Journal of Food Microbiology, 109, 121–126.

Alberts, J.F., Gelderblom, W.C., Botha, A., Van Zyl, W.H., 2009, Degradation of aflatoxin B_1 by fungal laccase enzymes, International Journal of Food Microbiology, 30, 47–52.

Altug, T., Youssef, A.E., Marth, E.H., 1990, Degradation of aflatoxin B_1 in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. Journal of Food Protection, 53, 581–628.

Anlı, E., Vural, N., Kızılet, R., 2008, An alternative method for the determination of some of the antioxidant phenolics in varietal Turkish Red Wines, Journal of the Institute of Brewing, 114 : 3 P 239–245

Azab, R. M., Tawakkol, W. M., Hamad, A. M., Abou-Elmagd, M. K., El-Agrab, H. M. ve Refai, M. K., 2005, Detection and estimation of aflatoxin B_1 in feeds and its biodegradation by bacteria and fungi, Egyptian Journal of Natural Toxins, 2: 39-56.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Baek, J. H., So, K. K., Ko, Y. H., Kim, J. M., Kim, D. H., 2014, Mycoflora and enzymatic characterization of fungal isolates in commercial meju, starter for a korean traditional fermented soybean product, Mycobiology, 42(3):291-295.

Bata, Á., Lásztity, R., 1999, Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms, Trends in Food Science and Technology, 10, 223-228.

Bennett, G.A., Lagoda, A.A., Shotwell, O.L., Hesseltine, C.M., 1981, Utilization of zearalenone-contaminated corn for ethanol production, Journal of the American Oil Chemists Society, 58, 974-976. 35.

Bennett, J.W., Klich, M., 2003, Mycotoxins, American Society for Microbiology, 16.3. p 497-516

Bothast, R.J., Bennett, G.A., Vancauwenberge, J.E., Richard, J.L., 1992. Fate of fumonisin b_1 in naturally contaminated corn during ethanol fermentation, Applied and Environmental Microbiology, 58, 233-236.

Boudergue, C., Burel, C., Dragacci, S., Favrot, M., Fremy, J., Massimi, C., Prigent, P., Debongnie, P., Pussemier, L., Boudra, H., 2009, Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety, European Food Safety Authority, Support Publish 6.

Böswald, C., Engelhardt, G., Vogel, H., Wallnöfer, P.R., 1995, Metabolism of fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast of technological relevance, Natural Toxins, 3, 138–144.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bradford, M.M., 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Caban˜es, F.J., 2001, An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture, International Journal of Food Microbiology, 71: 139–144

Bretz, M., Beyer, M., Cramer, B., Knecht, A., Humpf, H.U., 2006, Thermal degradation of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol, Journal of Agricultural Food Chemistry 54, 6445–6451.

Bryden, W.L., 2007, Mycotoxins in the food chain: Human health implications, Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16, 95–101

Cheli, F., Campagnoli, A., Pinotti, L., Savoini, G., Dell'orto, V., 2009, Electronic nose for determination of aflatoxins in maize, Biotechnology Agronomy Society and Environment 13(S), 39-43.

Chitrangada, D., Mishra, H.N., 2000, In vitro degradation of aflatoxin B_1 by horseradish peroxidase. Food Chemistry, 68, 309–313.

Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E., Hall, H. H., 1966, Microbial detoxification of aflatoxin, Applied Microbiology, 14:934–9.

Cozzi, G., Somma, S., Haidukowski, M., Logrieco, A. F., 2013, Ochratoxin a management in vineyards by *Lobesia botrana* Biocontrol, Toxins, 5, 49-59

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Deng, Y., Liu, L., Velázquez, B., Szczerba, M., Dixon, J.B., 2014. Interactions of aflatoxin B with smectites: interlayer accessibility, bonding mechanisms, and size matching, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, 27–43.

Doğan, Ö. B., 2015, Microbial detoxification of groundnut meal naturally contaminated with aflatoxin using *Rhodococcus erythropolis*, Middle East Technical University.

Fanelli, F., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Logrieco, A. F., Mulè, G., 2016, Light regulation of mycotoxin biosynthesis: new perspectives for food safety, World Mycotoxin Journal, 9, 129–146

Fouler, S. G., Trivedi, A. B., Kitabatake, N., 1994, Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide, Journal of the Association of Official Agriculture Chemistry, 77, 631–637.

Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmüller, S., 2008, Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria, Food and Chemical Toxicology, 46: 1398–1407

Gao, Y. N., Wang, J. Q., Li, S. L., Zhang, Y. D., Zheng, N., 2016, Aflatoxin M_1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins, Food Chemistry Toxicology, 96, 79–89

Goldblatt, L. A., Dollear, F. G., Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A., 1977, Detoxification of contaminated crops: mycotoxins in human and animal health, Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois, 139-150.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gupta, P. C., Bajpai, V., Mishra, V.,. Saxena, R. K., Singh, S., 2009, Effect of gamma irradiation on microbial load, aflatoxins and phytochemicals present in *Trigonella foenumgraecum* World Journal of Microbiology Biotechnology, 25:2267–2271

Harwig, J., Scott, P. M., 1971, Brine shrimp (*Artemiasalina l.*) larvae as a screening system for fungal toxins, Applied Microbiology, 21(6), 1011-1016.

Hassan, Y. I., Bullerman, L. B., 2013, Cell-surface binding of deoxynivalenol to *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans isolated from sourdough starter culture. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science, 2, 2323–2325.

Hassan,Y. I., Zhou, T., Bullerman, L. B., 2015, Sourdough lacticacid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents, Food Scientific Technology International, 22, 79–90.

Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, A. T., 2012, Applied Microbiology and Biotechnology, 93, 4, 1395–1410

Heussner, A., Bingle, L., 2015, Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data, Toxins, 7(10): 4253–4282.

Holmes, R. A., Boston, R. S., Payne, G. A., 2008, Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis, Applied Microbiology of Biotechnology, 78:559–572

Ibrahim, R. W., Jalab, H. A., 2014, The generalization of Plackett-Burman design based on fractional calculus of complex order, American Institute of Physics Conference Proceedings, 1635, 107

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Iram, W., Anjum, T., Iqbal, M., Ghaffar, A., Abbas, M., Khan, A., 2016, Structural analysis and biological toxicity of aflatoxins B_1 and B_2 degradation products following detoxification by *Ocimum basilicum* and *Cassia fistula* aqueous extracts, Frontiers in Microbiology, 7:1105

Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., Dussort, P., 2016, Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination, Mycotoxin Research, 32:179–205

Kong, Q., Zhai, C., Guan, B., Li, C., Shan, S., Yu, J., 2012, Mathematic modeling for optimum conditions on aflatoxin B_1 degradation by the aerobic bacterium *Rhodococcus erythropolis*, Toxins; 4(11): 1181–1195

Kudryavtseva, O. A., Dunaevsky, Y. E., Kamzolkina, O. V., Belozersky, M. A., 2008, Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes, Microbiology (77), 6, 643–653

Liu, D. L., Yao, D. S., Liang, R., Ma, L., Cheng, W. Q., Gu, L.Q., 1998, Detoxifcation of aflatoxin B_1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*, Food Chemistry of Toxicology, 36, 563–574.

Loi, M., Fanelli, F., Zucca, P., Liuzzi, V. C., Quintieri, L., Cimmarusti, M. T., Monaci, L., Haidukovski, M., Logrieco, A. F., Sanjust, E., 2016,. Aflatoxin B_1 and M_1 degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* redox mediators, Toxins, 8, 245.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Loi, M., Quintieri, L., Liuzzi, V. C., Haidukovski, M., Logrieco, A. F., Sanjust, E., Fanelli, F., Mulè, G., 2017, Aflatoxin M_1 removal and biotechnological application of a laccase from *Pleurotus eryngii* for milk safety. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia. In press. (8): 245

Maeba, H., Takamoto, Y., Kamimura, M. I., Miura, T. O., 1988, Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. Journal of Food Science, 53, 667–668.

Motomura, M., Toyomasu, T., Mizuno, K., Shinozawa, T., 2003, Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*, Microbiology Research, 158, 237–242.

Müller, H.M. 1983, Entgiftung von Mykotoxinen: II. Chemische Verfahren und Reaktion mit Inhaltsstoffen von futtermitteln, Übersirchten zur Tierernährung, 11, 47–80.

Özkaya, Ş., Temiz, A., 2003, Aflatoksinler : kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt: 01 Sayı: 01 Sayfa: 1-21

Park, L. D., Lee, L. S., Price, R. L., Pohland, A. E., 1988, Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: Current status and regulation. Journal Association of Official Analitic Chemistry, 71, 685–703.

Park, L.D., 1993, Perspectives on mycotoxin decontamination procedures, Food Additives and Contaminants, 10(1), 49-60.

Peraica, M., Radica, B., Lucica, A., Pavlovica, M., 1999, Toxic effects of mycotoxins in humans, Bulletin of the World Health Organization, 77 (9) 754-766

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck P., Lebrihi, A., 2008, Isolation of *Bacillus* spp. from thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B_1 and ochratoxin A detoxification, Journal of Applied Microbiology 104: 1495–1502

Péteri Z., Téren J., Vágvölgyi C., Varga J., 2007, Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts, Food Microbiology, 24: 205–210

Pohland, A. E., 1992, Ochratoxin A: a review, Pure and Applied Chemistry, v. 64, n. 7, p. 1029-1049.

Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Eslamifar, A., Schmidt, O. J., Gharebaghi, R., Karimian, M., Naseri, A., Sheikhi, M., 2006, Inhibitory effects of Akacid_plus on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, Mycopathologia, 161: 245–249

Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., Deries, R. P., Miia R. 2014, Mäkelä plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes, Jounals Ams for Microbiplogy, (78) 4614-4649

Sangare, L., Zhao, Y., Folly, Y. M. E., Chang, J., Li, J., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang Y., Liu, Y., 2014, Aflatoxin B_1 degradation by a *Pseudomonas* sp., Toxins 6, 3028-3040

Shephard, G.S., 2008, Impact of mycotoxins on human health in developing countries, Food Additives and Contaminants, 25, 146–151.

Shotwell, O. L., Burg, W. R., Diller, T., 1981, Thin layer chromatographic determination of aflatoxin in corn dust. Journal Association of Official Analitic Chemistry, Sep;64(5):1060-3.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sweeney, M.J., Dobson, A. D. W., 1998, Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species, International Journal of Food Microbiology, 43, 141-158.

Tabata, S., Kamimura. H., Ibe, A., Hashimoto, H., Tamura, Y., 1994. Degradation of aflatoxins by food additives, Journal of Food Protection, 57 (1): 42-47.

Taylor, M. C., Jackson, C. J., Tattersall, D. B., French, N., Peat, T. S., Newman, J., Briggs, L. J., Lapalikar, G. V., Campbell, P. M., Scott, C., 2010, Identification and characterization of two families of $F420H_2$-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation, Molecular Microbiology, 78,561–575

The International Agency for Research on Cancer (IARC)., 2002, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; World Health Organization: Lyon, France,; 82, 1–556.

Trail, F., Mahanti, N., Rarick, M., Mehigh, R., Liang, S. H., Zhou, R., Linz, J. E., 1995. Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. Applied Environment of Microbiology, 61**:**2665-2673.

Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., 2016, Biodegradation of mycotoxins: tales from known and unexplored worlds, Frontiers in Microbiology, 7; 561

Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., 2016, Biodegradation of mycotoxins: tales from known and unexplored worlds, Frontiers in Microbiology, 7, 561.

Var, I., Kabak, B., Özkarslı, M., 2004, Mikotoksin aranmasında kullanılan analiz yöntemleri, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Cilt: 02 Sayı: 11 Sayfa: 1-11

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Varga , J., Pe´ter, Z., Ta´bori, K., Te´ren, J., Va´gvolgyi, C., 2005, Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates, International Journal of Food Microbiology, 99: 321– 328

Varga, J., Rigo, K., Teren, J.; 2000, Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species, International Journal of Food Microbiology 59; 1–7

Vidyasagar, T., Sujatha, N., Sashidhar, R. B., 1997, Direct synthesis of aflatoxin B_1-N7 guanine adduct: a reference standard for biological monitoring of dietary aflatoxin exposure in molecular epidemiological studies. Food Additive Contaminants, Jul;14(5):457-67.

Villers, P., 2017, Food safety and aflatoxin control, Journal of Food Research, 6- 2, 1-12

Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhao, Y., Liu, Y., 2016, Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms, Toxins (8) 3: 83

Wu, F., 2007, Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feed, Animal Feed Science and Technology, 137, 363–374.

Yang, Q., Wang, J., Zhang, H., Li, C., Zhang, X., 2016, Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products, World Mycotoxin Journal, 9 (2): 269-278

Yehia, R.S., 2014, Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*, Brazilian Journal of Microbiology, 45, 127–133

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yousefi, S., Dadgar, S., Safara, M., Zaini, F., 2009, Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates from green– tiger shrimps (*Penaeus semisulcatus*), Iranian Journal of Microbiology, 1(4):18-22.

Zain, M. E., 2011, Impact of mycotoxins on humans and animals, Journal of Saudi Chemistry Society, 15, 129–144.

Zhang, X., Li, Y., Wang, H., Gu, X., Zheng, X., Wang, Y., Diao, J., Peng, Y., Zhang, H., 2016, Screening and identification of novel ochratoxin A-producing fungi from grapes. Toxins, 12:8-11

Zhao, L.H., Guan, S., Gao, X., Ma, Q. G., Lei, Y. P., Bai, X. M., Ji, C., 2011, Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcusfulvus*, Journal of Applied Microbiology, 110, 147–155

ÖZGEÇMİŞ

Tuncay Söylemez 1976 yılı Eskişehir doğumludur. T.C. vatandaşıdır. Lisans öğrenimini Kütahya Dumlupınar Üniversitesinde, 1998 yılında tamamlamış olup aynı yıl Anadolu Üniversitesi Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Yüksek lisans süresince "Eskişehir atmosferindeki *Alternaria sp.* ve *Cladosporium sp.* sporlarının mevsimsel dağılımı" konulu bir tez hazırlamış ve 2001 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlamıştır. Doktora eğitimine 2009 yılında başlayarak bu süreç içerisinde çeşitli eğitim ve seminerlere katılmış ERASMUS programı ile Almanya Leibniz Üniversitesinde staj yapmıştır. Çalışma konuları arasında mikrobiyal ekoloji, litolitik aktivite ve kromatografik yöntemlerle metabolitlerin ve proteinlerin saflaştırılması yer almaktadır.