

Farklı Mandıralarda Üretilen Küflü (Göğermiş) Civil Peynirin Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi

Determination of the Cytotoxic and Genotoxic Properties of Moldy (Blue Cheese) Civil Cheese Produced in Different Dairy Farms

Mehmet Enes Arslan¹, Abdurrahim Kadı²

Geliş tarihi/Received: 23.09.2020 • Kabul tarihi/Accepted: 22.12.2020

ÖZET

Amaç: Küflü (göğermiş) peynir genellikle ülkemizin doğu bölgesinde üretilip her kesimden insan tarafından yüksek miktarlarda tüketilen günlük bir besin kaynağıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, genel anlamda üretilen peynirler üzerinde yetişen mikroorganizmaların tanımlanması ve bu mikroorganizmalar tarafından üretilen toksinlerin belirlenmesi amacıyla düzenlenmiştir. Ancak küflü peynirler üzerinde yetişen mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitler, peynir içeriğinde bulunan suda ve alkolde çözünen protein, yağ ve karbonhidrat gibi moleküllerle etkileşime girerek herhangi bir toksik mekanizmaya neden olma potansiyelleri daha önce değerlendirilmemiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, Erzurum yöresine ait farklı mandıralardan alınan üç farklı küflü civil peynirin toplam izolatu organizmalarla birlikte hazırlanarak fibroblast hücre kültüründe (HDFa) *in vitro* sitotoksik ve genotoksik değerlendirmeleri yapılmıştır. Hücre kültüründe toksikolojik değerlendirmeler 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) hücre canlılık testiyle belirlenmiştir. İzolatların hücrelerde oluşturabileceği genotoksik özellikler Hoechst 33258 floresan boyama tekniği kullanılarak çekirdek yapıları floresan mikroskop altında incelenmiş ve farklı çekirdek mutasyonları belirlenmiştir. Ayrıca, akış sitometrisi tekniği kullanılarak hücrelerde oluşabilecek ölüm mekanizmaları ortaya konulmuştur.

Bulgular: Küflü peynirlerden elde edilen su ve alkol izolatlarının hücre kültürleri üzerinde minimum %10 ve maksimum %40 seviyesinde bir sitotoksositeye neden olduğu ve bu sonuçların kontrole kıyasla önemli bir seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca, çekirdek mutasyonları incelendiğinde uygulanan izolatların hücre kültürleri üzerinde önemli ölçüde bir mutasyona neden olmadığı belirlenmiştir. Küflü peynir uygulamaları, akış sitometrisi sonuçlarına göre hücre ölüm mekanizmalarının apoptotik ölüm yolları üzerinden gerçekleştiği görülmüştür.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda küflü peynir izolatlarının farklı seviyelerde sitotoksik özellikler gösterebileceği anlaşılmış ve kontrole kıyasla önemli seviyede bir genotoksosite göstermediği belirlenmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında, küflü peynir uygulamasının mutajenik bir etkiye sahip olmadığı fakat yüksek miktarlarda etkileşim durumunda apoptotik hücre ölüm mekanizmasının tetiklendiği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Küflü peynir, toksisite, *in vitro*, akış sitometrisi, biyogüvenlik

1. **İletişim/Correspondence:** Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye
E-posta: enes.aslan@erzurum.edu.tr • <https://orcid.org/0000-0002-1600-2305>

2. Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye • <https://orcid.org/0000-0001-9250-9397>

ABSTRACT

Aim: Moldy (blue cheese) cheese is generally produced in eastern region of our country as daily food sources consumed by many people. The previous studies were designed to identify microorganism varieties growing on the cheese and to investigate their toxic substances. Secondary metabolites produced by microorganisms grown on moldy cheeses and the toxic mechanism by interacting with water and alcohol soluble materials like proteins, fats and carbohydrates in cheese content were evaluated.

Material and Methods: Three different moldy cheese isolates from different dairy farms in Erzurum region were prepared together with organisms and *in vitro* cytotoxic and genotoxic evaluations were performed on fibroblast cells (HDFa). Toxicological evaluations were performed by 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) cell viability test. Genotoxic properties of isolates were examined using Hoechst 33258 fluorescent staining technique, nuclei structures were examined under fluorescence microscope and different nucleus mutations were determined. In addition, cell death mechanisms resulted from isolate applications have been investigated by flow cytometry technique.

Results: It was determined that water and alcohol isolates obtained from moldy cheeses caused a minimum of 10% and a maximum of 40% cytotoxicity on cell cultures, and these results reached a significant level compared to controls. In addition, when nuclear mutations were examined, it was seen that applied isolates did not cause a significant mutation on cell cultures. Finally, according to flow cytometry results, cell death mechanisms occur through apoptotic death pathways as a result of moldy cheese applications.

Conclusion: It was analyzed that moldy cheese isolates may show different levels of cytotoxic properties and they did not show a significant level of genotoxicity compared to the negative control. Also, it was understood that the application of moldy cheese did not have mutagenic effects but, the apoptotic cell death mechanism was enhanced when the high concentrations of isolates were applied.

Keywords: *Moldy cheese, toxicity, in vitro, flow cytometry, biosafety*

GİRİŞ

Peynir, yüksek kalite ve miktarda protein, A, B₂ vitamini, kalsiyum ve yağ içermesi nedeniyle günlük besin ögesi ihtiyacımızın karşılanmasında önemli bir yeri vardır (1). Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliğine (2) göre peynir; “Hammaddenin uygun bir pıhtılaştırıcı kullanılarak pıhtılaştırılması ve pıhtıdan peynir altı suyunun ayrılmasıyla ya da sütün permeatının ayrılmasından sonra pıhtılaştırılmasıyla elde edilen, farklı sertliklerde ve yağ içeriklerinde, salamura ile ya da kuru tuzlama ile tuzlanarak ya da tuzlanmadan, başlangıç kültür kullanarak ya da kullanmadan, telemesi haşlanarak ya da haşlanmadan, çeşnili ya da çeşnisiz olarak, tekniğine uygun olarak üretilen, olgunlaştırılmadan ya da olgunlaştırıldıktan sonra tüketilen, çeşidine özgü karakteristik özellikleri gösteren süt ürünleri” olarak tanımlanmıştır. Türkiye, peynir çeşitleri ve üretimleri bakımından oldukça zengin bir ülke konumundadır fakat

üretimlerinin yüksek miktarının yöresel olduğu ve bu yöresel üretimlerin diğer yörelerde yaygın olmadığı bildirilmiştir (3). Bu peynir çeşitlerinden birisi de Erzurum küflü civil, diğer adıyla göğermiş peynirdir. Küflü peynirler ülkemizde sevilerek tüketilen peynir çeşitlerinden birisidir. Divle tulum peyniri, Konya küflü peyniri, göğermiş peynir, Tomas peyniri, Isparta küflü peyniri, Kayseri çömlek peyniri ve küflü tulum peyniri ülkemizde başlıca üretilen geleneksel küflü peynirlerdir (4). Erzurum bölgesi ve civarında üretilen bu küflü peynir çeşidi olan göğermiş peynir iki farklı yöntemle üretilmektedir. Birinci yöntemde, civil peynir %70-75 ve lor peyniri %30-25 oranlarında karışım hazırlanarak yapılırken diğer yöntemde ise yalnızca civil peynir ile yapılmaktadır. Bu üretim yöntemlerinin her ikisinde peynirler tuzlandıktan sonra plastik bidonlara doldurulur ve bidonların ağızları sıkıca kapatılır. Bidonların kapakları

delinerek ters çevrilir ve peynir suyunun akarak ayrılması sağlanır. Bidonlar 8-12°C'de küf gelişimi oluşuncaya kadar depolanmaktadır (5).

Küflü peynirler evlerde ya da küçük işletmelerde herhangi bir başlangıç kültür kullanılmadan geleneksel yöntemlerle olgunlaştırılan ortamdaki ya da peynirin kendi doğal yapısında mevcut olan küfler ile olgunlaştırılarak üretilmektedir (4-6). Başlangıç kültürü kullanılarak üretilen küflü peynirlerde, peynirin yüzeyinde gelişmesi istenilen küflerin üretimde peynirin yüzeylerine püskürtülmesi ve peynirin içinde gelişmesi istenilen küfler ise süt pıhtılaşmadan önce ilave edilmektedir. Paketlenerek üretilen küflü peynirlerin üretiminde ise başlangıç küfleri paketleme sırasında ara ara serpilerek peynire inoküle edilmektedir (7). Küflü peynirler genellikle pastörizasyon işlemi görmemiş yağsız ya da bir miktar yağı alınmış koyun, keçi, inek sütünden veya bu sütlerin karışımları kullanılarak üretilir. Ayrıca, yağsız tulum peyniri gibi çeşitli peynirlerin ufalanarak karıştırılmasıyla da üretildiği bilinmektedir. İki üretim şeklinde de peynir altı suyunun süzdürülmesinden sonra bidon, çömlek ya da tulumlarda ve hava girmeyecek bir şekilde mahzen, mağara, depo veya toprak altına gömülerek peynir olgunlaştırılır (5). Olgunlaştırıldıktan sonra peynir parçalar şeklinde kesilir ve odalarda veya mağaralarda mavi-yeşil bir renk alıncaya kadar bekletilir. Küflü peynirin yüzeyinde beyaz ile mavi-yeşil damarlı küfler oluşmaktadır. Peynirde aroma ve tat yoğunluğu flora nedeniyle oluşmaktadır (6).

Başlangıç kültürü için seçilecek olan küflerin, patojenik ve toksik özelliklerinin olmamasının yanı sıra antibiyotik benzeri sekonder metabolitler üretmemeleri gerekmektedir. Başlangıç kültüründe kullanılan bu küfler proteolitik, amilolitik, lipolitik aktiviteler gösterebilmelidir. Bununla beraber istenilen tat, koku ve görünüşü sağlayabilmeli ve karakteristik küf aromasını peynire verebilmelidirler. Başlangıç kültürleri peynirin yüzeyinde veya içerisinde rahatlıkla gelişebilmeli ve diğer mikroorganizmaların aktivitelerini engellememelidirler. Ayrıca üründe istenilen

miktarda ve renkte miseller oluşturabilmelidirler (7). Küflü civil peynir üzerinde daha önce yapılmış bir çalışmada, Erzurum'dan temin edilen 41 küflü civil peynir örneklerinden 186 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlardan koloniler elde edilmiş ve elde edilen bu koloniler geleneksel ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Suşların makroskobik ve mikroskobik özellikleri yönünden değerlendirilmesi sonucunda 186 izolatin tamamı *Penicillium* cinsine ait olup ağırlıklı *P. Roqueforti* olduğu belirlenmiştir (8). *P. Roqueforti* cinsinin ürettiği Roqueforti C ve onun öncü maddesi Roqueforti D gibi toksik maddelerin mutajenik olmadığı ancak paralitik ve nörotoksik özellik gösterdiği bilinmektedir (9). Bunun yanında, PR-toksin *P. Roqueforti* tarafından üretilen, nükleik asit ile protein sentezini inhibe ettiği ve insanlar için sitotoksik olduğu bilinen bir sekonder metabolittir. *P. patulin*, *P. griseofulvum*, *P. expansum*, *P. sclerotigenum* *P. carneum* ve *P. paneum* türleri tarafından üretilen patulinin ise immunsupresif ve karsinojenik özellik gösteren bir toksin olduğu bilinmektedir. Ticari başlangıç kültürü olarak kullanılan ve mavi küflü peynirlerden izole edilen *P. Roqueforti*'nin birçok besiyeri ortamında bu toksini ürettiği bildirilmiştir (10,11). Peynirin yüzeyinde bulunan ve bir zaman sonra peynirin içine nüfuz eden mikotoksinler karaciğer ve böbrek bozukluğu, sinir ve bağışıklık sistemi bozukluğu ve deri duyarlılığı ya da nekrozu gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedirler (12-14). Günümüzde 350'ye yakın mikotoksin üretebilen küf olduğu bilinmektedir. Ayrıca küfler tarafından oluşturulan 200'den fazla mikotoksin çeşidi bildirilmiştir (15). Bu toksinler arasında; aflatoksinler, okratoksinler, patulin, trikotesen, zearalenon, fumonisin, sitrinin, sterigmatosistin, penisillik asit, fumonisin ve *Penicillium roqueforti* toksini (PR toksini) en sık karşılaşılanlardır (15-17). Erzurum'da toplanan peynirlerden izole edilen *P. Roqueforti* izolatlarının tamamının 5 °C, 12 °C ve 25 °C'de patulin, PR toksin, penisillik asit ve roquefortine ürettikleri tespit edilmiştir (18). Bunun yanı sıra bir bildiriye farklı peynirlerden izole edilen 176 *P. roqueforti* suşunun %12'sinin patulin ve penisillik asit ürettikleri bildirilmiştir (19). Yapılan başka

bir çalışmada, 41 küflü civil peynirden elde edilen 195 *P. roqueforti* suşunun %83.03'ünün 25°C'de %51.5'inin de 5°C de toksin oluşturdukları ve oluşan bu toksinlerin PR toksin, pensilik asit ve roqueforti oldukları bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, *P. roqueforti* izolatlarının 28'inin 5°C ve 25°C'de toksin oluşturmadıkları da bildirilmiştir (8). Daha önceki çalışmalarda, peynir üzerinde yetişen küf türlerinin belirlenmesi ve izole edilen küf türlerinden elde edilen metabolitlerin karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada ise farklı mandıralarda üretilen küflü peynir örneklerinden saflaştırma yapmadan toplam izolatlarının, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin insan fibroblast hücre hattında belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örnek Seçimi

Küflü civil peynir örnekleri Erzurum ilinde üretim gösteren üç farklı mandıradan alınmıştır. Her bir peynir örneği için 10-15 gramında örnekler tartılmıştır. Daha sonra bu örnekler 3'er tekrar olacak şekilde sınıflandırılmıştır. Toplamda, her bir örnek başına 3 tekrar olacak şekilde 9 adet deneysel grup oluşturulmuş (küflü peynir) ve 3 tekrarlı küflendirilmemiş civil peynir örnekleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Küflü Peynir İzolatlarının Oluşturulması

İlk olarak küflü peynir örnekleri sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Daha sonra bir doküparçalayıcısında toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen küflü peynir örnekleri saf su ve etil alkol (%96) içerisinde bir gün boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Suda çözünmeyen maddelerden kurtulmak için filtrelenen örnekler liyofilizasyon cihazında kurutulmuştur. Elde edilen izolatlar farklı ağırlıklarda alekotlanarak su içerisinde belirli konsantrasyonlarda çözülmüştür.

İnsan Fibroblast Hücre Kültürü

İnsan fibroblast hücre hattı (HDFa, ATCC® PCS-201-012™) DMEM besiyeri içerisinde %1 penisilin/strepromisin antibiyotik karışımı, %10 FBS, %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklık ortamında konfluensiye ulaşana kadar büyütülmüştür. Ekstrakte edilen küflü peynir örnekleri toksikolojik çalışmalarda 48'lik hücre kültürü plakalarında büyütülen fibroblast hücre hattında denenmiştir. Denemeler üç tekrar halinde; üç farklı küflü peynir izolatının uygulandığı hücre kültürü, küfsüz peynir izolatının uygulandığı hücre kültürü ve negatif kontrol olarak hiçbir uygulamanın yapılmadığı fibroblast hücre kültürü analiz edilmiştir. Fibroblast hücre kültürü sağlıklı insan hücre tipi olması ve hücre kültürü tabanına yapışma özelliği ile genotoksisite ve sitotoksisite analizlerinin yapılmasında güvenilir bir hücre kültürü modelidir. Peynir örnekleri, genellikle sitotoksik ve genotoksik etki çalışmalarında kullanılan minimum doz aralığında (1.5-200 µg/ml) hücre kültürlerine uygulanmıştır.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Analizi

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) analizi *in vitro* ortamda canlılık yüzdesini belirlemek için renk yoğunluğunu ölçen kolorimetrik bir tekniktir. Hücreler 48'lik plate'e bölme başına 100 µL kültür mediumu içerisinde 10^a (a=5) hücre bulunacak şekilde, muamele edilmiş izolatlarla birlikte ve yoksun olarak ekilmiştir. Hücrelerin CO₂ etüvünde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve her bir bölmeye 10 µL MTT karışımı eklenmiştir. Dairesel karıştırıcıda bir dakika hafifçe karıştırılıp CO₂ etüvünde 3-4 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda oluşan formazan bölmelerin dibinde koyu kristaller halinde görülmektedir. Kültür mediumu hücre tabakasını dağıtmadan dikkatli bir şekilde her bir bölmeden aspire edilmiştir. Alternatif olarak dibe yapışmayan hücrelerin çökmesi için aspire edilmeden önce plate 400xg'da 10 dakika santifrüjlenmiştir. Her bir bölmeye 100 µL kristal çözücü solüsyon (DMSO) eklenmiştir.

Her bir numunenin absorbansı 570 nm'de microplate okuyucu kullanılarak ölçülmüştür (20).

Hoechst 33258 Floresan Boyama ile Çekirdek Yapısı Analizi

Hoechst 33258 boyama mutasyona uğramış çekirdekleri saptamak için kullanılmıştır. Fibroblast hücre kültürüne küflü peynir izolatları, normal peynir izolatları farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve negatif kontrol olarak herhangi bir izolatın uygulanmadığı hücre kültürü kullanılmıştır. Hücre çekirdek morfolojisini analiz etmek için 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler fosfat tamponlu tuzlu suda %4 paraformaldehitte 4 °C'de 30 dakikada sabitlenmiştir. Hücreleri PBS ile yıkadıktan sonra nükleer DNA'lar oda ısısında 5 dakika boyunca 1 uM Hoechst 33258 floresan boyası ile inkübe edilmiştir. Hücreler floresan mikroskopu (Leica® DM IL LED) altında 20X büyütmede gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır (21).

Apoptoz-Nekroz Testi

Deneysel uygulamaların yapıldığı hücre kültürlerine 5 dakika oda sıcaklığında tripsin uygulanarak hücreler kültür plakasının tabanından kaldırılmıştır. 5×10^4 hücre santrifüj ile toplanmış ve 500 ul 1X bağlama tamponunda yeniden süspanse edilmiştir. Daha sonra, kültürler 5 ul Annexin V-FITC ve 5 ul propidyum iyodür (PI 50 ug/ml) ilave edilmiş ve karanlıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, kültürler, FITC ve rodamin için çift filtre seti kullanılarak bir akış sitometrisi cihazında incelenmiştir (22).

İstatiksel Analizler

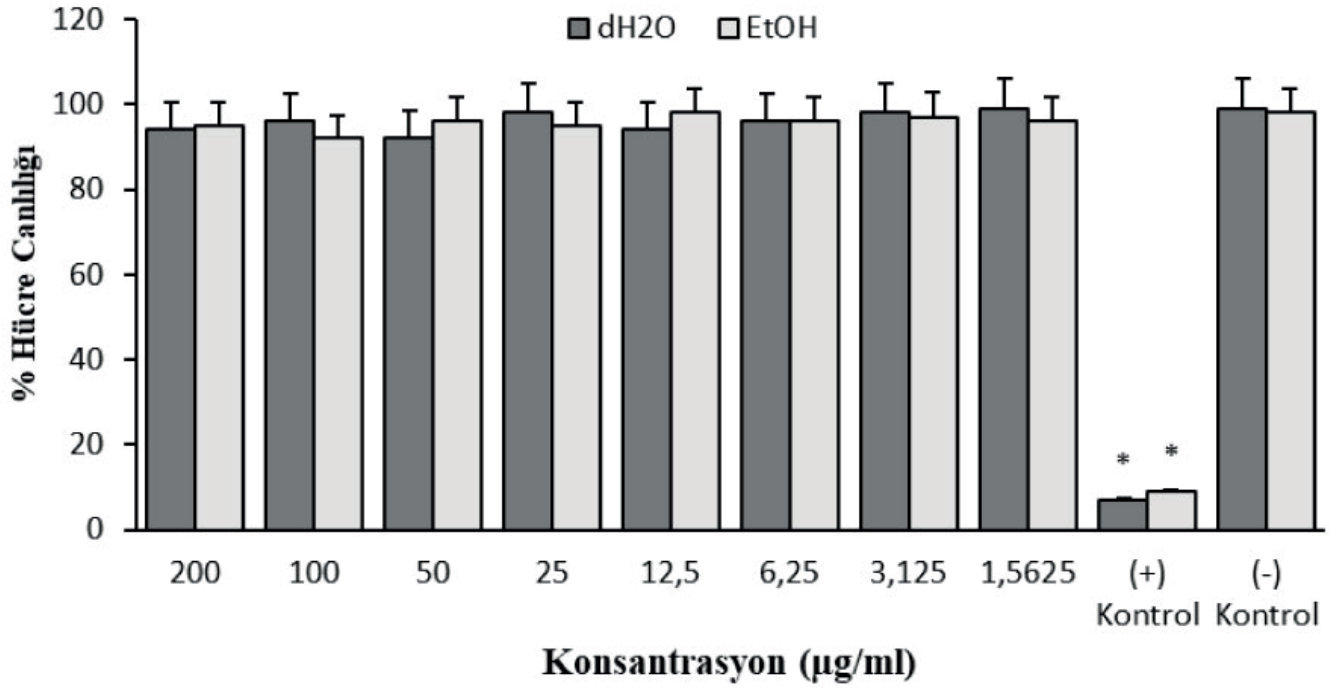
Grup analizleri One-way Anova işlemi ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların hücreler üzerindeki toksik etkileri Dunnet (kontrolle karşı) ve Tukey çoklu kıyaslama analizleriyle karşılaştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi %5 olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Hesaplamalar, GraphPad Prism versiyon 7.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Küflendirilmemiş civil peynirin etil alkol (EtOH) ve su (dH_2O) izolatlarının hücre canlılığı üzerine olan etkileri incelendiğine, negatif kontrole kıyasla önemli ölçüde bir değişim göstermemiş ve toksisite gözlenmemiştir (Şekil 1). Bunun yanında, küflü peynir su izolatlarının uygulanması sonucunda kültürlerdeki MTT canlılık testleri incelendiğinde üç farklı izolatın da hücreler üzerinde önemli ölçüde canlılığı azalttığı belirlenmiştir. Her bir izolatın en düşük konsantrasyonunda (dH_2O-1 , $1,562 \mu g ml^{-1}$) dahi hücrelerde minimum %20 seviyesinde canlılığı azalttığı hesaplanmıştır. En yüksek konsantrasyonda uygulanan su izolatlarının (dH_2O-2 , $200 \mu g ml^{-1}$) minimum %30 sitotoksositeye neden olduğu anlaşılmıştır (Şekil 2). Aynı şekilde, etil alkol izolatlarının canlılık üzerinde önemli ölçüde etkili olduğu belirlenmiştir. Fakat etil alkol izolatlarının en düşük dozunda (EtOH-1, $1,562 \mu g ml^{-1}$) sulu izolatlara kıyasla daha düşük bir sitotoksik etki (yaklaşık %10) gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca, en yüksek dozda uygulanan etil alkol izolatların (EtOH-2, $200 \mu g ml^{-1}$) minimum %44 sitotoksositeye neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

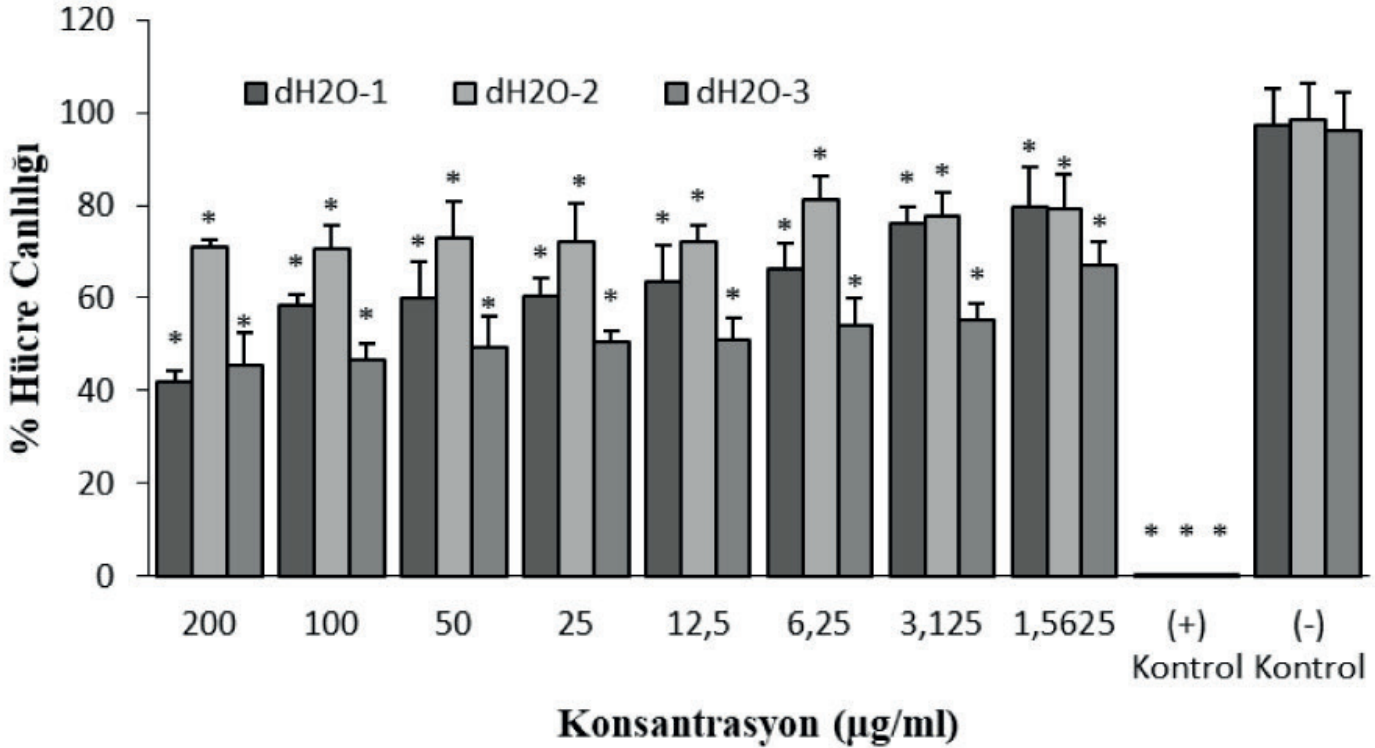
Küflü peynirlerden elde edilen su (dH_2O) ve etil alkol (EtOH) izolatlarının insan fibroblast (HDFa) hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda oluşabilecek nükleer anomaliler, Hoechst 33258 Floresan boyama tekniği ile bir floresan mikroskop yardımıyla belirlenmiştir. Çalışmada su ve etil alkol izolatları hücre kültürüne en yüksek dozda ($200 \mu g ml^{-1}$) uygulanmış ve 24 saatin sonunda hücrelerdeki anomaliler (MN; mikronükleus, Lobbed ve Notched anomalileri) sayılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde farklı küflü peynirlerden elde edilen su ve alkol izolatlarının hücre kültürleri üzerinde negatif kontrollere (izolatların uygulanmadığı hücre kültürü) kıyasla önemli seviyede bir değişiklik meydana getirmemişlerdir (Tablo 1 ve Şekil 4).

Ek olarak, su ve alkol izolatların HDFa hücre kültüründe oluşturduğu sitotoksosite mekanizmasını



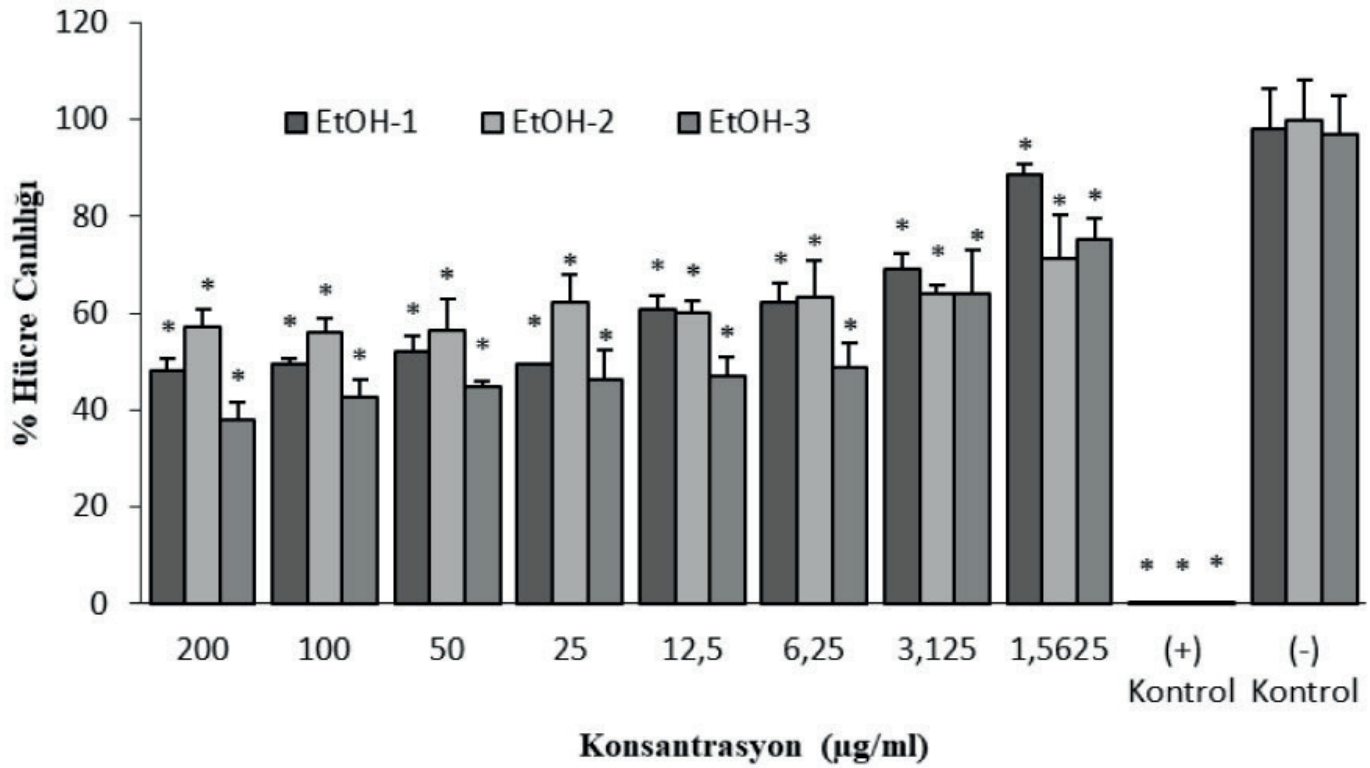
Şekil 1. Küflendirilmemiş civil peynirin su (dH₂O) ve etil alkol (EtOH) izolatlarının insan fibroblast (HDFa) hücre kültürü üzerinde MTT hücre canlılık testi ile sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.

Sembol (*), izolat uygulamalarının negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0.05$) temsil etmektedir.



Şekil 2. Küflü peynirin su (dH₂O) izolatlarının insan fibroblast (HDFa) hücre kültürü üzerinde MTT hücre canlılık testi ile sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.

Sembol (*), izolat uygulamalarının negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0.05$) temsil etmektedir.



Şekil 3. Küflü peynirin etil alkol (EtOH) izolatlarının insan fibroblast (HDFa) hücre kültürü üzerinde MTT hücre canlılık test ile sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.

Sembol (*), izolat uygulamalarının negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0.05$) temsil etmektedir.

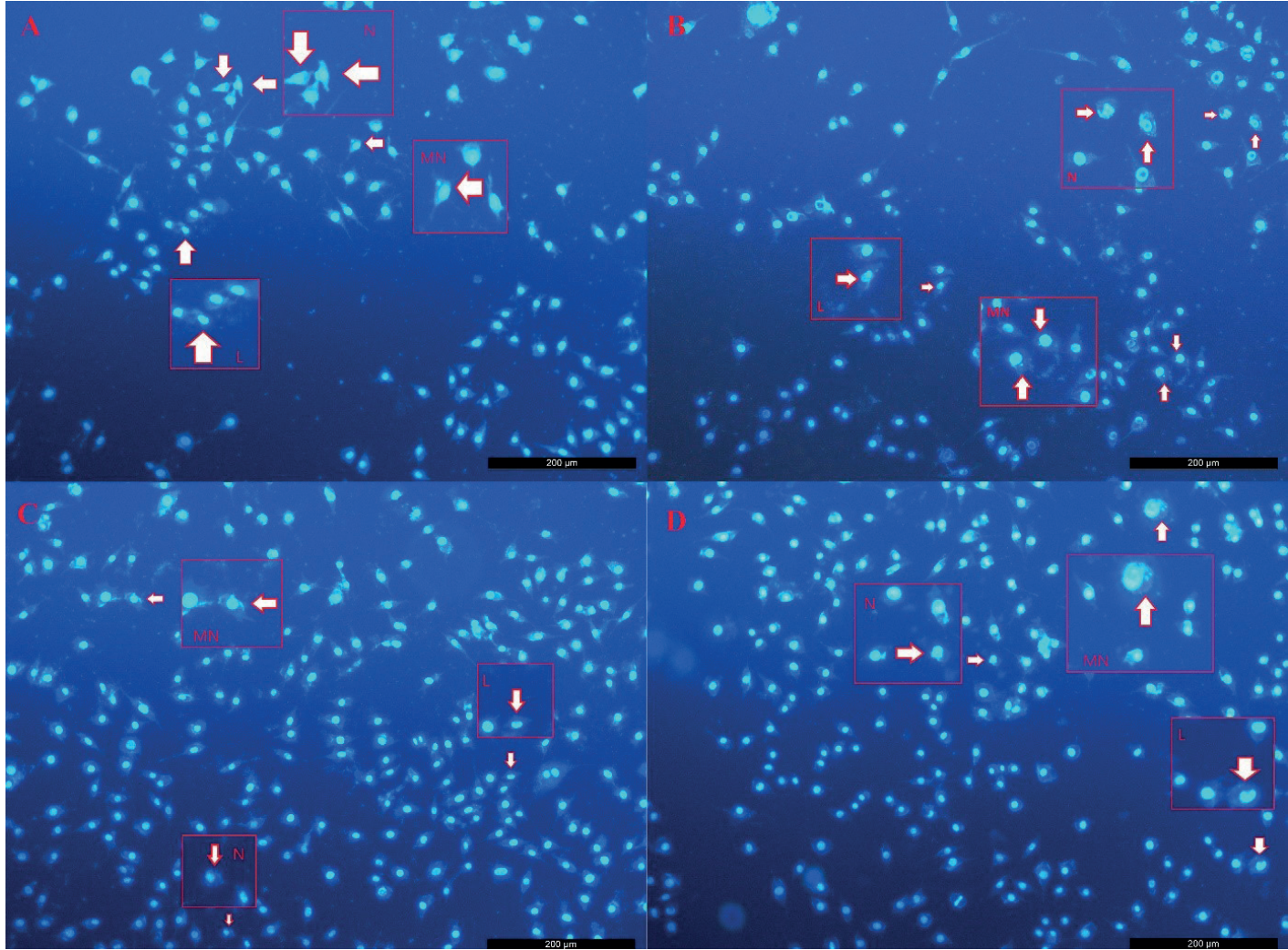
Tablo 1. Küflü peynirlerden elde edilen su (dH₂O) ve etil alkol (EtOH) izolatları uygulanan insan fibroblast (HDFa) hücre hattında nükleer anomaliler.

	Nükleer Anomaliler (NA)			
	Toplam MN	Toplam Loblu	Toplam Çentikli	Ortalama NA/1000 hücre ± SD
(-) Kontrol	11	8	6	0.025±0.0018 ^a
EtOH-1 (200 µg ml ⁻¹)	13	7	8	0.028±0.0019 ^a
EtOH-2 (200 µg ml ⁻¹)	12	5	9	0.026±0.0018 ^a
EtOH-3 (200 µg ml ⁻¹)	14	7	6	0.027±0.0018 ^a
dH ₂ O-1 (200 µg ml ⁻¹)	12	6	8	0.026±0.0017 ^a
dH ₂ O-2 (200 µg ml ⁻¹)	13	7	8	0.028±0.0019 ^a
dH ₂ O-3 (200 µg ml ⁻¹)	15	6	5	0.026±0.0018 ^a

^a sembolü ile gösterilen değerler arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı belirtilmektedir.

incelemek için akış sitometrisi analizi yapılmıştır. Yapılan analizler, 200 µg ml⁻¹ konsantrasyonda uygulanan küflü peynir izolatların hücre canlılıkları üzerine olan etkileri hücre canlılığı testleriyle paralellik göstermektedir. Çalışma sonucunda alkol izolatlarının su izolatlarına kıyasla daha yüksek bir oranda hücre canlılığını düşürdüğü anlaşılmıştır.

Ölüm mekanizmaları analiz edildiğinde, küflü peynir izolatlarının sitotoksikite mekanizmasının daha çok apoptotik bir yolak izlediği belirlenmiştir (Şekil 5). Apoptoz oranlarına bakıldığında, alkol izolatlarının ortalama %48'lik bir apoptotik ölüm gözlenirken, su izolatlarında ortalama %37'lik bir oranda apoptoz analiz edilmiştir.



Şekil 4. Hoechst 33258 Floresan boyama ile çekirdek yapısı analizi örnek görüntüleri. Her bir örnek maksimum konsantrasyonda ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) hücre kültürüne uygulanmıştır.

A- Negatif kontrol (hiçbir izolatin uygulanmadığı hücre kültürü)

B- Etil alkol (EtOH-1) izolatu uygulanan hücre kültürü

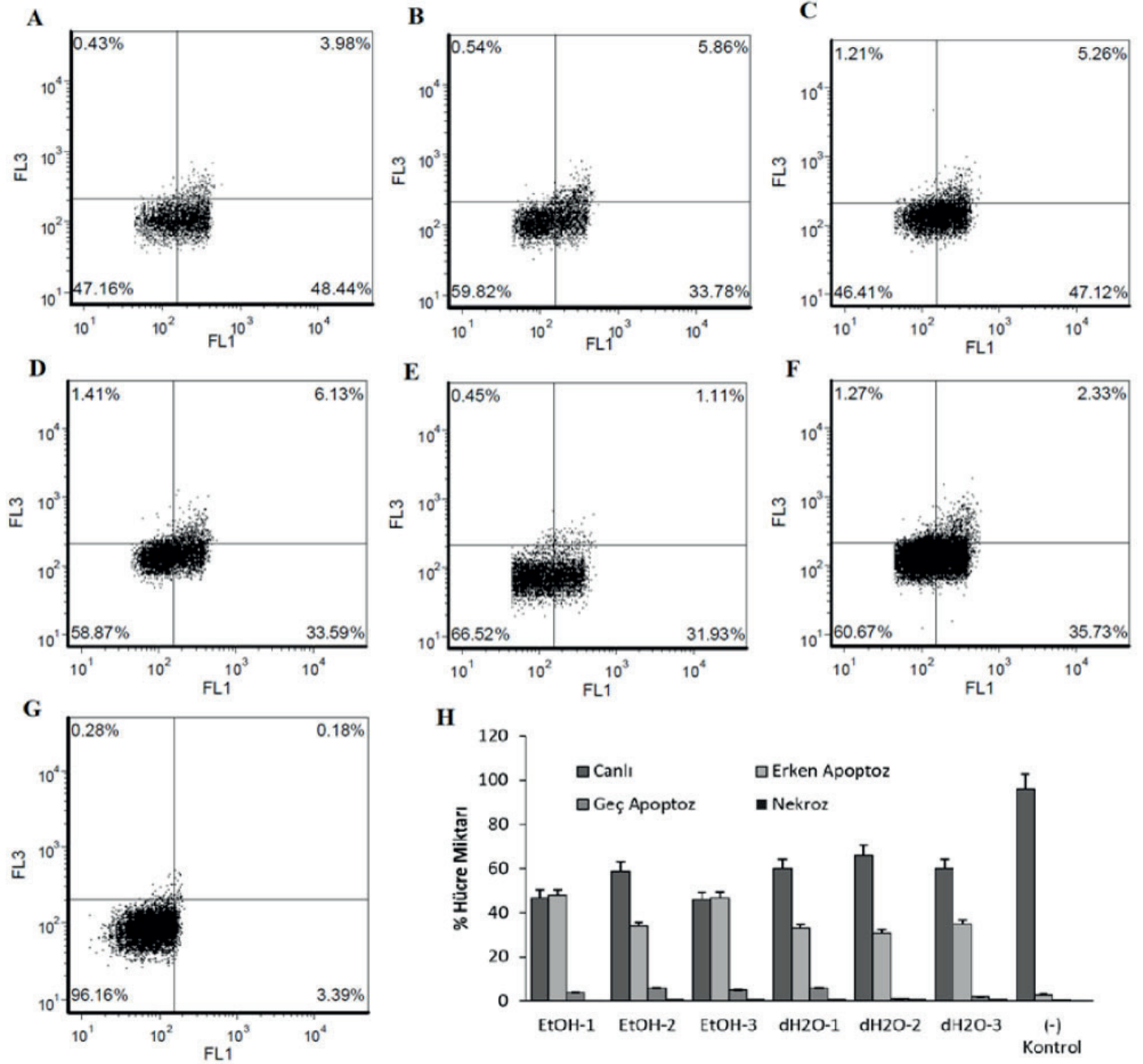
C- Su (dH2O-1) izolatu uygulanan hücre kültürü

D- Su (dH2O-2) izolatu uygulanan hücre kültürü görüntüsü

TARTIŞMA

Küflü peynir, öncelikle Türkiye'nin doğusunda, özellikle Erzurum ilinde, civil peynir ve lor peyniri kullanan mandıralarda üretilmektedir. Üretim sırasında, civil peynir ve lor peynir karışımı keçi derisine veya plastik torbalara preslenir ve üç ay veya daha uzun sürede olgunlaştırılır. Olgunlaşma döneminde, doğal kontaminant küf türleri peynir yüzeyinde büyür ve tadına katkıda bulunur (23,24). Üretilen küflü peynirlerin insan sağlığı üzerine olan etkileri ayrıntılı bir çalışmayla henüz belirlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda ise farklı

küflü peynir çeşitleri üzerinde oluşan küf türlerinin belirlenmesi ve bu türlerin oluşturabileceği mikotoksinlerin araştırılması amaçlanmıştır (25-27). Bu çalışmada, Erzurum yöresinde üç farklı mandırada üretilen küflü civil peynirin sitotoksik ve genotoksik incelemesi *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmalardan farklı olarak küf ve peynir izolatları beraber hazırlanarak, küf metabolitlerinin peynir içeriğinde bulunan protein, yağ ve karbonhidrat gibi maddelerden ayrıştırılmadan toplam izolasyon örneklerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 5. Küflü peynir izolatları uygulanan hücre kültürlerinin akış sitometrisi (annexin V- (FL1-H) ve PI- (FL2-H) etiketli hücreler) sonuçları. A- EtOH-1 izolatı uygulanmış hücre kültürü, B- EtOH-2 izolatı uygulanmış hücre kültürü, C- EtOH-3 izolatı uygulanmış hücre kültürü, D- dH2O-1 izolatı uygulanmış hücre kültürü, E- dH2O-2 izolatı uygulanmış hücre kültürü, F- dH2O-3 izolatı uygulanmış hücre kültürü, G- Negatif kontrol (Hiçbir izolatın uygulanmadığı hücre kültürü) ve H-İzolatların uygulandığı hücre kültürlerinin grafiksel gösterimi.

Daha önce yapılan bir çalışmada, küflü peynirlerden izole edilen küf türlerinin tamamının *Penicillium* cinsine ait olduğu belirlenmiş ve bu cins içerisinde baskın suşun *P. Roqueforti* olduğu anlaşılmıştır (8). *P. Roqueforti* türü üzerinde ki toksikolojik çalışmalar bu

türün iki farklı sekonder metabolit (Roqueforti C ve Roqueforti D) ürettiği ve üretilen bu metabolitlerin nörotoksik ve parolitik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ancak, üretilen bu sekonder metabolitlerin DNA üzerinde mutajenite etkilerinin olmadığı ileri

sürülmüştür (9). Dahası, *P. Roqueforti* türü tarafından üretilen ve PR-toksin olarak adlandırılan bir diğer metabolitin protein ve nükleik asit sentezini bloklayarak insanlar üzerinde toksik bir etki yarattığı gözlenmiştir (10). Bu çalışmaların dışında, peynir yüzeyinde gelişen farklı küf türlerinin ürettiği çeşitli mikotoksinlerin (aflatoksinler, okratoksinler, patulin, trikotesen, zearalenon, fumonisin, sitrinin, sterigmatosistin, penisillik asit ve fumonisin) zamanla peynir içeriğine karıştığı ve tüketilmesi durumunda sinir, bağışıklık, sindirim ve boşaltım sistemi üzerinde olumsuz etkilerinin oluşacağını öne süren bazı araştırmalar literatürde yer almaktadır (12,13,15,16). Bu çalışmada ise küflü ve küflendirilmemiş civil peynirlerden hazırlanan su (dH₂O) ve etil alkol (EtOH) izolatlarının HDFa hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkileri MTT hücre canlılık testiyle analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, farklı mandıralarda üretilen üç peynir örneğinden hazırlanan izolatların konsantrasyona bağlı şekilde ve önemli düzeyde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Karşılaştırmalı kontrol olarak hazırlanan küflendirilmemiş civil peynir izolatının hücre kültürü üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin bulunmadığı ve sonuç olarak civil peynir üzerinde büyütülen küf türlerinin peynir içerikleriyle beraber toksik bir etki gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 2 ve 3).

Peynir izolatlarının uzun vadede sağlık sorunlarına neden olup olmayacağı genotoksiste analiz yöntemi olan mikroçekirdek testiyle belirlenmiştir. Mikroçekirdek analizi genellikle hücrelerin maruz kaldığı maddelerin büyük mutasyonlara neden olma kapasitesini tayin etmede ve kanserojen madde tayininde kullanılmaktadır (28,29). Daha önce yapılan bir çalışmada ise birçok *Penicillium* cinsinin sekonder metabolit olarak ürettiği patulin organik bileşiğinin kanserojenik ve immunsupresif etkileri bildirilmektedir (11). Ancak, bu çalışmada uygulanan küflü peynir izolatlarının, negatif kontrole kıyasla önemli düzeyde bir genotoksisteye sahip olmadığı ve MN, Loblu ve Çentikli mutasyonlarının negatif kontrole benzer bir seviyede olduğu belirlenmiştir (Tablo 1 ve Şekil 4).

Hücre ölüm mekanizmalarının insan sağlığı açısından büyük bir önemi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalara göre, apoptotik ölüm yollarının nekrozdan farklı olarak kontrollü bir ölüm çeşidi olması nedeniyle sağlık açısından olumsuz etkileri daha düşüktür. Bunun yanında, daha çok hasar görmüş ve yaşlanmış hücrelerin apoptoza uğradığı belirtilmekte ve sonuç olarak apoptoz yolağının hücre yenilenmesini arttırdığı öne sürülmektedir (30,31). Bu çalışmanın sonucunda, küflü peynir izolatlarının daha çok apoptotik bir ölüm mekanizmasıyla hücre kültüründe sitotoksisteye neden olduğu belirlenmiş (Şekil 5) ve bu mekanizmanın insan sağlığı açısından büyük risklere neden olmayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile küflü peynirin insan fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu ve bu sitotoksistenin apoptotik bir yolak üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca, küflü peynirin insan sağlığı açısından mutajenik ve kanserojenik bir etki göstermediği anlaşılmıştır. Hatta hücre yenilenmesini tetikleyici etkisinin olabileceği yapılan bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Ancak, çalışmanın daha kesin sonuçlar sunabilmesi için küflü peynir diyetinin hayvan deneyleri ve gen seviyeleri üzerinde analiz edilmesi gerekmektedir. Gelecekte yapılması düşünülen çalışmalarda, Erzurum bölgesine özgü küflendirilmiş civil peynir üzerinde yetişen küf türlerinin belirlenmesi ve bu türlerden elde edilecek spesifik toksinlerin araştırılması daha net veriler elde edilmesini sağlayacaktır.

Çıkar çatışması - Conflict of interest: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler. • *The authors declare that they have no conflict of interest.*

Maddi destek: Yapılan çalışma TÜBİTAK 2209-a kapsamında 1919B011902013 proje numarasıyla desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kaynar P. Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar. Turk Mikrobiol Cem Derg. 2011;41(1):1-8.
2. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Türk gıda kodeksi peynir tebliği. Resmi Gazete. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/02/20150208-16.htm>. Published 2015. Accessed June 18, 2020.

3. Tarakci Z, Temiz H. A review of the chemical, biochemical and antimicrobial aspects of Turkish Otlu (herby) cheese. *Int J Dairy Technol.* 2009;62(3):354-60.
4. Kamber U, Terzi G. The traditional cheeses of Turkey: Central Anatolian Region. *Food Rev Int.* 2008;24(1):74-94.
5. Yücel İŞ, Karapınar M, Yaman DB, Yenice E. Isparta ili ve yöresine ait geleneksel küflü çömlük peynirinin mikroflorası üzerine bir araştırma. *Türkiye 9. Gıda Kongresi.* 2006:461-4.
6. Hayaloglu AA, Kirbag S. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *Int J Food Microbiol.* 2007;115(3):376-80.
7. Yetim H, Çakmakçı S. Küfle olgunlaştırılan bazı bitkisel ve hayvansal gıdalar. *Gıda.* 1997;22(4).
8. Cakmakci S, Cetin B, Gurses M, Dagdemir E, Hayaloglu AA. Morphological, molecular, and mycotoxigenic identification of dominant filamentous fungi from moldy civil cheese. *J Food Prot.* 2012;75(11):2045-9.
9. Frisvad JC, Thrane U, Samson RA, Thrane U, Samson RA. Mycotoxin producers. *Food Mycology.* 2007:149-74.
10. Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetics and biochemical profiles. *Microbiology.* 1996;142(3):541-9.
11. Geisen R, Cantor MD, Hansen TK, Holzappel WH, Jakobsen M. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int J Food Microbiol.* 2001;65(3):183-91.
12. İşleyici Ö, Can Sancak Y, Morul F. Divle tulum peynirinde aflatoksin M1 düzeyi üzerine bir araştırma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* 2011;22(2):105-10.
13. Topal Ş. Gıdalarda bulunan önemli toksik küfler ve sağlık açısından değerlendirilmesi. *Gıda.* 1986;11(6).
14. Sağdıç O, Özçelik S, Şimşek B, Özdemir C. Geleneksel yöntemle üretilen küflü peynirlerin mikrobiyolojik nitelikleri ve küf florası. *Türkiye 10 Gıda Kongresi.* 2008;(1):709-12.
15. Dragacci S, Gleizes E, Freymy JM, Candlish AAG. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. *Food Addit Contam.* 1995;12(1):59-65.
16. Tunail N. Mikrobiyel enfeksiyon ve intoksikasyonlar. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü yayını. 2000;82-88 Erişim: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/DosyaGoster.aspx?DIL=1&BELGEANAHA=784&DOSYASIM=210010301.pdf>, Erişim Tarihi:20.11.2020
17. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2008;28(1):63-92.
18. Erdogan A, Gurses M, Sert S. Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheeses produced in Turkey. *Int J Food Microbiol.* 2003;85(1-2):83-5.
19. Tsai WYJ, Liewen MB, Bullerman LB. Toxicity and sorbate sensitivity of molds isolated from surplus commodity cheeses. *J Food Prot.* 1988;51(6):457-62.
20. Venugopala KN, Khedr MA, Girish YR, Bhandary S, Chopra D, Morsy MA, et al. Crystallography, in Silico Studies, and In Vitro Antifungal Studies of 2,4,5 Trisubstituted 1,2,3-Triazole Analogues. *Antibiotics.* 2020;9(6):350
21. Küçükdoğru R, Türkez H, Arslan ME, Tozlu ÖÖ, Sönmez E, Mardinoğlu A, et al. Neuroprotective effects of boron nitride nanoparticles in the experimental Parkinson's disease model against MPP+ induced apoptosis. *Metab Brain Dis.* 2020;35(6):947-57.
22. Habib SA, Abdelrahman RS, Abdel Rahim M, Suddek GM. Anti-apoptotic effect of vinpocetine on cisplatin-induced hepatotoxicity in mice: The role of Annexin-V, Caspase-3, and Bax. *J Biochem Mol Toxicol.* 2020;34(10).
23. Bullerman LB, Olivigni FJ. Mycotoxin producing-potential of molds isolated from cheddar cheese. *J Food Sci.* 1974;39(6):1166-8.
24. Tekinşen KK, Elmalı M. Taze civil (çeçil) peynirin bazı mikrobiyolojik özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Vet Bilim Derg.* 2010;1(4):78-81.
25. Geisen R, Cantor M., Hansen T, Holzappel W, Jakobsen M. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int J Food Microbiol.* 2001;65(3):183-91.
26. Gobbetti M, Lowney S, Smacchi E, Battistotti B, Damiani P, Fox PF. Microbiology and biochemistry of taleggio cheese during ripening. *Int Dairy J.* 1997;7(8-9):509-17.
27. Hayaloglu AA. Cheese varieties ripened under brine. In: McSweeney PLH, Fox PE, Cotter PD, editors. 4th ed. *Cheese.* Elsevier; 2017:997-1040.
28. Pardini B, Viberti C, Naccarati A, Allione A, Oderda M, Critelli R, et al. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer. *Br J Cancer.* 2017;116(2):202-10.
29. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2006;28(3):625-31.
30. Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop D, Bedford JS, et al. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal.* 2010;3(110):ra13-ra13.
31. Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal.* 2010;3(145):re8-re8.