

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

**AFLATOKSİN M1 BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE
PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR, BİYOPOLİMER VE
DİYET LİFİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Dyt. Sümeyra SEVİM

**Beslenme ve Diyetetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2023**

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

**AFLATOKSİN M1 BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE
PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR, BİYOPOLİMER VE
DİYET LİFİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Dyt. Sümeyra SEVİM

**Beslenme ve Diyetetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mevlüde KIZIL**

**ANKARA
2023**

ONAY SAYFASI

**AFLATOKSİN M1 BİYOKİŞİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE PROBİYOTİK
MİKROORGANİZMALAR, BİYOPOLİMER VE DİYET LİFİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Öğrenci: Sümeyra SEVİM

Danışman: Prof. Dr. Mevlüde KIZIL

Bu tez çalışması 31.05.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Beslenme ve Diyetetik Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Nevin ŞANLIER*
Ankara Medipol Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Alev KESER*
Ankara Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Banu SANCAK*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Aylin AYAZ*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Derya DİKMEN*
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

08 Haziran 2023

J.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

08 / 06 / 2023

Uzm. Dyt. Sümeyra Sevim

I “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılmaması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Mevlüde KIZIL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Dyt. Sümeyra Sevim

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca heyecanıma ortak olan, değerli bilgileriyle bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek çalışmalarımda beni cesaretlendiren çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mevlüde Kızıl'a,

Tez izleme komitesinde görev alarak çalışmaya önemli katkılar sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Banu Sancak ve Prof. Dr. Mendane Saka'ya,

Tez çalışmam süresince hem bilimsel hem manevi destek ve yardımları için Ar. Gör. Arife Macit, Ar. Gör. Gülsüm Gizem Topal, Ar. Gör. Betül Kışioğlu, Ar. Gör. Ekin Kırbaş, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı Eğitim sorumlusu Doç. Dr. Ü. Gül ERDEM ve Mikrobiyoloji Uzmanlık Öğrencileri'ne,

Aramızdaki tüm fiziksel mesafelere rağmen her daim yanımda olduklarını hissettiren değerli arkadaşlarım Elif Turan, Dr. Öğr. Üyesi Saniye Sözlü, Dyt. Öznur Bulat, Dyt. Aliye Bakırcı'ya, her koşulda yanımda olan kız kardeşlerim Rabia, Aslı, Özlem, Şeyma ve Neslihan'a,

Hayatımın her anında en büyük desteğim ve şansım olan değerli babam Ali Şükrü Sevim, annem Narin Sevim, kardeşim M. Polat Sevim, ve yeni yol arkadaşım Ramazan Karacı'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Sevim, S., Aflatoksin M1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Probiyotik Mikroorganizmalar, Biyopolimer ve Diyet Lifi Etkinliğinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023.

Aflatoksin M1 (AFM1) süt ve süt ürünlerinde en sık bulunan mutajenik ve karsinojenik özelliklere sahip önemli bir mikotoksindir. Bu çalışmada probiyotik olarak *Leuconostoc mesenteroides* RSKK 06043, *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 08022, prebiyotik olarak inülin ve biyopolimer olarak kitosanın sütte AFM1 bağlama kapasitesi ve in vitro sindirim modeli uygulaması ile AFM1 biyoerişilebilirliği üzerine etkisi incelenmiştir. Oluşturulan çalışma gruplarında (pozitif ve negatif kontrol, AFM1+ *S. cerevisiae*, AFM1+ *L. mesenteroides*, AFM1+*S. cerevisiae*+ *L. mesenteroides*, AFM1+inülin, AFM1+kitosan, AFM1+*S. cerevisiae*+*L. mesenteroides*+inülin, AFM1+*S. cerevisiae*+*L. mesenteroides*+kitosan) bulunan serbest AFM1 miktarı inkübasyon sonrası, in vitro sindirim modeli uygulamasında ince bağırsak ve kolon sonrasında HPLC ile belirlenmiştir. İnkübasyon sonrası AFM1 bağlanma düzeyi %26,7-50,9 arasında bulunmuştur. En yüksek AFM1 bağlanma düzeyini *S. cerevisiae*; en düşük kitosan göstermiştir. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir ($p>0,05$). İn vitro sindirim modeli uygulamasında AFM1'in sütte biyoerişilebilirliği ince bağırsak sonrasında $90,35\pm1,15$; kolon sonrasında $81,40\pm0,00$ bulunmuştur. *S. cerevisiae* bulunan ve *L. mesenteroides*+*S. cerevisiae*+Kitosan bulunan örneklerde ince bağırsak sonrası AFM1 biyoerişilebilirliğinde önemli derecede düşüklük saptanmıştır (sırasıyla $29,30\pm2,29$; $54,68\pm6,79$; $p<0,001$). Diğer örneklerde ise $68,37-88,72$ arasında tespit edilmiştir ($p>0,05$). Kolon sonrası *S. cerevisiae* bulunan ve inülin bulunan örneklerde AFM1 biyoerişilebilirliği kontrol grubuna göre anlamlı olmayan artış göstermiştir (sırasıyla $91,16\pm4,60$ ve $96,05\pm2,23$; $p>0,05$). Diğer örneklerde ise AFM1 biyoerişilebilirliği $51,55-60,23$ arasında anlamlı düzeyde düşmüştür ($p<0,001$). Bu çalışmada *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides*, inülin ve kitosanın sütte AFM1 bağlanma kapasiteleri gösterilmiş ve *L. mesenteroides* ve kitosanın en kararlı biyolojik ajan olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kitosan ve probiyotik bakteriler, süt ürünlerinde aflatoksinlerin biyoerişilebilirliğini azaltmak için güvenilir biyolojik ajan olarak kullanılabilirler.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M1, probiyotik, in vitro sindirim, kitosan, inülin, biyoerişilebilirlik

Bu proje, Hacettepe Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir (Proje No: THD-2021-18916).

ABSTRACT

Sevim, S., Investigation of Probiotic Microorganisms, Biopolymer and Dietary Fiber Efficacy on Aflatoxin M1 Bioaccessibility, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Program of Nutrition and Dietetics, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2014.

Aflatoxin M1 (AFM1) is an important mycotoxin with mutagenic and carcinogenic properties, most commonly found in milk and dairy products. In this study, the effects of *Leuconostoc mesenteroides* RSKK 06043, *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 08022 as a probiotic, inulin as a prebiotic and chitosan as a biopolymer on AFM1 binding capacity and in vitro digestion model application on AFM1 bioaccessibility in milk were investigated. The free AFM1 level in the created study groups (positive and negative control, AFM1+ *S. cerevisiae*, AFM1+ *L. mesenteroides*, AFM1+ *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides*, AFM1+inulin, AFM1+chitosan, AFM1+*S. cerevisiae*+ *L. mesenteroides*+inulin, AFM1+ *S. cerevisiae*+ *L. mesenteroides*+chitosan) was determined by HPLC after incubation, after small intestine and colon in the application of in vitro digestion model. AFM1 binding level after incubation was found to be between 26.7-50.9%. *S. cerevisiae* had the highest AFM1 binding level; chitosan showed the lowest AFM1 binding level. However, no significant difference was found between the groups ($p>0.05$). The bioavailability of AFM1 in milk after the in vitro digestion model was $90.35\pm1.15\%$ after the small intestine; found $81.40\pm0.00\%$ after the colon. AFM1 bioavailability was significantly reduced after the small intestine in samples that included *S. cerevisiae* and *L. mesenteroides*+*S. cerevisiae*+Chitosan ($29.30\pm2.29\%$; $54.68\pm6.79\%$, respectively; $p<0.001$). In the other samples, it was determined between 68.37-88.72% ($p>0.05$). AFM1 bioavailability in samples with post-colon *S. cerevisiae* and inulin showed a non-significant increase compared to the control group ($91.16\pm4.60\%$ and $96.05\pm2.23\%$, respectively; $p>0.05$). In the other samples, AFM1 bioavailability decreased significantly between 51.55-60.23% ($p<0.001$). In this study, AFM1 binding capacities of *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides*, inulin, and chitosan in milk were shown and *L. mesenteroides* and chitosan were determined to be the most stable biological agents. In addition, chitosan and probiotic bacteria can be used as safe biological agent to reduce the bioaccessibility of aflatoxins in dairy products.

Key Words: Aflatoxin M1, probiotic, in vitro digestion, chitosan, inulin, bioaccessibility

This study was supported by Hacettepe University BAP (Project No: THD-2021-18916).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLOLAR	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar	1
1.2. Amaç ve Varsayımlar	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Mikotoksinler	6
2.1.1. Aflatoksin	6
2.1.2. Aflatoksin Metabolizması ve Sağlıkla İlişkisi	7
2.1.3. Aflatoksin M1	8
2.1.4. Aflatoksin Kontrol Yöntemleri	10
2.2. Probiyotikler	10
2.3. Besin Hidrokolloidleri	12
2.3.1. Prebiyotik: İnülin	13
2.3.2. Biyopolimer: Kitosan	15
2.4. Probiyotik Bakterilerin Aflatoksin M1'i Bağlayıcı Özelliği	16
2.5. İn Vitro Sindirim Çalışmaları	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Gereç	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Liyofilize Bakteri Kültürünün Aktivasyonu ve Hazırlanması	24
3.2.2. Aflatoksin M1 ile Kontamine Örneklerin Hazırlanması	25
3.2.3. İn Vitro Sindirim Modelinin Uygulanması	26

3.2.4. Aflatoksin M1 Ekstraksiyonu ve HPLC Analizi	32
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	33
4. BULGULAR	35
4.1. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin İnkübasyon sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri	35
4.1.1. Probiyotik Bakteri ve Mayanın İnkübasyon sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri	36
4.1.2. Prebiyotik ve Biyopolimerlerin İnkübasyon sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri	36
4.1.3. Probiyotik Mikroorganizmalar, Prebiyotik ve Biyopolimer Kombinasyonlarının İnkübasyon Sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri	37
4.2. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Sütte AFM1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	38
4.2.1. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin İnce Bağırsak Sonrası Sütte AFM1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	38
4.2.2. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Kolon Sonrası Sütte AFM1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	41
4.3. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin İnkübasyon ve İn Vitro Sindirim Sonrasında Sütte AFM1 Bağlanma Düzeylerinin Karşılaştırılması	43
5. TARTIŞMA	46
5.1. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri	47
5.2. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Sütte Aflatoksin M1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	51
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	57
6.1. Sonuçlar	57
6.2. Öneriler	60
7. KAYNAKLAR	62
8. EKLER	73
EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	

EK-2: Orjinallik Ekran Çıktısı

9. ÖZGEÇMİŞ

75



SİMGELER ve KISALTMALAR

xg	Relatif Santrifüj Kuvveti (RCF)
µg	Mikrogram
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADI	Acceptable Daily Intake (kabul edilebilir günlük alım miktarı)
AF	Aflatoksin
AFB1	Aflatoksin B1
AFM1	Aflatoksin M1
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists (Resmi Tarım Kimyagerleri Derneği)
BSA	Sığır Serum Albümini
Bkz	Bakınız
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CO ₂	Karbondiyoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DON	Deoksinivalenol
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	U.S. Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)
FB	Fumonisinler
g	Gram
GRAS	Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenilir Olarak Kabul Edilen)
H ₂	Hidrojen gazı
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanseri Araştırma Kuruluşu)
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram

kob	Koloni Oluşturan Birim
KSCN	Potasyum Tiyosiyanat
L	Litre
LOD	Limit of Detection (Saptama Sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (Ölçüm Limiti)
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MPL	Maximum Permitted Level (Maksimum İzin Verilen Limit)
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe
nm	Nanometre
N ₂	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum fosfat
NaSO ₄	Sodyum sülfat
NH ₄ Cl	Amonyum klorür
ng	Nanogram
NOEL	No Observable Effect (Gözlenebilir Etki Oluşturmayan Düzey)
OTA	Okratoksinler
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
pg	Pikogram
ppb	Milyarda bir
ppt	Binde bir
RIVM	Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü
RNA	Ribonükleik Asid
RSD	Relative Standard Deviation (Bağıl Standart Sapma)
spp.	Türler
v	Hacim
UV	Ultraviyole
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose (Maya özütü Peptonlu Dekstroz)
ZEA	Zearalenon



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2, M1, M2) kimyasal yapısı.	7
2.2. Hidrokolloidlerin biyolojik kökenlerine göre sınıflandırılması.	13
3.1. Süt tozuna ait HPLC kromatogramı.	24
3.2. İn vitro sindirim modelinin şematik gösterimi.	30
3.3. AFM1'in vakum manifolda yerleştirilmiş aflatoksin M1'e özgü immünoafinite kolonu ile ekstraksiyonu.	32
4.1. Pozitif kontrol örneklerinde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.	35
4.2. Negatif kontrol örneklerinde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.	35
4.3. <i>S. cerevisiae</i> 'nin bulunduğu örneklerde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.	36
4.4. Kitosanın bulunduğu örneklerde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.	36
4.5. Probiyotik bakteri ve maya ile prebiyotik ve biyopolimerlerin inkübasyon sonrası sütte AFM1'e bağlanma yüzdeleri.	38
4.6. İnülin bulunan örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasında ince bağırsak sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.	39
4.7. Çalışma gruplarında ince bağırsak sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.	40
4.8. <i>L. mesenteroides</i> 'in bulunduğu örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasında kolon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.	41
4.9. Çalışma gruplarında kolon sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.	43
4.10. Çalışma gruplarının sütte ve in vitro sindirim modeli sonrasında tespit edilen AFM1 bağlanma yüzdeleri.	45

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Farklı ülkelerde süt ve süt ürünlerinde Aflatoksin M1 yönetmeliğine göre izin verilen miktarlar.	9
2.2. Probiyotik mikroorganizmalar ve prebiyotiklerin AFM1'e bağlanmasına yönelik bazı çalışmaların özetleri.	18
2.3. İn vitro sindirim modeli kullanılarak AFM1 biyoerişilebilirliği ile ilgili yapılan çalışmaların özetleri.	22
3.1. Süt örnekleri çalışma grupları.	26
3.2. Uygulanan sindirim modelinin bileşenleri.	28
3.3. Çalışma gruplarının HPLC analizi yapılan aşamaları.	31
3.4. AFM1'in geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.	33
4.1. Probiyotik bakteri ve maya ile prebiyotik ve biyopolimerlerin inkübasyon sonrası sütte AFM1'e bağlanma düzeyleri.	37
4.2. İn vitro sindirim modeli uygulamasında ince bağırsak sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.	40
4.3. İn vitro sindirim modeli uygulamasında kolon sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.	42

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar

Aflatoksin (AF), *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen ve en toksik grup olarak nitelendirilen mikotoksin grubudur. Aflatoksinler, besinlerin üretim aşamalarında hasattan önce, hasat sırasında, hasat sonrasında, depolama süresince, tahıl, kurubaklagil, yağlı tohumlar gibi ürünlerin işlenmesi sırasında oluşabilmektedir. Aflatoksin oluşumunu coğrafik konum, çevresel koşullar (sıcaklık, nem), besinin bileşimi, mikrobiyal rekabet, ürüne uygulanan fiziksel işlemler etkileyebilmektedir (1).

Bugüne kadar 20’den fazla aflatoksin tanımlanmış olmakla birlikte Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 toksijenik küfler tarafından doğal olarak sentezlenen ve yiyeceklerde görülen temel türleridir. Bunlar içerisinde de en toksik olan tür AFB1’dir. AFB1’in farklı metabolitleri olmakla birlikte yüksek reaktif tipi 4-hidroksi metaboliti olan AFM1’dir. AFM1, AFB1 ile kontamine yemlerle beslenmiş laktasyon yapan hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. Karaciğerde metabolize olan AFB1’in yaklaşık %0,3-6,2’sinin AFM1’e metabolize olduğu ve süt bezleriyle süte salındığı belirtilmektedir (1, 2).

AFM1 toksisite mekanizması insanlarda henüz net olarak açıklanamamakla birlikte AFB1 mekanizmasına benzerlik gösterdiği düşünülmektedir. Ancak AFB1’den farklı olarak AFM1 mikotoksini öncü bir metabolik aktivasyona gerek duymadan insan hücrelerinde direk sitotoksik etki gösterebileceği ileri sürülmektedir (3). Bunun yanı sıra AFM1’in, AFB1’den daha düşük toksijenik etkiye sahip olduğu belirtilmekle birlikte AFM1’in sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkileri de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (4-6). Uluslararası Kanseri Araştırma Kuruluşu (IARC; International Agency for Research on Cancer) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yapılan çalışmalar neticesinde AFB1 ve AFM1’i “Sınıf 1: Yeterli kanıt elde edilmiş insan karsinojenleri” olarak sınıflandırmıştır (7, 8).

AFM1’in pastörizasyon ve sterilizasyon gibi ısı işlemlerden etkilenmediği ve bu nedenle tüketime hazır süt ve süt ürünlerinin üretimi ve bekletme süresince stabil kaldığı belirtilmektedir. Dolayısıyla besin güvenliği ve halk sağlığı yönünden bakıldığında AFM1, besin zincirine kontamine süt ve süt ürünleri aracılığıyla

girmektedir. İnsanların diyetle AFM1 maruziyeti ve sağlık riski arasındaki ilişkisi dikkate alındığında AFM1 maruziyetini en aza indirmek için birçok ülkede süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek AFM1 seviyeleri için kabul edilebilir en üst limitler yasal düzenlemelerle belirlenmiştir. Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) sütte kabul edilebilir en yüksek AFM1 seviyesini 0,5µg/L; Avrupa Birliği çiğ sütte, ısıtılmış işlem görmüş sütte ve süt ürünlerinde en yüksek 0,05 µg/L AFM1 miktarını kabul etmektedir (7, 9). Ülkemizde de benzer şekilde çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt ve süt ürünlerinin üretiminde kullanılan sütte bulunabilecek en yüksek AFM1 miktarı 0,05 µg/kg (50 ng/kg) olarak belirlenmiştir (10).

Besin zincirinde aflatoksin kontaminasyonunu önlemenin en iyi yolu gelişmiş tarım uygulamaları ve ürünlerin uygun depolanmasının benimsenmesidir. Ancak aflatoksinin normal besin işleme koşulları altında stabil kalması ve uygulamalardaki zorluklar nedeniyle bu her zaman mümkün olmamaktadır. AFM1 kontaminasyonunu engellemek ve/veya azaltmak için bugüne kadar çeşitli fiziksel uygulamalar (ısı, ultraviyole ışık veya iyonlaştırıcı radyasyon) ve kimyasal ajanların (klorlamaya ek olarak oksidan veya hidrolitik maddeler) kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır (2, 7). Ancak bu yöntemler ürün kalitesinde ve lezzetinde bozulma, verimlilikte azalma, yüksek konsantrasyon seviyelerinde toksik etki gösterme ve yüksek maliyet vb. dezavantajları nedeniyle yeterince etkinlik sağlayamadığı belirlenmiştir. Bu nedenle toksik olmayan, güvenilir, çevre dostu, etkin ve maliyet kazancı sağlayan biyolojik yöntemler üzerinde durulmaktadır (11).

Mikotoksinlerin patojen olmayan mikroorganizmalar özellikle güvenilir, etkin ve çevre dostu probiyotik özellikteki, maya ve bakteriler tarafından bağlanarak biyolojik detoksifikasyonu yaklaşımı çeşitli araştırmacılar tarafından üzerinde çalışılmış ve oldukça umut vadeci sonuçlar ortaya konulmuştur (12-14). Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda bazı probiyotik maya ve bakteri türlerinin (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis*) AFM1 ile kontamine edilmiş sıvı ortam ve sütte AFM1'e bağlandığı ve AFM1 seviyesinin önemli düzeyde azaldığı gösterilmiştir (7, 12-16). Probiyotik bakteriler ve mayaların aflatoksinle bağlanma mekanizması henüz net olmamakla birlikte metabolik bir yıkım ya da kimyasal bir bağlanmadan ziyade

hücre duvarı bileşenlerine (peptidoglikan ve polisakkaritler) adezyon yeteneği ile gerçekleşen fiziksel bir bağlanma ile oluştuğu ileri sürülmektedir. Dolayısıyla temel olarak mikroorganizmanın sahip olduğu bağlanma bölgesi sayısına göre bağlanma kapasitesinin değiştiği düşünülmektedir (7, 15).

Besinlerle alınan toksin ve benzeri kirletici miktarlarının vücut tarafından kullanılabilir miktarı her zaman yansıtmaması, bu konudaki bir diğer soru işareti olup biyoerişilebilirlik/biyoyararlanım kavramını ortaya çıkarmıştır. Biyoerişilebilirlik çalışmalarının insanlar üzerinde gerçekleştirilmesindeki birçok dezavantaj nedeniyle araştırmacılar laboratuvar ortamında gastrointestinal sindirim koşullarının taklit edildiği in vitro sindirim modelleri üzerine yoğunlaşmışlardır. Özellikle de toksin benzeri zararlı bileşenlerin biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesinde in vitro sindirim modellerinin kullanımının daha uygun olacağı belirtilmektedir (17-19).

Çeşitli besin modellerinde ve in vitro solüsyonlarda probiyotik bakterilerin AFM1'e bağlanma yeteneği ile AMF1 seviyesinin azaldığını gösteren birçok çalışma bulunmasına rağmen, besinde oluşan bağlı aflatoksin-mikroorganizma kompleksinin emilim ya da metabolizma için uygun halde bulunan serbest aflatoksine göre gastrointestinal sistemdeki biyoerişilebilirliğinin nasıl değiştiği tam olarak bilinmemektedir (12-16). Son yıllarda probiyotik bakterilerin AFM1 biyoerişilebilirliği üzerine etkisini incelemek için yapılan in vitro sindirim modeli çalışmalar artmış olmakla birlikte çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Kabak ve Özbey (2012) probiyotik bakterilerin in vitro sindirim modelinde AFM1 biyoerişilebilirliğini %15,5-31,6 oranında azalttığını (20), Serrano-Niño ve ark. (2013) ise %22,72-45,17 oranında azalttığını göstermiştir (3).

Bununla birlikte son yıllarda prebiyotiklerin probiyotik bakteriler üzerindeki olumlu etkileri, dolayısıyla mikotoksinlerin detoksifikasyonunda da faydalı olabileceği düşünülmektedir bu yönde çalışmalar yapılmıştır (13-21). Sevim ve ark. (2019) inülinin çeşitli probiyotik bakterilerin AFM1'e bağlanma kapasitesini artırdığını göstermiştir (13). Başka bir çalışmada ise prebiyotiklerin besin içeriğindeki AFM1 seviyesini azaltmada önemli bir katkı sağlamadığı, ancak inülinin biyoerişilebilirlikte *L. acidophilus*'un etkinliğini artırdığını ifade etmiştir (21).

Besinlerde bulunan toksinlerin biyolojik detoksifikasyonunda kullanılabilecek biyolojik ajanlara probiyotik bakterilerin yanı sıra bir yenisini daha eklenmiştir. Assaf

ve ark. (2018) probiyotik bakteri ve mayaların aflatoksinlere bağlanma mekanizmasında etkin rol oynadığı düşünülen hücre duvarı anahtar bileşeninden yola çıkarak aynı bileşeni içeren biyopolimer kitinin de AFM1'e bağlanarak AFM1 seviyesini önemli düzeylerde azalttığını göstermiştir (9).

Ancak tüketilen besinde oluşan AFM1-biyolojik ajan kompleksinin yanı sıra serbest AFM1 de bulunmakta ve besinde oluşan bu bağlı aflatoksinin insan vücudundaki biyoerişilebilirliğinin serbest aflatoksine göre farklı olup olmadığı henüz açığa kavuşturulmamıştır. Bunun yanı sıra probiyotik bakterilerin AFM1 biyoerişilebilirliği üzerine etkisini inceleyen in vitro sindirim modeli çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Ayrıca bu çalışmalarda kullanılan sindirim modelleri ince bağırsak simülasyonu ile sonlandırılmış ve bağlı aflatoksin-biyolojik ajan kompleksinin birçok canlı mikroorganizma içeren kolonda herhangi bir değişime uğrayıp uğramadığı bilinmemektedir (19, 20). Ek olarak biyoerişilebilirlikle ilgili yapılan çalışmalarda bugüne kadar sadece bakteriler kullanılmıştır (3, 19-21). Ancak son yıllarda mayaların bakterilere göre antibiyotik direnci gelişimi ve yapısal olarak daha büyük olmasının sağladığı avantajlar nedeniyle mayaların bakterilere göre daha iyi bir alternatif olabileceği üzerinde durulmaktadır (7, 11). Ayrıca besin güvenliğinin sağlanması için besin hidrokolloidlerinin kullanılması da yeni ve güvenilir bir yaklaşım ortaya koymaktadır. Süt ve süt ürünlerinde AFM1 seviyelerinin ve biyoerişilebilirliğinin azaltılmasında en etkin biyolojik yöntemin belirlenmesi için farklı probiyotik, prebiyotik ve biyopolimer gibi biyolojik ajanların etkinliğinin araştırıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. En yüksek etkinliğe sahip olduğu belirlenen biyolojik ajanlar ile de fonksiyonel besin üretimine katkı sağlanabilecektir.

1.2. Amaç ve Varsayımlar

Amaç:

Bu çalışmada biyolojik ajan olan probiyotik bakteri, maya, prebiyotik ve biyopolimerin sütteki in vitro AFM1 biyoerişilebilirliği üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Varsayımlar:

1. Probiyotik bakteri ve mayalar AFM1'e bağlanarak sütteki AFM1 seviyesini azaltırlar.
2. Prebiyotikler ve biyopolimerler probiyotik bakterilerin sütte AFM1'e bağlanma kapasitesini değiştirir.
3. Probiyotikler, prebiyotikler ve biyopolimerler AFM1'in biyoerişilebilirliğini değiştirirler.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, tarım alanlarındaki mahsullerde hasat öncesi ve sonrasında veya ürünlerin işleme ve depolanması sırasında mantar büyümesi için uygun sıcaklık ve nem altında mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir (22). En yaygın mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait çeşitli ipliksi mantarlar tarafından üretilmektedir (23).

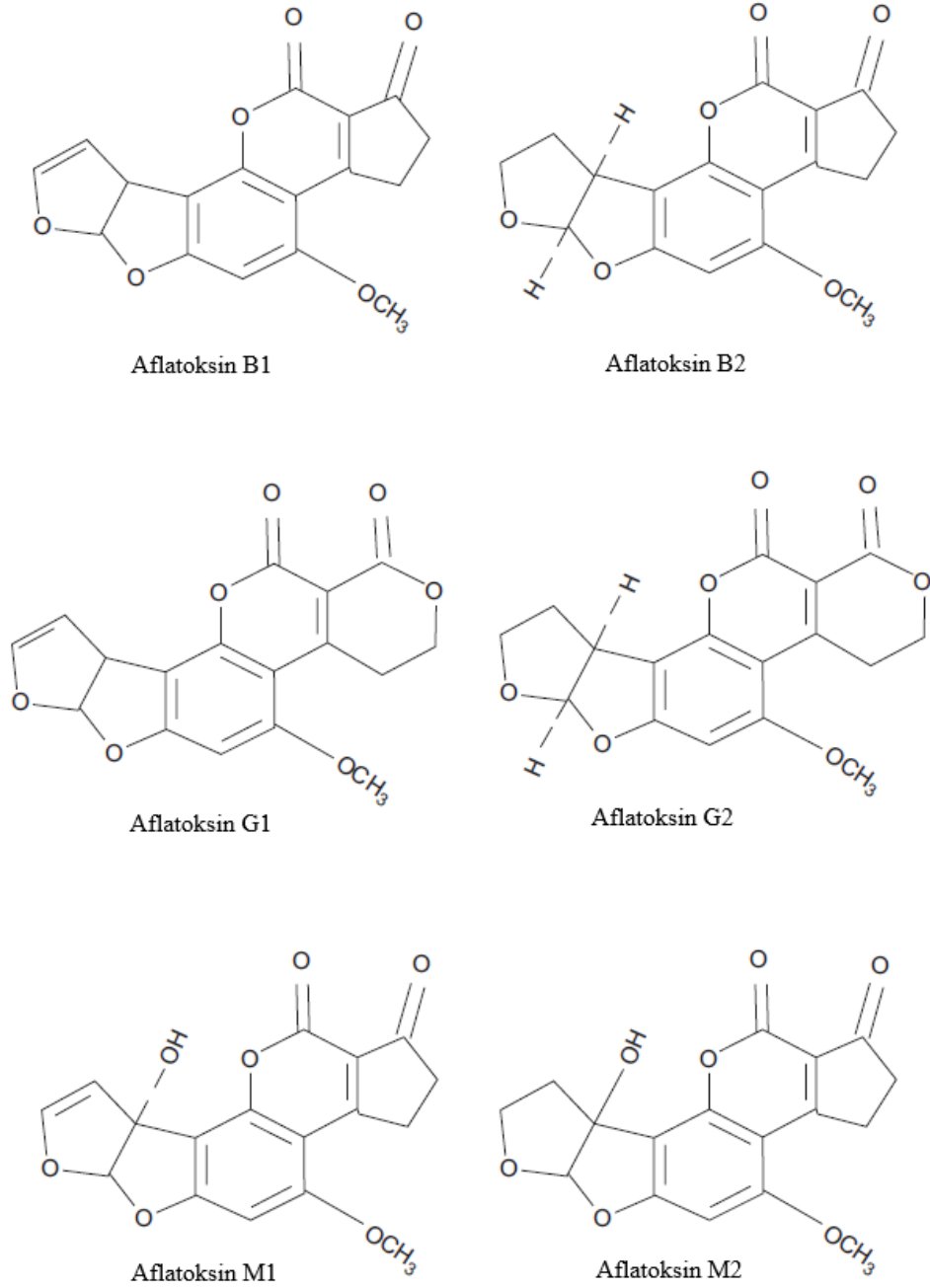
Mantarların çevredeki yaygın dağılımı nedeniyle mikotoksinler besin ve yemlerdeki ana kontaminantlardan biri olarak gösterilmekte ve kontamine besinlerin tüketilmesiyle akut veya kronik olumsuz etkileri ortaya çıkabilmektedir. Karaciğer başta olmak üzere vücutta birçok organ veya sistemi etkileyebilmektedirler (22).

Günümüzde 400'den fazla mikotoksin türü tanımlanmıştır ve bilim dünyası karsinojenler ve/veya toksik mikotoksin çeşitleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda Aflatoksinler (AF), Okratoksinler (OTA), Fumonisinler (FB), Zearalenon (ZEA) ve Deoksinivalenol (DON) sahip oldukları teratojenite, karsinojenite, mutajenite, genotoksisite ve immünsüpresyon etkileri ve sahip oldukları yüksek prevalans sebebiyle halk sağlığı bakımından endişelere sebep olmaktadır (24, 25). Bunlar içerisinde de aflatoksinler insan sağlığı üzerinde en zararlı etkiyi gösteren mikotoksin grubu olarak belirtilmektedir. Ayrıca epidemiyolojik çalışmalara göre AF alımı ile insan hepatoselüler karsinomunun yüksek prevalansı arasında doğrusal bir korelasyon gösterilmiştir (25).

2.1.1. Aflatoksin

Aflatoksin, *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* mantar türlerinin ikincil metabolitidir ve 20 farklı türü tanımlanmıştır (16). Bunlar içerisinde dört ana türü olan AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 toksijenik mantarlar tarafından doğal olarak sentezlenirken AFM1 ve AFM2, AFB1 ve AFB2'nin hidroksile metabolitleri olarak hayvansal ürünlerde meydana gelmektedir (26-28). Aflatoksinlerin akut ve kronik toksisiteleri arasında şiddet sıralaması ise AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 şeklinde iken, AFM1 ve AFM2 öncüllerine kıyasla daha az etkili olarak gösterilmiştir (2).

Aflatoksinlerin kimyasal yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (1).



Şekil 2.1. Aflatoksinlerin (B1, B2, G1, G2, M1, M2) kimyasal yapısı (1).

2.1.2. Aflatoksin Metabolizması ve Sağlıkla İlişkisi

Aflatoksinlerin ana biyolojik etkisi insan ve hayvan sağlığı üzerinde akut veya kronik karaciğer hastalığı olmakla birlikte hem hücresel hem de hümorale yanıt için hepatotoksisite, karsinogenisite, mutajenite, teratojenisite ve immünoşüpresanlar olarak da kabul edilmektedir. Mikotoksin ile kontamine olmuş besinlerin uzun süreli

tüketimi başta karaciğerde olmak üzere diğer dokularda hasara sebep olarak belirgin veya mikroskobik anormalliklerin oluşmasına neden olabilmektedir (2, 22).

Aflatoksinle kontamine besin alımını takiben aflatoksinler gastrointestinal sistemden hızlıca emilirler ve mikrozomal enzim Sitokrom P-450 (CYP450) aracılığıyla metabolize edilirler. Ortaya çıkan aflatoksin-8,9-epokside metaboliti DNA hasarına neden olmakta ve karaciğer kanserini tetiklemektedir (24, 28). Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda RNA yapısında, protein yapısında ve endoplazmik retikulumda bozukluklara neden olduğu belirtilmektedir (29-31).

Güncel deneysel yaklaşımlar ile yapılan çalışmalar diyetle aflatoksine maruz kalmanın, hepatoselüler karsinom ve kronik bağırsak enflamatuvar hastalıkları gibi farklı hastalık türlerinin gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilebileceğini ortaya koymaktadır (1). Bunun yanı sıra anne sütü aracılığıyla anneden bebeğe aflatoksin geçişi olabildiği ve gelişen fetüs için de risk oluşturduğu gösterilmiştir (32, 33).

2.1.3. Aflatoksin M1

AFM1, Aflatoksin B1 ve B2 ile kontamine yemlerle beslenmiş çiftlik hayvanlarının meme bezleri yoluyla süte geçen, ayrıca insanlarda karaciğer sitokrom P450 enzimlerinin etkisiyle AFB1'den üretilebilen, AFB1'in başlıca hidrosillenmiş türevidir (34). Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC; International Agency for Research on Cancer) AFM1'i "Sınıf 1: Yeterli kanıt elde edilmiş insan karsinojenleri" olarak sınıflandırmış ve insanlar için karsinojenik madde olarak kabul etmiştir (35). Avrupa Birliği'nin "Gıda Maddelerinde Bazı Kontaminantların Maksimum Düzeylerini Belirleyen Komisyon Direktifi"nde; aflatoksinlerin genotoksik karsinojen maddeler olması nedeniyle NOEL (No Observable Effect; gözlenebilir etki oluşturmeyen düzey) ve ADI (Acceptable Daily Intake; kabul edilebilir günlük alım miktarı) değerinin tespit edilemediği belirtilmiştir (36).

Aflatoksinlerin insanlar tarafından alınması, esas olarak kontamine tarım ürünlerinin ve/veya kontamine yemlerle beslenen süt salgılayan hayvanlardan elde edilen hayvansal ürünlerin tüketimi yoluyla gerçekleşmektedir. Farklı hayvansal ürün türleri arasında süt ve süt ürünleri AFM1'in en güçlü kaynaklarıdır (1). Süt ve süt ürünleri her yaş grubu tarafından sıklıkla tüketilen ve özellikle çocuk beslenmesinde

önemli bir yere sahip olan bir besindir. Bu besinlerin AFM1 ile kontaminasyonu, AFM1'in pastörizasyon ve sterilizasyon gibi ısı işlemlerden etkilenmemesi nedeniyle halk sağlığı açısından önemli bir risk teşkil etmektedir. Bu nedenle Türkiye de dahil olmak üzere birçok ülkede süt ve süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen AFM1 seviyeleri yasal düzenlemeler ile belirlenmiştir. (37). Kodeks Alimentarius Komisyonu ve Avrupa Komisyonu (AK) gibi uluslararası bilim toplulukları, süt ve süt bazlı ürünlerde AFM1 için izin verilen maksimum seviyeyi (MPL, maximum permitted level) belirlemiştir. Kodeks Alimentarius Komisyonu, peynirde AFM1'in MPL'sinin 250 ng/kg'dan yüksek olmaması gerektiğini belirtmiştir. Ayrıca AK çiğ, pastörize ve sterilize sütler için MPL'yi 50 ng/L olarak belirlemiştir (1). Farklı ülkelerde süt ve süt ürünlerinde bulunması izin verilen maksimum Aflatoksin M1 limitleri Tablo 2.1.'de verilmiştir (38).

Tablo 2.1. Farklı ülkelerde süt ve süt ürünlerinde Aflatoksin M1 yönetmeliğine göre izin verilen miktarlar (38).

Ülke	Süt (µg/kg)	Süt ürünleri (µg/kg)
USA	0,50	0,50
Avrupa Birliği	0,05	0,05
Avusturya	0,05	0,05 (yağ)
Fransa	0,05; 0,03 (3 yaş altı çocuklar için)	-
Bulgaristan	0,50	0,10 (süt tozu)
Brezilya	0,50	5,0 (süt tozu)
Türkiye	0,05	0,25 (peynir)
Mısır	0	0
Arjantina	0,05	0,50 (süt ürünleri)

Ancak buna rağmen yapılan çok sayıda çalışmada ülkemizde ve diğer birçok ülkede süt ve süt ürünlerinde belirlenen yasal limitlerin üzerinde AFM1 tespit edilmiştir (39-41). Ek olarak AFM1 maruziyetinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar, başta çocuklar olmak üzere tüm yaş gruplarının sütte AFM1 varlığına bağlı olarak yüksek riske maruz kaldığını göstermiştir (42-44). Dolayısıyla süt ve süt ürünlerinde AFM1 seviyelerinin ve maruziyetinin azaltılması için pratik, etkili ve ucuz yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir (45).

2.1.4. Aflatoksin Kontrol Yöntemleri

Besinlerde ve yemlerde aflatoksin oluşumunu kontrol altında tutmak için öncelikle üründe oluşumunu engellemek gerekir. Ancak bunu sağlamak her zaman mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla bu ürünlerden toksini temizlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (46). Bu yöntemler arasında ısı, ultraviyole ışık ya da iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel yöntemler ve klorlama, oksitleyici ya da hidrolize edici ajanların kullanıldığı kimyasal yöntemler yer almaktadır. Ancak fiziksel ve kimyasal yöntemler çeşitli dezavantajları (ürün kalitesinde, organoleptik ve besleyici özelliklerinde bozulma, yüksek maliyet) nedeniyle yeteri kadar etkinlik göstermemektedir (47, 48). Bu nedenle insan sağlığı ve besin kalitesi üzerinde olumsuz etkilere neden olmayacak güvenilir ve etkin kontrol yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (49).

Son yıllarda, hayvan sindirim sisteminde mikotoksinlere bağlanma yeteneğine sahip bazı bağlayıcı ajanların kullanılması, mikotoksinlerin biyoyararlanımını ve toksisitesini azaltıcı olarak endüstriyel uygulama potansiyeline sahip önemli bir yaklaşım olarak gösterilmektedir (2). Bu bağlayıcı ajanlar içinde patojen olmayan mikroorganizmalar ile ilgili önemli çalışmalar yapılmış ve umut vadeci sonuçlar elde edilmiştir (49-51). Bununla birlikte mikotoksinlerin sahip oldukları kimyasal özelliklerinden dolayı besinden uzaklaştırılmasında farklı doğal bağlayıcıların kullanımı üzerinde de durulmaktadır. Besin endüstrisinde kullanılabilen doğal bağlayıcılar arasında selüloz, maya hücre duvarı polisakkaritleri ve peptidoglikanlar gibi kompleks sindirilemeyen karbonhidratlar bulunmaktadır. Ayrıca aflatoksine bağlanma yeteneği bulunan mikroorganizmaların çoğalmasını destekleyen prebiyotiklerin kullanımının da faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle son yıllarda çeşitli prebiyotik ve biyopolimerlerin etkinliği de araştırılmaktadır (9, 21, 52).

2.2. Probiyotikler

Probiyotik ajan tanımı, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre yeterli miktarda uygulandığında konakçı üzerinde çok sayıda sağlık açısından yararlı etkilere neden olan canlı mikroorganizmalardır (53, 54). Bu canlı mikroorganizmaların, memelilerin sindirim sisteminin dengesinin korunmasına yardımcı olmada ve ishal, üriner enfeksiyonlar,

kandidiyazis, laktoz intoleransı, hiperkolesterolemi, bağışıklık bozuklukları, sindirim enzimlerini etkileyen diğer gıda alerjileri gibi bazı hastalıkların kontrol ve/veya tedavi edilmesinde, ayrıca karsinojen ajanların inhibisyonu ve kansere neden olan bileşikler nötralize etmede faydalı olduğu bildirilmektedir (2, 55-57).

Probiyotikler, patojenik olmayan birçok çeşitli bakteri, mantar ve algleri içermekte ve çoğunlukla insan kaynaklarından, hayvanlardan ve çevreden türetilmektedir. Ancak insanların kullanabileceği probiyotik ürünler için yalnızca insan kaynaklı türlerin kullanımı uygun görülmektedir. Fermente süt ürünleri gibi probiyotik ürünler için kullanılan probiyotik mikroorganizmalar, esas olarak bağırsak mikroorganizmaları olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinden oluşmaktadır (2, 53, 54, 57).

Probiyotik ürünlerde yaygın olarak kullanılan mikroorganizma türleri aşağıda verilmiştir (2, 56, 57).

- Bakteriler:

- (i) *Lactobacillus* türleri: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. sporogenes*, *L. rhamnosum*, *L. delbrueck*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. lactus*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. crispatus*

- (ii) *Bifidobacterium* türleri: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. thermophilum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. animalis*

- (iii) *Streptococcus* türleri: *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. alivarius*, *S. intermedius*, *S. thermophilis*, *S. diacetylactis*

- (iv) *Bacillus* türleri: *B. subtilis*, *B. clausiic*

- (v) *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* Nissle suşu, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

- Maya ve küfler: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida: krusei*, *pintolopesii*

Probiyotik mikroorganizmaların günlük terapötik dozu yaklaşık log 8-9 kob/g olarak belirtilirken bir ürünün probiyotik olarak nitelendirilebilmesi için minimum log 6–7 kob/g konsantrasyonlarında bulunması gerektiği belirtilmiştir (58). Benzer şekilde FDA da minimum log 6–7 kob/g konsantrasyonlarında probiyotik mikroorganizma bulunması gerektiğini belirtmektedir. Ancak sindirim ve depolamanın canlılık üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, terapötik etkinin sağlanabilmesi için

probiyotik mikroorganizma konsantrasyonunun log 8-9 kob/g olması önerilmektedir (59).

2.3. Besin Hidrokolloidleri

Son yıllarda, besin bilimindeki araştırmalardaki önemli gelişmeler daha çok reolojiyi, kaliteyi, besin değerini artırmada büyük bir uygulama ile farklı koloidal sistemlerin üretimine ve bunların özellikle besin ve ilaç sektörlerinde kullanımına odaklanmaktadır. Bu bağlamda, polisakkaritler ve proteinler gibi besin kolloidleri, güçlü hidrofilik yapıları nedeniyle büyük potansiyele sahiptir (60, 61). Bunlar, gerçek çözelti ile süspansiyon arasında orta düzeyde olan bir kolloidin özelliklerini sergileyen ve dolayısıyla hidrofilik kolloidler veya hidrokolloidler olarak adlandırılan koloidal bir dağılım oluşturmaktadır. Aslında besin kolloidlerinin geleneksel uygulamaları, besin sisteminin reolojik özelliklerini (jelleşme, koyulaşma, stabilize etme ve emülsifikasyon kapasitesi) modüle etme yeteneklerine dayanmakta ve bununla birlikte yeni üretilmiş besinlerin duyuşal özelliklerini ve yapısını (ürün içi ve ağız içi) tanımlamada önemli bir rol oynamaktadır (60, 62).

Doğal fonksiyonel özelliklerin yanı sıra bu biyopolimerler, yağ yerine geçme özellikleriyle az yağlı besinlerin üretiminde ya da diyet lifleri olarak besinin besleyici özelliğinin iyileştirilmesinde çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca sindirilmiş besinlerin artan viskozitesi kütle transferinin azalmasına yardımcı olmakta ve bu durum mide boşalmasının azalmasına ve enzimatik faaliyetin yavaşlamasına neden olmaktadır. Böylece kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, tip 2 diyabette insülinemik kontrolün sağlanması, glisemik yanıtın düzenlenmesi, obezitenin iyileştirilmesi, bağışıklığın düzenlenmesi ve kolon sağlığının korunması gibi birçok sağlık yararı sağlamaktadır (60, 61).

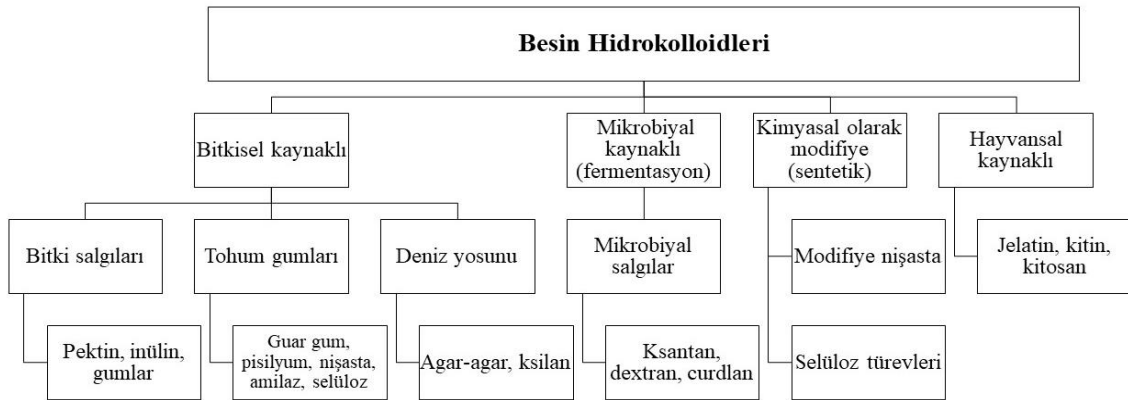
Hidrokolloidlerin sağlık üzerindeki faydalarının yanı sıra günümüzde besinde biyoaktif bileşiklerin kararlılığını iyileştirmek için bariyer malzemeleri olarak kullanıldığı uygulamalar da giderek yaygınlaşmaktadır. Sahip oldukları yapı tasarımı, kendiliğinden toplanma davranışı, hidrofobik etkileşimler ve molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları dahil olmak üzere gösterdikleri koloidal özellikleri ile besin endüstrisinde uygulama alanları artmaktadır (61, 63, 64).

Hidrokolloidler, doğada her yerde bulunan yapısal olarak çok çeşitli gıda polisakkaritleri sınıfıdır. Çoğu doğal hidrokolloid, karasal bitki ve deniz yosunları dahil olmak üzere bitki kaynaklıdır. Hayvansal kaynaklı kitin ve kitosan da gıda endüstrisinde geniş uygulamaları bulunan hidrokolloidlerdir. Bitki ve hayvan kaynaklı olanların yanı sıra mikroorganizmalar da çok çeşitli fizikokimyasal özellikler, yapısal ve metabolik fonksiyonlar sergileyen çeşitli polisakkaritler (bakteriyel selüloz, ksantan, dekstran, pullulan ve curdolan) salgılamaktadırlar (61).

Kaynaklarına göre hidrokolloidler dört ana kategoriye ayrılmaktadır (61):

1. Bitkisel kaynaklı hidrokolloidler
2. Hayvansal kaynaklı hidrokolloidler
3. Mikrobiyal kaynaklı hidrokolloidler (fermentasyon)
4. Kimyasal olarak modifiye edilmiş bitkisel kaynaklı hidrokolloidlerdir (sentetik sakızlar).

Şekil 2.2., biyolojik kökenlerine göre sınıflandırılmış hidrokolloidlerin genel bir bakışını sunmaktadır (61).



Şekil 2.2. Hidrokolloidlerin biyolojik kökenlerine göre sınıflandırılması.

2.3.1. Prebiyotikler: İnülin

Prebiyotikler başlangıçta “kolondaki bir veya sınırlı sayıda bakterinin üremesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen ve böylece konağın sağlığını iyileştiren sindirilemeyen gıda bileşenleri” olarak tanımlanmıştır (56). Daha sonra bu tanım, “mide-bağırsak mikroflorasında hem

bileşimde hem de aktivitede fayda sağlayan spesifik değişikliklere izin veren seçici olarak fermente edilmiş bir bileşen" olarak geliştirilmiştir (57, 65).

Prebiyotikler çoğunlukla oligosakkaritlerden oluşmakta olup bazı polisakkaritleri de (ör. inülin) içermektedirler. Yaygın olarak kullanılan prebiyotikler frukto-oligosakkaritler/oligofruktoz (FOS), galakto-oligosakkaritler (GOS), inülin, izomalto-oligosakkarit (IMO), beta-glukan ve psyllium kabuğudur. Prebiyotiklerin sağlık yararları, probiyotikler gibi yararlı mikroorganizmaların uyarılmasıyla ve kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) gibi prebiyotiklerin hidrolizinden üretilen metabolitlerin etkileriyle ilgilidir (58, 66). Ayrıca fizyolojik ve besleyici özelliklerin yanı sıra ürün yapısının ve dokusunun iyileştirilmesinde sağladıkları katkılar ile besin endüstrisinde de önemli yer almaktadırlar. Özellikle bazı prebiyotik lifler yağ benzeri özellikleri sayesinde az yağlı ya da yağsız ürünlerde yağ ikame maddeleri olarak kullanılmaktadır (57, 66, 67).

Ondokuzuncu yüzyılın başlarında *Inula helenium* olarak bilinen bir bitkinin köklerinden depo karbonhidratı olarak keşfedilen inülin, prebiyotiklerle ilgili yapılan çalışmalarda büyük ilgi çekmektedir. Yaklaşık 45.000 bitki türünün (çiçekli bitkilerin %15'i) ana karbonhidrat deposunun inülin olduğu belirtilmektedir (68, 69).

Inülin, sağlık yararlarının yanı sıra sahip olduğu işlevsel özellikleri nedeniyle besin sanayinde kullanım alanları giderek artmaktadır. Uzun zincirli inülin fraksiyonları az çözünür ve nispeten viskoz yapısıyla az yağlı süt ürünlerinde yağ ikame maddeleri olarak kullanılabilir. Ayrıca süt veya suda parçalandığında mikro kristaller oluşturma yeteneği sayesinde yağ benzeri bir his ile kremsi bir doku sağlar. Bu nedenle inülin pişmiş ürünler, dondurmalar, sürülebilir ürünler, dolgular, şekerlemeler ve salata sosları gibi ürünlerde şeker ve yağın yerine yaygın olarak kullanılmaktadır (69). Bunun yanı sıra inülin tüm AB ülkelerinde yasal olarak gıda veya gıda bileşenleri (katkı maddeleri olarak değil) olarak sınıflandırılmakta ve ABD'de genel olarak güvenli kabul edilen anlamında GRAS (Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen) olarak nitelendirilmektedir. Tüm bu ülkelerde, yiyecek ve içeceklerde içerik olarak belirli sınırlamalar olmaksızın kullanılabilir (70).

2.3.2. Biyopolimer: Kitosan

Kitin selülozdan sonra dünyada en çok bulunan yenilenebilir ve toksik olmayan doğal bir biyopolimer olarak geniş bir uygulama alanına sahiptir. Son yıllarda kitinin deasetilasyonundan elde edilen kitosan kendine özgü yapısı, biyo-uyumluluğu, biyo-çözünebilirliği, düşük maliyeti ve diğer fonksiyonel özellikleriyle birçok biyopolimerden daha avantajlı olduğu düşünülmüş besin, ilaç, kozmetik, ziraat, biyoteknoloji gibi farklı alanlarda kullanım olanağı sağlamaktadır (71, 72). Bununla birlikte kitosan FDA tarafından genellikle güvenilir olarak bilinen GRAS kategorisinde yer almakta ve bazı ülkelerde doğal gıda katkı maddesi olarak kabul edilmektedir. Kitosan biyoaktif yapısı ve katyonik karakteri ile gıda sanayisinde kullanım için büyük avantaj sağlamakta ve besin ögesi (fonksiyonel besin üretimi), gıda katkı maddesi, antimikrobiyal ajan (gıda koruyucu), diyet lifi ve gıda takviyesi olarak kullanımı giderek artmaktadır (71).

Kitosan, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, immünolojik olarak nötr, antiinflamatuvar, anti-tümör gibi yara iyileştirici ve antioksidan aktivitesiyle de insan sağlığı üzerinde bir dizi faydalı özelliğe sahip bulunmuştur (72). Kitosan, spesifik kitinaz enzimi olmayan herhangi bir organizmanın gastrointestinal sisteminde hidrolize olmayan diyet lifi sağlayabilmektedir. Ayrıca kitosanın prebiyotik kapasitesi de rapor edilmiştir (73). Son yıllarda özellikle hipertansiyon, dislipidemi ve obeziteye karşı farmakoterapi veya diyet lifi olarak kullanımlarıyla dikkat çekmektedir. İnsan çalışmaları, bir gıda takviyesi olarak kitosan uygulamalarının, plazmadaki toplam kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol miktarlarını azaltmada etkili olduğunu ve karaciğer ve plazma triasilgliserolünü düşürebileceğini göstermiştir. Kitosanın plazma lipidlerini azaltmadaki etkileri, diyet lipidlerini ve safra asitlerini bağlama ve pankreatik lipaz aktivitesini inhibe etme, böylece gastrointestinal sistemdeki bağırsak yağ emilimini azaltma yetenekleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (74-76). Türk Gıda Kodeksi Beslenme ve Sağlık Beyanları Yönetmeliği (2017)'ne göre de günde 3 g kitosan alınması normal kan LDL kolesterol düzeyinin korunmasına katkıda bulunacağı belirtilmektedir (65).

Kitosanın çeşitli çalışmalarda antimikrobiyal özelliği de gösterilmiştir (77, 78). Kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin arkasındaki en önemli faktörler mikroorganizma tipi ve deasetilasyon derecesi olarak belirtilmektedir. Kitosan, D-

glukozamin ve N-asetil-d-glukozamin birimlerinin rastgele bir kopolimeridir. Asetilasyon veya deasetilasyon derecesi olarak ifade edilen bu iki monomerik birim arasındaki oran ve moleküler ağırlık, kitosanın antimikrobiyal aktivitesinde ve sulu ortamdaki çözünürlüğünde önemli rol oynamaktadır. Kitosan, mantar veya bakterilerin geçirgenliğe yol açan hücre yüzeyinde aktif bulunmuştur. Bu etkileşimin çoğunlukla elektrostatik olduğu ve kitosanın protonlanmış amino gruplarının pozitif yükleri ile hücre yüzeyindeki negatif yüklü moleküller arasında gerçekleştiği düşünülmektedir (79).

Özellikle son on yılda kitosan, meyve veya sebze kalitesini korumak ve *Penicillium expan*, *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobroma*, *Alternaria tenuissima* ve *Fusarium oxysporum* gibi çok sayıda patojenik mantarın neden olduğu tarımsal ürünlerin hasat sonrası hastalıklarını azaltmak için yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (80, 81). Fungistatik veya fungisidal bir ajan olarak mikroorganizmalar üzerinde doğrudan etki gösterebildiği ve mantar veya bakterilerin hücre yüzeyine bağlanabildiği ileri sürülmektedir. Ayrıca kitosanın, negatif yüklü fosfolipidlerle elektrostatik etkileşimler yoluyla hücre zarını etkilediği; hücre zarı bozulduktan sonra, hücreye girme yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir (82, 83). Meng ve ark. (2020), kitosanın, *Aspergillus ochraceus*'u karşı antifungal etkisi olduğunu göstermiştir. Etki mekanizması olarak da kitosanın hücre duvarı ve hücre zarı bütünlüğün bozulması ve ribozom biyogenezi inhibisyonunu desteklemesi belirtilmektedir (84). Antifungal aktivite kitosanın en önemli biyoaktivitelerinden biri olarak gösterilmekte ve kitosanın tarla ürünleri, meyve ve sebzeler için zararlı olan fitopatojenik mantarların büyümesini azaltabileceği bildirilmektedir (85).

2.4. Probiyotik Bakterilerin Aflatoksin M1'i Bağlayıcı Özelliği

Bugüne kadar çeşitli laboratuvar sıvılarında, süt ve süt ürünlerinde yapılan çeşitli çalışmalarda probiyotik maya olarak *S. cerevisiae*, *S. boulardi*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*; probiyotik bakteri olarak *Lactobacillus rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. delbrueckii spp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis*'in AFM1'e bağlanarak ürünlerdeki AFM1 seviyesinin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir (12-16, 86-88). AFM1 ile kontamine besinlerde

probiyotik mikroorganizmalar tarafından AFM1'in azaltılmasına yönelik yapılan bazı çalışmaların özellikleri ve sonuçları Tablo 2.2.'de özetlenmiştir (21, 86-88, 93-100).

Probiyotik mikroorganizmalar tarafından aflatoksin düzeyinin azalmasının altında yatan mekanizma halen net olmamakla birlikte metabolik ya da kimyasal bir aktiviteden ziyade toksin ile mikroorganizma arasında gerçekleşen fiziksel bir bağlanma olduğu ve bu bağlanmanın da hücre duvarı bileşenleri (peptidoglikan ve polisakkaritler) aracılığıyla gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Özellikle yapılan çalışmalarda elde edilen azalma düzeylerinin test edilen mikroorganizmaların türüne göre değişmesi, farklı mikroorganizmanın sahip olduğu bağlanma bölgesi sayısının ve dolayısıyla bağlanma kapasitesinin farklı olmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (7, 15). Ayrıca bağlanma mekanizmasını araştırmaya yönelik yapılan bir çalışmada probiyotik bakterinin göstermiş olduğu antitumör aktivitenin, hücre duvarındaki protein yapısında olmayan, karbonhidrat-karbonhidrat kompleksi veya lipid-karbonhidrat kompleksinden kaynaklandığı belirlenmiştir (89).

Farklı konseptli deneyler sonucunda asit ve/veya ısı işlemler, mikroorganizma konsantrasyonu, mikroorganizma canlılığı, mikroorganizma türü, pH, ve inkübasyon sıcaklığı ve süresi gibi faktörlerin de probiyotik mikroorganizmaların bağlanma düzeyini etkilediği belirtilmektedir (15, 47, 90, 91). Yapılan bir çalışmada ise AFM1 bağlama düzeyini etkileyen en önemli etkenin mikroorganizma konsantrasyonu olduğu belirtilmiştir (92).

Bunun yanı sıra probiyotiklerin hidrofobik yapıları sayesinde gastrointestinal sistemde aflatoksine kovalent olmayan bağlarla bağlandığı ve oluşan mikroorganizma-aflatoksin kompleksi sayesinde aflatoksinin intestinal lümeninden emilimi ve biyoyararlanımının azalabileceği üzerinde durulmaktadır (48). Ancak oluşan bu mikroorganizma-aflatoksin kompleksinin emilim ya da metabolizma için uygun halde bulunan serbest aflatoksine göre gastrointestinal sistemdeki biyoerişilebilirliğinin nasıl değiştiği halen araştırma konusudur.

Tablo 2.2. Probiyotik mikroorganizmalar ve prebiyotiklerin AFM1'e bağlanmasına yönelik bazı çalışmaların özetleri.

Tür	Mikroorganizma		Başlangıç AFM1 konsantrasyonu		Deneysel Koşulları		Analiz Yöntemi	AFM1 azalma seviyesi (%)	Çalışma Sonuçları	Yazar
	Konsantrasyon (kob/ml)				Süre	Sıcaklık (°C)				
<i>L. plantarum</i> MON03	10 ⁸		0.05 µg/mL 0.10 µg/mL 0.20 µg/mL		0, 4, ve 24 saat	37	HPLC	15.3–76.9	İnkübasyon süresi ve toksin konsantrasyonu, AFM1 azalması önemli bir etkidir.	Abbès ve ark. (2013) (88)
<i>L. rhamnosus</i> GAF01								25.1–95.1		
<i>B. animalis</i> spp. <i>lactis</i> BB-12					37 °C'de 4 saat			~ 53		
<i>L. casei</i> LC-01					inkübasyon sonrasında ve 4 °C'de 21 gün depolama sonrasında			~ 58		
ABT-5 (<i>L. acidophilus</i> La-2, BB-12, <i>S. thermophilus</i>)	-		50 ng/kg				ELISA	~ 50	Depolama süresi ve canlı hücre sayısı AFM1 azalması önemli bir etkidir.	Barukčić ve ark. (2018) (87)
<i>Enterococcus durans</i>										
<i>Weissella confusa</i>	10 ⁸		0.1 mg/mL		4 saat	37	Dipstick method	10	<i>W. confusa</i> H1 ve <i>L. plantarum</i> S2 süte AFM1 bağlanma yeteneğine sahiptir.	Chaudhary, H. J. ve A. R. Patel (2022) (93)
<i>L. acidophilus</i>	2%							30.9 – 78.3 (30.9-100)		El-kest, M.M., Hariri, M.E., Khafaga, N.I.M. ve Refai, M.K. (2015) (94)
<i>B. lactis</i>	2%		50.2 ppt		27°C'de 5 saat inkübasyon, 4 °C'de 24-45-72 saat depolama		ELISA	54.8 – 91.6 (54.8-100) 62.5 – 96.2 (62.5-100)	72 saat sonra AFM1 tespit edilememiştir.	
İki mikroorganizma birlikte	1% + 1%							40.88 – 91.82 24.86 – 89.33 61.46 – 93.20	M.o. türü, m.o. konsantrasyonundan daha önemlidir.	
<i>L. rhamnosus</i>								61.60 – 95.86	Başlangıçtaki yüksek AFM1 konsantrasyonu daha fazla AFM1 bağlanmasına neden olmuştur.	
<i>L. plantarum</i>								53.55 – 100.0	İnkübasyon süresi ve sıcaklığı, AFM1 bağlanma miktarı üzerinde etkili olmuştur.	
<i>S. boulardii</i>										
<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. plantarum</i>	10 ⁷ ve 10 ⁹		0.5 ve 0.75 ng/mL		30 ve 90 dk	4 ve 37	ELISA			Khadiji ve ark. (2020) (95)
<i>L. rhamnosus</i> + <i>S. boulardii</i>										

Tablo 2.2. (Devam) Probiyotik mikroorganizmalar ve probiyotiklerin AFM1'e bağlanmasına yönelik bazı çalışmaların özetleri.

Mikroorganizma		Başlangıç AFM1 konsantrasyonu	Deney Koşulları		Analiz Yöntemi	AFM1 azalma seviyesi (%)	Çalışma Sonuçları	Yazar
Tür	Konsantrasyon (kob/ml)		Süre	Sıcaklık (°C)				
<i>L. plantarum</i> KM	10 ⁸	0.5 µg/L	0, 2, 4 ve 24 saat	4	HPLC	21-92	İnkübasyon devam ettiği sürece AFM1 bağlanması geri dönüşümlüdür.	Kuharić ve ark. (2018) (96)
<i>L. rhamnosus</i> RC007 <i>Kluyveromyces marxianus</i> VM003						61 36		
<i>Pediococcus acidilactici</i> RC005	10 ⁷	50 ng/mL	60 dk	25	HPLC	34	<i>P. pentosaceus</i> RC006 ve <i>K. marxianus</i> VM003'ün AFM1 bağlanma yeteneği ilk defa gösterilmiştir.	Martínez ve ark. (2019) (86)
<i>P. pentosaceus</i> RC006 <i>S. cerevisiae</i> RC016 <i>S. boulardii</i> RC009						26 19 25		
<i>B. animalis</i> <i>lactis</i> PTCC1736	10 ⁸ ve 10 ⁹	0.25, 0.5, 0.75 mg/mL	30, 60, 120 dk ve 24 saat	4 ve 37	HPLC	43.5 – 54.1 39.6 – 52.4	AFM1 bağlanmasında sıcaklık, bakteri konsantrasyonu ve canlılık diğer faktörlerden daha önemli etkiye sahiptir.	Namvar ve ark. (2018) (97)
<i>L. delbrueckii bulgaricus</i> PTCC 1737								
<i>L. plantarum</i> β-glukan	0.01 ve 0.005 %	0.5 µg/L	0 saat	4	HPLC	80 65 ve 63	AFM1 ile kontamine sütün LAB ve beta-glukan ile işlenmesinin, sütteki makro besinlerin içeriği üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır.	Pavlek ve ark. (2021) (98)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. casei</i> <i>B. lactis</i>	10 ⁷ ve 10 ⁹	0.500 ppb	ph 4.2 olana kadar inkübasyon ve 28 gün depolama	40	HPLC	27.0 – 59.4 15.6 – 16.8 10.6 – 13.8 22.4 – 35.8	Probiyotik bakteriler, fermentasyon ve buzdolabında saklama sırasında Doogh'ta serbest AFM1 bağlayıcı maddeler olarak hareket edebilir. Probiyotik bakterilerin AFM1 bağlanma yeteneği türe özgüdür.	Sarлак ve ark. (2017) (99)
<i>L. acidophilus</i> PTCC 1643			2, 11 ve 30 gün depolama	4, 21 ve 37	ELISA	38.41 – 100.0 62.67 - 100 39.07 - 100	<i>L. acidophilus</i> ve <i>L. plantarum</i> 'ün kullanılması, özellikle uzun saklama süresi ve daha yüksek sıcaklık derecelerinde fermente sütte bulunan AFM1'in bağlanması için faydalı olabilir.	Sokoutifar ve ark. (2018) (100)
<i>L. plantarum</i> PTCC 1058 <i>L. acidophilus</i> + <i>L. plantarum</i>	10 ⁴	180 pg/mL						
<i>L. acidophilus</i> La-5	10 ⁸ (+ 0.75 % inülin, β-glukan, polidekstroz)	1 ve 2 µg/L	0 ve 6 saat,	37	HPLC	17.65–71.52	En yüksek bağlanmanın AFM1'in en yüksek başlangıç konsantrasyonu, inkübasyon süresi 0 saat ve probiyotik ve inülin kombinasyonunda gerçekleşmiştir.	Wochner ve ark. (2019) (21)

2.5. İn Vitro Sindirim Çalışmaları

İnsan sağlığı risk değerlendirmesinde, besinlerin tüketimi, birçok kirletici maddeye maruz kalmanın ana yolu olarak kabul edilmektedir. Tüketilen bir kirleticinin (alınan) toplam miktarı, her zaman vücut için kullanımı mevcut olan miktarı yansıtmamaktadır. Kirleticinin yalnızca belirli bir miktarı biyolojik olarak kullanılabilir. Biyoyararlanım, besinlerle alınan kontaminantın sistemik dolaşıma ulaşan ve toksik etkilerini gösterebilen oranını tanımlamak için kullanılan bir terimdir (17). Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar, besinlerden elde edilen bileşiklerin biyoyararlanımının, besin kaynağına, besinin işlenmesine veya hazırlanmasına bağlı olarak önemli ölçüde farklı olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, A ürünündeki bir kirletici madde toksisiteye neden olabilirken, B ürünündeki aynı miktardaki kirletici madde toksik etki göstermeyebilir. Bu nedenle de biyoyararlanım çalışmaları gün geçtikçe önem kazanmaktadır (17-19).

İnsan sindirim sistemi aşamalarını laboratuvar ortamında taklit eden in vitro sindirim yöntemi, besin veya farmasötiklerin gastrointestinal sistemdeki davranışlarını incelemek için kullanılmaktadır. İnsan beslenme çalışmaları, diyetle ilgili çalışmalara hala altın standardı ararken, in vitro modeller daha hızlı, daha ucuz, daha az emek gerektiren ve etik kısıtlamaları olmayan çalışmalardır. Bunun yanı sıra modeldeki tekrarlanabilirlik, kontrollü koşullar ve kolay örneklem seçimi in vitro sindirim modelinin uygulanabilirliğini daha da avantajlı hale getirmektedir (101).

İnsan sindirim sistemini taklit eden in vitro sindirim modeli çalışmaları kolonik fermentasyonu dahil etsin ya da etmesin, stabilite ve biyoyararlanım gibi olayların değerlendirilmesinde değerli ve yararlı araçlar olarak kabul edilmektedir (102). Ayrıca besin işleme tekniklerinin biyoyararlanım üzerine etkisinin belirlenmesinde de kullanılabilir (103).

Simüle sindirim modelleri oral faz, gastrik faz, intestinal faz ve nadiren de olsa kolonik fermentasyonu içermektedir. Bu modeller sindirim enzimleri varlığı ve konsantrasyonları, pH, sindirim süresi, tuz, iyon konsantrasyonu ve diğer faktörleri hesaba katarak fizyolojik koşulları taklit etmektedir (101).

Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, Bilthoven, The Netherlands) tarafından besin matrisinin

alınan kontaminantların biyoerişilebilirliği üzerindeki etkilerini incelemek ve böylece besindeki kontaminantların insanlarda risk değerlendirmesinin yapılabilmesi için kullanılabilecek bir in vitro sindirim modeli geliştirilmiştir (17, 20). Bu sindirim modeli 37°'de 5 dk ağızdaki sindirimin taklidiyle başlayıp, 2 saat mide ile devam etmekte ve 2 saat ince bağırsak taklidi ile tamamlanmaktadır. Bu in vitro sindirim modeli kullanılarak AFM1'in biyoerişilebilirliği ilk defa 2012 yılında Kabak ve Özbey tarafından çalışılmış ve sütte aflatoksin biyoerişilebilirliği %80,5-83,8 arasında belirlenmiştir (20).

İn vitro sindirim modeli kullanılarak AFM1 biyoerişilebilirliği ile ilgili yapılan çalışmalar Tablo 2.3.'de verilmiştir (3, 19-21). Görüldüğü üzere AFM1 biyoerişilebilirliği üzerine biyolojik ajanların etkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Ayrıca var olan bu çalışmalarda yalnızca ince bağırsaktaki biyoerişilebilirlik değerlendirilmiştir. Ancak ince bağırsaktan emilmeden kolona geçen aflatoksin-biyolojik ajan kompleksinin kolonda birçok mikroorganizma ve enzim aktiviteleri nedeniyle de değişikliğe uğraması muhtemeldir. Dolayısıyla besinde AFM1 bağlanma kapasitesi gösteren biyolojik ajanların gastrointestinal sistem boyunca kararlılıklarının değerlendirilmesi ve AFM1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca farklı biyolojik ajanların değerlendirilmesi ile AFM1 biyoerişilebilirliğinin azaltılmasında yeni ve güvenilir yaklaşımlar ortaya konulması önemli olmaktadır.

Tablo 2.3. İn vitro sindirim modeli kullanılarak AFM1 biyoerişilebilirliği ile ilgili yapılan çalışma özetleri.

Mikroorganizma		Başlangıç AFM1 konsantrasyonu	Analiz Yöntemi	AFM1 biyoerişilebilirliğindeki azalma seviyesi (%)	Çalışma Sonuçları	Yazar
Tür	Konsantrasyon (kob/ml)					
<i>L. acidophilus</i> NCFM 150B	10 ⁸	0.05, 0.5 ve 1 µg/L	HPLC	15.5 – 31.6	Yapay ve doğal olarak kontamine olmuş süt arasında AFM1 biyoerişilebilirliği açısından fark bulunmamıştır. AFM1 biyoerişilebilirliği, probiyotik bakterilerin varlığında azalmıştır. Farklı miktarlarda AFM1 ile kontaminasyon sindirim modeli sonrasında AFM1 biyoerişilebilirliğinin azalmasında etkili olmamıştır.	Kabak and Ozbey (2012) (20)
<i>B. bifidum</i>						
<i>B. species</i> 420						
<i>L. acidophilus</i>						
<i>L. rhamnosus</i>						
<i>L. casei</i> Shirota						
<i>L. plantarum</i> CRD7	10 ⁹	10 ng/mL	ELISA	52.84±3.34 44.09±5.86 32.61±3.13 37.5±3.51 48.26±4.53	AFM1'in biyoerişilebilirliği, seçilen probiyotik suşlar kullanılarak önemli ölçüde azalmıştır ve azalma düzeyi probiyotik türüne bağlı bulunmuştur.	Panwar ve ark. (2019) (19)
<i>L. rhamnosus</i> CRD9						
<i>L. plantarum</i> CM63						
<i>L. plantarum</i> BM71						
<i>L. plantarum</i> HIF81						
<i>L. acidophilus</i> NRRL B-4495	1-2 x 10 ⁹	10 ng/mL	HPLC	22.7±2.60 26.50±1.80 24.54±4.10 32.20±2.81 45.17±2.64	AFM1 biyoerişilebilirliğinin azalması, değerlendirilen probiyotik türüne bağlı bulunmuştur. Her bakterinin farklı sayıda bağlanma bölgesine sahip olabileceği düşünülmektedir.	Serrano-Niño, ve ark. (2013) (3)
<i>L. reuteri</i> NRRL B-14171						
<i>L. rhamnosus</i> NRRL B-442						
<i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178						
<i>B. bifidum</i> NRRL B-41410						
<i>L. acidophilus</i> La-5	10 ⁸ (+ 0.75 % inülin veya β-glukan veya Polydextrose)	1 ve 2 µg/L	HPLC	0	En yüksek bağlanmanın AFM1'in en yüksek konsantrasyonu, inülinasyon süresi 0 saat ve probiyotik ve inülin kombinasyonu olduğu durumda bulunmuştur.	Wochner ve ark. (2019) (21)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ocak – Ağustos 2022 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda toplam 54 örnek üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

Çalışma kapsamında bağlanma yetenekleri araştırılacak olan probiyotik bakteri olarak *Leuconostoc mesenteroides* RSKK 06043, maya olarak *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 08022 yerli suşu liyofilize olarak Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilmiştir. Suşların seçiminde literatürde daha önce çalışılmamış olması dikkate alınmıştır.

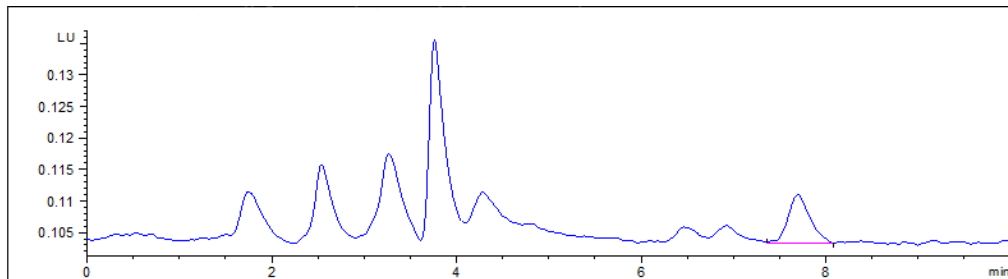
L. mesenteroides RSKK 06043 suşunun çoğaltılmasında MRS agar (Biokar), *S. cerevisiae* RSKK 08022 suşunun çoğaltılmasında YPD agar (CONDA 1546-500) kullanılmıştır.

AFM1 standardı, *Aspergillus flavus* tarafından elde edilen >%98 saflıkta (Sigma-A6428-50UG), vida kapaklı şişede 50 µg olarak temin edilmiştir. Molekül ağırlığı 328,27 g/mol olup, 1,00 – 1,10 mg/ml çözünürlüğe sahiptir.

Test parametrelerinin AFM1'i bağlama yeteneğinin belirlenmesinde AFM1'e karşı spesifik antikorları içeren AFM1 TM immunoaffinity kolonu (R-Biopharm EASI-EXTRACT) kullanılmıştır.

Test parametrelerinin AFM1'i bağlama yeteneğinin HPLC ile belirlenmesinde kullanılan tüm kimyasallar HPLC saflığındadır.

Süt örneklerinin hazırlanması için yağsız süt tozu (<%1 yağ) yerel bir hipermarketten temin edilmiştir. Süt tozuna ait HPLC kromatogramı Şekil 3.1.'de verilmiştir. Süt tozunun AFM1 içeriği ölçüm limitinin altında kalmıştır.



Şekil 3.1. Süt tozuna ait HPLC kromatogramı.

Probiyotik bakterilerin bakteri yoğunluğunun ayarlanması için Fosfat Tamponlu Tuz (PBS; pH 7,4) (PBS- Life Technologies™ Gibco® 10010-031) kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan inülin (BENEO-Orafti®HSI) hindibadan elde edilmiş ve %86' dan fazla inülin içeren endüstriyel bir üründür ve yerel distribütör tarafından temin edilmiştir.

Biyopolimer olarak kullanılan kitosan %100 doğal kitosan ekstraktı olarak (deasetilasyon derecesi %80,6) yerel bir satıcıdan temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Liyofilize Bakteri Kültürünün Aktivasyonu ve Hazırlanması

Liyofilize bakteri kültürünün hazırlanmasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

- *L. mesenteroides* RSKK 06043 ve *S. cerevisiae* RSKK 08022 liyofilize kültürlerini içeren cam tüpler uç kısmından 1-2 cm içerden keskin eğe ile çeltiklenmiştir.
- Tüp alkolle ıslatılmış gazlı bez ile dezenfekte edilmiştir.
- Tüp gazlı bez ile sarılıp çeltiklenmiş bölgeden kırılmıştır.
- Liyofilize bakteri kültürünü içeren cam ampul içerisine 1 mL MRS sıvı besiyeri, liyofilize maya içeren cam ampul içerisine 1 mL Brain Heart İnfüzyon ilave edilir ve bir iki dakika çözünmesi beklenmiştir.
- Çözdürülmüş *L. mesenteroides*, MRS agara ekilir ve mikroaerofilik ortamda 30°C'de 72 saatlik inkübasyonun ardından tekrarlayan pasajlar yapılmıştır.
- Çözdürülmüş *S. cerevisia* ise YPD agara ekilir ve 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından tekrarlayan pasajlar yapılmıştır.

Çalışma gruplarına eklenecek bakteri miktarı 2×10^8 kob/mL olacak şekilde; maya miktarı ise 2×10^6 kob/mL olacak şekilde McFarland densidometresi ile PBS (pH 7,4) çözeltisi içerisinde ayarlanmıştır.

3.2.2. Aflatoksin M1 ile Kontamine Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada 50 µg AFM1 (Sigma) standardı asetonitril ile çözündürülerek 10 µg/ml stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışma gruplarında 10 ng/mL AFM1 olacak şekilde stok çözeltiden uygun miktarda çözelti alınıp steril falkon tüplere konulmuş ve içerisindeki asetonitril N₂ gazı altında uzaklaştırılmıştır.

Çalışmada kullanılacak olan süt önceden 50±5°C'ye ısıtılmış distile su ile %10 oranında yağsız süt tozu 15 dk karıştırılarak elde edilmiştir. Hazırlanan sütler 37°C'ye soğutulup N₂ gazı ile asetonitril uzaklaştırılmış AFM1 çözeltisi içeren tüp ile birleştirilerek AFM1 kontamine süt örnekleri hazırlanmıştır. AFM1 ile kontamine süt örnekleri test edilecek bakteri (2x10⁸ kob/mL), maya (2x10⁶ kob/mL), inülin (%5) ve kitosan (%1) ile birleştirilerek Tablo 3.1'de belirtilen çalışma gruplarının her birinden 6 adet hazırlanarak toplamda 54 örnek oluşturulmuştur. Eklenen probiyotik mikroorganizma miktarının belirlenmesinde Türk Gıda Kodeksi Beslenme ve Sağlık Beyanı Yönetmeliği'nde belirtilen bir ürünün probiyotik ürün olarak adlandırılabilmesi için içermesi gereken minimum canlı probiyotik mikroorganizma miktarı (1x10⁶ kob/mL) göz önüne alınmıştır (65). McFarland densidometresi ile yapılan yoğunluk ölçümünde, PBS içerisinde 10⁶ kob/mL maya bulunduğunda ölçülen yoğunluk, bakteri yapısının maya yapısına göre küçük olması sebebiyle 10⁸ kob/mL bakteri bulunduğunda ölçülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada oluşturulan örneklerde mikroorganizma yoğunluğunun aynı olabilmesi için eklenen miktarlar oluşabilecek kayıplar da göz önüne alınarak maya için 2x10⁶ kob/mL ve bakteri için 2x10⁸ kob/mL olarak belirlenmiştir. Eklenen inülin miktarı ise daha önce yapılan çalışmalarda inülinin prebiyotik etkisini göstermek için günlük alınması önerilen miktarın bir porsiyon besinin tüketimiyle karşılanması için o besine eklenen miktar göz önüne alınarak belirlenmiştir (104-107). Kitosan miktarı da benzer şekilde özellikle besinlerde antimikrobiyal ve antioksidan etkisinin gösterildiği miktar baz alınarak belirlenmiştir (73, 84).

Negatif kontrol hariç tüm örnekler 10 ng/mL AFM1 kontamine süt ile dublike olarak hazırlanmış ve hazırlanan örnekler 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Çalışma gruplarının, sütte AFM1 bağlanma düzeylerinin tespiti için, elde edilen örnekler inkübasyon sonrasında 15 dk 3000xg santrifüj edilip süpernatant ayrılmış ve içerisindeki serbest AFM1 miktarı HPLC analizi ile belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Süt örnekleri çalışma grupları.

Örnek ismi	Örnek içeriği
Pozitif kontrol	Sadece AFM1 kontamine süt
Negatif kontrol	AFM1 olmayan, ancak mikroorganizma olan süt
Test grubu 1	AFM1 kontamine süt + 10 ⁸ kob/mL <i>L. mesenteroides</i>
Test grubu 2	AFM1 kontamine süt + 10 ⁶ kob/mL <i>S. cerevisiae</i>
Test grubu 3	AFM1 kontamine süt + 10 ⁸ kob/mL <i>L. mesenteroides</i> + 10 ⁶ kob/mL <i>S. cerevisiae</i>
Test grubu 4	AFM1 kontamine süt + 10 ⁸ kob/mL <i>L. mesenteroides</i> + 10 ⁶ kob/mL <i>S. cerevisiae</i> + İnülin (%5)
Test grubu 5	AFM1 kontamine süt + 10 ⁸ kob/mL <i>L. mesenteroides</i> + 10 ⁶ kob/mL <i>S. cerevisiae</i> + Kitosan (%1)
Test grubu 6	AFM1 kontamine süt + Kitosan (%1)
Test grubu 7	AFM1 kontamine süt + İnülin (%5)

Elde edilen sonuçlar neticesinde test parametrelerinin AFM1 bağlanma yüzdesi aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Bağlanma yüzdesi} = 100 * \left(1 - \frac{\text{Örnekteki AFM1 pikinin alanı}}{\text{AFM1 kontrol pikinin alanı}}\right)$$

Çalışma gruplarının, sütte AFM1'in biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisini incelemek için ise inkübe edilen örneklerle laboratuvar ortamında gastrointestinal sindirimin taklidi için geliştirilen in vitro sindirim modeli uygulanmıştır.

3.2.3. İn Vitro Sindirim Modelinin Uygulanması

İnkübasyon sonrasında örneklerle Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, Bilthoven, The Netherlands) tarafından laboratuvar ortamında gastrointestinal sindirimin taklidi için geliştirilen in vitro sindirim modeli uygulanmıştır (24, 35). Bu sindirim modeli 37°C'de 5 dk ağızdaki sindirimin taklidiyle başlayıp, 2 saat mide ile devam etmekte ve 2 saat ince bağırsak taklidi ile tamamlanmaktadır. Bu çalışmada ayrıca florada bulunan bakteriyel enzimler (proteaz ve viskozim L) kullanılarak kolon taklidi sağlanmıştır. Proteaz enzim solüsyonu (Protease type XIV bacterial from *Streptomyces grise*; Sigma P5147) eklendikten sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilir,

ardından arka bağırsak mikrobiyal fermentasyonunu simüle etmek için mikrobiyal enzimin bir ikamesi olarak Viscozyme L (Sigma V2010) eklenerek 37°C’de 16 saat inkübe edilmiştir (36).

Uygulanan sindirim modelinin bileşenleri Tablo 3.2.’de belirtilmiştir.



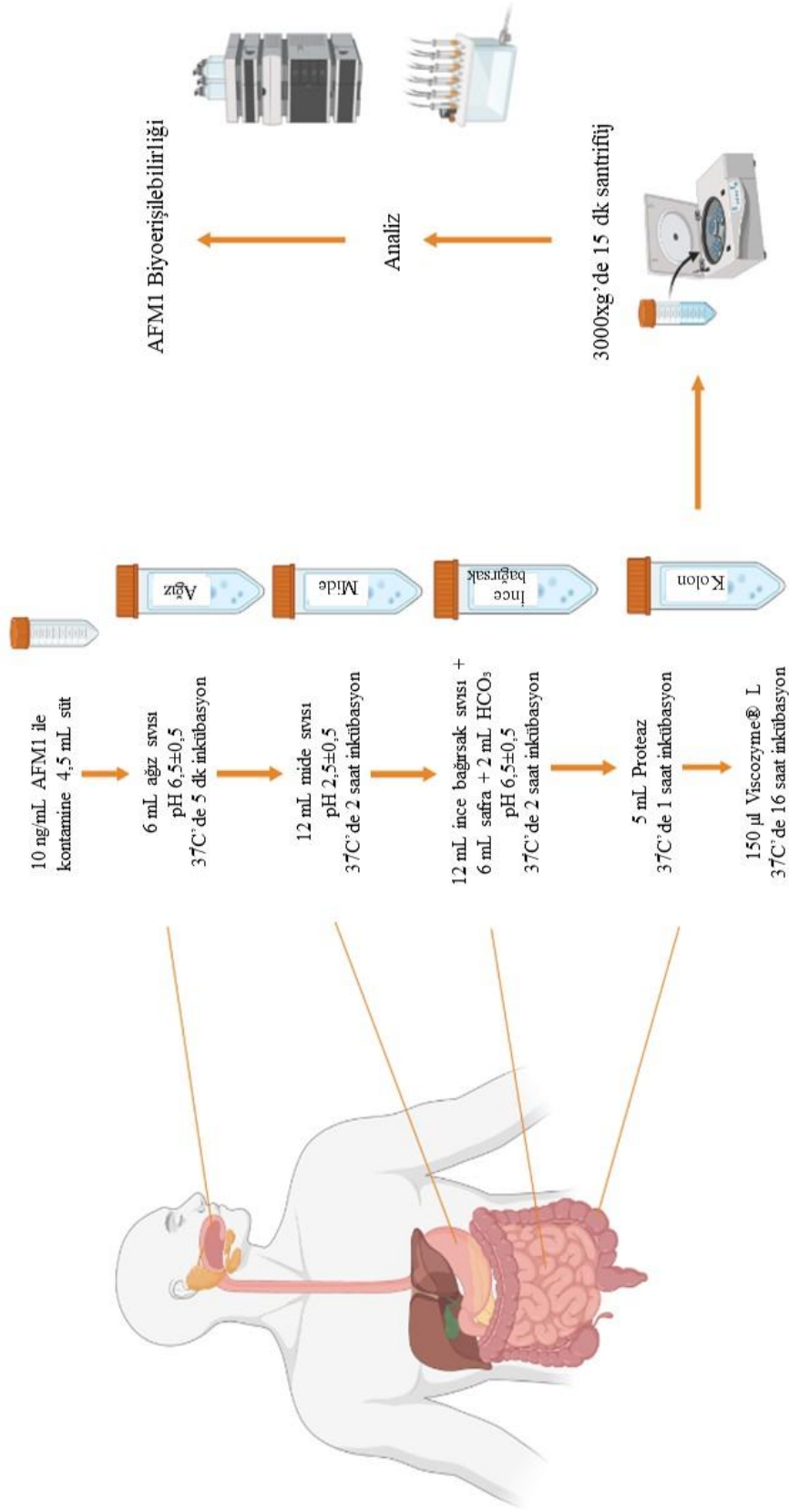
Tablo 3.2. Uygulanan sindirim modelinin bileşenleri.

Parametreler İçerik (litre)	Tükürük	Mide özsuyu	Duodenal sıvı	Safra
İnorganik solüsyon	0,9 g KCl 0,2 g KSCN 0,9 g NaH ₂ PO ₄ 0,57 g NaSO ₄ 0,3 g NaCl 1,7 g NaHCO ₃ 0,2 g üre	2,75 g NaCl 0,27 g NaH ₂ PO ₄ 0,82 g KCl 0,4 g CaCl ₂ · 2H ₂ O 0,31 g NH ₄ Cl 6,5 mL HCl 0,65 g glukoz 0,02 g glukuronik asit 0,085 g üre 0,33 g glukozamin hidroklorid 1 g BSA 2,5 g pepsin 3 g musin	7,01 g NaCl 3,39 g NaHCO ₃ 0,08 g KH ₂ PO ₄ 0,56 g KCl 0,05 g MgCl ₂ 0,18 mL HCl 0,1 g üre	5,26 g NaCl 5,79 g NaHCO ₃ 0,38 g KCl 0,15 mL HCl (37%)
Organik solüsyon				0,25 g üre
Organik ve inorganik solüsyon karışımına eklenecekler	290 mg a-amilaz 15 mg ürik asit 25 mg musin		0,2 g CaCl ₂ · 2H ₂ O 1 g BSA 9 g pankreatin 1,5 g lipaz	0,22 g CaCl ₂ · 2H ₂ O 1,8 g BSA 30 g safra

Uygulanan in vitro sindirim modelinin uygulama aşamaları aşağıda detaylı olarak verilmiştir. Şematik gösterimi de Şekil 3.2.'de verilmiştir.

ÖRNEK		4,5 mL
AĞIZ		6 mL tükürük 5 dk, 37°C'de 6.5 ± 0.5
MİDE		12 mL mide suyu 2 saat, 37°C'de, pH 2.5±0.5
İNCE BAĞIRSAK		12 mL duodenal su + 6 mL safra + 2 mL NaHCO ₃ (1 M) 2 saat, 37°C'de, pH 6.5±0.5
KOLON		5 mL Proteaz 1 saat, 37°C'de, pH 8.0
		150 µL Viscozyme L 16 saat, 37°C de
Elde edilen karışım		15 dk 3000xg Santrifüj

İn vitro sindirim modeli uygulaması



Şekil 3.2. İn vitro sindirim modelinin şematik gösterimi.

Sindirim modelinin ince bağırsak ve kolon aşamaları sonrasında AFM1 tayini ayrı ayrı yapılarak sindirim aşamalarının AFM1 bağlanması üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sindirim modeli tamamlanan örnekler 15 dk 3000xg santrifüj edilerek süpernatant ve sindirilen pellet kısmı ayrılmış, süpernatant içerisindeki serbest AFM1 miktarı HPLC analizi ile belirlenmiştir.

Örneklerin HPLC analizi yapılan aşamaları Tablo 3.3.'de belirtilmiştir. Buna göre her bir test grubundan 6'şar örnek olmak üzere toplamda 54 örnek hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. Çalışma gruplarının HPLC analizi yapılan aşamaları.

	İnkübasyon sonrası	İnce sonrası	bağırsak Kolon sonrası
Pozitif kontrol	P.1 örnek	P.1.İ	P.1.K
	P.2 örnek	P.2.İ	P.2.K
Negatif kontrol	N.1 örnek	N.1.İ	N.1.K
	N.2 örnek	N.2.İ	N.2.K
Test grubu 1	1.1 örnek	1.1.İ	1.1.K
	1.2 örnek	1.2.İ	1.2.K
Test grubu 2	2.1 örnek	2.1.İ	2.1.K
	2.2 örnek	2.2.İ	2.2.K
Test grubu 3	3.1 örnek	3.1.İ	3.1.K
	3.2 örnek	3.2.İ	3.2.K
Test grubu 4	4.1 örnek	4.1.İ	4.1.K
	4.2 örnek	4.2.İ	4.2.K
Test grubu 5	5.1 örnek	5.1.İ	5.1.K
	5.2 örnek	5.2.İ	5.2.K
Test grubu 6	6.1 örnek	6.1.İ	6.1.K
	6.2 örnek	6.2.İ	6.2.K
Test grubu 7	7.1 örnek	7.1 İ	7.1 K
	7.2 örnek	7.2 İ	7.2 K

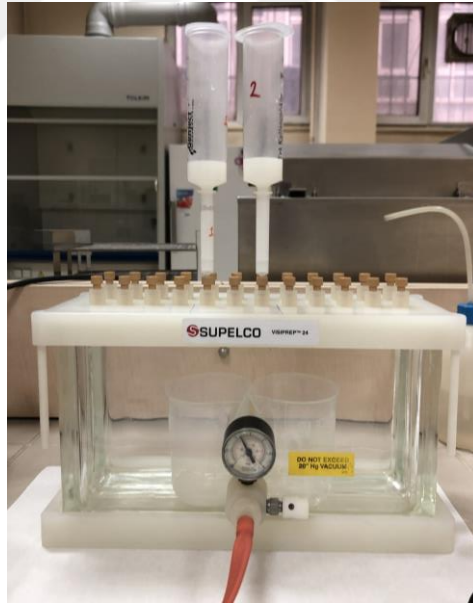
Elde edilen sonuçlar neticesinde AFM1 biyoerişilebilirliği aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır.

$$Biyoerişilebilirlik = 100 * \left(\frac{\text{in vitro sindirilmiş örnekteki miktar}}{\text{sindirim öncesi miktar}} \right)$$

3.2.4. Aflatoksin M1 Ekstraksiyonu ve HPLC Analizi

Deney aşamaları tamamlanan tüm numuneler HPLC analizi öncesi AFM1'e özgü immünoafinite kolonu (R-Biopharm; Darmstadt, Almanya) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri aşağıda belirtilmiştir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen örnekler alüminyum folyoya sarılarak -20°C'de ışık görmeyecek şekilde HPLC analizine kadar saklanmıştır.

İnkübasyon süreci ve sindirim modeli aşamaları tamamlanan örnekler 5 dk 2750xg santrifüj edilerek süpernatant ve sindirilen pellet kısmı ayrılarak vakum manifolda yerleştirilmiş aflatoksin M1'e özgü immünoafinite kolonu ile elue edilmiştir (Şekil 3.3.). Elde edilen eluat bir vialde toplanarak HPLC cihazı ile analiz edilinceye kadar -18°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.3. AFM1'in vakum manifolda yerleştirilmiş aflatoksin M1'e özgü immünoafinite kolonu ile ekstraksiyonu.

Süt örneklerinin AFM1 analizlerinde AOAC (2005) metodundan yararlanılmıştır. Elde edilen örneklerdeki AFM1'in kantitatif analizi izokratik koşullarda floresans detektörlü HPLC cihazı ile yapılmıştır. Cihaza bağlı olarak vakum

degaser, izokratik pompa ve otomatik enjeksiyon sistemi yer almaktadır. Analiz için C18 (250x4.6 mm, 5 m) kolon ve Su+Asetonitril+Metanol (68:24:8 v/v/v)'den oluşan mobil faz kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, pompa akış hızı 1 mL/dakika, eksitasyon dalga boyu 360 nm ve emisyon dalga boyu 430 nm olarak ayarlanmıştır. Tüm ayarlamalar sonunda her bir örnekten bir defa olmak üzere HPLC cihazına 100 µL enjeksiyon yapılarak sonuçlar elde edilmiştir.

Yöntem Validasyonu

Yöntem validasyonu amacıyla geri kazanım çalışması yapılmıştır. AFM1 geri kazanım miktarlarını belirlemek için standart ilave metodu kullanılmıştır. Bunun için ekstraksiyon öncesinde örneğe belirli konsantrasyonlarda (0,5; 1; 5 ve 10 ng/mL) AFM1 stok solüsyon eklenmiştir. AFM1'in geri kazanım oranı ortalama %80,03 olarak bulunmuştur.

Çalışmada analiz edilen AFM1'in standart solüsyonlarının (0,5; 1; 5 ve 10 ng/mL) kalibrasyon eğrisi ile hesaplanan saptama sınırı (Limit of detection, LOD) ve ölçüm limiti (Limit of quantification, LOQ) değerleri Tablo 3.4.'te verilmiştir.

Tablo 3.4. AFM1'in geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.

	Kons. (ng/ml)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	R²
AFM1	0.5	74,8	1,66	0,0197	0,0599	0,9986
	1	80,0	3,53			
	5	80,3	12,50			
	10	85,0	11,72			

Kons.: Konsantrasyon; RSD %: Bağlı Standart Sapma (Relative Standard Deviation); LOD: Saptama Sınırı (Limit of Detection); LOQ: Ölçüm Limiti (Limit of Quantification).

3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Test parametrelerinin AFM1'i bağlama yeteneklerinin belirlenmesinde elde edilen veriler SPSS 23 istatistik paket programı ile analiz edilmiştir. Tüm analizler dublike olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma gruplarının inkübasyon sonrası bağlanma düzeyleri, ince bağırsak ve kolon sonrası biyoerişilebilirlik düzeyleri arasındaki farklılık ve her çalışma grubunun kendi içinde inkübasyon sonrası, ince bağırsak ve kolon sonrası bağlanma düzeyleri arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi

(ANOVA) ile belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farkın önemi ise Post-Hoc Tukey testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak en düşük anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alınmıştır (108).

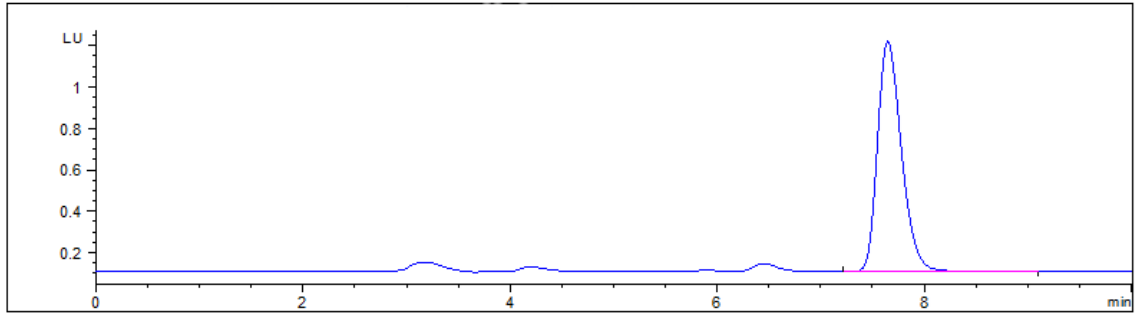


4. BULGULAR

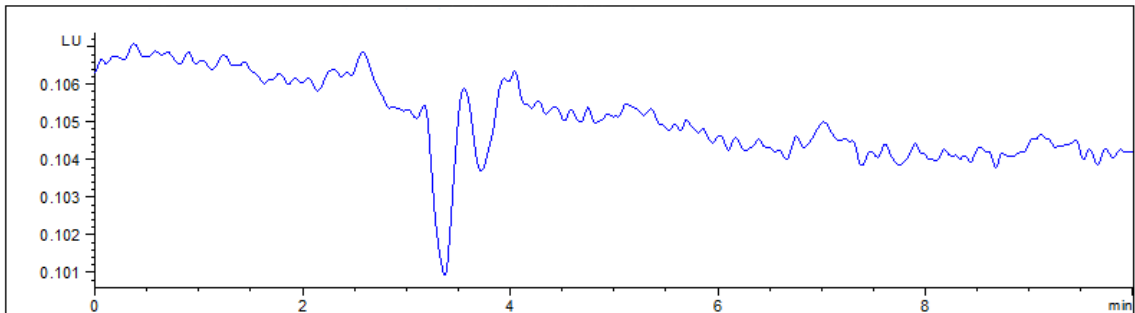
Bu çalışmada pozitif ve negatif kontrol gruplarında dışında 7 farklı çalışma grubunda inkübasyon sonrası AFM1 bağlanma düzeyi %26,7-50,9 arasında; in vitro sindirim modeli uygulamasında AFM1'in sütte biyoerişilebilirliği ince bağırsak sonrasında AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi %29,30-88,72 arasında bulunurken kolon sonrasında %51,55-96,05 arasında bulunmuştur.

4.1. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin İnkübasyon sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri

İnkübasyon sonrası yapılan analizlerde pozitif kontrol örneklerinde tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.1.'de, negatif kontrol örneklerinde tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Negatif kontrol örneklerinde AFM1 seviyesi tespit limitinin altında kalmıştır.



Şekil 4.1. Pozitif kontrol örneklerinde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.

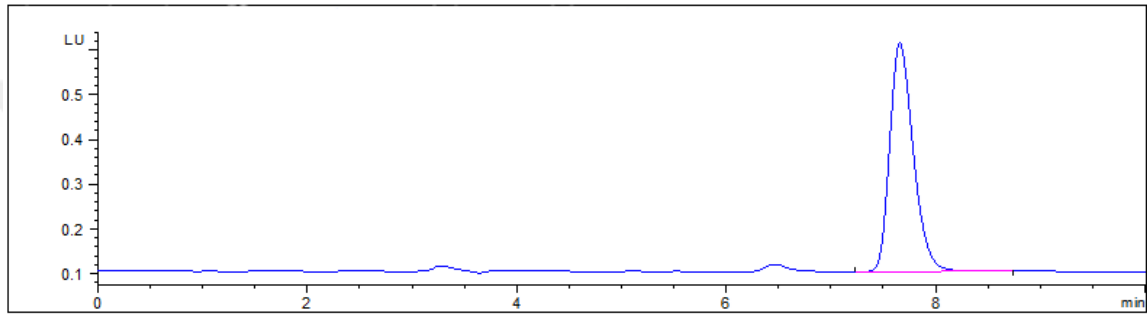


Şekil 4.2. Negatif kontrol örneklerinde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.

4.1.1. Probiyotik Bakteri ve Mayanın İnkübasyon sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri

4 saatlik inkübasyon sonrasında *L. mesenteroides*'in AFM1 bağlanma düzeyi ortalama $34,4 \pm 6,7$; *S. cerevisiae*'nin AFM1 bağlanma düzeyi $50,9 \pm 5,1$ bulunmuştur. *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde inkübasyon sonunda AFM1 bağlanma düzeyi $36,2 \pm 7,2$ olarak tespit edilmiştir.

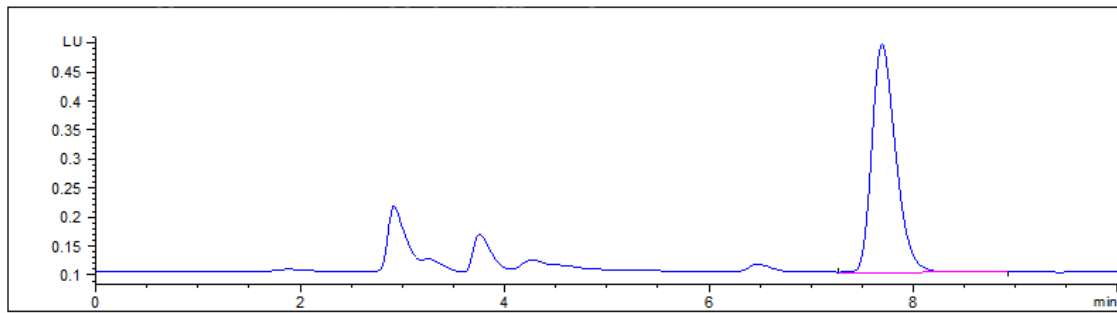
S. cerevisiae'nin bulunduğu örneklerde tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *S. cerevisiae*'nin bulunduğu örneklerde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.

4.1.2. Prebiyotik ve Biyopolimerlerin İnkübasyon sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri

İnkübasyon sonrası kitosanın AFM1 bağlama düzeyi $26,7 \pm 0,0$ iken inülinin AFM1 bağlama düzeyi $38,0 \pm 8,8$ bulunmuştur. Kitosanın bulunduğu örneklerde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kitosanın bulunduğu örneklerde inkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.

4.1.3. Probiyotik Mikroorganizmalar, Prebiyotik ve Biyopolimer Kombinasyonlarının İnkübasyon Sonrası Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri

İnülin, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde inkübasyon sonrası AFM1 bağlanma düzeyi $44,3 \pm 4,1$ bulunurken kitosan, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde inkübasyon sonrası AFM1 bağlanma düzeyi $39,5 \pm 0,5$ bulunmuştur.

Buna göre 7 çalışma grubunda tespit edilen AFM1 bağlanma kapasitesi ortalama $26,7 \pm 0,0$ ile $50,9 \pm 5,1$ arasında bulunmuştur. En yüksek AFM1 bağlama kapasitesi *S. cerevisiae*'nin bulunduğu örneklerde görülürken en düşük AFM1 bağlama kapasitesi kitosan bulunan örneklerde saptanmıştır. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir ($p > 0,05$).

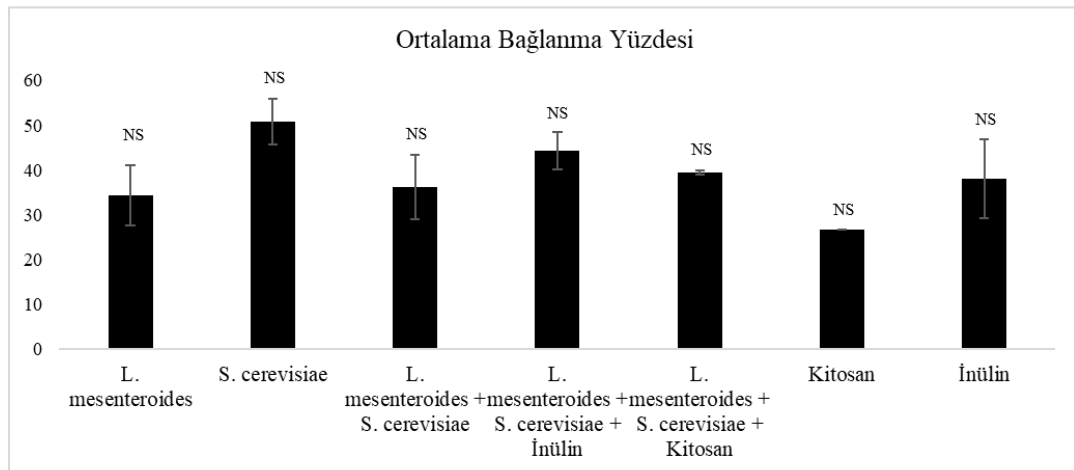
Test parametrelerinin sütte AFM1'e bağlanma düzeyleri Tablo 4.1' de ayrıntılı olarak verilmiş ve Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Probiyotik bakteri ve maya ile prebiyotik ve biyopolimerlerin inkübasyon sonrası sütte AFM1'e bağlanma düzeyleri.

Çalışma grupları	Test parametresi	Bağlanma Yüzdesi
Test grubu 1	<i>L. mesenteroides</i>	$34,4 \pm 6,7$
Test grubu 2	<i>S. cerevisiae</i>	$50,9 \pm 5,1$
Test grubu 3	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i>	$36,2 \pm 7,2$
Test grubu 4	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i> + İnülin	$44,3 \pm 4,1$
Test grubu 5	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i> + Kitosan	$39,5 \pm 0,5$
Test grubu 6	Kitosan	$26,7 \pm 0,0$
Test grubu 7	İnülin	$38,0 \pm 8,8$
p		0,055

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

p, AFM1 bağlanma düzeyleri tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.5. Probiyotik bakteri ve maya ile prebiyotik ve biyopolimerlerin inkübasyon sonrası sütte AFM1'e bağlanma yüzdeleri.

NS: Not Significant (istatistiksel olarak anlamlı değil, $p>0,05$).

4.2. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Sütte AFM1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

AFM1'in sütte biyoerişilebilirliği ince bağırsak sonrasında $90,35 \pm 1,15$ olarak tespit edilmiştir. Kolon sonrasında ise AFM1'in sütte biyoerişilebilirliği $81,40 \pm 0,00$ olarak bulunmuştur.

4.2.1. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin İnce Bağırsak Sonrası Sütte AFM1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

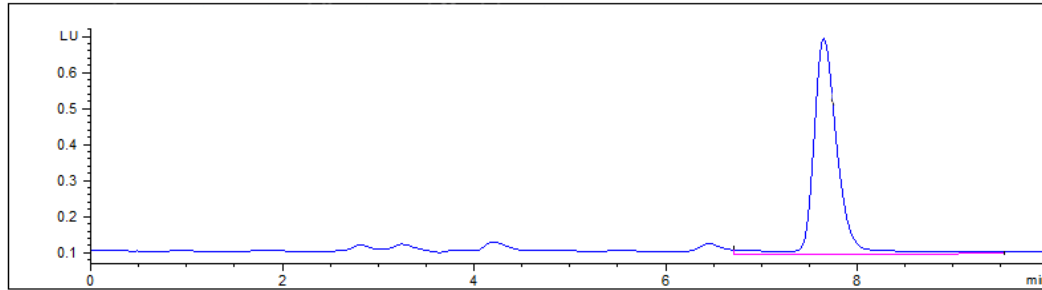
S. cerevisiae ve *L. mesenteroides* 'in Etkisi

İn vitro sindirim modeli uygulanan örneklerde ince bağırsak sonrası en düşük AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi *S. cerevisiae* bulunan 2. test grubunda tespit edilmiş ($29,30 \pm 2,29$) ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$). *L. mesenteroides* bulunan 1. test grubunda ise AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $70,00 \pm 6,90$ olarak tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* ve *L. mesenteroides*'in birlikte bulunduğu 3. test grubunda da AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $68,37 \pm 9,21$ bulunmuştur. Bu test gruplarında tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri de pozitif kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

İnülin ve Kitosanın Etkisi

Kitosan bulunan 6. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $70,82 \pm 5,75$ bulunurken inülin bulunan 7. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $88,72 \pm 8,05$ bulunmuştur. İki test grubunda da tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi pozitif kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

İnülinin bulunduğu örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasında ince bağırsak sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. İnülin bulunan örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasında ince bağırsak sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.

S. cerevisiae, *L. mesenteroides*, İnülin ve Kitosan Kombinasyonlarının Etkisi

İnülin, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu 4. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $71,63 \pm 4,60$ olarak bulunmuştur. *L. mesenteroides* + *S. cerevisiae* + Kitosan bulunan 5. test grubunda da AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $54,68 \pm 6,79$ oranı ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,001$).

Tablo 4.2.'de in vitro sindirim modeli uygulamasında ince bağırsak sonrası sütte tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri ayrıntılı olarak verilmiş ve Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.

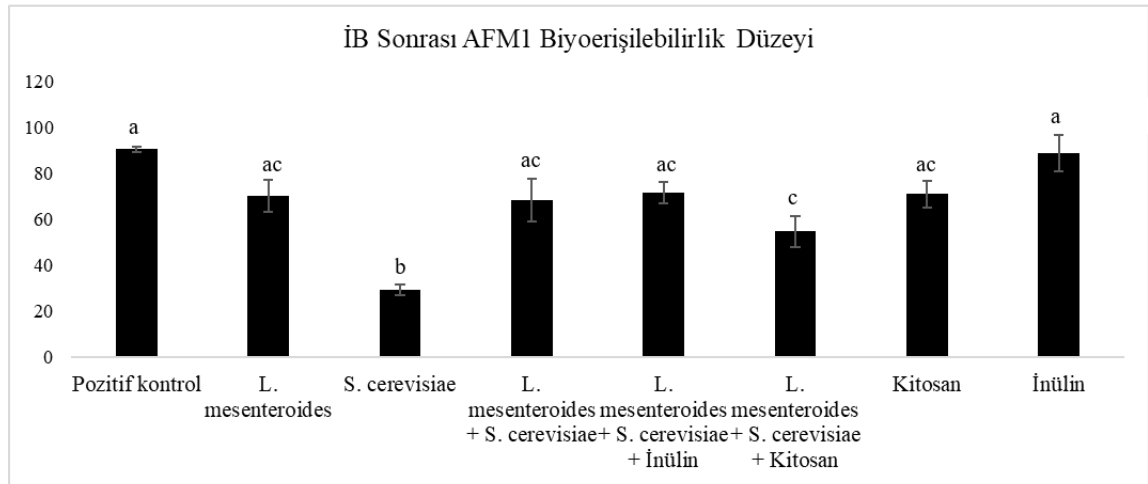
Tablo 4.2. İn vitro sindirim modeli uygulamasında ince bağırsak sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.

Çalışma grupları	İB sonrası
Pozitif kontrol	Test parametresi içermeyen kontrol grubu
Test grubu 1	<i>L. mesenteroides</i>
Test grubu 2	<i>S. cerevisiae</i>
Test grubu 3	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i>
Test grubu 4	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i> + İnülin
Test grubu 5	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i> + Kitosan
Test grubu 6	Kitosan
Test grubu 7	İnülin
p	<0,001

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

p, AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir.

Aynı sütun içinde farklı harfler Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$), aynı harfler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p>0,05$).



Şekil 4.7. Çalışma gruplarında ince bağırsak sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.

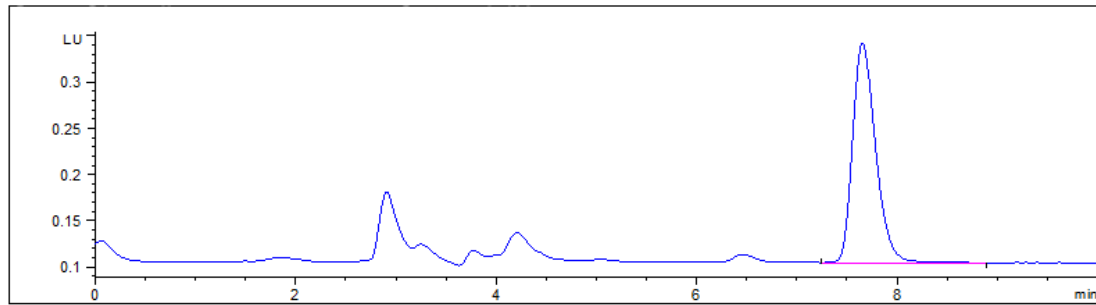
Farklı harfler Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak birbirinden farklılığı ($p<0,05$), aynı harfler istatistiksel olarak birbirinden farklı olmayı ifade etmektedir.

4.2.2. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Kolon Sonrası Sütte AFM1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

S. cerevisiae ve *L. mesenteroides*'in Etkisi

Kolon fazı eklenerek uygulanan in vitro sindirim modeli sonrasında *L. mesenteroides* bulunan 1. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirliği $51,55 \pm 3,38$; bakteri ve mayanın birlikte bulunduğu 3. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirliği $53,72 \pm 2,29$ düzeyi ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0,001$). Diğer taraftan *S. cerevisiae* bulunan 2. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirliği kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($91,16 \pm 4,60$). Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

L. mesenteroides'in bulunduğu örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasında kolon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *L. mesenteroides*'in bulunduğu örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasında kolon sonrası tespit edilen AFM1 düzeyine ait HPLC kromatogramı.

İnülin ve Kitosanın Etkisi

Kitosanın bulunduğu 6. test grubunda ($60,23 \pm 2,29$) AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p < 0,001$), inülin bulunan 7. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirliği kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($96,05 \pm 2,23$). Ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

***S. cerevisiae*, *L. mesenteroides*, İnülin ve Kitosan Kombinasyonlarının Etkisi**

İnülin, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu 4. test grubunda ve kitosan, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu 5. test grubunda AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (sırasıyla %59,42±10,35 ve %52,09±4,60; $p<0,001$).

Tablo 4.3.'te in vitro sindirim modeli uygulamasında kolon sonrası sütte tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri ayrıntılı olarak verilmiş ve Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.

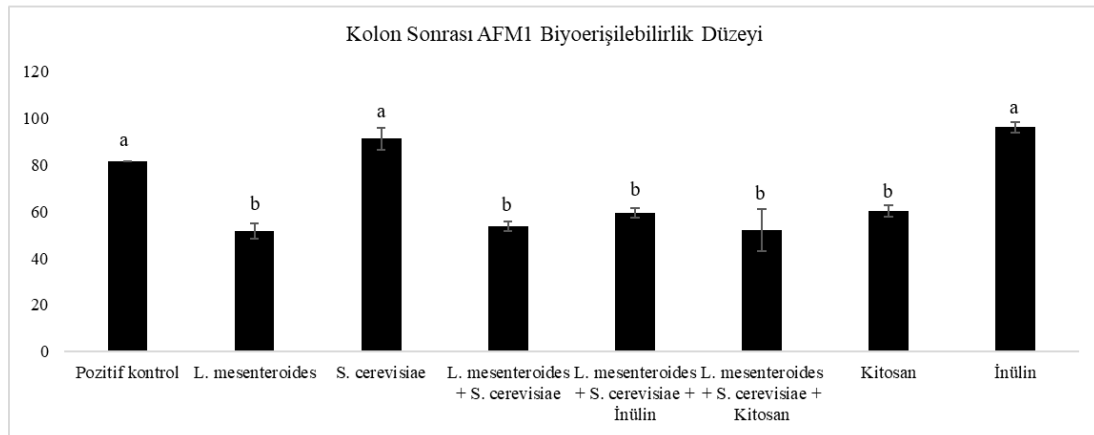
Tablo 4.3. İn vitro sindirim modeli uygulamasında kolon sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.

Çalışma grupları		Kolon Sonrası
Pozitif kontrol	Test parametresi içermeyen kontrol grubu	81,40±0,00 ^a
Test grubu 1	<i>L. mesenteroides</i>	51,55±3,38 ^b
Test grubu 2	<i>S. cerevisiae</i>	91,16±4,60 ^a
Test grubu 3	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i>	53,72±2,29 ^b
Test grubu 4	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i> + İnülin	59,42±10,35 ^b
Test grubu 5	<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i> + Kitosan	52,09±4,60 ^b
Test grubu 6	Kitosan	60,23±2,29 ^b
Test grubu 7	İnülin	96,05±2,23 ^a
p		<0,001

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

p, AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir.

Aynı sütun içinde farklı harfler Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$), aynı harfler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p>0,05$).



Şekil 4.9. Çalışma gruplarında kolon sonrası tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyleri.

Farklı harfler Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak birbirinden farklılığı ($p < 0,05$), aynı harfler istatistiksel olarak birbirinden farklı olmayı ifade etmektedir.

4.3. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin

İnkübasyon ve İn Vitro Sindirim Sonrasında Sütte AFM1 Bağlanma Düzeylerinin Karşılaştırılması

Çalışma gruplarının kendi içlerinde inkübasyon sonrası ve in vitro sindirim modeli sonrasında tespit edilen AFM1 bağlanma yüzdeleri Şekil 4.10.'da belirtilmiştir.

L. mesenteroides'in bağlanma kapasitesi inkübasyon sonrasına göre ince bağırsak sonrası azalırken kolon sonra artış göstermiştir. Ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$).

S. cerevisiae'nın bağlanma kapasitesi inkübasyon sonrasına göre ince bağırsak sonrası istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artarken ($p > 0,05$) kolon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış göstermiştir ($p < 0,05$).

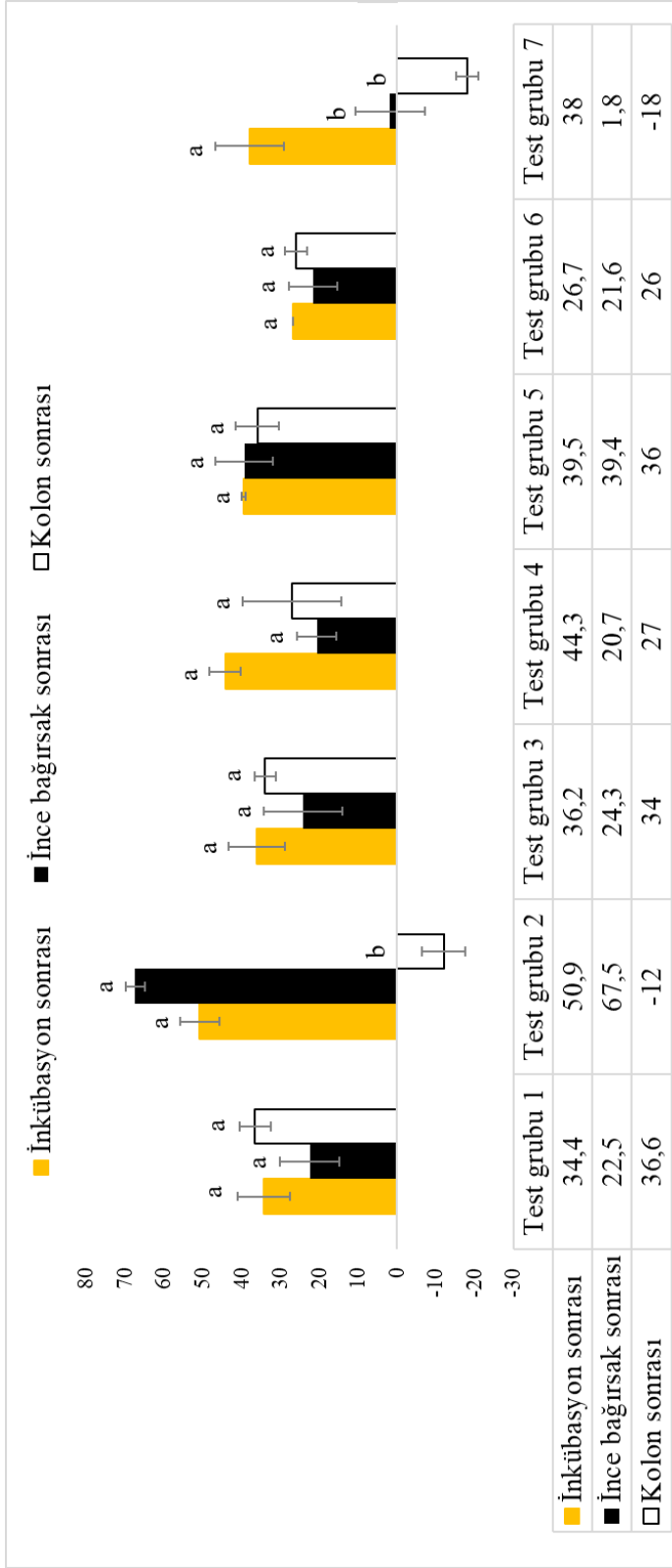
S. cerevisiae ve *L. mesenteroides*'in birlikte sağladıkları bağlanma düzeyi inkübasyon sonrasına göre ince bağırsak sonrası azalırken kolon sonra artış göstermiştir. Ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Benzer şekilde *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides* kombinasyonuna inülin ya da kitosan eklendiğinde elde edilen bağlanma düzeyi de inkübasyon sonrasına göre ince bağırsak sonrası azalırken kolon sonra artış göstermiş, ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Kitosanın bağlanma kapasitesi de benzer şekilde inkübasyon sonrasına göre ince bağırsak sonrası azalırken kolon sonra artış göstermiş, ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

İnülinin bağlanma kapasitesi ise inkübasyon sonrasına göre ince bağırsak ve kolon sonrası istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış göstermiştir ($p<0,05$).





Şekil 4.10. Çalışma gruplarının sütte ve in vitro sindirim modeli sonrasında tespit edilen AFM1 bağlanma yüzdeleri.

Test grubu 1, *L. mesenteroides*
 Test grubu 2, *S. cerevisiae*
 Test grubu 3, *L. mesenteroides* + *S. cerevisiae*
 Test grubu 4, *L. mesenteroides* + *S. cerevisiae* + İnülin
 Test grubu 5, *L. mesenteroides* + *S. cerevisiae* + Kitosan
 Test grubu 6, Kitosan
 Test grubu 7, İnülin

Veriler ortalamaya±standart sapma olarak verilmiştir.

AFM1 bağlanma düzeyleri tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiş ve gruplar arasındaki farkın önemi Post-Hoc Tukey testi ile belirlenmiştir.

ab, Her bir test grubu içindeki farklı küçük harfler, test gruplarının kendi içindeki inkübasyon, ince bağırsak ve kolon sonrası değerleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

Probiyotik mikroorganizmalar, besin karsinojenlerine karşı gösterdikleri bağlanma yetenekleriyle birlikte bilim dünyasında önemli bir yer almaktadır. Bugüne kadar birçok probiyotik türü mikotoksinler de dahil olmak üzere farklı besin karsinojenleriyle çalışılmış ve *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnasus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. johnson*, *B. bifidum* gibi probiyotik türlerinin AFM1'e bağlanma yeteneği sergileyerek besin ya da laboratuvar sıvılarında AFM1 seviyelerinin azalmasını sağladığı gösterilmiştir (12-17). Son yıllarda besinlerin yapısal ve besleyici kalitesini artırmaya yönelik besin hidrokolloidleri üzerine ilgi yoğunlaşmış ve bu hidrokolloidlerin antimutajenik etkiler gösterebileceği üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmada probiyotik bakteri ve maya ile prebiyotik ve biyopolimerlerin sütte AFM1'e bağlanma düzeyleri ve sütte AFM1 biyoerişilebilirliğini azaltıcı etkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında probiyotik bakteri olarak boza, kefir, kıymız yapımında kullanılan starter bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides*, maya olarak *Saccharomyces cerevisiae*, prebiyotik olarak inülin ve piyopolimer olarak kitosan kullanılmıştır.

Çalışmada inkübasyon süresi (4 saat) ve sıcaklığı (37°C), AFM1 konsantrasyonu (10 ng/ml), probiyotik mikroorganizma konsantrasyonu (bakteriler için 2×10^8 kob/mL; mayalar için 2×10^6 kob/mL), kitosan (%1) ve inülin (%5) konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Eklenen inülin miktarı, daha önce yapılan çalışmalarda inülinin prebiyotik etkisini göstermek için günlük alınması önerilen miktarın bir porsiyon besinin tüketimiyle karşılanması için o besine eklenen miktar göz önüne alınarak belirlenmiştir (104-107). Kitosan miktarı da benzer şekilde özellikle besinlerde antimikrobiyal ve antioksidan etkisinin gösterildiği miktar baz alınarak belirlenmiştir (73, 84).

İnkübasyon süresinin probiyotik bakterilerin mikotoksinlere bağlanması üzerindeki kesin etkisi henüz netlik kazanmamıştır. Ancak El-Nezami ve ark. (1998) çeşitli laktik asit bakterilerinin 0 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında AFB1'e bağlanma düzeylerinin benzer olduğunu ve bu sebeple bakterilerin AFB1'e bağlanmasının hızlı bir süreç olduğunu ortaya koymuştur (47). Kabak ve Var (2008) da laktik asit bakterilerinin mikotoksinlerin bağlanması için optimum inkübasyon süresinin net olmadığını, ancak 0-4 saat arasında hızlı bir bağlanma sürecinin gerçekleştiğini belirtmiştir (92). Ayrıca Serrano-Nino ve ark. (2013) da inkübasyon

süresinin artırılmasının laktik asit bakterilerinin mikotoksinlere daha fazla bağlanmasına neden olmadığını göstermiştir (3). Dolayısıyla bu çalışmada tüm bu verilerden yola çıkarak seçilen 4 saatlik inkübasyon süresinin test parametrelerinin bağlanma aktivitelerini ortaya koymak için yeterli bir süre olduğu düşünülmektedir.

5.1. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Sütte Aflatoksin M1'e Bağlanma Düzeyleri

Mevcut çalışmada probiyotik bakteri, maya, prebiyotik ve biyopolimer ilave müdahalesi neticesinde başlangıçta 10 ng/mL AFM1 ile kontamine edilmiş süt örneklerinde AFM1 seviyesi %26,7-50,9 oranında azalmıştır (Bkz Tablo 4.1). Kullanılan test parametrelerine göre toksin bağlanma düzeyi değişiklik göstermiştir. *S. cerevisiae*, %50,9±5,1 seviyesi ile en yüksek bağlanma kapasitesini gösterirken *L. mesenteroides* 'in bağlanma düzeyi %34,4±6,7 olarak tespit edilmiştir. Karazhiyan ve ark. (2016) yoğurttaki *S. cerevisiae* PTCC 5177 türünün %47,9-89,8 düzeyinde, Martinez ve ark. (2019) ise sütte *S. cerevisiae* RC016 türünün %19 düzeyinde AFM1 bağlama kapasitesi olduğunu göstermiştir (86, 109). Ancak Martinez ve ark. (2019)'nın test ettikleri diğer mikroorganizmaların (*L. rhamnosus*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *K. marxianus*, *S. boulardii*) sağladığı bağlanma düzeyine göre *S. cerevisiae*'nin bağlanma düzeyi daha düşük bulunmuştur. Khadivi ve ark. (2020) da test ettikleri *S. boulardii* maya türünün diğer test bakterilerinden daha yüksek bağlanma sağladığını belirtmektedir (95). Biyolojik yöntemlerde mikroorganizmaların AFM1'e bağlanma yeteneğinin sahip oldukları hücre duvarı bileşimleri ve hücre duvarı yüzey yükü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (110). *S. cerevisiae* hücre duvarının β -1,3-glukan ve β -1,6-glukan yapıdan oluştuğu ve hücre duvarının kimyasal bileşimi ve fiziksel yapısına bağlı olarak hücre yüzeyinde bulunan polar moleküllerin fiziksel bağlanma için çok sayıda bölge sunduğu belirtilmektedir (111). Bunun yanı sıra laktik asit bakterilerinin aflatoksin bağlama yetenekleri hücre duvarı yapısında bulunan peptidoglikan, teikoik asit, protein ve polisakkarit tabakasından ve bazı suşların ürettiği ekzopolisakkaritlere atfedilmektedir (112). Bu bileşiklerin mikotoksinleri bağlayabilen çeşitli negatif yüklü gruplar (karboksil, hidroksil ve fosforil) içerdiği belirtilmektedir (111). Dolayısıyla yapılan çalışmalarda kullanılan probiyotik suşların sahip olduğu farklı hücre duvarı yapıları, farklı bağlanma bölgesi

sayısı ve kapasitesine neden olmakta ve bu durum da suşların etkinliğinde farklı sonuçların ortaya çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

L. mesenteroides'in çeşitli besin modellerinde ve laboratuvar solüsyonlarında AFB1'e bağlanma yeteneği ve *Aspergillus* üzerine antogonist etkisinin olduğu gösterilmiştir (113-116). Bunun yanı sıra ticari meyve sularında patulin seviyesini düşürdüğü ve *Penicillium expansum*'un in vitro misel büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (117). Ayrıca güncel bir çalışmada *Fusarium* spp.'a karşı en etkin antifungal etkiyi gösteren laktik asit bakterisi olarak *L. mesenteroides* bulunmuştur (118). *L. mesenteroides*'in AFM1 bağlanma yeteneği ise ilk defa bu çalışmada incelenmiş ve $34,4 \pm 6,7$ oranında bağlanma tespit edilmiştir.

Probiyotik bakteri ve mayanın birlikte kullanılması ile gerçekleşen AFM1 bağlanma seviyesi ($36,2 \pm 7,2$) tek başına mayanın sağladığı bağlanmadan ($50,9 \pm 5,1$) daha düşük bulunmasına karşın tek başına bakteri müdahalesinden ($34,4 \pm 6,7$) yüksek olduğu gözlenmiştir. Buna göre *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides* için sinerjik etki sağladığı düşünülürken; *L. mesenteroides*'in *S. cerevisiae* için sinerjik etkiyi desteklemediği görülmüştür. Benzer dizayna sahip bir çalışmada Khadivi ve ark. (95) *S. boulardii*, *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* türlerinin sütte ayrı ayrı ve birlikte etkinliği incelenmiş ve en yüksek bağlanmanın ($100,0 \pm 0,58$) tüm mikroorganizmaların birlikte bulunduğu örneklerde gerçekleştiği belirtilmiştir. Ayrıca bağlanma düzeyinde mikroorganizma türünün konsantrasyondan daha önemli bir etken olduğunu, inkübasyon süresi ve sıcaklığının da bağlanma düzeyini etkilediğini belirtmiştir (95). Başka bir çalışmada da *B. lactis*'in *L. acidophilus* ile sinerjik etki göstererek tekli kültürlerine göre ikili kültürün AFM1 seviyesini azaltmada daha etkin olduğu gösterilmiştir (94). Öte yandan Sevim ve ark. (2019) da *L. plantarum* ve *B. animalis* ATCC 27672'nin de yoğurtta sinerjik etki gösterirken *L. plantarum* ve *B. bifidum*'un antogonist etki gösterdiğini rapor etmiştir (13).

Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda birçok probiyotik mikroorganizmanın besinlerde AFM1 bağlama düzeyleri tespit edilmiştir (3, 15, 16, 92). Bu bağlanmanın mikroorganizmanın sahip olduğu hücre duvarı yapısıyla ilgili olduğu belirtilmiştir (47). Altında yatan mekanizma henüz net olarak açıklanamamakla birlikte, mikroorganizma metabolizması tarafından sağlanan bir azaltma ya da kimyasal bir birleşmesinin aksine fiziksel bir bağlanma üzerinde

durulmaktadır. Bu fiziksel bağlanma ise mikroorganizmanın hücre duvarı bileşenine (polisakkarit ve peptidoglikan) atfedilmektedir (16, 119). Dolayısıyla mikroorganizmanın hücre duvarı bileşimi, yapısı ve bu yapının bütünlüğü AFM1 bağlanmasında büyük önem taşımaktadır (7). Bu çalışmada da probiyotik bakteri ve maya tarafından farklı düzeylerde AFM1 bağlanma düzeyleri sergilenmiştir. Bu durumun bakteri ve mayaların sahip olduğu farklı morfolojik yapılar, hücre duvarı bileşenleri ve miktarlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bu farklılıklar bulundukları ortamda birbirleriyle olan etkileşimlerini ve de birbirlerinin toksin bağlama kapasitelerini etkileyebilmektedir.

Prebiyotikler gastrointestinal sistem enzimlerinden etkilenmeden kolona ulaşabilen ve probiyotik mikroorganizmalar tarafından özgün olarak kullanılıp metabolize edilen karbonhidratlardır (120). Çeşitli in vitro çalışmalarda inülinin probiyotik bakterilerin aktivitesini desteklediği, ayrıca antimutajenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (121-124). Yapılan bu çalışmada, prebiyotik olarak inülinin AFM1 üzerindeki etkisi incelenmiş ve $38,0 \pm 8,8$ oranında bağlanma sağladığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra maya ve bakterinin birlikte kullanıldığı ikili çalışma grubunda AFM1 bağlanma seviyesi $36,2 \pm 7,2$ iken inülin eklendiğinde bu oranın $44,3 \pm 4,1$ 'e yükseldiği görülmektedir (Bkz. Şekil 4.10.). Probiyotik bakterilerin AFM1 bağlama kapasitesine inülinin etkisini inceleyen iki farklı çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuş ve inülin eklendiğinde probiyotik bakterilerin bağlanma kapasitelerinin arttığı belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacılar mikroorganizma türüne göre etki düzeyinin farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir (13, 21). Yapılan çeşitli çalışmalarda hindiba bazlı inülinin özellikle *Lactobacillus* türleri için bir karbon kaynağı olduğu ve probiyotiklerin aktivitesini desteklediği gösterilmiştir (121, 125). Ancak başka bir çalışmada da inülinin *L. acidophilus* La-5 ve *B. animalis* Bb-12 probiyotik bakterilerin aktivitesi üzerinde önemli bir katkısının olmadığı gösterilmiştir (126). Çalışma sonuçlarındaki farklılık, farklı türlerdeki probiyotik mikroorganizmaların substrat kaynağına vermiş olduğu özgün cevapla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kullanılan mikroorganizma türü, birbirleriyle olan ilişkisi, kullanılan inülinin türü ve miktarı da çalışma sonuçlarını etkilemektedir.

Son zamanlarda literatürde besinlerde bulunan toksinlerin biyolojik detoksifikasyonunda kullanılabilecek biyolojik ajanlara bir yenisi daha eklenmiştir.

Assaf ve ark. (2018) probiyotik bakteri ve mayaların aflatoksinlere bağlanma mekanizmasında etkin rol oynadığı düşünülen hücre duvarı anahtar bileşeninden [amino şeker N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc)] yola çıkarak aynı bileşeni içeren biyopolimer kitinin de AFM1 bağlanmasında etkili olabileceğini belirtmiştir. Buna yönelik yapılan çalışmada kitinin farklı deney koşulları sonucunda PBS'te %12,61-54,45 oranında, sütte ise %34,05-84,57 oranında AFM1'e bağlanarak AFM1 seviyesini önemli düzeylerde azalttığı gösterilmiştir (9).

Kitinin deasetilasyonundan elde edilen bir diğer biyopolimer kitosan ise kendine özgü yapısı ve düşük maliyeti ile birçok biyopolimerden daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Özellikle kitosanın meyve ve sebzelerin kalitesini korumak ve hasat sonrası çeşitli küf ve mantarların neden olduğu hastalıkları azaltmak için kullanılabileceği belirtilmektedir (71-75). Yapılan bir çalışmada %70'ten fazla deasetilasyona sahip düşük moleküler ağırlıklı kitosanın en düşük dozda (0,5 mg/g) ışınlanmış mısır ve buğday tanelerinde DON ve FB üretimini azaltabildiği gösterilmiştir (127). Bir başka çalışmada kitosanın laboratuvar ortamında *Aspergillus ochraceus* küfünün çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (84). Başka bir çalışmada da optimize edilmiş koşullar (pH 4, 35°C'de 8 saat inkübasyon) altında kitosanın hurma çekirdeği kekinde AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, ZEA, FB1 ve FB2 seviyelerini maksimum düzeyde (sırasıyla %94,35; 45,90; 82,11; 84,29; 90,03; 51,30; 90,53 ve 90,18) düşürdüğü belirtilmiştir (128).

Kitosanın AFM1 üzerindeki etkisi ise ilk defa bu çalışmada incelenmiş ve sütte %26,7±0,0 oranında AFM1 bağlama kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.1.). Böylece kitosanın AFM1 detoksifikasyonu için biyolojik bir ajan olabileceği görülmüştür. Ancak kitosanın göstermiş olduğu bağlanma düzeyi test parametreleri arasında en düşük düzey olduğu görülmüştür. Bununla birlikte maya ve bakterinin birlikte kullanıldığı ikili çalışma grubunda %36,2±7,2 olan AFM1 bağlanma seviyesi kitosan eklendiğinde %39,5±0,5'e yükselmiştir (Bkz. Tablo 4.1.). Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da kitosanın da probiyotik mikroorganizmaların AFM1 bağlanma kapasitesini artırdığı söylenebilmektedir.

5.2. Probiyotik Bakteri ve Maya ile Prebiyotik ve Biyopolimerlerin Sütte Aflatoksin M1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

Besinlerle alınan toksin ve benzeri kirletici madde miktarları her zaman vücut tarafından kullanılabilir miktarı yansıtmamaktadır. Çünkü bu maddelerin yalnızca belirli bir miktarı biyolojik olarak kullanılabilir. Dolayısıyla sadece gıdadan salınan/ayrışan (yani biyolojik olarak erişilebilir olan) ve biyoyararlı (kan, organ ve dokulardaki konsantrasyon) kontaminant kısmı toksik etki gösterebilmektedir. Deney hayvanları ve insanlarda yapılan çalışmalar, bileşiklerin oral biyoyararlanımının gıda kaynağına/matriksine, işleme ve hazırlama yöntemlerine bağlı olarak önemli ölçüde farklı olabileceğini göstermektedir (17-19). Biyoyararlanım, gıdada sindirilen toksin ya da kirleticinin sistemik dolaşıma ulaşan ve toksik etkilerini gösterebilen oranını tanımlamak için kullanılan bir terimdir (17).

Sindirim proseslerini taklit eden in vitro sindirim modelleri ile gastrointestinal sistemdeki sindirim süreçleri basitleştirilmiş bir şekilde simüle edilmekte ve oral biyoyararlanımın bir göstergesi olarak besinlerle alınan kirleticilerin salınımının (biyoerişilebilirlik) ölçülmesi sağlanmaktadır. İnsan beslenme çalışmaları diyetle ilgili çalışmalara hala altın standart ararken, in vitro modeller hızlı, ucuz ve etik kısıtlamaları olmayan çalışmalar olmasının yanı sıra tekrarlanabilirlik ve kolay örneklem seçimi in vitro sindirim modelini daha avantajlı hale getirmektedir (101).

Çeşitli besin modellerinde ve in vitro solüsyonlarda probiyotik bakterilerin AFM1'e bağlanma yeteneği ile AMF1 seviyesinin azaldığını gösteren çeşitli kanıtlara rağmen (3, 15, 16, 92) pratik açıdan bakıldığında mikroorganizmalar bu ortamlardan uzaklaştırılmamakta ve mikroorganizma-aflatoksin kompleksi olarak üründe bulunmaya devam etmektedir. Dolayısıyla ürünler serbest veya mikroorganizmaya bağlı toksin bulunup bulunmadığına bakılmaksızın tüketilmektedir. Bazı araştırmacılar (6, 48, 129) aflatoksine bağlanan mikroorganizmalar ve bu bağlanmanın karsinojenlerin bağırsak lümeninden emilimini ve biyoyararlanımını azaltabileceğini belirtmiş olmasına rağmen üründe gerçekleşen aflatoksin-mikroorganizma kompleksinin emilim ve metabolizma için uygun halde bulunan serbest aflatoksine göre gastrointestinal sistemdeki biyoerişilebilirlik düzeyinin nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada proteolitik enzim ile işlem görmüş sütte, işlem görmemiş süte göre AFM1 bağlama kapasitesi %30,7 oranında daha fazla bulunmuş

ve bu durum AFM1'in süt proteinine bağlanmasıyla ilişkilendirilmiştir (130). Dolayısıyla sütte gerçekleşen bağlanma düzeyi ile sindirim modeli uygulaması sonrasında tespit edilen bağlanma düzeylerinin farklı olması beklenmektedir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada probiyotik mikroorganizmalar ile inülin ve kitosanın sütte AFM1 bağlanma kapasitesinin belirlenmesinin yanı sıra in vitro sindirim modeli ile AFM1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisi de incelenmiştir.

İn vitro sindirim modeli uygulaması sonucunda sütte AFM1'in biyoerişilebilirliği $90,35 \pm 1,15$ olarak bulunmuştur. AFM1'in biyoerişilebilirliği ülkemizde ilk defa 2012 yılında Kabak ve Özbey tarafından çalışılmış ve $80,5-83,8$ arasında değiştiği belirtilmiştir (20). Diğer taraftan sütte AFM1 biyoerişilebilirliğini $94,32$ ve 100 bulan araştırmacılar da bulunmaktadır (3, 19).

İnce bağırsak sonrası sütte en yüksek AFM1 bağlanması *S. cerevisia* bulunan örnekte gerçekleşmiş ve AFM1 biyoerişilebilirliği $67,5 \pm 2,5$ oranında azalmıştır. En düşük bağlanma ise inülin bulunan örnekte gerçekleşmiş ve AFM1 biyoerişilebilirliği $1,8 \pm 8,9$ oranında azalmıştır. Yapılan bir çalışmada *L. acidophilus* NCFM 150B, *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* Shirota probiyotik bakterilerinin in vitro sindirim modeli altında AFM1'in biyoerişilebilirliğini $15,5-31,6$ oranında azalttığı gösterilmiştir (20). Benzer sonuçlar, beş probiyotik suşun (*L. acidophilus* NRRL B-4495, *L. reuteri* NRRL B-14171, *L. rhamnosus* NRRL B-442, *L. johnsonii* NRRL, B-2178 ve *B. bifidum* NRRL B-41410) yeteneğini değerlendiren Serrano-Nino ve ark. tarafından da rapor edilmiştir. İn vitro sindirim modeli uygulaması sonrasında eklenen probiyotik bakteriler ile AFM1 biyoerişilebilirliğinde $22,72-45,17$ 'lik bir azalma tespit edilmiştir (3).

S. cerevisiae ve *L. mesenteroides*'in AFM1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisi bağlanma kapasiteleriyle benzer bulunmuştur. İki mikroorganizmanın birlikte bulunduğu örneklerde AFM1 biyoerişilebilirliğindeki azalma $24,3 \pm 10,1$ ile *S. cerevisia*'nın tek başına sağladığı azalmadan daha düşükken *L. mesenteroides*'ten ($22,5 \pm 7,6$) daha yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan inülinin bağlanma kapasitesi kitosandan yüksek bulunmasına rağmen (Bkz. Tablo 4.1.) ince bağırsak sonrası AFM1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisi tam tersi olmuştur (Bkz. Tablo 4.2.). İnülin tek başına AFM1 biyoerişilebilirliğini $1,8 \pm 8,9$ oranında düşürürken kitosan $21,6 \pm 6,3$ oranında düşürmüştür. Bununla birlikte kitosan eklenen *S. cerevisia* + *L.*

mesenteroides'li örnekteki biyoerişilebilirliğin düşüşü ($39,4 \pm 7,5$) inülin eklenen örneklerdekinden ($20,7 \pm 5,0$) daha yüksek olmuştur. Sonuç olarak kitosanın inkübasyon sonrası AFM1 bağlanma kapasitesi düşük kalmasına rağmen AFM1 biyoerişilebilirliğinin azaltılmasında inülininden daha yüksek bir etkiye sahip olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.10.).

Yapılan sınırlı sayıda çalışma ile probiyotiklerin AFM1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkileri in vitro sindirim modelinde gösterilmiştir. Çalışmalarda kullanılan sindirim modelleri ince bağırsak taklidi ile sona ermekte olup bağı aflatoksin-mikroorganizma kompleksinin kolonda herhangi bir değişime uğrayıp uğramadığı bilinmemektedir. Bu nedenle kolonun da dahil edildiği in vitro sindirim modeli çalışmaların yapılması aflatoksin-mikroorganizma kompleksinin GİS altındaki son durumu ve kompleksin bahsi geçen fiziksel bağlanma ve detoksifikasyon mekanizmasının açıklanması için büyük önem taşımaktadır.

Literatürdeki bu boşluk da dikkate alınarak ilk defa bu çalışmada mikrobiyotada bulunan bakteriyel enzimler (proteaz ve viskozim L) kullanılarak kolon taklidi sağlanmıştır. Bu amaçla kullanılan proteaz solüsyonu (Protease type XIV bacterial from *Streptomyces grise*) üç kazeinolitik aktivite ile bir aminopeptidaz aktivitesinin bir karışımıdır. Proteaz enzimi, peptit bağlarının hidrolizi ile proteinleri katabolize etmektedir (131). Çalışmada kullanılan bu ürün de proteinin geniş çaplı ya da tamamen ayrışmasını (degradasyonu) sağlamaktadır. Ayrıca kazeini >70 oranında mono-amino asitler olarak sindirebilmekte ve enzime dirençli nişastanın izolasyonu için de kullanılmaktadır (131). Kolon fazının ikinci aşamasında kullanılan viskozim L (Sigma V2010) ise *Aspergillus* sp.'den elde edilen “Hücre Duvarı Bozucu Enzim Kompleksi” olarak da adlandırılan çok enzimli bir üründür ve selüloz, hemiselüloz, ksilanaz ve beta glukanaazdan oluşmaktadır. Bu fibrolitik enzimler hücre duvarı bileşenlerini parçalayarak lif sindirilebilirliğini iyileştirme ve laktik asit bakterileri için substrat olarak mevcut suda çözünür karbonhidrat miktarını arttırmada kullanılmaktadır (132).

Kolon sonrasında AFM1'in sütte biyoerişilebilirliği $81,40 \pm 0,00$ olarak tespit edilmiştir. Test grupları içerisinde en yüksek AFM1 bağlanması *L. mesenteroides* bulunan örnekte görülmüş ve biyoerişilebilirlik $36,6 \pm 4,1$ oranında azalmış; en düşük bağlanma ise kitosan bulunan örnekte tespit edilmiş ve biyoerişilebilirlik $26,0 \pm 2,8$

oranında azalmıştır. Farklı olarak çalışma gruplarından ikisinde (Test grubu 2: *S. cerevisiae* ve Test grubu 7: İnülin) AFM1 biyoerişilebilirliğinin kolon sonrası arttığı tespit edilmiştir. Sütte inkübasyon ve ince bağırsak sindirimi sonrasında tespit edilen en yüksek bağlanmanın sağlandığı *S. cerevisiae*'lı örneklerde kolon sonrası AFM1 biyoerişilebilirliğinin $12,0 \pm 5,6$ oranında arttığı görülmüştür. Benzer şekilde inülin bulunan örneklerde de AFM1 biyoerişilebilirliğinin $18,0 \pm 2,8$ oranında arttığı tespit edilmiştir. Ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Buna rağmen elde edilen bulgular sonucundan *S. cerevisiae* ve inülinin bağlanmasının geri dönüşümlü olduğu ve özellikle kolonda bulunan enzimlerin *S. cerevisiae* ve inülinin bağlanma yeteneklerini ortadan kaldırdığı söylenebilmektedir. İnülin, gastrointestinal sistemin üst kısmında sindirilmemekte, glikolitik yolda emilip metabolize edilmemekte ya da 'şekerler' veya nişastalar gibi doğrudan glikojen olarak depolanmamakta ve kolona geçerek kolon mikrobiyotası tarafından fermente edilmektedir (133). Bu nedenle kolon fazına kadar in vitro sindirim modelinden etkilenmemesi beklenmektedir. Ancak inülinin bulunduğu 7. test grubunda inkübasyon sonrası tespit edilen bağlanma ($38,0 \pm 8,8$), in vitro sindirim modeli sonrasında neredeyse tespit edilememiştir.

Inülin ve kitosanın probiyotik mikroorganizmalar ile birlikte etkinliğine bakıldığında da ince bağırsak sonrasında tespit edilen oranlara benzer şekilde kitosan eklenen *S. cerevisiae* + *L. mesenteroides*'li örnekteki biyoerişilebilirlikteki düşüş ($36,0 \pm 5,6$) inülin eklenen örneklerdekenden ($27,0 \pm 12,7$) daha yüksek olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.10.).

Çeşitli çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların aflatoksinlere fiziksel bağ ile bağlanmasının bir sonucu olarak bu bağların geri dönüşümlü olabileceği ileri sürülmektedir (119, 134, 135). Yapılan bu çalışma sonuçları da bağlanmanın geri dönüşümlü olduğunu desteklemekte ve özellikle besinde tespit edilen bağlanma düzeyinin sindirim sonrası farklı düzeylerde değişebileceğini göstermektedir. Assaf ve ark. (2018) (9) PBS'de art arda yıkamalar sonrasında AFM1'in kitine bağlanmasının kısmi olarak geri dönüşümlü olduğunu ve bu geri dönüşümün yıkamalarda bozulabilen kovalent olmayan bağın varlığının bir göstergesi olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, AFM1/kitin kompleksinin PBS ile yıkanması sonucunda kitin parçacıkları arasına yığılmış serbest AFM1 miktarlarının çözeltiye geri salınmış olmasıyla da ilişkili

olabileceğini belirtmiştir. Benzer şekilde aynı çalışmada 5 yıkama sonrasında sütte kitinin AFM1'e bağlanmasının %84,57'den %34,05'e düştüğü gösterilmiştir. Araştırmacı AFM1 bağlanmasındaki bu ciddi düşüşün, kitin partikülleri arasındaki sürtünmenin artmasından dolayı AFM1 ile oluşan elektrostatik bağların bozulmasından kaynaklandığını belirtmektedir. Ayrıca kitin konsantrasyonundaki artış nedeniyle, kitin partikülleri arasında serbest AFM1 tutulumunun daha yüksek olabileceği ileri sürülmektedir (9).

AFM1 biyoerişilebilirliğini etkileyen başka bir açıklayıcı mekanizma olarak in vitro sindirim sırasında kazeinin yapısındaki değişim öne sürülebilir. Süt proteini olan kazeine bağlandığı ileri sürülen toksinin, in vitro model sonrası parçalanmasıyla adsorbe edilme durumu ve/veya yapısı değişmiş olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla test parametrelerinin farklı kimyasal yapıları nedeniyle, in vitro sindirim modeli sonrası değişen toksin konumuna farklı cevaplar verdiği söylenebilir. Bunun yanı sıra, süt veya diğer ortamlarda aflatoxin bağlanma stabilitesinin depolama süresi, pH, süt sıcaklığı ve kullanılan mikrobiyal adsorbanların konsantrasyonu gibi farklı çevresel koşullara göre farklılık gösterebildiği ileri sürülmektedir. Özellikle AFM1'e bağlı mikrobiyal katkı maddelerinin sütte kalması hedeflendiğinde, stabil olmayan bir ortamda serbest AFM1 miktarlarını sürekli olarak izlemek ve mikrobiyal ajanların konsantrasyonunu tahmin etmenin zor olduğu belirtilmektedir (11, 136).

Bu çalışmada *L. mesenteroides* ve kitosanın bağlanma kapasitesinin kolon sonrası arttığı belirlenmiştir. Ayrıca *L. mesenteroides* ve kitosanın bulunduğu 1. ve 7. test gruplarında inkübasyon sonrası tespit edilen bağlanma düzeyi ile kolon sonrası tespit edilen bağlanma düzeyi benzer bulunmuştur. Dolayısıyla bu çalışmada *L. mesenteroides* ve kitosanın AFM1 bağlanmasında en kararlı yapıya sahip olduğu görülmektedir. Literatürde adsorban ajanlar olarak *L. mesenteroides* ya da kitosan kullanılmasıyla besinde AFM1 biyoerişilebilirliğinin azaltılmasına ilişkin veri bulunmamaktadır. Ancak Meca ve ark. (137) β -1,3 glukan, kitosan, FOS, galaktomannan, inülin ve pektin olmak üzere farklı diyet liflerinin beauverisin (BEA) biyoerişilebilirliği üzerine etkisini incelemiş ve kitosan ve β -1,3 glukan kullanımının BEA biyoerişilebilirliğinin azaltılmasında en etkin bileşen olduğunu belirtmiştir. Araştırmacı bu durumu bu iki besleyici lifin bakteriler tarafından gerçekleştirilen fermantasyona direnme kapasitesine sahip olmasıyla ilişkilendirmiştir (137). *L.*

mesenteroides'in antifungal ve antimikotoksijenik özelliklerinin olduğu gösterilmiş olsa da biyoerişilebilirlik üzerine henüz bir çalışma bulunmamaktadır (118, 138).

Sonuç olarak test edilen probiyotik bakteri, maya, prebiyotik ve biyopolimerin sütte farklı düzeylerde AFM1 bağlama kapasitesi olduğu gösterilmiştir. Kullanılan iki biyolojik ajanın (*L. mesenteroides* ve kitosanın) ilk defa kullanılıyor olması çalışma sonuçlarının literatür ile kıyaslanmasında sınırlılıklara sebep olsa da uygulanan in vitro sindirim modeli ile bu biyolojik ajanların sütte AFM1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur. Biyolojik ajanların besinde sağladıkları bağlanma düzeyi gastrointestinal sistem boyunca değişiklik göstermiştir. *L. mesenteroides* ve kitosanın gastrointestinal sistemde AFM1 bağlanma kapasitesi en az etkilenen yapılara sahip olduğu gözlemlenirken *S. cerevisae* ve inülinin etkinliği sindirim enzimlerinden büyük oranda etkilenmiştir. Ayrıca bu biyolojik ajanların birlikte kullanımı sonucu farklı sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla kullanılan ajanların sahip oldukları farklı yapılar nedeniyle ajan-toksin arasında gerçekleşen etkileşim farklı olmakta ve bunun sonucunda da farklı AFM1 bağlanma düzeyleri ortaya çıkmaktadır. Ayrıca AFM1 bağlanmasına yönelik yapılan çalışmalarda biyoyararlanım düzeylerinin değerlendirilmesinin büyük önem taşıdığı görülmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Biyolojik ajan olan probiyotik bakteri (*L. mesenteroides*), maya (*S. cerevisiae*), prebiyotik (inülin) ve biyopolimerin (kitosan) sütte AFM1 biyoerişilebilirliği üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yürütülen bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde belirtilmektedir.

1. Pozitif kontrol örneklerinde inkübasyon sonrası yapılan analizlerinde ortalama 6.825 ppb AFM1 tespit edilmiştir. Negatif kontrol örneklerinde ise AFM1 seviyesi tespit limitinin altında kalmıştır.
2. İnkübasyon sonrasında *L. mesenteroides*'in AFM1 bağlanma düzeyi ortalama %34,4±6,7; *S. cerevisiae*'nın AFM1 bağlanma düzeyi %50,9±5,1; *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde AFM1 bağlanma düzeyi %36,2±7,2 olarak tespit edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası kitosanın AFM1 bağlama düzeyi % 26,7±0,0 inülinin AFM1 bağlama düzeyi %38,0±8,8 bulunmuştur.
4. İnkübasyon sonrası inülin, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde AFM1 bağlanma düzeyi %44,3±4,1; kitosan, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde AFM1 bağlanma düzeyi %39,5±0,5 bulunmuştur.
5. İnkübasyon sonrası tespit edilen AFM1 bağlanma düzeyi ortalama %26,7 ile %50,9 arasında olmuştur. En yüksek AFM1 bağlama düzeyi *S. cerevisiae*'nin bulunduğu örneklerde görülürken en düşük AFM1 bağlama düzeyi kitosan bulunan örneklerde saptanmıştır. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).
6. AFM1'in sütte biyoerişilebilirliği ince bağırsak sonrasında %90,35±1; kolon sonrasında ise AFM1'in biyoerişilebilirliği %81,40±0,00 olarak bulunmuştur.
7. İn vitro sindirim modeli uygulanan örneklerde ince bağırsak sonrası en düşük AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi *S. cerevisiae* bulunan örneklerde tespit edilmiş (%29,30±2,29) ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,001$).

8. *L. mesenteroides* bulunan örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasının ince bağırsak sonrasında AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $70,00 \pm 6,90$ olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
9. *S. cerevisiae* ve *L. mesenteroides*'in birlikte bulunduğu örneklerde in vitro sindirim modeli uygulamasının ince bağırsak sonrasında AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $68,37 \pm 9,21$ bulunmuştur. Pozitif kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
10. İn vitro sindirim modeli uygulamasının ince bağırsak sonrasında kitosan örneklerde AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $70,82 \pm 5,75$ bulunurken inülin bulunan örneklerde AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $88,72 \pm 8,05$ bulunmuştur. Tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi pozitif kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
11. İn vitro sindirim modeli uygulamasının ince bağırsak sonrasında inülin, *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $71,63 \pm 4,60$ olarak bulunmuştur. Tespit edilen AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi pozitif kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
12. İn vitro sindirim modeli uygulamasının ince bağırsak sonrasında *L. mesenteroides* + *S. cerevisiae* + Kitosan bulunan örneklerde AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi $54,68 \pm 6,79$ oranı ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,001$).
13. Kolon fazı eklenerek uygulanan in vitro sindirim modeli sonrasında *L. mesenteroides* bulunan örneklerde AFM1 biyoerişilebilirliği $51,55 \pm 3,38$ düzeyi ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0,001$).
14. Kolon fazı eklenerek uygulanan in vitro sindirim modeli sonrasında *S. cerevisiae* bulunan örneklerde AFM1 biyoerişilebilirliği kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($91,16 \pm 4,60$). Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

15. Kolon fazı eklenerek uygulanan in vitro sindirim modeli sonrasında *L. mesenteroides* ve *S. cerevisiae*'nin birlikte bulunduğu örneklerde AFM1 biyoerişilebilirliği $53,72 \pm 2,29$ düzeyi ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0,001$).
16. Kolon fazı eklenerek uygulanan in vitro sindirim modeli sonrasında kitosanın bulunduğu örneklerde ($60,23 \pm 2,29$) AFM1 biyoerişilebilirlik düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p < 0,001$), inülin bulunan örneklerde AFM1 biyoerişilebilirliği kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($96,05 \pm 2,23$). Ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
17. *L. mesenteroides*'in bağlanma kapasitesi inkübasyon sonrasına ($34,4 \pm 6,7$) göre ince bağırsak sonrası azalırken ($22,5 \pm 7,6$) kolon sonrası artış ($36,6 \pm 4,1$) göstermiştir. Ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$).
18. *S. cerevisiae*'nin bağlanma kapasitesi inkübasyon sonrasına ($50,9 \pm 5,1$) göre ince bağırsak sonrası istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artarken ($67,5 \pm 2,5$; $p > 0,05$) kolon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış ($-12,0 \pm 5,6$; $p < 0,05$) göstermiştir.
19. *S. cerevisiae* ve *L. mesenteroides*'in birlikte sağladıkları bağlanma düzeyi inkübasyon sonrasına göre ince bağırsak sonrası azalırken kolon sonra artış göstermiştir. Ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$).
20. *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides* kombinasyonuna kitosan eklendiğinde elde edilen bağlanma düzeyi inkübasyon sonrasına ($36,2 \pm 7,2$) göre ince bağırsak sonrası azalırken ($24,3 \pm 10,1$) kolon sonra artış ($34,0 \pm 2,8$) göstermiş, ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
21. *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides* kombinasyonuna inülin eklendiğinde elde edilen bağlanma düzeyi inkübasyon sonrasına ($44,3 \pm 4,1$) göre ince bağırsak sonrası azalırken ($20,7 \pm 5,0$) kolon sonra artış göstermiş ($27,0 \pm 12,7$), ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
22. Kitosanın bağlanma kapasitesi de benzer şekilde inkübasyon sonrasına ($26,7 \pm 0,0$) göre ince bağırsak sonrası azalırken ($21,6 \pm 6,3$) kolon sonra artış

(%26,0±2,8) göstermiş, ancak bu iki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

23. İnülinin bağlanma kapasitesi ise inkübasyon sonrasına (%38,0±8,8) göre ince bağırsak ve kolon sonrası istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış göstermiştir (sırasıyla %1,8±8,9 ve %-18,0±2,8; $p < 0,05$).

6.2. Öneriler

İyi tarım uygulamaları (GAP) ve doğru saklama koşulları, besinlerde aflatoksin kontaminasyonunu önlemek için en iyi stratejiler olarak kabul edilirken, mikotoksin kontaminasyonu sorununu ortadan kaldırmak, inaktivasyon veya biyoyararlanımlarını azaltmak için fiziksel, kimyasal veya biyolojik olmak üzere çeşitli yöntemler önerilmiştir. Biyolojik yaklaşımlar arasında aflatoksinlere bağlanabilen biyolojik ajanların kullanılması toksinin organizmadaki biyoyararlanımını azaltmak için güçlü bir alternatif sunmaktadır. Uygun suşların diyetle dahil edilmesi ile aflatoksinlerin gastrointestinal sistemdeki biyoyararlanımı azaltılarak sağlık üzerindeki zararlı etkileri azaltılabilir. Bunun yanı sıra diyetle aflatoksin maruziyetini azaltmak için alternatif biyolojik ajanlar da ele alınmaktadır. Son yıllarda özellikle güçlü hidrofilik yapıları nedeniyle ön plana çıkan besin hidrokolloidleri önemli bir çalışma alanı olarak görülmektedir. Besin hidrokolloidleri besinlerin reolojik özelliklerini iyileştirmesinin yanı sıra besin değeri katkıları ile de fonksiyonel besin üretimi için önemli avantajlar sağlayabilirler. Ayrıca *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi faydalı bakterileri destekleyici roller sergileyerek simbiyotik etki de gösterebilirler.

Bu çalışma ile probiyotik mikroorganizmalar, prebiyotik ve biyopolimer varlığında AFM1'in azaltılması ve biyoerişilebilirliği, tüm bağırsak boyunca bir süt gıda matrisi kullanılarak ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca probiyotik bakteri olarak *L. mesenteroides* ile biyopolimer olarak kitosan ilk kez kullanılmış ve AFM1 bağlanma kapasiteleri gösterilmiştir. Sağlık riskleri açısından AFM1 maruziyeti göz önüne alındığında, tüm aflatoksinler her zaman emilim için mevcut durumda olmadığından biyoerişilebilirlik değerlendirmeleri gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır. Nitekim bu çalışmadan elde edilen veriler inkübasyon sonrası üründe tespit edilen AFM1 miktarları ile sindirim taklidi sonunda tespit edilen miktarlar arasındaki farkı ortaya koymuştur. Ayrıca biyolojik ajanların besinde sağladığı AFM1 bağlanma

düzeyleri gastrointestinal sistem boyunca farklı düzeylerde sonuçlar vermiştir. Bu çalışmada AFM1 ile bağlanmasının oldukça kararlı olduğu ve AFM1 biyoerişilebilirliğini önemli düzeyde azalttığı belirlenen *L. mesenteroides* ve kitosan ön plana çıkmaktadır. Bu sayede kitosan ve probiyotik bakterilerin, süt ürünlerindeki aflatoksinlerin biyoerişilebilirliğini azaltmak için gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceği göz önünde bulundurulabilir. İleri çalışmalarda dinamik in vitro sindirim modellerinin uygulanması, kolon fazının enzimlerle simülasyonu yerine mikrobiyal simülasyonunun yapılması, gastrointestinal sistem boyunca probiyotik mikroorganizmaların canlılığının değerlendirilmesi de biyolojik ajanlar ve mikotoksinlerin davranışlarının değerlendirilmesinde avantaj sağlayacaktır. Ayrıca en yüksek etkinliğe sahip olduğu belirlenen biyolojik ajanlar ile fonksiyonel besin üretimine de katkı sağlanabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Shahbazi Y. Aflatoxin M1 Contamination in Milk and Dairy Products: Implications on Human Health. Watson, RR, Collier, RJ, Preedy, VR, editors. Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease. London: Academic Press; 2017.
2. Afshar P, Shokrzadeh M, Raeisi SN, Ghorbani-HasanSarai A, Nasiraii LR. Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon*. 2020;178:50–8.
3. Serrano-Niño J, Cavazos-Garduño A, Hernandez-Mendoza A, Applegate B, Ferruzzi M, San Martin-González M, ve ark. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food control*. 2013;31(1):202-7.
4. Gao Y, Wang J, Li S, Zhang Y, Zheng N. Aflatoxin M1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;96:79-89.
5. Zhang J, Zheng N, Liu J, Li F, Li S, Wang J. Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;83:54-60.
6. Ben Salah-Abbès J, Abbes S, Jebali R, Haous Z, Oueslati R. Potential preventive role of lactic acid bacteria against aflatoxin M1 immunotoxicity and genotoxicity in mice. *Journal of Immunotoxicology*. 2015;12,:107–14.
7. Corassin CH, Bovo F, Rosim RE, Oliveira CAF. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control*. 2013;31(1):80-3.
8. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chemical agents and related occupations. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2012:224–48.
9. Assaf JC, Khoury AE, Atoui A, Louka N, Chokr A. A novel technique for aflatoxin M1 detoxification using chitin or treated shrimp shells: in vitro effect of physical and kinetic parameters on the binding stability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102: 6687–97.
10. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği [İnternet]. 2011 [Erişim Tarihi 5 Mart 2023]. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm>
11. Assaf JC, Nahle S, Chokr A, Louka N, Atoui A, Khoury AE. Assorted Methods for Decontamination of Aflatoxin M1 in Milk Using Microbial Adsorbents. *Toxin*. 2019;11(304):1-23.
12. Khoury AE, Atoui A, Yaghi J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*. 2011;22:1695-9.

13. Sevim S, Topal GG, Tengilimoglu-Metin MM, Sancak B, Kizil M. Effects of inulin and lactic acid bacteria strains on aflatoxin M1 detoxification in yoghurt. *Food Control*. 2019;100:235–9.
14. Abdelmotilib NM, Hamad GM, Elderea HB, Salem EG, Sohaimey SAE. Aflatoxin M1 Reduction in Milk by a Novel Combination of Probiotic Bacterial and Yeast Strains. *European Journal of Nutrition & Food Safety*. 2018;8(2):83-99.
15. Bovo F, Corassin CH, Rosim RE, de Oliveira CA. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food and Bioprocess Technology*. 2013;6(8):2230-4.
16. Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF, Badr FH. Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food control*. 2014;43:129-34.
17. Versantvoort CHM, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJM, Sips AAJ. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43:31-40.
18. Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*. 2004;42:817-24.
19. Panwar R, Kumar N, Kashyap V, Ram C, Kapila R. Aflatoxin M1 Detoxification Ability of Probiotic Lactobacilli of Indian Origin in In vitro Digestion Model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019;11:460–9.
20. Kabak B, Ozbey F. Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Food Control*. 2012;28:338-44.
21. Wochner KF, Moreira MCC, Kalschne DL, Colla E, Drunkler DA. Detoxification of Aflatoxin B1 and M1 by *Lactobacillus acidophilus* and prebiotics in whole cow's milk. *Journal of Food Safety*. 2019;39:1-10.
22. Tayfur M. Gıda Kaynaklı Enfeksiyonlar ve Zehirlenmeler. *Gıda Hijyeni*. 2009:311-4.
23. Steyn P, Stander M. Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins and fumonisins. *General and Applied Toxicology 2nd Edition United Kingdom: Macmillan Reference Ltd*. 1999:2145-76.
24. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2008:63-92.
25. Girgin G, Başaran N, Şahin G. Dünyada Ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. *Deneyisel Biyoloji Dergisi*. 2001:97.
26. Doğan H ve Halkman A. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. AÜ ZF Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını Sim Matbaası, Ankara 522s. 2000;28.

27. Reddy L, Odhav B, Bhoola K. Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *Biological chemistry*. 2006;387(1):87-93.
28. Bbosa GS, Lubega A, Kyegombe DB, Kitya D, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW. Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems: INTECH Open Access Publisher; 2013.
29. Sharma V, Sharma C, Paliwal R, Pracheta SS, Sharma S. Ameliorative effects of Curcuma longa and curcumin on aflatoxin B1 induced serological and biochemical changes in kidney of male mice. *Asian J Biochem Pharmaceut Res*. 2011;2(1):338-51.
30. Mohamed AM, Metwally NS. Antiaflatoxicogenic activities of some aqueous plant extracts against AFB1 induced Renal and Cardiac damage. *of Pharmacology and Toxicology*. 2009;4(1):1-16.
31. Wangikar P, Dwivedi P, Sinha N, Sharma A, Telang A. Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B 1 with special reference to microscopic effects. *Toxicology*. 2005;215(1):37-47.
32. Thrasher JD ve Crawley SL. Neurotoxicity of Mycotoxins 2015 [Erişim tarihi 15 Ocak 2023] Erişim adresi: <http://www.drthrasher.org/page189.html>.
33. Dvorackova I, Kusak V, Veselý D, Vesela J, Nesnidal P, editors. Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye). *Annales de la nutrition et de l'alimentation*; 1976.
34. Gürbay A, Engin AB, Çağlayan A, Şahin G. Aflatoxin M1 levels in commonly consumed cheese and yogurt samples in Ankara, Turkey. *Ecology of food and nutrition*. 2006;45(6):449-59.
35. Campagnollo FB, Ganey KC, Khaneghah AM, Portela JB, Cruz AG, Granato D, ve ark. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*. 2016(68):310-29.
36. Regulation E. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union*. 1881;2006:L364.
37. Kabak B. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'un *Aspergillus flavus* Gelişimi ve Aflatoksin B1 ve Aflatoksin M1 Üzerine Etkisinin İn Vitro Şartlarda Araştırılması. Adana: Çukurova Üniversitesi 2002.
38. Iqbal SZ, Jinap S, Pirouz A, Faizal AA. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2015;46(1):110-9.
39. Cano-Sancho G, Marin S, Ramos AJ, Peris-Vicente J, Sanchis V. Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Revista Iberoamericana de Micología*. 2010;27(3):130-5.
40. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F. A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control*. 2011;22(12):1956-9.

41. Atasever MA, Atasever M, Özturan K. Aflatoxin M1 levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2011;35(1):59-62.
42. Kos J, Lević J, Đuragić O, Kokić B, Miladinović I. Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control*. 2014;38:41-6.
43. Škrbić B, Živančev J, Antić I, Godula M. Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*. 2014;40:113-9.
44. Duarte SC, Almeida AM, Teixeira AS, Pereira AL, Falcão AC, Pena A, ve ark. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*. 2013;30(2):411-7.
45. Montaseri H, Arjmandtalab S, Dehghanzadeh G, Karami S, Razmjoo M, Sayadi M, ve ark. Effect of production and storage of probiotic yogurt on aflatoxin M1 residue. *Journal of food quality and hazards control*. 2014;1(1):7-14.
46. Kabak B, Dobson AD, Var Il. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2006;46(8):593-619.
47. El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B 1. *Food and Chemical Toxicology*. 1998;36(4):321-6.
48. Peltonen KD, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT. Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(13):1942-5.
49. Kabak B ve Var I. Mikotoksin Biyosentezinin Engellenmesinde Ve Mikotoksinlerin Detoksifikasyonunda Biyolojik Ajanların Kullanımı. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*. 2004(5).
50. Aliabadi MA, Alikhani FE, Mohammadi M, Darsanaki RK. Biological control of aflatoxins. *European Journal of Experimental Biology*. 2013;3(2):162-6.
51. Arıcı M, Çelikyurt G. Gıda ve Yemlerde Bulunan Mikotoksinlerin Mikroorganizmalar Tarafından Detoksifikasyonu. *Türkiye 10 Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs; Erzurum2008.
52. Keser O, Kutay HC. Mikotoksinlerin Önlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler II. Kimyasal ve Biyolojik Yöntemler. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 2009;35(1):19-30.
53. FAO, WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report; 2002.
54. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;15(1):1-9.
55. Oliveira T, Ramalhosa E, Nunes L, Pereira JA, Colla E, Pereira EL. Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives

- from Northeast of Portugal. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2017;44:167-72.
56. Lee YK ve Salminen S. *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons; 2009.
 57. Arihara K. *Probiotics. Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2014.
 58. Guimarães JT, Balthazar CF, Silva R, Rocha RS, Graça JS, Esmerino EA, ve ark. Impact of probiotics and prebiotics on food texture. *Current Opinion in Food Science*. 2020;33:38-44.
 59. Knorr D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science & Technology*. 1998;9(8):295-306.
 60. Li JM ve Nie SP. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids*. 2016;53:46-61.
 61. Manzoor M, Singh J, Bandral JD, Gani A, Shams R. Food hydrocolloids: Functional, nutraceutical and novel applications for delivery of bioactive compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;165:554-67.
 62. Yang X, Li A, Li X, Sun L, Guo Y. An overview of classifications, properties of food polysaccharides and their links to applications in improving food textures. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;102:1-15.
 63. Luo Y, Wang Q, Zhang Y. Biopolymer-based nanotechnology approaches to deliver bioactive compounds for food applications: a perspective on the past, present, and future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(46):12993-3000.
 64. Ahmad M, Ashraf B, Gani A, Gani A. Microencapsulation of saffron anthocyanins using β glucan and β cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during in-vitro digestion. *International journal of biological macromolecules*. 2018;109:435-42.
 65. Türk Gıda Kodeksi Beslenme ve Sağlık Beyanları Yönetmeliği [İnternet]. 2007 [Erişim Tarihi: 4 Mayıs 2023] Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/01/20170126M1-5.htm>.
 66. Singla V, Chakkaravarthi S. Applications of prebiotics in food industry: A review. *Food science and technology international*. 2017;23(8):649-67.
 67. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines October 2011 [Erişim Tarihi: 6 Nisan 2023]. Erişim adresi: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-english-2011.pdf>.
 68. Perrin S, Warchol M, Grill J, Schneider F. Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;90(6):859-65.

69. Ahmed W, Rashid S. Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2019;59(1):1-13.
70. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British journal of Nutrition*. 2002;87(S2):S287-S91.
71. Morin-Crini N, Lichtfouse E, Torri G, Crini G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*. 2019;17:1667–92.
72. Sun L, Sun J, Chen L, Niu P, Yang X, Guo Y. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. *Carbohydrate Polymers*. 2017;163:81-91.
73. Inanli AG, Tümerkan ETA, Abed NE, Regenstein JM, Özogul F. The impact of chitosan on seafood quality and human health: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;97:404–16.
74. Muanprasat C, Chatsudthipong V. Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*. 2017;170:80-97.
75. Ngo D-H, Vo T-S, Ngo D-N, Kang K-H, Je J-Y, Pham HN-D, et al. Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*. 2015;51:200-16.
76. Chiu C-Y, Chang T-C, Liu S-H, Chiang M-T. The regulatory effects of fish oil and chitosan on hepatic lipogenic signals in high-fat diet-induced obese rats. *Journal of food and drug analysis*. 2017;25(4):919-30.
77. Hosseini M, Jafar SM. Review Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;85:467–75.
78. Bonilla F, Chouljenko A, Reyes V, Bechtel P-J, King J-M, Sathivel S. Impact of chitosan application technique on refrigerated catfish fillet quality. *LWT-Food Science and Technology*. 2018;90:277–82.
79. Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 2017;164:268-83.
80. Wang L, Wu H, Qin G, Meng X. Chitosan disrupts *Penicillium expansum* and controls postharvest blue mold of jujube fruit. *Food Control*. 2014;41:56-62.
81. Wang Y, Li B, Zhang X, Peng N, Mei Y, Liang Y. Low molecular weight chitosan is an effective antifungal agent against *Botryosphaeria* sp. and preservative agent for pear (*Pyrus*) fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;95:1135-43.
82. Márquez IG, Akuaku J, Cruz I, Cheetham J, Golshani A, Smith ML. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International journal of food microbiology*. 2013;164(1):108-12.

83. Olicón-Hernández DR, Hernández-Lauzardo AN, Pardo JP, Peña A, Velázquez-del Valle MG, Guerra-Sánchez G. Influence of chitosan and its derivatives on cell development and physiology of *Ustilago maydis*. *International journal of biological macromolecules*. 2015;79:654-60.
84. Meng D, Garba B, Ren Y, Yao M, Xia X, Li M, et al. Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;158:1063–70.
85. Guo Z, Chen R, Xing R, Liu S, Yu H, Wang P, et al. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. *Carbohydrate Research*. 2006;341(3):351-4.
86. Martinez MP, Magnoli AP, Pereyra MG, Cavaglieri L. Probiotic bacteria and yeasts adsorb aflatoxin M1 in milk and degrade it to less toxic AFM1-metabolites. *Toxicon*. 2019;172:1-7.
87. Barukčić I, Bilandžić N, Markov K, Jakopović KL, Božanić R. Reduction in aflatoxin M1 concentration during production and storage of selected fermented milks. *International journal of dairy technology*. 2018;71(3):734-40.
88. Abbès S, Salah-Abbès JB, Sharafi H, Jebali R, Noghabi KA, Oueslati R. Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM1 in vitro and to counteract AFM1 immunotoxicity in vivo. *Journal of immunotoxicology*. 2013;10(3):279-86.
89. Haskard C, Binnion C, Ahokas J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-biological interactions*. 2000;128(1):39-49.
90. Hernandez-Mendoza A, Guzman-de-Peña D, Garcia H. Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. *Journal of applied microbiology*. 2009;107(2):395-403.
91. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(7):3086-91.
92. Kabak B, Var I. Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 2008;43(7):617-24.
93. Chaudhary HJ, Patel AR. Removal of aflatoxin M1 from milk and aqueous medium by indigenously isolated strains of *W. confusa* H1 and *L. plantarum* S2. *Food Bioscience*. 2022;45:101468.
94. El-kest MM, Hariri ME, Khafaga NIM, Refai MK. Studies On Contamination Of Dairy Products By Aflatoxin M1 and Its Control By Probiotics. *Journal of Global Biosciences*. 2015;4(1):1295-312.
95. Khadivi R, Razavilar V, Anvar S, Akbari-Adergani B. Aflatoxin M1-binding ability of selected lactic acid bacteria strains and *Saccharomyces boulardii* in the experimentally contaminated milk treated with some biophysical factors. *Archives of Razi Institute*. 2020;75(1):63.

96. Kuharić Ž, Jakopović Ž, Čanak I, Frece J, Bošnjir J, Pavlek Ž, ve ark. Removing aflatoxin M1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2018;69(4):334.
97. Namvar Rad M, Razavilar V, Anvar SAA, Akbari-Adergani B. Selected bio-physical factors affecting the efficiency of *Bifidobacterium animalis lactis* and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* to degrade aflatoxin M1 in artificially contaminated milk. *Journal of Food Safety*. 2018;38(4):e12463.
98. Pavlek Ž, Bošnjir J, Ivešić M, Serdar S, Kuharić Ž, Jakopović Ž, ve ark. Investigation of milk quality after removal of afm1 using lactic acid bacteria and beta-glucan. *Medica Jadertina*. 2021;51(1):5-12.
99. Sarlak Z, Rouhi M, Mohammadi R, Khaksar R, Mortazavian AM, Sohrabvandi S, ve ark. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). *Food control*. 2017;71:152-9.
100. Sokoutifar R, Razavilar V, Anvar AA, Shoeiby S. Degraded aflatoxin M1 in artificially contaminated fermented milk using *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* affected by some bio-physical factors. *Journal of food safety*. 2018;38(6):e12544.
101. Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, ve ark. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*. 2014;5(6):1113-24.
102. Cilla A, Alegría A, Barberá R, Lagarda MJ. Foods or bioactive constituents of foods as chemopreventives in cell lines after simulated gastrointestinal digestion: a review. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Disease—A Role for Antioxidants*, InTech. 2013:131-51.
103. Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 2011;125(1):1-12.
104. Verruck S, Liz GRd, Dias CO, Amboni RDdMC, Prudencio ES. Effect of full-fat goat's milk and prebiotics use on *Bifidobacterium* BB-12 survival and on the physical properties of spray-dried powders under storage conditions. *Food Research International*. 2019;119:643-52.
105. Borges JV, Souza JAd, Fagnani R, Costa GN, Santos JSD. Reduced-fat Frescal Sheep Milk Cheese With Inulin: A First Report About Technological Aspects and Sensory Evaluation. *Journal of Dairy Research*. 2019;86(3):368-73.
106. Asarat M, Vasiljevic T, Ravikumar M, Apostolopoulos V, Donkor O. Extraction and Purification of Short-chain Fatty Acids from Fermented Reconstituted Skim Milk Supplemented with Inulin. *Food Analytical Methods*. 2016;9:3069–79.
107. Watson AW, Houghton D, Avery PJ, Stewart C, Vaughan EE, Meyer PD, ve ark. Changes in stool frequency following chicory inulin consumption, and effects on stool consistency, quality of life and composition of gut microbiota. *Food Hydrocolloids*. 2019;96:688-98.

108. Alpar R. Spor, sağlık ve eğitim bilimlerinden örneklerle uygulamalı istatistik ve geçerlik- güvenirlik. Ankara: Detay Yayıncılık; 2012.
109. Karazhiyan H, Mehraban SM, Karazhyan R, Mehrzad A, Haghighi E. Ability of different treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to surface bind aflatoxin M1 in yoghurt. 2016.
110. Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of applied microbiology*. 2004;97(5):1038-44.
111. Vahidimehr A, Khiabani MS, Mokarram RR, Kafil HS, Ghiasifar S, Vahidimehr A. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* cell walls immobilized on nano-silica entrapped in alginate as aflatoxin M1 binders. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:1080-6.
112. Lahtinen S, Haskard C, Ouwehand A, Salminen S, Ahokas J. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food additives and contaminants*. 2004;21(2):158-64.
113. Zinedine A, Faïd M, Benlemlih M. In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *Int J Agric Biol*. 2005;7(1):67-70.
114. Lee K-M, Kim J-G. The effects of lactic acid bacteria on the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Environmental Health Sciences*. 2005;31(2):127-33.
115. Cheon S-H, Kim S-j, Lee S-i, Chung Y, Kim SH, Cho J, ve ark. Effect of lactic acid bacteria on changes of aflatoxin levels during kimchi fermentation. *Korean Journal of Food Preservation*. 2015;22(5):758-67.
116. Ogunbanwo ST, Enitan AM, Emeya P, Okanlawon BM. Influence of lactic acid bacteria on fungal growth and aflatoxin production in ogi, an indigenous fermented food. *Advances in food sciences*. 2005;27(4):189-94.
117. Ngolong Ngea GL, Yang Q, Tchabo W, Castoria R, Zhang X, Zhang H. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LB7 isolated from apple surface inhibits *P. expansum* in vitro and reduces patulin in fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*. 2021;339:109025.
118. Mateo EM, Tarazona A, Aznar R, Mateo F. Exploring the impact of lactic acid bacteria on the biocontrol of toxigenic *Fusarium* spp. and their main mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 2023;387:110054.
119. Mahmood Fashandi H, Abbasi R, Mousavi Khaneghah A. The detoxification of aflatoxin M1 by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: A review. *Journal of food processing and preservation*. 2018;42(9):e13704.
120. Oliveira RPDS, Perego P, De Oliveira MN, Converti A. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. *LWT-Food Science and Technology*. 2011;44(2):520-3.
121. Donkor ON, Nilmini S, Stolic P, Vasiljevic T, Shah N. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*. 2007;17(6):657-65.

122. Pharmaceutiques UdL. Dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of nutrition*. 1995;125:1401-12.
123. Mauro M, Pesarini J, Marin-Morales M, Monreal M, Monreal A, Mantovani M, ve ark. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. *Genetics and Molecular Research*. 2014;4808-19.
124. Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON. Effect of refrigerated storage on probiotic viability and the production and stability of antimutagenic and antioxidant peptides in yogurt supplemented with pineapple peel. *Journal of Dairy Science*. 2015;98(9):5905-16.
125. Desai AR, Powell IB, Shah NP. Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science*. 2004;69:57-60.
126. Bedani R, Rossi EA, Isay Saad SM. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology* 2013;34:382-9.
127. Zachetti VG, Cendoya E, Nichea MJ, Chulze SN, Ramirez ML. Preliminary study on the use of chitosan as an eco-friendly alternative to control *Fusarium* growth and mycotoxin production on maize and wheat. *Pathogens*. 2019;8(1):29.
128. Abbasi Pirouz A, Selamat J, Zafar Iqbal S, Iskandar Putra Samsudin N. Efficient and Simultaneous Chitosan-Mediated Removal of 11 Mycotoxins from Palm Kernel Cake. *Toxins*. 2020;12(2):115.
129. Kabak B, Brandon EF, Var I, Blokland M, Sips AJ. Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2009;44(5):472-80.
130. Brackett RE, Marth EH. Association of aflatoxin M1 with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1982;174(6):439-41.
131. SİGMA. Protease from *Streptomyces griseus*, Type XIV, ≥ 3.5 units/mg solid, powder [Erişim tarihi 28 Temmuz 2022]. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/p5147>.
132. Erdoğan S, Demirel M. Conservation characteristics and nutritive value of sunflower silages as affected by the maturity stages and fibrolytic enzymes. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 2016;4(6):464-9.
133. Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L, Roberfroid M. Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001;41(5):353-62.
134. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug metabolism reviews*. 2009;41(1):1-7.

135. Assaf JC, Atoui A, Khoury AE, Chokr A, Louka N. A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Brazilian journal of microbiology*. 2018;49:120-7.
136. Daaa Attia Marrez EMS, Hoda Samir El-Sayed, Yousef Yasseen Sultan. Detoxification of aflatoxin B1 in milk using lactic acid bacteria. *Journal of Biological Sciences*. 2018;18:144-51.
137. Meca G, Meneghelli G, Ritieni A, Mañes J, Font G. Influence of different soluble dietary fibers on the bioaccessibility of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin. *Food and chemical toxicology*. 2012;50(5):1362-8.
138. Ouiddir M, Bettache G, Salas ML, Pawtowski A, Donot C, Brahimi S, ve ark. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food microbiology*. 2019;82:160-70.



8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Sümeyra Sevim
 Ödev başlığı: sümeyra doktora tez
 Gönderi Başlığı: AFLATOKSİN M1 BİYOKİŞİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE PROBİYOTİK ...
 Dosya adı: S_meyra_SEV_M_D_zeltmeler_yap_lm_hali.DOCX
 Dosya boyutu: 2.02M
 Sayfa sayısı: 73
 Kelime sayısı: 17,024
 Karakter sayısı: 117,309
 Gönderim Tarihi: 07-Haz-2023 12:49ÖS (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2110936893



EK-2: Orjinallik Ekran Çıktısı

AFLATOKSİN M1 BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR, BİYOPOLİMER VE DİYET LİFİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 12	% 6	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	% 1
4	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	ccsenet.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
7	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

tez.sdu.edu.tr

9. ÖZGEÇMİŞ

